

DENISE TORRES DA CRUZ REIS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES  
DIGESTIVAS *TRIPSINA-LIKE* DO INTESTINO DA LAGARTA DA  
SOJA ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-  
INSETO**

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  
2009

DENISE TORRES DA CRUZ REIS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES  
DIGESTIVAS *TRIPSINA-LIKE* DO INTESTINO DA LAGARTA DA  
SOJA ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-  
INSETO**

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: 30 de abril de 2009

---

Dr. Marcelo Matos Santoro  
(Co-Orientador)

---

Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia  
(Co-Orientador)

---

Dra. Maria Cristina Baracat-Pereira

---

Dr. Luciano Gomes Fietto

---

Dra. Maria Goreti Almeida Oliveira  
(Orientadora)

Ao meu marido Conrado e minha filha Carolina com amor e gratidão pelo apoio, compreensão e carinho durante a elaboração deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento do projeto.

À professora Maria Goreti Oliveria Almeida, pela orientação, apoio, compreensão e confiança.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, pela coorientação e especialmente pela receptividade em seu laboratório.

Ao professor Thiago Rennó dos Mares-Guia, pela coorientação, atenção dispensada e sugestões apresentadas.

Ao secretário da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola (UFV), Eduardo Pereira Monteiro, pela prontidão em ajudar, pela competência e carinho.

Ao funcionário do Laboratório Prof. Marcos Luiz dos Mares-Guia (ICB-UFMG), Jamil Silvano, pela paciência e todo apoio técnico prestado na realização dos ensaios deste trabalho.

À funcionária e amiga do Laboratório Prof. Marcos Luiz dos Mares-Guia (ICB-UFMG), Jacqueline Oliveira, pela escuta atenta, pelo ombro amigo, pelo bate-papo do cafezinho...

À amiga Pollyanna Amaral Viana pela amizade, apoio e companhia de bancada.

Ao aluno de iniciação científica Fabrício Rainha Ribeiro pelo senso de colaboração e responsabilidade cuja contribuição foi indispensável na realização deste trabalho.

Aos amigos integrantes do Laboratório Prof. Marcos Luiz dos Mares-Guia (ICB-UFMG), Alexandre, Agenor, Bruna, Cecília, Cristina, Kádima, Luciana, Marina, Marcos Aurélio, Thaís, Valdete, William, pela hospitalidade, pelos momentos compartilhados de euforia e frustração, pela contribuição no trabalho, pela experiência de vida. Muito obrigada mesmo!

Aos meus pais, João e Rosalva, meus irmãos Deise e Joãozinho, minha cunhada Natália, por serem minha família querida, por me apoiarem sempre e se fazerem presentes mesmo à distância.

Ao meu marido Conrado e minha filha Carolina, por todo amor, paciência e apoio incondicional. Vocês iluminam minha existência. Amo vocês!!!

## **BIOGRAFIA**

DENISE TORRES DA CRUZ REIS, filha de João Cruz Reis e Rosalva Torres da Cruz Reis, nasceu em 29 de novembro de 1974 na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em março de 1992 iniciou o curso de graduação em Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, colando grau em setembro de 1997.

Em agosto de 2003 iniciou o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo em fevereiro de 2005.

Em março de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, defendendo Tese em abril de 2009.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	5
2.1. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)	5
2.2. Os inibidores de protease e as interações planta-inseto	9
2.3. A digestão e as enzimas digestivas nos insetos	14
2.3.1. Serino proteinases	18
2.3.2. Tripsinas	22
<b>3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA DIGESTIVA SOLÚVEL TRIPSINA-LIKE DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera)</b>	30
<b>Resumo</b>	30
<b>3.1. Introdução</b>	32
<b>3.2. Material e métodos</b>	34
3.2.1. Insetos	34
3.2.2. Obtenção do extrato enzimático	35
3.2.3. Ensaio enzimáticos e de determinação de proteína	35
3.2.4. Purificação enzimática	36
3.2.4.1. Cromatografia de afinidade	37
3.2.4.2. Cromatografia de troca-aniônica	37
3.2.4.3. Cromatografia de fase reversa	38
3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)	38
3.2.6. Eletroforese em gel de substrato (desnaturante e nativo)	40

3.2.7. Caracterização enzimática	41
3.2.7.1. Atividade amidásica	41
3.2.7.2. Atividade esterásica	41
3.2.7.3. Efeito do pH	42
3.2.7.4. Efeito da temperatura	42
3.2.7.5. Determinação da $K_M$ , $V_{máx}$	43
3.2.8. Avaliação do efeito de inibidores e íons cálcio na atividade da enzima digestiva <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i>	43
3.2.9. Obtenção de peptídeos trípticos e análise por espectrometria de massa	44
3.2.10. Análise estatística dos dados	46
<b>3.3. Resultados e discussão</b>	<b>47</b>
3.3.1. Purificação da enzima digestiva solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	47
3.3.2. Determinação da massa molecular	53
3.3.3. Determinação da atividade proteolítica em gel de substrato (nativo e desnaturante):	54
3.3.4. Caracterização enzimática	57
3.3.4.1. Efeito do pH	57
3.3.4.2. Efeito da temperatura	59
3.3.4.3. Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), e velocidade máxima ( $V_{máx}$ )	61
3.3.4.4. Avaliação do efeito de inibidores e de íons cálcio	64
3.3.4.5. Cromatografia de fase reversa	69
3.3.4.6. Obtenção de peptídeos trípticos e análise por espectrometria de massa	70
<b>3.4 Conclusões</b>	<b>73</b>
<b>4. PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA TRIPSINA-LIKE LIGADA À MEMBRANA DO INTESTINO DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera)</b>	<b>75</b>
<b>Resumo</b>	<b>75</b>
<b>4.1. Introdução</b>	<b>76</b>
<b>4.2. Material e métodos</b>	<b>78</b>

4.2.1. Obtenção do extrato enzimático	78
4.2.2. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa	79
<b>4.3. Resultados e discussão</b>	<b>80</b>
4.3.1. Purificação da enzima <i>tripsina-like</i> ligada à membrana do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	80
4.3.2. Determinação da massa molecular por SDS-PAGE	84
4.3.3. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa	86
<b>4.4. Conclusões</b>	<b>93</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>94</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>96</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
<b>8. APÊNDICE</b>	<b>106</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN- acetonitrila

BAPNA- benzoil-arginina-p-nitroanilida

CHAPS- 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato

DTT- ditioneitol

E- enzima

E-64- trans-epoxi succinil-L-leucinoamido-(4-guanidino-butano)

ES'- complexo inicial de Michaelis

ES''- intermediário acil-enzima

IAA- iodoacetamida

IC<sub>50</sub>- concentração do inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%

K<sub>cat</sub>- constante catalítica

K<sub>M</sub>- constante de Michaelis

m/z- relação massa-carga

MALDI- Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser

MS- espectrometria de massa

P'- produto correspondente a fração amina do substrato

P''- produto correspondente a fração acil do substrato

PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida

PMSF- fluoreto de fenilmetilsulfonil

S- substrato

SBBI- inibidor de tripsina da soja tipo Bowman-Birk

SBTI- inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz

SDS- dodecil sulfato de sódio

TAME- tosil-arginina-metil-éster

TFA- ácido trifluoroacético

TLCK- N- $\alpha$ - tosil-L-fenilalanina clorometilcetona

TOF- "time of flight"

TPCK- N- $\alpha$  tosil-L-lisina clorometilcetona

Tris- Tris (hidroximetil) amino metano

V<sub>max</sub>- velocidade máxima

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Anticarsia gemmatalis</i> , inseto adulto	6
Figura 2: Estágio larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	7
Figura 3: Diagrama esquemático do sistema digestivo de <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera)	16
Figura 4: Mecanismo de inibidores de serino-proteinases que formam análogos do intermediário tetraédrico	20
Figura 5: Mecanismo catalítico de serino-proteinases	21
Figura 6: Estrutura tridimensional da $\beta$ -tripsina pancreática bovina	23
Figura 7: Modelo de secreção de tripsina de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera)	26
Figura 8: Fluxograma de purificação da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	36
Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato solúvel concentrado do intestino de <i>A. gemmatalis</i> em coluna de p-aminobenzamidina-agarose.	48
Figura 10: Perfil cromatográfico da troca-aniônica em Resource Q da fração enzimática solúvel de <i>A. gemmatalis</i> oriunda da cromatografia de afinidade.	49
Figura 11: Perfil cromatográfico da troca-aniônica em Resource Q do extrato solúvel concentrado do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	51
Figura 12: Perfil eletroforético em SDS-PAGE da purificação da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> do intestino de <i>A. gemmatalis</i> .	52
Figura 13: Determinação da massa molecular da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> .	54
Figura 14: Perfil da atividade proteolítica da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> do intestino de <i>A. gemmatalis</i> após separação em SDS-PAGE (12,5%) e incubação com solução de caseína 2%.	55
Figura 15: Atividade proteolítica da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> , após separação em gel nativo (PAGE) e incubação com caseína 2%.	56
Figura 16: Efeito do pH na atividade da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> .	58
Figura 17: Efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i>	60
Figura 18: Efeito da concentração do substrato L-BApNA na velocidade da reação catalisada pela enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i>	63

Figura 19: Efeito da concentração do substrato L-TAME na velocidade da reação catalisada pela enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i>	63
Figura 20: Cromatografia de fase reversa da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i>	69
Figura 21: Perfil dos peptídeos trípticos da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF)	71
Figura 22- Distribuição do score na análise dos fragmentos trípticos da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> realizada pelo MASCOT	72
Figura 23: Perfil cromatográfico do extrato não solúvel concentrado do intestino de <i>A. gemmatalis</i> em coluna de p-aminobenzamidina-agarose	81
Figura 24: Perfil cromatográfico da troca-aniônica da fração enzimática ligada à membrana do intestino de <i>A. gemmatalis</i> pós-cromatografia de afinidade	82
Figura 25: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12,5 %) das etapas de purificação da enzima <i>tripsina-like</i> ligada à membrana do intestino de <i>A. gemmatalis</i> (A) e gel de atividade (B)	83
Figura 26: Determinação da massa molecular da enzima <i>tripsina-like</i> ligada à membrana do intestino de <i>A. gemmatalis</i> .	85
Figura 27: Cromatografia de fase reversa da enzima <i>tripsina-like</i> ligada à membrana do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . A: gradiente de 60 minutos; B: gradiente de 30 minutos.	87
Figura 28: Cromatografia de fase reversa da $\beta$ -tripsina bovina.	88
Figura 29: Espectro de massa (MALDI-TOF) da <i>tripsina-like</i> ligada à membrana do intestino de <i>A. gemmatalis</i> .	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Etapas de purificação da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> .	47
Tabela 2: Parâmetros cinéticos da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A.gemmatalis</i>	62
Tabela 3: Efeito de inibidores na atividade da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A.gemmatalis</i>	65
Tabela 4: Resumo da análise dos fragmentos trípticos da enzima solúvel <i>tripsina-like</i> de <i>A. gemmatalis</i> pelo MASCOT	73
Tabela 5: Etapas de purificação da enzima <i>tripsina-like</i> ligada à membrana de <i>A. gemmatalis</i>	80

## RESUMO

REIS, Denise Torres da Cruz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009. **Purificação e caracterização de proteases digestivas *tripsina-like* do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Marcelo Matos Santoro, Thiago Rennó dos Mares-Guia, Raul Narciso Carvalho Guedes.

A *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), conhecida como lagarta da soja, é considerada a principal praga desta cultura, causando enormes prejuízos devido ao ataque herbívoro. Os danos causados pelo ataque da lagarta associados à relevância econômica do cultivo da soja para o Brasil, fomentam a busca por alternativas no controle deste inseto. Devido à importância das proteases digestivas na fisiologia das larvas, o estudo de inibidores de proteases como agentes de controle de pragas tem recebido atenção contínua. A redução da atividade proteolítica através da ingestão de inibidores de proteases, seja por incorporação na dieta ou uso de plantas geneticamente modificadas, compromete a digestão e reflete em efeitos não apenas no crescimento e desenvolvimento das larvas, mas também na fertilidade e fecundidade do adulto. Entretanto, alguns insetos são capazes de desenvolver mecanismos de resistência à presença dos inibidores, envolvendo as próprias proteases digestivas. Torna-se evidente que uma análise caso a caso, partindo do conhecimento do processo digestivo básico do inseto alvo e das enzimas que compõem seu repertório digestivo são fundamentais para que as estratégias de controle que atuam via intestino sejam bem sucedidas pois, desta forma, a seleção ou desenho de inibidores mais específicos e eficientes pode ser alcançada. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a purificação e a caracterização de enzimas digestivas *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*. Extratos enzimáticos solúvel e não solúvel foram obtidos a partir do intestino de larvas do 5º instar de *Anticarsia gemmatalis*, mantidas em dieta artificial. Após concentração por ultrafiltração ambos os extratos foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de p-aminobenzamidina agarose e posteriormente à cromatografia de troca aniônica, obtendo-se as

enzimas após a eluição com gradiente salino (NaCl 0 a 1 mol.L<sup>-1</sup>).O rendimento da enzima presente no extrato solúvel (enzima *tripsina-like* solúvel) foi de 52% e a atividade específica final de 26,75 μmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>/mg. A enzima presente na fração não solúvel (enzima *tripsina-like* ligada à membrana) foi solubilizada com uso detergente (CHAPS) e após as etapas de purificação apresentou um rendimento de 11% e atividade específica de 18,61 μmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>/mg proteína. A massa molecular determinada para a enzima solúvel e para a enzima ligada à membrana foi 24,9 kDa (SDS-PAGE) e 28.632 Da (MALDI-TOF), respectivamente. Ambas as enzimas apresentaram atividade proteolítica em gel de substrato contendo caseína. Devido ao baixo rendimento e atividade específica, a caracterização cinética da enzima ligada à membrana não foi realizada. A atividade máxima da enzima *tripsina-like* solúvel foi detectada em pH 9,0 e a 35°C utilizando-se L-BApNA como substrato e em pH 8,0 e a 25°C utilizando-se L-TAME. Os valores de K<sub>M</sub> obtidos para os substratos L-BApNA e L-TAME foram de 0,12 mmol.L<sup>-1</sup> e 49 μmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A enzima solúvel foi inibida por PMSF, TLCK e benzamidina, mas não pelo TPCK, confirmando sua classificação como enzima *tripsina-like*. A atividade enzimática da enzima solúvel não foi afetada pela presença de íons cálcio (0 a 20 mmol.L<sup>-1</sup>). Os inibidores proteicos da soja, SBTI e SBBI reduziram a atividade em até 80% na maior concentração testada, 0,1 μmol.L<sup>-1</sup> e 0,5 μmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente, tornando-os candidatos aos ensaios de inibição *in vivo*. A identidade da enzima solúvel não pôde ser estabelecida através da busca por homologia dos peptídeos trípticos em banco de dados pelo MASCOT, embora o maior *score* obtido tenha sido com uma enzima *tripsina-like* de outro inseto da mesma ordem (Lepidoptera). A semelhança nos perfis eletroforético e cromatográfico das enzimas solúvel e ligada à membrana suscita a possibilidade da forma ligada à membrana ser precursora da forma solúvel como já foi descrito em outros insetos. Através do conhecimento produzido neste trabalho surgem perspectivas para a realização de pesquisas complementares que poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas baseadas na inibição de proteases digestivas.

## ABSTRACT

REIS, Denise Torres da Cruz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2009. **Purification and characterization of trypsin-like digestive proteases from the velvetbean caterpillar involved on plant-insect interactions.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee members: Marcelo Matos Santoro, Thiago Rennó dos Mares-Guia, Raul Narciso Carvalho Guedes.

*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), the velvetbean caterpillar, is considered the main pest of soybean culture, causing important yield losses due to herbivorous attack. Taking into account the damage caused by the caterpillar and the economic relevance of soybean culture to Brazil, the search for alternative control methods is encouraged. As the digestive proteases play fundamental roles in the larvae physiology, the study of protease inhibitors as agents for pest control is receiving continuous attention. The decrease in proteolytic activity due to the ingestion of proteases inhibitors, by means of the incorporation in the diet or by the use of transgenic plants, impairs the digestion with consequences not only to the larvae growth and development but also to the adult fertility and fecundity. However, some insects develop resistance mechanisms to inhibitors involving their own digestive proteases. It turns out that the success of the strategies for insect control, acting through the gut, depends on a case by case analysis, considering the basic digestive process of the target insect and the enzymes that compose its proteolytic repertoire. Therefore, the selection or design of more specific and efficient inhibitors can be achieved. In this context, this work aimed to purify and characterize trypsin-like digestive proteases from *Anticarsia gemmatalis*. Soluble and non-soluble extracts were obtained from the gut of *Anticarsia gemmatalis* fifth instar larvae, reared in artificial diet. After being concentrated by ultrafiltration, the extracts were submitted to an affinity chromatography on a *p*-aminobenzamide column followed by an anionic chromatography. The enzymes were obtained after elution with a saline gradient (NaCl 0 to 1 mol.L<sup>-1</sup>). The yield of the soluble trypsin-like enzyme was 52% with a final specific activity of 26.75 μmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>/mg protein. The enzyme present on the non-soluble fraction (membrane bound trypsin-like enzyme) was solubilized with detergent (CHAPS). After the purification steps the yield of this enzyme was 11%, with a

final specific activity of  $18.61 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}/\text{mg}$ . The molecular mass determined for the soluble enzyme and for the membrane-bound enzyme were 24.9 kDa (SDS-PAGE) and 28.63 Da (MALDI-TOF), respectively. Both enzymes showed proteolytic activity in substrate gel containing casein. Due to the low yield and specific activity of the membrane bound trypsin-like enzyme, no further kinetic characterization was attempted. The maximum activity of the soluble trypsin-like enzyme was detected at pH 9.0 and  $35^{\circ}\text{C}$  with L-BApNA as substrate and at pH 8.0 and  $25^{\circ}\text{C}$  with L-TAME. The  $K_M$  values obtained for L-BApNA and L-TAME were  $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $49 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectively. The soluble trypsin-like enzyme activity was inhibited by PMSF, TLCK and benzamidine, but not by TPCK, reinforcing its trypsin-like character. Additionally, the activity of this enzyme was not affected by calcium ions ( $0$  to  $20 \text{mmol.L}^{-1}$ ). The soybean proteinaceous inhibitors SBTI and SBBI, at their highest concentration tested,  $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectively, decreased the soluble trypsin-like enzyme activity at almost 80%, becoming candidates for *in vivo* inhibition assays. The soluble trypsin-like enzyme identity could not be established by the MASCOT search for homology using the tryptic peptides. However, the highest score was obtained for a trypsin-like enzyme from another Lepidoptera insect. The similarity of eletrophoretic and chromatographic profiles from soluble and membrane bound tripsin-like enzymes supports the hypothesis that the membrane bound enzyme can a precursor of the soluble enzyme, as described for other insects. The knowledge gained by this work brings perspectives for complementary studies which can further contribute to the development of strategies for pest control based on digestive proteases inhibition.

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, dos quais cerca de 10-20% sejam devido aos insetos (Silva-Filho e Falco, 2000; Ferry *et al.*, 2006). 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 e Boulter, 1999). Essas perdas ocorrem mesmo com o uso extensivo de pesticidas e fungicidas e, na ausência de tais medidas de proteção, as perdas poderiam ser ainda maiores. Segundo Lawrence e Koundal (2002), as perdas estimadas em culturas ao redor do mundo sem o uso de pesticidas ou outras estratégias de controle não-químico atingem 70% da produção, representando um prejuízo de 400 bilhões de dólares.

A soja é um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país, sendo plantada praticamente em todo território nacional. O levantamento da safra 2008/2009 feito em março de 2009 pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) prevê que a área cultivada com soja nesta safra seja de 21.563, 1 mil hectares, com uma produção de 58.136, 5 mil toneladas (CONAB, 2009). A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a

qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (Andrade et al., 2004). Estima-se que as perdas causadas na cultura da soja na ausência do uso de pesticidas seja da ordem de 58% (Hilder e Boulter, 1999).

Entre os insetos que trazem conseqüências econômicas mais significativas na soja, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja (Praça et al., 2006). A lagarta da soja é um inseto mastigador e se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. E ainda, quando se alimentam, além de removerem nutrientes, as lagartas injetam toxinas nas plantas (Silva et al., 2002).

Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização de agroquímicos (Lawrence e Koundal, 2002), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as conseqüências ambientais inaceitáveis, como a contaminação da cadeia alimentar e cursos de água e a própria pressão de consumidores contra essa prática, têm provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna. É crescente a busca por desenvolvimento de compostos de menor custo, que sejam mais específicos e menos poluentes, como os biopesticidas, além do uso cada vez mais freqüente de práticas de engenharia genética, que permitem que genes de resistência de qualquer origem (planta, animal, microrganismo, sintético) sejam utilizados nos programas de melhoramento de plantas (Hilder e Boulter, 1999; Andrade et al. 2004).

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros tem servido de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (Gatehouse, 2002; Ferry *et al.*, 2004). Uma das formas naturais de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada por inibidores de proteases. Acredita-se que os inibidores co-evoluíram com o ataque herbívoro dos insetos, e funcionam bloqueando proteases digestivas no intestino das larvas, limitando a liberação de aminoácidos da dieta e conseqüentemente prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Genes que codificam inibidores de proteases já têm sido usados para produzir plantas transgênicas resistentes ao ataque de insetos (Volpicella *et al.* 2003)., Em contrapartida, como resultado da co-evolução das interações planta-inseto, estes também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através da produção de novas proteases digestivas resistentes aos inibidores (Jongsma e Boulter, 1997; Bown *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 2001; Srinivasan *et al.*, 2006). Entretanto, foi demonstrado que diferentes insetos são afetados de maneira diversa quando expostos ao mesmo nível de expressão de um determinado inibidor de protease (MTI-2) em diferentes plantas (De Leo *et al.*, 2001).

Desta forma, acredita-se que o sucesso das estratégias de controle de pragas baseadas no uso de inibidores de proteases depende de uma análise caso a caso, envolvendo necessariamente o conhecimento mais detalhado do processo digestivo básico do inseto alvo, a caracterização das enzimas

digestivas presentes em seu intestino e estudos de sensibilidade aos inibidores. De posse dessas informações, inibidores mais potentes ou que sejam especificamente direcionados contra as enzimas produzidas pelos insetos podem vir a ser projetados e usados como alternativa aos agroquímicos no controle de insetos praga (De Leo *et al.*, 2001; Volpicella *et al.*, 2003).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

A *Anticarsia gemmatalis*, mais conhecida como lagarta da soja, é um inseto da ordem Lepidoptera, nativa de áreas tropicais e subtropicais das Américas, descrita pela primeira vez na Flórida em 1903 (Bárbara, 2006). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros (Praça *et al.*, 2006)

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com consequente redução da produção de grãos (Silva *et al.*, 2002). Os maiores danos ocorrem na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% do desfolhamento até atingir seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (Andrade *et al.*, 2004). Embora a preferência alimentar desta lagarta seja a soja, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais

causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período de floração (Batista *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (Andrade *et al.*, 2004). Seu ciclo biológico é de aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais. A fase adulta dura cerca de 15 dias, com a mariposa medindo cerca de 30 a 38 mm e apresentando coloração variando de cinza a marrom avermelhado ou amarelado, sem dimorfismo sexual. Uma linha transversal escura unindo as pontas das asas é observada quando estas estão completamente estendidas (Figura 1). Essas mariposas são frequentemente encontradas durante o dia em locais sombreados, principalmente na base das plantas. No entanto, todo o processo reprodutivo ocorre durante o período noturno (Praça *et al.*, 2006).



Figura 1: *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto. Fonte: <http://www.carolinanature.com/moths/>

A oviposição ocorre na face inferior das folhas, embora em casos de infestações mais sérias os ovos possam ser encontrados na superfície superior das folhas, pecíolos e até mesmo hastes. Os ovos são arredondados e

achatados na superfície inferior, medem de 1 a 2 mm de diâmetro e apresentam cor branca até a eclosão, após a qual adquirem coloração marrom-avermelhada. O período de incubação geralmente dura de três a cinco dias (Bárbara, 2005).

As lagartas recém-eclodidas alimentam-se das folhas e dependendo das condições ambientais podem apresentar de cinco a seis ínstaes larvais, chegando a medir de 40 a 50 mm de comprimento. Sua coloração é variável, apresentando listras longitudinais verde escuras proeminentes e listras estreitas nas cores branca, amarela ou rosa. Em condições de alta população apresentam coloração negra, mantendo as estrias brancas (Figura 2). No estágio pré-pupa, que dura em média 2 dias, as larvas encolhem atingindo um comprimento médio de 25 mm e adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais. As pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20 mm no comprimento e 4 a 6 mm na largura, sendo encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de 2 cm. O estágio pupal dura em média 7 dias, culminando com a emergência do adulto. (Bárbara, 2006; Praça *et al.*, 2006).



FIGURA 2: Estágio larval de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja). Fonte: <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartasoja.htm>

No controle desta praga segue-se uma tendência geral de se experimentar métodos alternativos de controle em substituição aos inseticidas químicos que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes. O uso de produtos de amplo espectro, ou seja, não seletivos, além de destruir inimigos naturais, pode selecionar o aparecimento de populações resistentes desta praga, exigindo o uso de produtos mais fortes ou doses elevadas (Batista *et al.*, 2005). A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável. No Brasil, destaca-se o programa de controle da lagarta da soja desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que utiliza o Vírus da Poliedrose Nuclear Multicapsídeo *Baculovírus anticarsia* (AgMNPV). Este vírus é altamente específico e atua driblando de maneira eficiente os mecanismos de defesa da lagarta (Andrade *et al.*, 2004). Em 20 anos, o uso desta estratégia gerou uma economia estimada entre R\$ 300 e 400 milhões, sendo que mais de 20 milhões de litros de inseticidas químicos deixaram de ser aplicados nas regiões produtoras que adotaram este método de controle (Praça *et al.*, 2006). Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* são também utilizados no controle das lagartas há mais de vinte anos. *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que produz inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação. Estas proteínas são chamadas de delta-toxinas e são produzidas sob a forma de protoxinas, as quais são transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e pela ação de proteases. A toxina ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Batista *et al.*, 2005).

As enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas. Sua participação eficaz na ativação das endotoxinas do *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis* já foi descrita (Pereira *et al.*, 2005), além de ter sido demonstrado que sua inibição, na presença de inibidores de proteases causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (McManus e Burges, 1995; De Leo *et al.*, 2001; Zavala *et al.*, 2004). Portanto, o conhecimento das enzimas digestivas da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de novos programas de controle desta praga.

## **2.2- Os inibidores de protease e as interações planta-inseto**

Plantas e insetos co-existem há mais de 350 milhões de anos (Gatehouse, 2002). As interações planta-inseto estabelecidas durante todo esse período co-evoluíram e as plantas tornaram-se capazes de sintetizar uma ampla variedade de moléculas que permitem a defesa contra o ataque de insetos (Mello e Silva-Filho, 2002). A maioria dos muitos compostos de defesa sintetizados pelas plantas são metabólitos secundários pequenos e não proteicos como alcalóides, terpenóides, flavonóides, saponinas, etc (Hilder e Boulter, 1999; Piubelli *et al.* 2005), além de proteínas de defesa, como os inibidores protéicos de proteases (De Leo *et al.* 2001).

Os inibidores de proteases podem estar presentes de maneira constitutiva em várias partes das plantas, podendo representar 5-15% da

proteína total de sementes e órgãos de armazenamento, ou podem ser induzidos, local e sistemicamente, em resposta ao ataque de insetos herbívoros (Jongsma e Boulter, 1997). Acredita-se que o mecanismo de defesa induzida, além de proteger contra o ataque dos insetos herbívoros, atua diminuindo os custos fisiológicos da defesa quando os insetos não estão presentes (Stotz *et al.*, 1999). Os inibidores têm como características o fato de serem extremamente resistentes à proteólise e permanecerem ativos em condições diversas de pH intestinal, além de já terem sido identificados inibidores contra praticamente todas as classes de proteases descritas (Jongsma e Boulter, 1997).

Os inibidores das serino proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (Gatehouse e Gatehouse, 2006; Lawrence e Koundal, 2002). São proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em pelo menos 16 famílias diferentes baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. Seu mecanismo de ação ocorre por inibição competitiva. Atuam bloqueando a ligação do substrato à enzima através da ligação de um segmento peptídico diretamente no sítio catalítico, de maneira semelhante ao substrato ou ao produto. A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa ( $10^{-7}$  a  $10^{-14}$  M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é

alcançada (Gatehouse e Gatehouse, 2006; Lawrence e Koundal, 2002; Bode e Huber, 1992).

A ingestão dos inibidores pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação das proteínas no intestino médio, sendo considerados agentes antimetabólicos por causarem deficiência protéica nos insetos. Os seus efeitos são atribuídos à sua interferência direta na digestão protéica, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Há ainda uma outra hipótese de que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, através de um mecanismo de “feedback”, que levaria a uma hiperprodução de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis, deslocando aminoácidos para síntese de mais proteases em detrimento de outras proteínas essenciais (Silva-Fialho e Falco, 2000). Esse efeito é normalmente observado após a ingestão crônica dos inibidores, e a limitação dos aminoácidos essenciais seria responsável pela redução do crescimento e desenvolvimento dos insetos (Broadway, 1995).

Evidências da função de defesa dos inibidores de proteases em plantas têm sido comprovadas em diversos experimentos, ressaltando a importância destes como candidatos ao uso nas estratégias de controle de insetos. A incorporação de inibidores de proteases na dieta foi capaz de retardar o crescimento de *Spodoptera litura* (McManus e Burges, 1995) e de inibir em até 85% a atividade de serino proteases no intestino médio de *Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar* e *Helicoverpa zea* (Broadway, 1995). Além disso, tanto a expressão heteróloga de genes de inibidores nas plantas (McManus *et al.*,

1994; De Leo *et al.*, 2001) quanto a alteração da expressão de genes de inibidores endógenos (Zavala *et al.*, 2004) demonstraram que os insetos alimentados destas plantas transformadas tiveram seu crescimento reduzido e a taxa de sobrevivência diminuída em até 40%.

Entretanto, os insetos, assim como as plantas, desenvolveram mecanismos de se defenderem dos efeitos deletérios que os inibidores de proteases podem exercer sobre eles, afetando sua taxa de crescimento, mortalidade e fecundidade. Estes mecanismos incluem o uso de proteases para os quais a planta não apresenta inibidores, degradação proteolítica dos inibidores e mutações adquiridas tornando as proteases menos sensíveis aos inibidores sem afetar a atividade proteásica (Jongsma e Bolter, 1997). Diversos experimentos demonstraram, por exemplo, que coleópteras e lepidópteras são capazes de se adaptarem à produção dos inibidores de proteases através da produção de proteinases insensíveis à inibição. Novas proteinases insensíveis são selecionadas do repertório de enzimas digestivas disponíveis no genoma dos insetos (Jongsma e Bolter, 1997; Bown *et al.*, 1997; Paulillo *et al.*, 2000; De Leo *et al.*, 2001; Mazumdar-Leighton and Broadway, 2001). Jongsma e colaboradores (1995) demonstraram que as larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas com folhas de tabaco transgênicas contendo o inibidor PPI2 (potato Proteinase Inhibitor II) apresentaram apenas 18% das enzimas sensíveis ao inibidor, comparadas a 78% das enzimas sensíveis de larvas em dieta controle, sem inibidor. As larvas compensaram a perda da atividade trípica aumentando em 2,5 vezes a síntese de novas proteases, insensíveis ao inibidor. Entretanto, Broadway (1995) demonstrou que nem todos os inibidores

de proteases foram capazes de aumentar o nível de expressão de enzimas resistentes aos inibidores, mesmo quando estes inibiram uma proporção significativa da atividade enzimática. Além disso, observou que o aumento de enzimas resistentes aos inibidores foi diretamente influenciado pela dose e tempo de exposição ao inibidor. Em outro estudo, foi demonstrado que diferentes insetos, *Plutella xylostella*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera littoralis* (três lepidópteros), foram afetados de maneiras diversas pelos mesmos níveis de expressão de MTI-2 (Mustard Trypsin Inhibitor) em diferentes plantas, ressaltando a relevância de uma análise caso a caso, considerando-se os insetos alvos e o nível de expressão do inibidor de protease na planta em estratégias de proteção de plantas baseadas no uso de inibidores de proteases (De Leo *et al.*, 2001).

Vários aspectos devem então ser considerados ao se avaliar a capacidade de um inibidor em afetar o desenvolvimento do inseto herbívoro, incluindo a concentração do inibidor ou seu nível de expressão na planta, sua atividade contra as enzimas alvo no inseto, a estabilidade do inibidor no intestino médio do inseto e a capacidade adaptativa do inseto (Jongsma e Bolter, 1997; De Leo *et al.*, 2001). Já tem sido proposto avaliar a constante de dissociação para diferentes inibidores com proteases específicas, para que sejam selecionados inibidores mais efetivos no caso de transferência de genes (Hilder e Boulter, 1999). Outra estratégia visa provocar mutações sítio-dirigidas nos inibidores, baseadas na estrutura do complexo enzima-inibidor, objetivando aumentar a afinidade da ligação e conseqüentemente seu poder de inibição (Lawrence e Koundal, 2002). Logo, um conhecimento mais detalhado das

enzimas produzidas pelos insetos, principalmente das interações enzima-inibidor, bem como da resposta dos insetos à exposição a estes inibidores são fundamentais para que estratégias de proteção de culturas utilizando as enzimas-alvo destes inibidores sejam bem sucedidas.

### **2.3- A digestão e as enzimas digestivas nos insetos**

A grande diversidade de insetos e seu sucesso evolucionário se devem à capacidade de ocuparem diferentes nichos ecológicos e de apresentarem hábitos alimentares diversos, utilizando-se de diferentes fontes de alimentos. Com uma alimentação adequada, uma larva pode crescer, sofrer muda e eventualmente se tornar um inseto adulto. Logo, o processamento do alimento e o perfeito funcionamento do canal alimentar são atividades críticas à sua existência (Nation, 2001) e é por isso que interferir com a digestão, afetando o status nutricional do inseto através da utilização dos inibidores de proteases, é uma estratégia tão amplamente utilizada pelas plantas para se defenderem do ataque de insetos (Gatehouse e Gatehouse, 2006).

O sistema digestivo ou intestino de lepidópteras é um simples tubo projetado para a extração eficiente de nutrientes em um sistema de fluxo constante (Figura 3A). Após ser triturado pelas mandíbulas, o alimento ingerido passa pelo relativamente pequeno intestino anterior onde é misturado às enzimas e secreções digestivas produzidas pelas glândulas salivares e mandibulares. O intestino médio é a maior porção do intestino, e é o principal sítio de secreção de enzimas digestivas, digestão do alimento e absorção de

nutrientes. O bolo alimentar segue para o intestino posterior onde ocorre reabsorção de água e íons e posterior excreção das fezes (Nation, 2001). No intestino médio a digestão dos polímeros componentes da dieta, como celulose, amido e proteínas, ocorre em três fases: inicial, intermediária e final, e dependem da ação das hidrolases digestivas. As fases e as enzimas associadas a cada uma delas são separadas espacialmente e temporalmente, devido à presença da membrana peritrófica e do fluxo de fluidos no interior do intestino (Terra *et al.*, 1996a). A membrana peritrófica, composta principalmente de quitina, glicosaminoglicanos e proteínas, atua separando o conteúdo do lúmen intestinal das células digestivas epiteliais, compartimentalizando as moléculas de enzimas, nutrientes e produtos da digestão nos espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, regulando a digestão seqüencial das moléculas poliméricas. Desta forma, a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, enquanto as digestões intermediária e final ocorrem no espaço ectoperitrófico e células do intestino médio, respectivamente (Tellam, 1996) (Figura 3B).

Na fase inicial da digestão ocorre uma diminuição do peso molecular das moléculas poliméricas através da ação das polímero- hidrolases, como tripsina,  $\alpha$ -amilase, celulase e hemicelulase. Os oligômeros resultantes sofrem novamente hidrólise durante a fase intermediária através da ação das polímero hidrolases ou oligômero-hidrolases, como  $\alpha$ -amilase e aminopeptidase, respectivamente. Os produtos desta fase, normalmente dímeros, dipeptídeos ou pequenos oligômeros, são então processados na fase final da digestão,

produzindo monômeros por ação de dímero- hidrolases, como as dipeptidases (Terra *et al.*, 1996a).

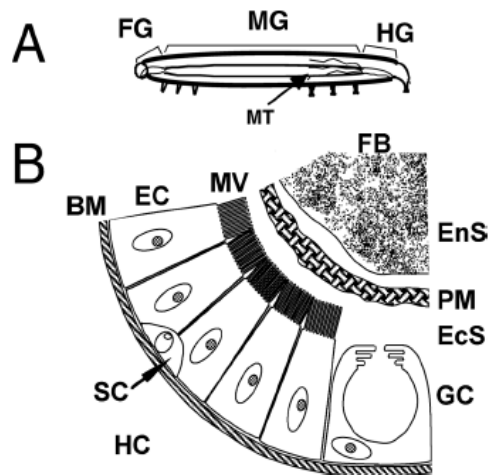


Figura 3: Diagrama esquemático do sistema digestivo de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera). (A) Seção sagital de larva no 4º instar. Abreviações: FG: intestino anterior; MG: intestino médio; HG: intestino posterior; MT: túbulos de Malpighi. (B) Porção de uma seção transversal do intestino médio. Abreviações: FB: bolo alimentar; EnS: espaço endoperitrófico; PM: membrana peritrófica; EcS: espaço ectoperitrófico; EC: célula colunar epitelial; MV: microvilosidades; GC: células goblet; SC: células tronco; BM: membrana basal; HC: hemolinfa (Pauchet *et al.*, 2008)

Várias enzimas digestivas são restritas às células do intestino médio podendo estar associadas à membrana microvilar, associadas ao glicocálice ou estar presentes intracelularmente. As enzimas intracelulares corresponderiam às enzimas em vias de serem excretadas (Terra e Ferreira, 1994). A demonstração de que enzimas podem estar associadas à microvilosidades baseia-se no aumento de sua atividade específica nas preparações de microvilosidades ou por acompanharem enzimas marcadoras de membrana plasmática durante os procedimentos de fracionamento (Lemos e Terra, 1992a). Além disso, as enzimas podem ser imunolocalizadas nas microvilosidades, através do uso de anticorpos específicos, como foi demonstrado para tripsina em *Musca domestica* por Jordão e colaboradores (1996).

A ocorrência de diferentes enzimas digestivas no canal alimentar dos insetos é normalmente associada à composição química da dieta ingerida. Entretanto, a teoria da adaptação à dieta não deve desconsiderar aspectos filogenéticos na determinação do tipo (não quantidade) das enzimas presentes no intestino dos insetos. Na verdade, considera-se a possibilidade de que os insetos possuam uma ampla variedade de enzimas digestivas, cujas quantidades relativas presentes podem mudar em resposta à dieta. Essa mudança poderia ocorrer durante a alimentação de um indivíduo ou ser resultante da adaptação de um grupo taxonômico de insetos em relação a uma dieta em particular, o que resultaria na presença de enzimas cujas atividades seriam permanentemente maiores que outras. (Terra e Ferreira, 1994).

De um modo geral, as principais enzimas encontradas no intestino dos insetos são as proteases e as carboidrases. A síntese de proteases é uma importante atividade metabólica das células intestinais dos insetos, tendo sido observado que os mRNAs de proteases correspondem à aproximadamente 20% dos mRNAs destas células (Bown *et al.*, 1997). As proteases (peptídeo-hidrolases, EC 3.4) atuam nas ligações peptídicas e incluem as proteinases endopeptidases (EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.2.4.11-19). As proteinases são subdivididas em sub-classes com base no mecanismo catalítico, demonstrado pelo uso de reagentes específicos ou efeito de pH, e incluem as serino-proteinases (EC 3.4.21), as cisteíno-proteinases (EC 3.4.22) as aspartato-proteinases (EC 3.4.23) e as metaloproteinases (EC 3.4.24) (Terra *et al.*, 1996b). As serino-proteinases, particularmente tripsina e quimiotripsina, são as principais proteinases digestivas presentes na maioria dos grupos de

insetos, com exceção de algumas espécies de hemípteras e coleópteras, nas quais cisteíno e aspartato proteinases predominam (Lam *et al.*, 2000).

### **2.3.1- Serino-proteinases**

As serino-proteinases pertencem a uma das maiores famílias gênicas do reino animal, são amplamente distribuídas na natureza e encontradas em todos os reinos de vida celular, bem como em vários genomas virais (Page e Di Cera, 2008). No genoma humano, por exemplo, cerca de 500 genes que codificam proteinases foram identificados, dos quais 30% são serino-proteinases ou homólogos de serino-proteinases (Herrero *et al.*, 2005). Entre os insetos, um estudo com *Helicoverpa armigera* demonstrou a existência de pelo menos 28 genes diferentes pertencentes à família das serino-proteinases cujos produtos são expressos no intestino (Bown *et al.*, 1997). Estas enzimas estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos importantes além da digestão de proteínas, incluindo: coagulação sanguínea, fibrinólise, imunidade humoral e celular, transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (Page e Di Cera, 2008; Herrero *et al.*, 2005; Krem *et al.*, 1999; Perona e Craik, 1995).

Nos insetos, as serino-proteinases mais estudadas são aquelas expressas no intestino médio das larvas e envolvidas com o processo digestivo, sendo responsáveis basicamente pela digestão inicial das proteínas, clivando cadeias de polipeptídeos intactas em peptídeos menores que irão sofrer ação de exopeptidases gerando aminoácidos, produto final da digestão

(Lawrence e Koundal, 2002). Vários insetos, particularmente lepidópteras, dependem das serino-proteinases digestivas (tripsina, quimitripsina e elastase-like) como enzimas primárias da digestão sendo, portanto, a classe dominante de proteinases presentes no intestino médio destas larvas (Terra e Ferreira, 1994; Broadway, 1997; Hilder e Boulter, 1999).

As serino-proteinases se caracterizam por apresentarem um resíduo de serina e um de histidina no sítio ativo, além de um resíduo de ácido aspártico, compondo a tríade catalítica. A presença da serina é reconhecida pela inativação da enzima na presença de DFP (diisopropilfluorofosfato) ou PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto). A ocorrência de histidina no sítio ativo pode ser demonstrada pelo uso de cetonas como o TPCK (N- $\alpha$ -tosil-L-fenilalanina clorometilcetona) ou TLCK (N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometilcetona) (Mares-Guia e Shaw, 1965; Terra e Ferreira, 1994). O PMSF e DFP são extremamente eletrofílicos e reagem irreversivelmente com o resíduo de Ser 195 formando um composto tetraédrico estável que mimetiza o intermediário tetraédrico da reação das serino-proteinases (Figura 4). Os derivados de clorometilcetonas reagem com as serino-proteinases formando um hemiacetal com o resíduo de Ser 195 e alquilando o resíduo de His 57; a reação ocorre através da formação de um intermediário epóxido (Figura 4).

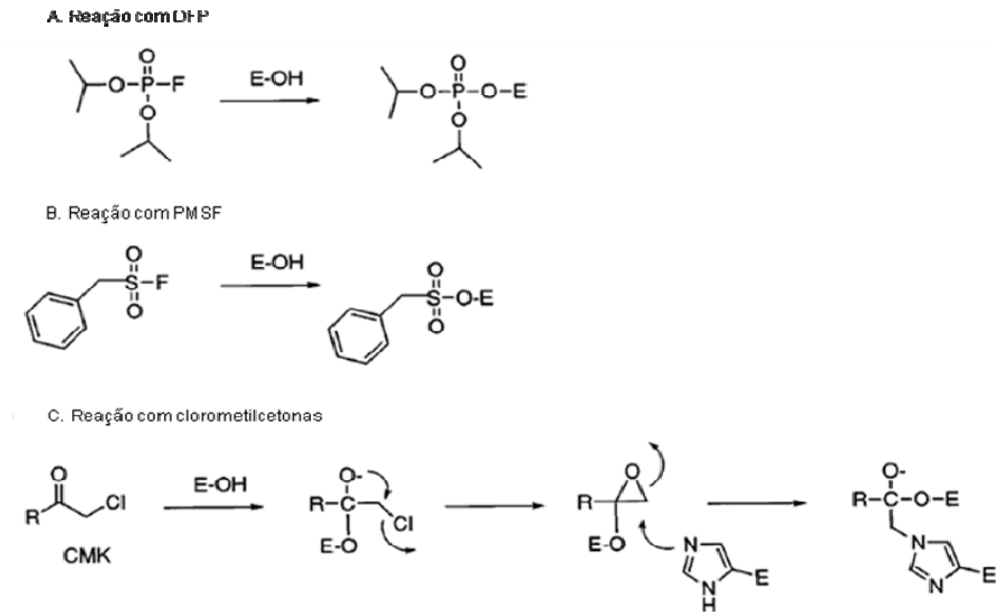


Figura 4: Mecanismo de inibidores de serino-proteinases que formam análogos do intermediário tetraédrico. E-OH: enzima- hidroxila do resíduo de Ser 195. (Hedstrom, 2002)

A sequência N-terminal IVGG é um motivo conservado que frequentemente ocorre nas formas ativas (não em zimógenos) das serino proteinases (Lam *et al.*, 2000). A sequência consenso GDSGG ao redor da serina reativa 195, também é usualmente utilizada na identificação das serino-proteinases. Já a sequência C-terminal é responsável pela especificidade do substrato e controle da atividade catalítica. Esta porção normalmente é codificada por um único éxon e contém a maioria dos resíduos que fazem contato com os resíduos P1 a P3 do substrato, bem como domínios responsáveis pela modulação da atividade catalítica (Krem *et al.*, 1999).

O mecanismo catalítico envolvendo a transferência de grupo acil ocorre de maneira idêntica para hidrólise de ligações éster ou amida. Inicialmente o átomo de carbono da carbonila do substrato é atacado pela serina reativa da tríade catalítica, cuja nucleofilicidade é aumentada pela presença de uma histidina adjacente que atua funcionando como uma base catalisadora. A doação de um próton pela histidina ao novo grupo álcool formado (ou amina se

o substrato for uma amida ao invés de éster) resulta na dissociação do primeiro produto e na concomitante formação de um complexo covalente acil-enzima. A reação de desacilação ocorre pelo ataque nucleofílico da água, seguindo os mesmos passos da reação anterior. A água ataca o grupo carbonil, enquanto o próton é concomitantemente removido pela histidina, que atua agora como um catalisador ácido. Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações (Figura 5). Este mecanismo é capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ligação peptídica mais de  $10^9$  vezes em relação à reação não catalisada (Perona e Craik, 1995; Hedstrom, 2002; Page e Di Cera, 2008).

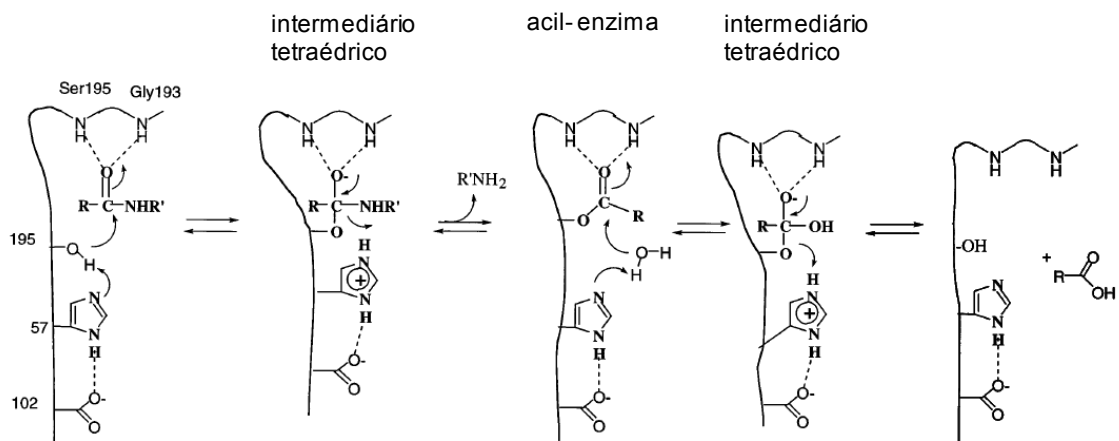


Figura 5: Mecanismo catalítico de serino-proteínas (Hedstrom, 2002)

O nível de mRNAs que codificam serino-proteínas no intestino médio dos insetos varia e é modificado de maneira específica em diferentes insetos na presença de inibidores (Bown *et al.*, 1997; Gatehouse *et al.*, 1997). A ocorrência de famílias multigênicas parece ser comum, e os insetos parecem se assemelhar aos vertebrados, onde a diversidade de sequência da tripsina e outros genes de serino-proteínas correspondem à evolução da

especificidade e função da enzima. A indução transcricional e a complexa regulação dos múltiplos genes codificando enzimas estruturalmente diversas, principalmente tripsinas, em resposta à ingestão de inibidores de proteases, provavelmente reflete uma adaptação dos insetos à utilização de dietas contendo estes inibidores. Conhecimentos gerados a partir da identificação do produto da tradução de cada mRNA destas tripsinas, através da produção de enzimas recombinantes ou a purificação bioquímica das enzimas a partir de tecidos do intestino médio, poderiam ajudar nas estratégias de controle de insetos permitindo o desenvolvimento de inibidores potentes e específicos e a produção de plantas transgênicas expressando múltiplos inibidores, levando em consideração a diversidade das enzimas digestivas do inseto (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001).

### **2.3.2- Tripsinas**

As tripsinas (EC 3.4.21.4) são serino-proteinases e são consideradas as proteases digestivas mais importantes da maioria dos insetos (Terra *et al.*, 1996b). A molécula de tripsina (beta) consiste de uma única cadeia polipeptídica formada por dois domínios de estruturas similares unidos assimetricamente e em cuja interface estão situados os resíduos de aminoácidos catalíticos (Figura 6). A tripsina está envolvida na fase inicial da digestão de proteínas, e se caracteriza por conter uma tríade catalítica composta pelos resíduos His 57, Asp 102 e Ser 195, que atua clivando ligações

peptídicas internas de cadeias polipeptídicas preferencialmente no lado carboxil de resíduos básicos como arginina e lisina.



Figura 6: Estrutura tridimensional da beta-tripsina pancreática bovina. O primeiro domínio está representado em azul (1-105aa) segundo domínio vermelho (106-223aa). N-terminal em cor laranja, C-terminal em cor azul claro. Tríade catalítica: Ser (amarelo), His (lilás) e Asp (verde). (Protein Data Bank, pdb, 1CE5)

As tripsinas purificadas de todos os insetos, com exceção das lepidópteras, atuam hidrolisando mais eficientemente substratos contendo arginina no sítio P1 do que substratos contendo lisina (Lopes *et al.*, 2006). Tipicamente, as tripsinas isoladas da maioria dos insetos apresentam massa molecular entre 20.000 e 35.000 Da, ponto isoelétrico entre 4 e 5, atividade ótima em pH alcalino, entre 8 e 9. As tripsinas de lepidópteras normalmente apresentam maior pH ótimo correspondendo ao alto valor de pH do conteúdo do intestino médio. A maioria das sequências de serino-proteinases de lepidópteras não contêm resíduos de lisina. O resíduo de lisina na posição 188 é conservado em tripsinas de mamíferos e de díptera. Entretanto, em lepidópteras este resíduo é substituído por arginina. Tem sido sugerido que

essa substituição seja uma adaptação necessária à estabilidade da enzima no intestino destes insetos cujo valor de pH é bastante elevado, associado à necessidade das enzimas digestivas permanecerem protonadas (Bown *et al.*, 1997; Mazundar-Leighton *et al.*, 2000). Entretanto, já foi descrita a presença de lisina na sequência de tripsinas digestivas de *Sesamia nonagroides* (Novilo *et al.*, 1999; Diáz-Mendonza *et al.*, 2005) e *Helicoverpa armigera* (Mazundar-Leighton *et al.*, 2000). Essas enzimas são inibidas de maneira específica e irreversível pelo TLCK (N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometil cetona), que atua sobre o resíduo de histidina do sítio catalítico. Apesar de substratos derivados de éster ou amida, como o TAME (p-tosil-L-arginina-metil-éster) ou BApNA ( $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida), respectivamente, serem hidrolisados por extratos de intestino médio de insetos, isso não constitui uma prova definitiva da presença de enzimas *tripsina-like*, já que outras enzimas podem agir sobre eles. Contudo, há evidências suficientes de que a maioria das enzimas presentes no intestino médio dos insetos que hidrolisam estes substratos são *tripsina-like* (Terra e Ferreira, 1994).

Embora a especificidade primária das tripsinas da maioria dos insetos seja semelhante à dos vertebrados e estas apresentem homologia de sequência na região do sítio catalítico, suas propriedades contrastam em diversos aspectos. As tripsinas de insetos, na maioria dos casos, são instáveis em pH ácido, apresentam diferentes sensibilidades aos inibidores e tipicamente contêm menos pares de cisteínas nas suas seqüências que as tripsinas dos vertebrados (Terra *et al.*, 1996b; Lam *et al.*, 2000). O motivo de ligação de cálcio normalmente observado em tripsinas de mamíferos não ocorre na

maioria das sequências de tripsinas de insetos (Lopes *et al.*, 2006), embora haja relatos da importância dos íons cálcio na atividade de tripsinas de certos insetos (Wagner *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005; Budatha *et al.*, 2008). A autólise da tripsina também difere bastante entre as enzimas dos insetos e dos mamíferos. As ligações que sofrem autólise nas tripsinas dos mamíferos correspondem a Lys61-Ser62, Arg117-Val118 e Lys145-Ser146. Esses resíduos não são conservados entre os insetos, que provavelmente apresentam outras ligações susceptíveis à autólise. De fato, foi observada uma diferença significativa na autólise entre as tripsinas de lepidópteras e as de outros insetos (Lopes *et al.*, 2006).

O processamento de precursores e os mecanismos de secreção de tripsinas de insetos também parecem incluir aspectos que diferem dos outros animais. Há evidências que a forma solúvel de tripsina dos insetos seja derivada de uma forma ligada à membrana. A presença de tripsina na forma solúvel cujas propriedades cinéticas e físicas foram idênticas à forma associada à membrana microvilar em *Musca domestica* (Lemos e Terra, 1992 a, b) levou os autores a proporem um mecanismo de secreção de tripsina, onde a tripsina é sintetizada nas células do intestino médio dos insetos na forma ativa, mas associada à membrana de vesículas, que serão processadas nas microvilosidades tornando-se solúvel antes de ser secretada. Através de estudos de imunolocalização, Jordão e colaboradores (1996) também detectaram tripsinas em mais de uma forma no intestino de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Foram observadas tripsinas associadas à membrana microvilar das células do intestino médio, à membrana de vesículas secretórias

e no interior das microvilosidades. Foi proposto um modelo de secreção, onde a tripsina é sintetizada ligada à membrana através de um peptídeo âncora hidrofóbico. Posteriormente a enzima seria processada no complexo de Golgi e transportada em vesículas secretórias. Estas vesículas migram através das microvilosidades e, antes ou depois de se fundirem com a membrana microvilar são liberadas no lúmen intestinal na forma de vesículas de membrana dupla ou simples, respectivamente. As vesículas de membrana dupla se fundem e passam a formar uma membrana simples. A tripsina presente na superfície luminal dessas vesículas é então solubilizada por proteólise limitada ou por dissolução das vesículas devido ao pH altamente alcalino do conteúdo do intestino médio. Membranas remanescentes, com alguma tripsina ligada, são finalmente incorporadas à membrana peritrófica (Figura 7)

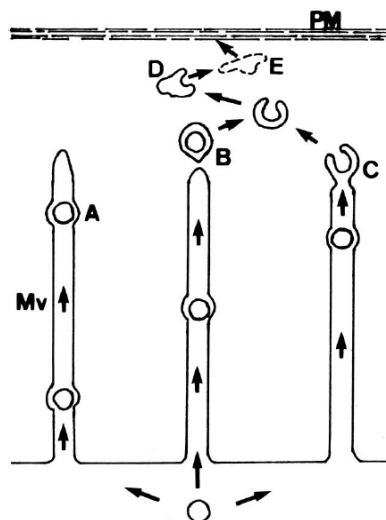


Figura 7: Modelo de secreção de tripsina de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Abreviações: PM: membrana peritrófica; Mv: microvilosidades. (A) vesículas secretórias migrando no interior microvilosidade; (B) a vesícula secretória é liberada no lúmen envolta pela membrana microvilar (membrana dupla); (C) a membrana da vesícula secretória se funde com a membrana da microvilosidade antes de sua liberação no lúmen; (D) as membranas das vesículas se fundem e se dissociam por ação do elevado pH do lúmen intestinal; (E) as membranas remanescentes das vesículas são incorporadas na membrana peritrófica (Jordão et al., 1999)

Experimentos com *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) também evidenciaram atividade de proteases *tripsina-like* associadas à membrana do intestino médio (Xavier *et al.*, 2005). Com base nestas observações, parece que os insetos controlam a atividade de suas proteinases digestivas não usando formas inativas ou zimógenos, mas através da ligação das proteinases a membranas, onde permanecem até serem liberadas no lúmen do intestino médio (Terra e Ferreira, 1994). Através da predição de sequências polipeptídicas de tripsinas do intestino de *Helicoverpa armigera* observou-se a presença de prováveis peptídeos de ativação (5 a 9 resíduos de aminoácidos) precedendo a sequência madura, todos terminando em arginina, sugerindo a clivagem tríptica ou até mesmo a autólise, em função da alteração conformacional induzida pela exposição ao ambiente alcalino do intestino (Bown *et al.*, 1997).

A tripsina tem sido implicada na adaptação de lepidópteros aos inibidores de proteases de plantas. Larvas de *Heliothis virescens* alimentadas com folhas de tabaco, que contém inibidores de proteases, expressaram novas moléculas de tripsina que formam oligômeros e aparentemente são mais resistentes aos PIs devido a maior afinidade pelo substrato (apresentam menores valores de  $K_M$ ) e por dificultarem a ligação do inibidor por impedimento estérico (Brito *et al.*, 2001). A ingestão de SBTI (inibidor tipo Kunitz de tripsinas e quimiotripsinas) por *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* produziu uma diversidade de novas tripsinas que diferiram em peso molecular, carga e susceptibilidade a inibidores (Broadway, 1997). Mazumdar-Leighton e Broadway (2001), estudando as mesmas espécies de insetos demonstraram

que a ingestão de SBTI causou uma indução transcricional de tripsinas insensíveis no intestino médio destes, diferentemente dos insetos que não se alimentaram do inibidor, que continuaram a expressar tripsinas sensíveis de maneira constitutiva. Esses autores sugerem que lepidópteros possuem tripsinas constitutivas (representadas pelas tripsinas sensíveis), que são produtos da tradução de um pool de mRNA pré-existente, e tripsinas induzidas (representadas pelas tripsinas insensíveis) que são transcricionalmente reguladas seguindo a ingestão de um inibidor de proteínas. Além disso, observaram que tripsinas sensíveis e insensíveis provavelmente diferem estruturalmente no sítio de ligação do substrato. Inibidores maiores tiveram menor efeito inibitório sobre enzimas insensíveis do que os inibidores menores, ao passo que ambos inibiram de maneira semelhante as enzimas sensíveis. Um sítio de ligação mais restrito dificultaria o acesso de inibidores maiores, ao passo que não afetaria a ação de inibidores menores. Somando às observações anteriores, Volpicella e colaboradores (2003) observaram que a hidrólise do substrato BapNA ( $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) pôde ser usada para distinguir as tripsinas sensíveis das insensíveis a inibidores em *Helicoverpa zea*. Este substrato, que possui um grupo benzoil na posição P2, foi pobremente degradado pelas enzimas insensíveis quando comparado com as enzimas sensíveis, enquanto substratos como a azocaseína, que possuem um aminoácido na posição P2, não permitem distinguir as enzimas. Aparentemente, o sítio S2 das tripsinas insensíveis é funcionalmente ou estruturalmente diferente, o que resulta em uma menor acomodação do grupo benzoil do BApNA. Foi sugerido que inibidores menores seriam muito mais

eficientes na redução da atividade de tripsinas. A mesma diferença pode representar o mecanismo pelo qual a enzima evita a ligação do inibidor, tornando-se insensível à sua presença (Volpicella *et al.*, 2003).

### **3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA DIGESTIVA SOLÚVEL TRIPSINA-LIKE DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA)**

#### Resumo

A soja é cultivada atualmente em praticamente todo território nacional. Com a ampliação do seu cultivo, a vulnerabilidade ao ataque de insetos-praga também aumentou. Entre as pragas da soja, destaca-se a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, como principal inseto desfolhador. Estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases (PIs) tem sido implementadas e o conhecimento das enzimas digestivas presentes no inseto alvo tem se mostrado fundamental para que sejam bem sucedidas. Este trabalho descreve a purificação de uma enzima digestiva solúvel *tripsina-like*, obtida a partir do intestino de larvas do 5º instar de *Anticarsia gemmatalis*. A purificação desta enzima foi realizada em duas etapas, pela combinação de uma cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina) e uma cromatografia de troca aniônica. O rendimento deste processo foi de 52% e a atividade específica da enzima foi de 26,75  $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}/\text{mg}$  de proteína. Foi determinada uma massa molecular aparente de 24,9 kDa (SDS-PAGE) para a enzima. A atividade proteolítica em gel de substrato revelou uma única banda ativa correspondente à banda observada na coloração pela prata. A enzima apresentou atividade máxima em pH 9,0 e a 35°C utilizando-se L-BApNA como substrato e em pH 8,0 e a 25°C utilizando-se L-TAME. Os valores de  $K_M$  obtidos foram de 0,12  $\text{mmol.L}^{-1}$  e 49  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para os substratos L-BApNA e L-

TAME, respectivamente. A enzima foi sensível à inibição pelo inibidor de serino-proteinases fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e pelos inibidores de tripsina N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK), benzamidina e aprotinina. A atividade enzimática não foi afetada pelo inibidor N- $\alpha$ -tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK) reforçando sua classificação como uma *tripsina-like*. A enzima também foi sensível à inibição pelo trans-epoxi succinil-L-leucinoamido-(4-guanidino-butano) (E-64) que, embora seja usado no diagnóstico de cisteíno-proteinases, apresenta ação inibitória sobre enzimas *tripsina-like* de lepidópteros. Os inibidores de proteinases tipo Bowman Birk de soja (SBBI) e o inibidor de tripsina da soja (SBTI) também foram capazes de inibir a enzima, reduzindo sua atividade em até 80% na maior concentração testada. A atividade enzimática não foi afetada pela presença de íons cálcio nas concentrações testadas. Esses resultados têm implicação no desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle desta praga que objetivam o uso de inibidores de proteases atuando via sistema digestivo. O conhecimento das moléculas-alvo dos inibidores, as proteases digestivas, permite que compostos mais específicos e mais potentes sejam selecionados ou desenvolvidos, tornando essa estratégia de controle mais eficiente na redução da população dos insetos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Anticarsia gemmatalis*, enzima *tripsina-like* solúvel, inibidores de protease, Lepidoptera, protease digestiva

### 3.1- INTRODUÇÃO

A *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera; Noctuidae), conhecida como lagarta da soja, é a principal praga desfolhadora desta cultura no Brasil. É encontrada em todos os locais de produção e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos (Praça *et al.*, 2006). Embora o uso de inseticidas químicos ainda seja o método predominantemente empregado para reduzir os danos econômicos causados às lavouras, novas tecnologias buscando alternativas sustentáveis de controle dos insetos têm surgido. No Brasil, a implementação do programa de Manejo Integrado de Pragas para controle deste inseto utilizando o Nucleopolihedrovirus de *A. gemmatalis* (AgMNPV), resultou em grande êxito do ponto de vista econômico e ambiental (Morales *et al.*, 2001). O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de insetos é considerado um componente essencial destes programas de Manejo Integrado de Pragas, uma vez que os danos causados pelos insetos e os impactos indesejáveis consequentes do uso de pesticidas são reduzidos.

Os inibidores de proteases de plantas (PIs), uma classe de proteínas de defesa contra ataque de insetos (Lawrence e Koundal, 2002; Ferry *et al.*, 2004), são moléculas úteis para a transformação de plantas. Tem sido demonstrado que os PIs são capazes de inibir proteases digestivas de insetos quando incorporados em dietas artificiais (McManus e Burges, 1995; Broadway, 1995) ou quando expressos em plantas transgênicas (McManus *et al.*, 1994; De Leo *et al.*, 2001; Zavala *et al.*, 2004). Entretanto, tem sido descrito que os insetos são capazes de se adaptarem à presença do PIs utilizando-se

de diferentes mecanismos (Jongsma *et al.* 1995; Jongsma e Bolter, 1997; Bown *et al.*, 1997; Paulillo *et al.*, 2000; De Leo *et al.*, 2001; Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001; Volpicella *et al.*, 2003), tornando fundamental uma ampliação do conhecimento sobre as enzimas digestivas dos insetos e de suas interações com os inibidores para um planejamento de estratégias sustentáveis e bem-sucedidas utilizando PIs (Hilder e Boulter, 1999; De Leo *et al.*, 2001; Volpicella *et al.*, 2003; Telang *et al.*, 2005; Christou *et al.*, 2006; Ferry *et al.* 2006).

As enzimas primárias da digestão em lepidópteras são as serino-proteinases, particularmente tripsinas (EC 3.4.21.4) (Terra e Ferreira, 1994; Terra *et al.*, 1996). As tripsinas estão envolvidas na fase inicial da digestão de proteínas, clivando ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas preferencialmente no lado carboxil de resíduos básicos, como L-arginina e L-lisina. As tripsinas isoladas do intestino médio de vários insetos exibem tipicamente massa molecular entre 20 e 35 kDa e atividade ótima em pH alcalino (Terra *et al.*, 1994). Embora as tripsinas apresentem uma grande similaridade de sequência, nos insetos essas enzimas diferem em relação à sensibilidade a inibidores e à especificidade por substratos (Terra e Ferreira, 1994; Bown *et al.*, 1997; Broadway, 1997; Terra e Ferreira 2005). Por exemplo, tripsinas de lepidópteras não apresentam preferência entre substratos contendo arginina ou lisina, embora tripsinas de mamíferos e da maioria dos insetos hidrolisem preferencialmente substratos contendo arginina (Lopes *et al.* 2006).

As enzimas digestivas de lepidópteras de várias espécies têm sido bastante estudadas (Marchetti *et al.*, 1998; Novillo *et al.*, 1999; Volpicella *et al.*,

2003; Diaz-Mendonza *et al.*, 2005 Telang *et al.*, 2005; Herrero *et al.*, 2005). Contudo, pouco se sabe sobre as proteases digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, embora esta permaneça figurando como uma das principais pragas da cultura da soja em locais de clima quente. Neste contexto, este trabalho descreve a purificação e a caracterização de uma enzima solúvel *tripsina-like* presente no intestino de larvas do 5º instar deste inseto.

### **3.2- MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos relatados nesta tese foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Instituto BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa e no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **3.2.1- Insetos**

Uma população de *Anticarsia gemmatalis* criada em laboratório foi alimentada com uma dieta artificial desenvolvida por Hoffman-Campo e colaboradores (1985) (APÊNDICE). As larvas foram mantidas em câmaras climatizadas a  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas.

### **3.2.2- Obtenção do extrato enzimático**

Larvas do 5º instar previamente imobilizadas no gelo tiveram os intestinos extraídos e mantidos a -20°C em solução de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> pH 3,0, na proporção de 5 intestinos por mL de solução. Os intestinos foram submetidos a um processo de lise celular através de ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 37°C (Oliveira *et. al.*, 2005). A suspensão obtida foi centrifugada a 100.000 g por 45 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado. Este sobrenadante (extrato solúvel, ES) foi posteriormente concentrado por ultrafiltração (extrato solúvel concentrado, ESC) em um dispositivo Amicon 8400 (Millipore®) utilizando-se uma membrana com poros de limite molecular de 10 kDa (Millipore®) e conservado a -20°C para uso posterior como fonte de enzima para purificação.

### **3.2.3- Ensaio enzimáticos e de determinação de proteína**

O teor protéico das amostras analisadas nas diversas etapas da purificação foi determinado pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) conforme descrito por Smith e colaboradores (1985).

A determinação da atividade enzimática das amostras correspondentes foi realizada utilizando-se o substrato L-BApNA na concentração final de 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 9,0. O tampão (850 µL) e o substrato (50 µL) foram pré-incubados por 5 minutos a temperatura de 35°C antes da adição da amostra enzimática (100 µL). Após 15 minutos de

incubação a reação foi parada pela adição de ácido acético 60% (250  $\mu$ L). As velocidades foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, através da medida da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 A) utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de  $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o produto (Budatha *et al.*, 2008).

### 3.2.4- Purificação enzimática

A enzima *tripsina-like* solúvel foi obtida a partir do extrato concentrado (ESC) da lagarta da soja conforme o fluxograma da Figura 8.

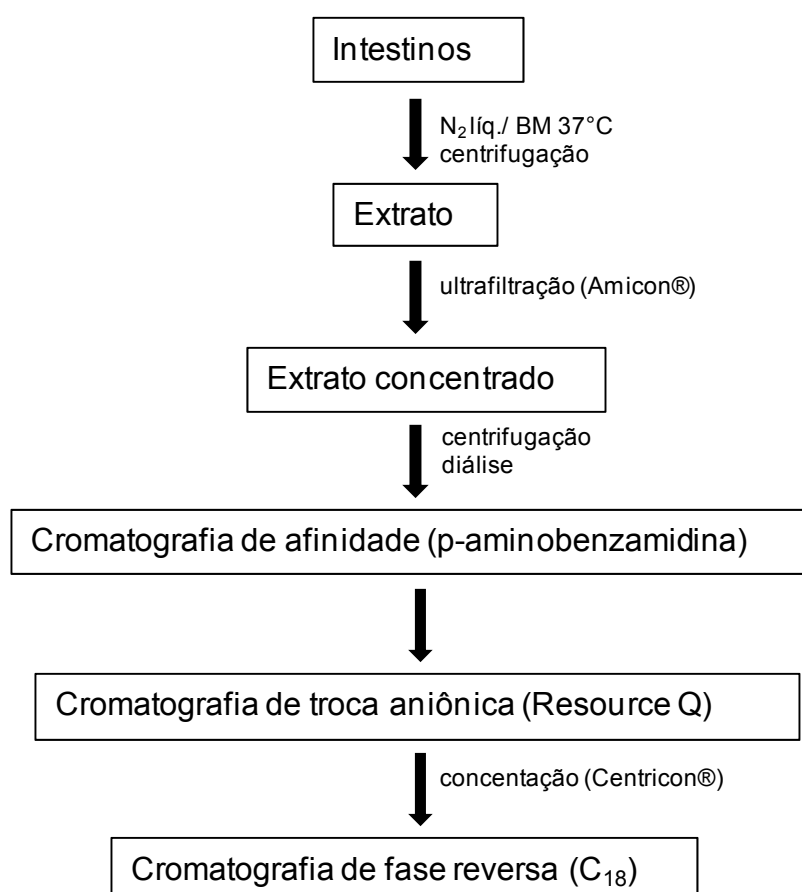


Figura 8: Fluxograma de purificação da enzima *tripsina-like* solúvel do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

#### **3.2.4.1- Cromatografia de afinidade**

O extrato solúvel concentrado (ESC) obtido a partir de 100 intestinos de *A. gemmatalis* foi dialisado, utilizando-se membranas com poros limite molecular de 6 a 8 kDa em tampão Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5 a 4°C e centrifugado a 16.250 g por 2 min. O sobrenadante foi separado e aplicado em uma coluna de p-aminobenzamidina agarose (2,5 mL) (Sigma®) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição das proteínas foi realizada com tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 3,0 a 4°C, com fluxo contínuo de 1 mL/min e coletadas em frações de 1,5 mL. As frações eluídas foram monitoradas pela determinação da Abs<sub>280</sub> e determinação da atividade *tripsina-like* utilizando L-BApNA como substrato (item 3.2.3). As frações mais ativas foram reunidas.

#### **3.2.4.2- Cromatografia de troca aniônica**

A amostra proveniente da cromatografia de afinidade ( item 3.2.4.1) teve o pH ajustado pela adição de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, até atingir o pH 8,6 e foi submetida à cromatografia de troca aniônica, em uma coluna Resource Q (6,4 x 30 mm) (Pharmacia Biotechnology®), previamente equilibrada com tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6. As proteínas foram eluídas por um gradiente salino crescente de 0 a 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl em tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6 em 30 minutos. O procedimento foi conduzido à temperatura ambiente, em Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (Pharmacia LKB- Control Unit-UV-1®) com fluxo de 1 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas e tiveram o pH

ajustado com ácido fórmico  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , adicionado em quantidade suficiente para manter o pH 3,0. As frações com maior atividade enzimática *tripsina-like* foram reunidas e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior nos ensaios de cinética enzimática.

#### **3.2.4.3- Cromatografia de fase reversa**

A amostra proveniente da troca aniônica (item 3.2.4.2) foi concentrada utilizando-se Centricon® (Millipore) com membrana com poros de limite molecular de 10 kDa, centrifugada a  $5.000 \text{ g}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente a amostra foi submetida à cromatografia de fase reversa em uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 ( $5\mu\text{m}$ ) (Merck), equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. As proteínas foram eluídas em gradiente linear de acetonitrila (0-80%) em TFA 0,1%, em 30 ou 60 minutos. O procedimento foi conduzido à temperatura ambiente em High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu®), com fluxo de  $1 \text{ mL/min}$  e detecção espectrofotométrica em 280nm.

#### **3.2.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a  $100 \text{ V}$  ( $20 \text{ mA}$ ). As amostras submetidas à eletroforese foram previamente precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 %, centrifugadas por 5 minutos a  $16.250 \text{ g}$ , lavadas

com acetona gelada, centrifugadas novamente, adicionadas ao tampão de amostra contendo 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0,08% azul de bromofenol (p/v), fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel.

Como marcadores de massa molecular foram utilizadas proteínas recombinantes com as seguintes massas: 15, 25, 35, 50, 75, 100 e 150 kDa (Sigma®). A massa molecular da fração proteica foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular. A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum e colaboradores (1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados em 100 mL de solução, contendo metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume, por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 min cada, com solução de etanol 50 %. À seguir, os géis foram lavados por 1 min, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Posteriormente, os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados por 15 min em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v). Após serem lavados por 3 vezes de 20 segundos com água destilada, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

### **3.2.6- Eletroforese em gel de substrato (desnaturante e nativo)**

A análise da atividade proteolítica em gel foi realizada segundo Garcia-Carreño e colaboradores (1993). A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), contendo SDS foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Quando necessário, as amostras foram concentradas por diálise em polietilenoglicol composto (15,000-20,000) (Sigma®). Posteriormente foram diluídas 1:4 em tampão de amostra contendo SDS, sem agente redutor e não foram fervidas. A corrida eletroforética foi realizada a 4°C, a 100 V (20 mA). Para remover o excesso de SDS o gel foi lavado em tampão 0,05 mol.L<sup>-1</sup> Tris-HCL, pH 8,5, por 30 minutos (3 lavagens de 10 minutos cada) a 4°C, sob agitação. Subsequentemente à eletroforese o gel foi imerso em 50 mL de uma solução 2 % de caseína em tampão 0,05 mol.L<sup>-1</sup> Tris-HCL, pH 8,0, por 30 minutos a 4°C. A temperatura foi elevada para 25°C e o gel foi incubado por mais 90 minutos. Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e corado em solução contendo 40% etanol, 10% ácido acético e 0,1% de Coomassie Brilliant blue R-250. A visualização das bandas ativas foi feita após a descoloração do gel com solução contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético.

O gel de substrato nativo foi realizado de maneira idêntica ao descrito anteriormente, exceto devido a ausência de SDS no gel e nos tampões de corrida e de amostra. Desta forma, a etapa de lavagem do gel após a corrida com o objetivo de remover o SDS não foi necessária.

### **3.2.7- Caracterização enzimática**

#### **3.2.7.1- Atividade amidásica**

A determinação da atividade amidásica da amostra foi realizada utilizando-se o substrato cromogênico L-BApNa (N- $\alpha$ -benzoil-L-Arg-*p*-nitroanilida). A mistura da reação continha 850  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 9,0, 50  $\mu$ L da solução de L-BApNA 5 mmol.L<sup>-1</sup> e 100  $\mu$ L do extrato enzimático. O tampão e amostra foram pré-incubados por 5 min à temperatura de 35°C. Após esse período a reação foi iniciada pela adição do substrato e monitorada por 5 minutos. As velocidades foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 A®) utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8.800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto (Pereira *et al.*, 2005).

#### **3.2.7.2- Atividade esterásica**

A determinação da atividade esterásica da amostra foi realizada utilizando-se como substrato L-TAME (N- $\alpha$ -*p*-tosil-L-Arg-metil-ester). A mistura da reação continha 850  $\mu$ L tampão Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, 50  $\mu$ L da solução de TAME 4 mmol.L<sup>-1</sup> e 100  $\mu$ L do extrato enzimático. O tampão e a amostra foram pré-incubadas por 5 minutos à temperatura de 25°C. Após esse período a reação foi iniciada pela adição do substrato e monitorada por 2,5 min

a 25°C. As velocidades iniciais foram determinadas pela medida da absorbância a 247 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 A), utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 540 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto.

### **3.2.7.3- Efeito do pH**

O perfis de pH foram determinados utilizando-se os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 mol.L<sup>-1</sup>: monofosfato/ fosfato dissódico (pH 6,0-7,0); Tris-HCl (pH 7,5-9,0); glicina-NaOH (pH 9,5-10,5).

A atividade enzimática nos respectivos valores de pH foi determinada como descrito nos itens 3.2.7.1 e 3.2.7.2, para os substratos L-BApNA e L-TAME, respectivamente, com a devida substituição do tampão correspondente a cada faixa de pH desejada.

### **3.2.7.4- Efeito da temperatura**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado a 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C utilizando-se um espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada (Shimadzu UV-160 A). As soluções (tampão, amostra, substrato) foram pré-incubadas por 5 minutos em cada temperatura. A reação foi iniciada pela adição do substrato e a atividade determinada como descrito nos itens 3.2.7.1 e 3.2.7.2, para os substratos L-BApNA e L-TAME, respectivamente.

### 3.2.7.5- Determinação da $K_M$ , e $V_{m\acute{a}x}$

A determinação da  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foi realizada utilizando-se concentrações crescentes dos substratos L-BApNA e L-TAME. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito nos itens 3.2.7.1 e 3.2.7.2. As concentrações testadas para o substrato L-BApNA foram 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> e para o substrato L-TAME foram 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 3.2.8- Avaliação do efeito de inibidores e íons cálcio na atividade enzima digestiva *tripsina-like* de *A. gemmatalis*

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi avaliado utilizando-se L- BApNA como substrato na presença de: a) PMSF (0,40 mmol.L<sup>-1</sup> a 1,6 mmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor irreversível de serino-proteases; b) TLCK (5 μmol.L<sup>-1</sup> a 20 μmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor irreversível de serino proteases *tripsina-like*; c) benzamidina (1 μmol.L<sup>-1</sup> a 100 μmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor competitivo de serino proteases; d) aprotinina (0,5 μmol.L<sup>-1</sup> a 2,0 μmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor de serino proteases, com exceção de trombina e Fator X<sub>a</sub>; e) TPCK (10 μmol.L<sup>-1</sup> a 100 μmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor irreversível de serino- proteases tipo quimi tripsina e f) E-64 (1 μmol.L<sup>-1</sup> a 10μmol.L<sup>-1</sup>), um inibidor irreversível de cisteíno-proteases. Foi também avaliado o efeito dos inibidores proteicos da soja, SBTI (0,1 μmol.L<sup>-1</sup> a 1 μmol.L<sup>-1</sup> ) e SBBI (0,5 μmol.L<sup>-1</sup> a 5 μmol.L<sup>-1</sup>). Todos os inibidores testados foram adquiridos da Sigma®.

A amostra enzimática foi previamente incubada com cada inibidor nas diferentes concentrações testadas por 5 minutos a temperatura de 35°C. O

substrato L-BApNA foi adicionado à reação e a atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.2.7.1.

O efeito dos íons cálcio na atividade enzimática foi avaliado através da adição de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) no tampão  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  Tris HCl, pH 9,0 na concentração final variando entre 0 e  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.2.7.1.

### **3.2.9. Obtenção de peptídeos trípticos e análise por espectrometria de massa**

Após a separação por SDS-PAGE (item 3.2.5) e coloração por Coomassie Brilliant Blue G250, a região do gel contendo a proteína foi extraída com auxílio de um bisturi, cortada em fragmentos de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  e colocada em um microtubo.

A digestão da proteína em gel foi realizada como descrito a seguir:

- **Remoção do corante:** Os fragmentos do gel contendo a proteína foram descorados durante 15 min por três vezes em solução contendo 50% v/v de acetonitrila (ACN) e  $25 \text{ mmol.L}^{-1}$  de bicarbonato de amônio, pH 8,0 e desidratados por duas vezes de 5 minutos em 100% de acetonitrila. A acetonitrila foi removida e os fragmentos de gel colocados em centrífuga com vácuo Univapo® 100 H (Uniequip) por cerca de 15 minutos, até ficarem completamente secos.
- **Redução e alquilação:** Os fragmentos de gel foram reduzidos em DTT ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  DTT/  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  bicarbonato de amônio, pH 8,0) por 30 minutos a temperatura ambiente e alquilados com IAA ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  IAA/

100 mmol.L<sup>-1</sup> bicarbonato de amônio, pH 8,0), por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. A IAA foi removida e os fragmentos de gel lavados com 100 mmol.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de amônio e posteriormente desidratados com 100% de ACN. A ACN foi removida e os fragmentos de gel colocados em centrífuga com vácuo Univapo® 100 H (Uniequip) por cerca de 15 min, até ficarem completamente secos.

- **Digestão das proteínas:** Os fragmentos de gel foram reidratados em 10 µL de solução de tripsina *Gold Sequence Grade* (Promega) contendo 20 ng de tripsina por microlitro em 25 mmol.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de amônio pH 8,0 e mantidos a 37°C por 12 horas.
- **Extração dos peptídeos:** Os peptídeos foram extraídos com duas lavagens de 30 minutos com a solução de eluição (5% v/v ácido fórmico/ 50% v/v ACN), sob agitação constante (vortex). A seguir as amostras foram concentradas em centrífuga com vácuo Univapo® 100 H (Uniequip) até o volume de 10 µL. As amostras foram conservadas a -20°C para uso posterior.

Para a análise por espectrometria de massas os peptídeos trípticos foram preparados em uma Zip-Tip (Millipore®) contendo resina de fase reversa (C<sub>18</sub>) previamente ativada com 50% v/v de ACN e equilibrada com 0,1% v/v de TFA. A amostra foi eluída da resina em 8 µL de solução 50% v/v de ACN contendo 0,1% v/v de TFA. Uma alíquota de 0,5 µL da amostra foi misturada a 0,5 µL da matriz (ácido-α-ciano-4-hidróxicinâmico) e aplicada na placa de

MALDI. Os espectros de massa MS e MS/MS foram obtidos usando o sistema MALDI-TOF-TOF Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics®), sendo adquiridos em modo refletor e internamente calibrados com peptídeos clivados pela tripsina. A calibração interna no modo MS foi feita utilizando-se uma mistura de 4 peptídeos: des-Arg1-Bradicinina ( $m/z = 904.468$ ), angiotensina I ( $m/z = 1296.685$ ), Glu1-fibrinopeptídeo B ( $m/z = 1570.677$ ) e ACTH (18-39) ( $m/z = 2465.199$ ). O espectro MS/MS foi externamente calibrado usando fragmentos íon/massa conhecidos observados no espectro MS/MS da angiotensina I. Os espectros provenientes de análises combinadas (MS+MS/MS) foram confrontados com o banco de dados MSDB usando o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Nas buscas, foram incluídos os seguintes parâmetros junto ao MASCOT: sem restrições de peso molecular, todas as entradas de origem, duas clivagens faltantes, tolerância de massa do peptídeo  $\pm 0,1\%$ , tolerância para MS/MS  $\pm 0,8$  Da, modificações variáveis dos resíduos de cisteína (carbamidometilação) e metionina (oxidação).

### **3.2.10. Análise estatística dos dados**

Os ensaios de caracterização enzimática foram realizados em triplicata e os dados foram analisados considerando-se o desvio padrão em relação à média. Os parâmetros cinéticos no estado estacionário foram obtidos por regressão não-linear, utilizando-se o programa Sigma Plot 8.0.

### 3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1- Purificação da enzima digestiva solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*

A enzima *tripsina-like* foi obtida a partir do extrato solúvel concentrado (ESC) após cromatografia de afinidade e de troca-aniônica, conforme esquematizado na figura 8. Durante as etapas de purificação as atividades enzimáticas foram determinadas utilizando-se o substrato L-BApNA, e o teor protéico determinado pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico, como descrito no item 3.2.3. Um resumo das etapas de purificação é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Etapas de purificação da enzima solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Atividade específica <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$ )	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato concentrado (ESC)	105,9	5,55	0,052	1	100
Afinidade (p-aminobenzamidina agarose)	0,78	6,88	8,82	167	124
Troca-aniônica (Resource-Q)	0,108	2,89	26,75	514	52

<sup>a</sup> Substrato usado: L-BApNA

O perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação, correspondente a aplicação do ESC na coluna de afinidade de p-aminobenzamidina –agarose (item 3.2.4.1), está representado pela Figura 9. Dois picos de atividade para o substrato testado foram observados.

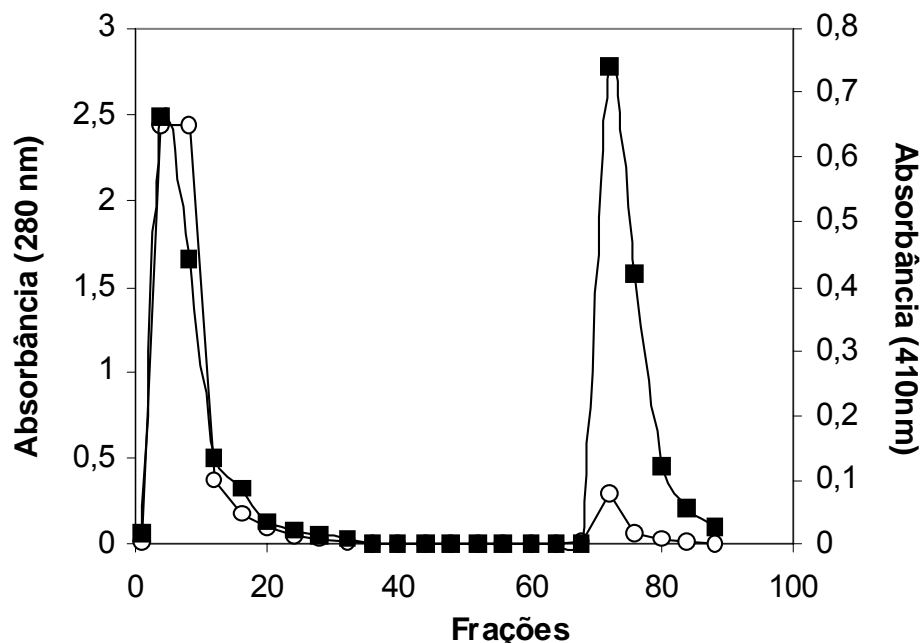


Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato solúvel concentrado de *Anticarsia gemmatalis* em coluna de p-aminobenzamidina-agarose equilibrada com Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5. As proteínas foram eluídas em glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 3,0. Substrato usado: L-BApNA. Absorvância em 410 nm (■); absorvância em 280nm (○).

O primeiro pico foi eluído inicialmente juntamente com a maior fração proteica durante a remoção de proteínas não ligadas e provavelmente corresponde a enzimas presentes no extrato enzimático, que não apresentam afinidade pela p-aminobenzamidina, mas que são capazes de hidrolisar o substrato BApNA (Terra e Ferreira, 1994). Além disso, a resina utilizada apresenta uma capacidade de ligação de 7 a 10 mg de tripsina por mL de resina, conforme informado pelo fabricante (Sigma ®), excluindo a possibilidade da amostra ter saturado os sítios de ligação à coluna.

O segundo pico de atividade foi eluído após o início da utilização do tampão de eluição. O rendimento após esta etapa cromatográfica foi de 124%, revelando que a enzima *tripsina-like* é separada de prováveis inibidores presentes no extrato bruto durante esse processo. Observação semelhante foi relatada durante a purificação de tripsinas de *Bombyx mori* (Eguchi e Kuriyama,

1985), *Locusta migratoria* (Lam et al., 2000) e *Heliothis virescens* (Brito et al., 2001). As frações ativas referentes ao segundo pico foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de troca-aniônica, em uma coluna Resource Q (item 3.2.4.2). O perfil desta cromatografia está representado na Figura 10.

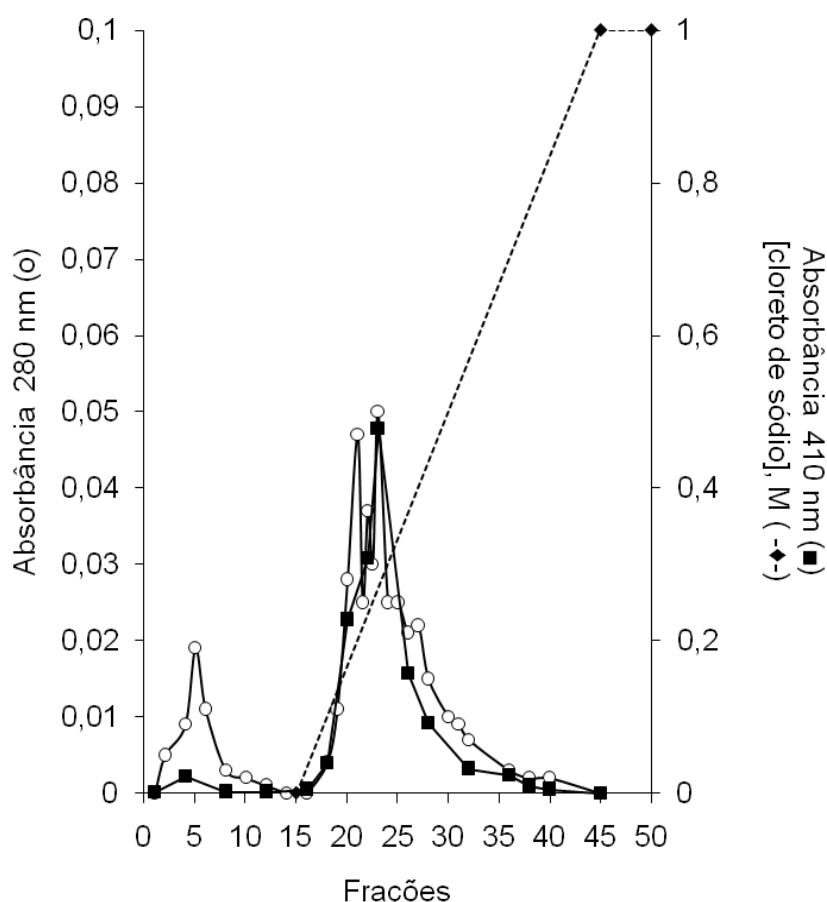


Figura 10: Perfil cromatográfico da troca-aniônica em Resource Q da fração enzimática solúvel de *Anticarsia gemmatalis* oriunda da cromatografia de afinidade. A coluna foi equilibrada com tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6. As proteínas foram eluídas por um gradiente salino crescente de 0 a 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl em tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6. Substrato usado; L-BAPNA. Absorbância em 410 nm (■); absorbância em 280nm (o); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (---).

O perfil cromatográfico desta etapa apresenta um pico proteico com atividade que é eluído com aproximadamente 0,3 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl. Observa-se ainda algumas frações fracamente ativas que são eluídas antes do início do

gradiente salino, semelhante ao perfil do extrato do intestino de *Musca domestica* em uma S-Sepharose (Lemos e Terra, 1992). Tripsinas de outros insetos já foram isoladas a partir da cromatografia de troca iônica, apresentando normalmente características aniônicas (Jongsma et al., 1996; Cristofolletti et al., 2001; Lopes e Terra, 2003), tendo sido descrita uma isoforma de tripsina com características catiônicas em *Locusta migratoria* (Lam et al., 2000). Análises filogenéticas de sequências de DNA de enzimas *tripsina-like* de lepidópteros demonstraram a ocorrência de pelo menos três tipos de tripsina (I, II, III) envolvidas com a digestão. Observou-se que as tripsinas pertencentes aos tipos I e III são usualmente aniônicas, e as pertencentes ao tipo II são usualmente catiônicas (Novillo et al.; 1999; Lopes et al., 2004; Diaz-Mendoza et al., 2005). Segundo, Muhlia-Almazán et al. (2008) a presença de tripsinas aniônicas ou catiônicas é espécie-específica e a diferença de cargas pode ser funcionalmente importante.

As frações mais ativas correspondentes ao pico aniônico foram reunidas e, ao final desta etapa, a enzima apresentou um fator de purificação de 500 vezes com um rendimento de 52% (Tabela 1).

Os protocolos de purificação de enzimas *tripsina-like* de insetos descritos na literatura normalmente envolvem uma ou ambas as etapas cromatográficas utilizadas neste trabalho. A escolha das etapas varia em função de características das amostras. Por exemplo, a combinação de cromatografias de troca-aniônica não pôde ser empregada na purificação de tripsinas de *Musca domestica* e *Diatrea saccharalis*, como foi para tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Periplaneta americana*, devido à ocorrência de autólise. A

cromatografia de afinidade foi, portanto, empregada como alternativa apresentando resultados satisfatórios (Lopes *et al.*, 2006). Neste trabalho optou-se pela combinação de ambas as etapas. Foi testada inicialmente a cromatografia de troca-aniónica como descrito no item 3.2.4.2, embora com gradiente mais lento, de 60 minutos. Observou-se um arraste da atividade, obtendo-se muitas frações ativas tanto naquelas frações que não ligaram à coluna quanto nas frações que foram eluídas após o início da gradiente (Figura 11).

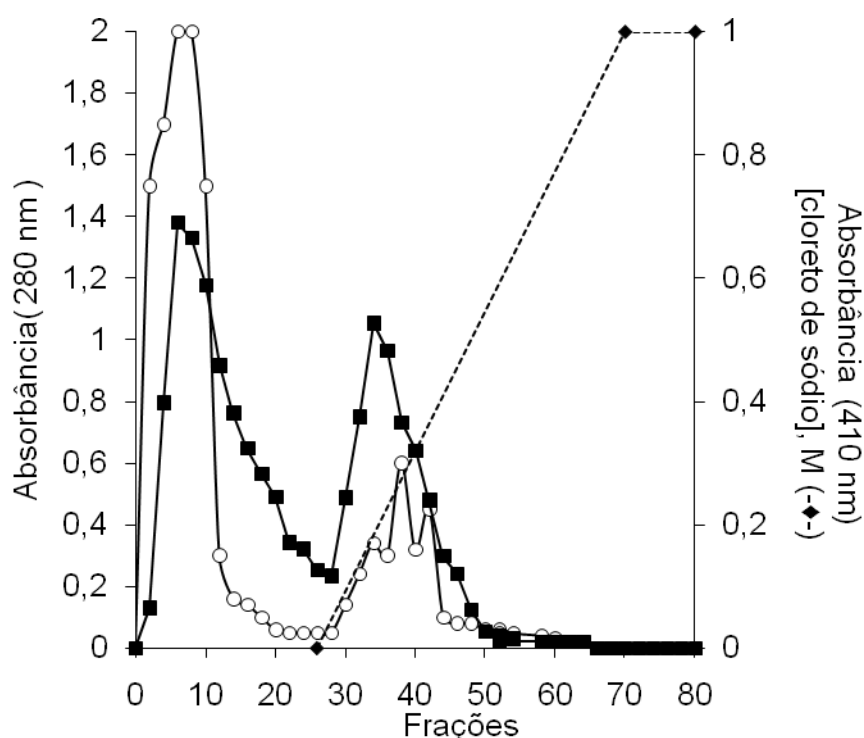


Figura 11: Perfil cromatográfico da troca-aniónica em Resource Q do extrato solúvel concentrado do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. A coluna foi equilibrada com tampão glicina  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,6. As proteínas foram eluídas por um gradiente salino crescente de 0 a  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl em tampão glicina  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,6. Substrato usado; L-BApNA. Absorbância em 410 nm (■); absorbância em 280nm (○); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (---).

A opção de fazermos primeiramente a cromatografia de afinidade se mostrou melhor ao observarmos que algumas frações ativas não apresentaram afinidade pela p-aminobenzamidina (Figura 8). Desta forma, a cromatografia de

troca-aniônica passou a ser realizada após a amostra ter sido separada por afinidade, sendo utilizadas somente as frações retidas na coluna de p-aminobenzamidina.

Amostras correspondentes a cada etapa de purificação foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, sob condições desnaturantes (item 3.2.5). O perfil de migração das proteínas presentes em cada etapa está representado na Figura 12.

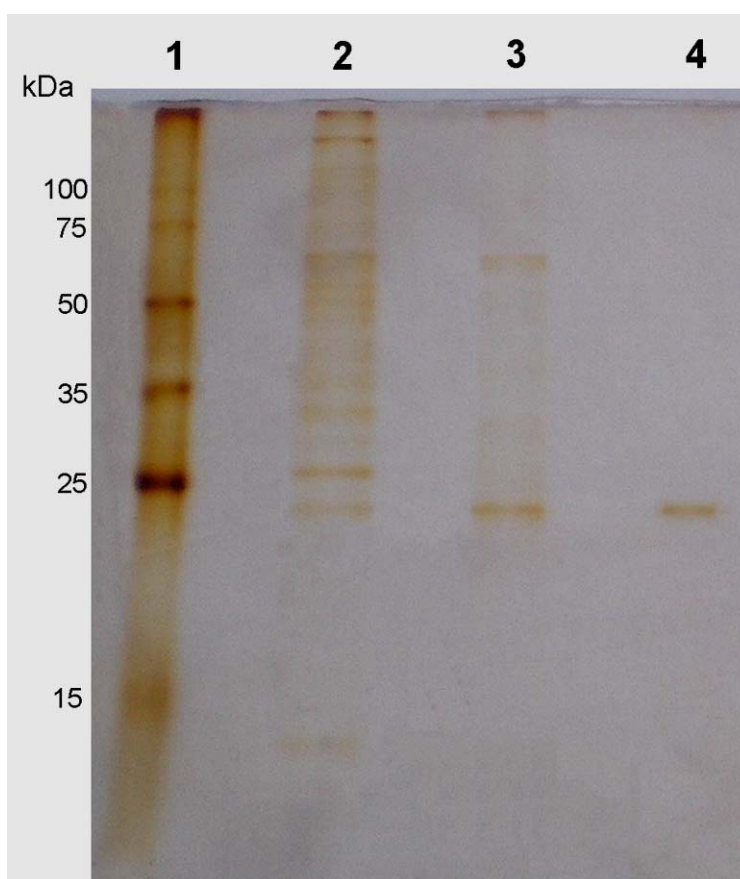


Figura 12: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12,5 %) da enzima solúvel *tripsina-like* do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. 1- marcadores de massa molecular; 2- extrato solúvel concentrado; 3- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose); 4- fração enzimática pós cromatografia de troca-aniônica (Resource-Q). As amostras foram coradas pelo método da prata.

As etapas cromatográficas se mostraram eficientes na separação da enzima *tripsina-like*, resultando em uma redução das espécies proteicas

presentes no extrato bruto (Figura 12, linha 2) até a observação de uma única banda na fração enzimática obtida a partir da cromatografia de troca iônica (Figura 12, linha 4).

### 3.3.2- Determinação da massa molecular

A massa molecular da proteína obtida após a troca-aniônica foi calculada a partir de uma regressão linear, correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com as distâncias percorridas por estas em SDS-PAGE 12,5 % (Figura 12). A distância percorrida pela amostra foi de 46 mm, o que resultou em valor estimado de massa molecular de aproximadamente 24,9 kDa (Figura 13).

A massa estimada de 24,9 kDa para a enzima solúvel *tripsina-like* de *A. gemmatalis* está em concordância com as massas de tripsinas observadas na maioria insetos, que variam entre 20 kDa e 35 kDa (Terra e Ferreira, 1994), bem como as tripsinas isoladas de outras espécies de lepidópteras: 27 kDa e 24 kDa em *Sesamia nonagroides* (Novillo *et al.*, 1999); 26 kDa e 29 kDa em *Helicoverpa armigera* (Telang *et al.*, 2005); 28,7 kDa em *Diatrea saccharalis* (Lopes *et al.*, 2006). No entanto, massas moleculares maiores, de 67 kDa e 70 kDa, foram observadas em *Heliothis virescens* (Brito *et al.*, 2001) e também menores, de 12,8 kDa, em *Bombyx mori* (Eguchi e Kuriyama, 1985) e de 17 kDa em *Locusta migratoria* (Lam *et al.*, 2000).

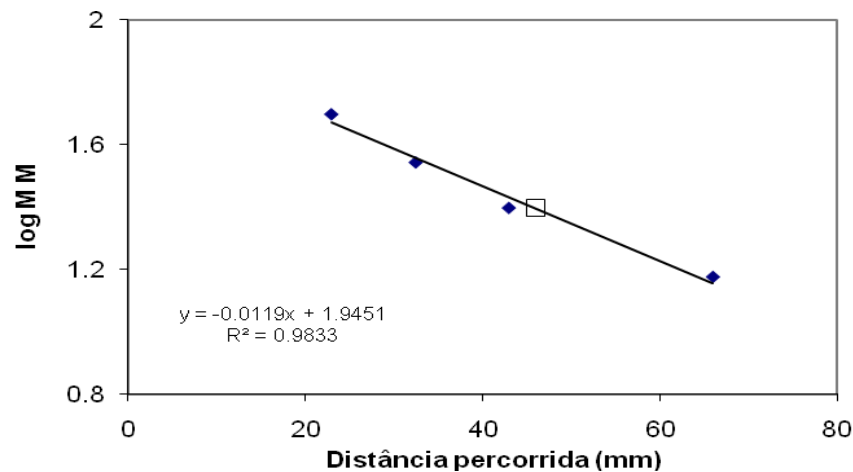


Figura 13: Determinação da massa molecular da enzima solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*. Marcadores de massa molecular (♦), amostra (□).

### 3.3.3- Determinação da atividade proteolítica em gel de substrato (nativo e desnaturante)

A atividade proteolítica das amostras nas diferentes etapas de purificação foi analisada através do gel de substrato, após separação em SDS-PAGE (12,5%) e subsequente incubação do gel em solução de caseína 2% em 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5 (item 3.2.6). Após a incubação com a caseína, o gel foi corado por Coomassie e bandas claras de atividade foram visualizadas contra um fundo azul (Figura 14).

Como era de se esperar, um grande número de proteases compõe o pool de enzimas presentes no extrato bruto do intestino da lagarta (Figura 14, linha 2). A ocorrência de múltiplas tripsinas no intestino de lepidópteros é comumente relatada na literatura, estando normalmente relacionada à capacidade de adaptação do inseto à presença de inibidores de proteases de plantas (Brito *et al.*, 2001; Volpicella *et al.*, 2003; Budatha *et al.*, 2008). Após a separação em coluna de afinidade três espécies fortemente ativas foram detectadas, revelando que entre as proteases inicialmente observadas no

extrato bruto, essas são provavelmente *tripsina-like*. Oliveira e colaboradores (2005) também identificaram três bandas com atividade proteolítica no extrato do intestino de *A. gemmatalis* após cromatografia de afinidade em coluna de aprotinina-agarose, porém com massas moleculares maiores que as observadas neste trabalho, variando entre 66 kDa e 91 kDa. Foi sugerida a formação de agregados para explicar essa discrepância.

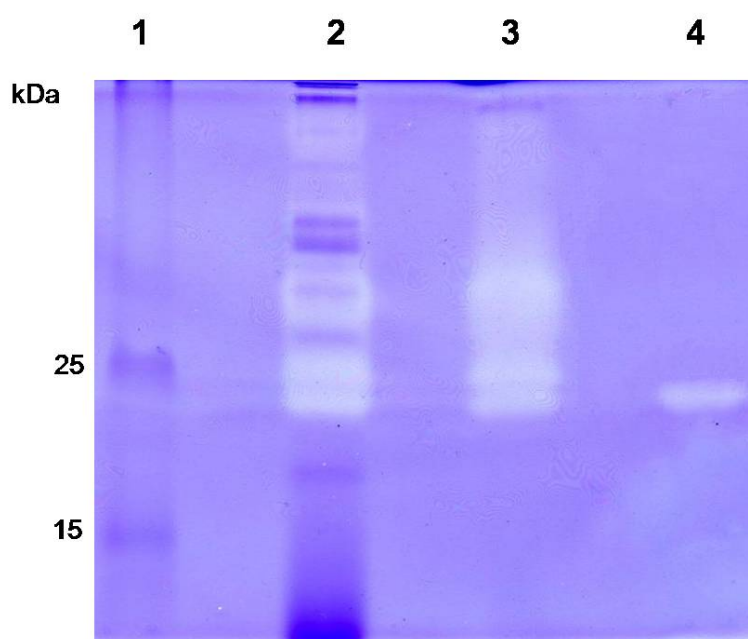


Figura 14: Perfil da atividade proteolítica da enzima solúvel *tripsina-like* do intestino de *Anticarsia gemmatalis* após separação em SDS-PAGE (12,5%) e incubação com solução de caseína 2%. 1- Padrão de massa molecular; 2- extrato solúvel concentrado; 3- amostra após afinidade; 4- amostra após troca-aniônica.

Foi observado que algumas espécies proteicas presentes na fração pós-afinidade detectadas pela coloração por prata (Figura 12) não apresentaram atividade proteolítica no gel (Figura 14). Mazumdar-Leighton e colaboradores (2000) identificaram um mRNA bastante abundante no intestino médio de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) codificando uma enzima *tripsina-like* onde a serina 195 foi substituída por um aspartato. As assinaturas e sequências de resíduos responsáveis pela interação com inibidores tipo SKTI foram mantidos,

sugerindo que proteínas como esta poderiam apresentar uma função relacionada com sinalização/interação. Essa hipótese poderia explicar a afinidade das amostras pelo inibidor (p-aminobenzamidina) e a incapacidade de hidrolisar o substrato proteico no gel de caseína.

A fração pós-troca-aniônica revelou a presença de uma única espécie ativa correspondente à mesma banda observada no gel corado pela prata (figura 10, linha 4), confirmando sua atividade proteolítica.

A atividade proteolítica da enzima em gel de substrato foi também determinada após separação da amostra em gel nativo de poliacrilamida (PAGE) 12,5% (item 3.2.6). Uma única banda de atividade foi visualizada, correspondente à mesma banda proteica observada em gel corado pela prata, cuja amostra foi separada nas mesmas condições (Figura 15 A e B).

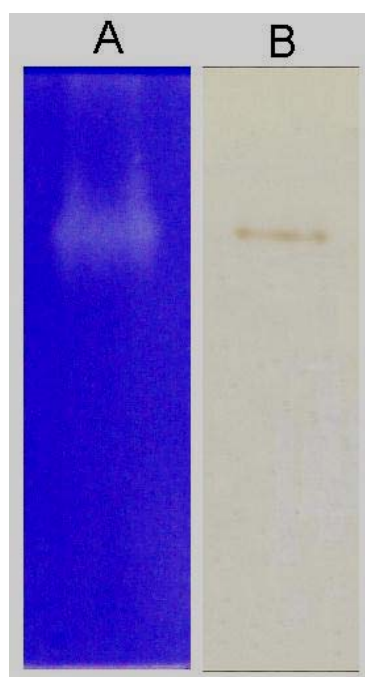


Figura 15: Atividade proteolítica da enzima solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*, após separação em gel nativo (PAGE- 12,5%) e incubação com solução de caseína 2%. A) amostra corada por Coomassie após incubação com caseína; B) amostra corada pelo método da prata.

### 3.3.4- Caracterização enzimática

#### 3.3.4.1- Efeito do pH

O efeito do pH na atividade da enzima foi determinado na faixa de pH compreendida entre 7,0 e 10,5, na temperatura de 35°C, utilizando-se o substrato sintético L-BApNA (Figura 16A) e entre 6,5 e 9,5, na temperatura de 25°C, utilizando-se o substrato, também sintético, L-TAME (Figura 16B), conforme descrito anteriormente no item 3.2.7.3.

O perfil de pH diferiu entre os substratos testados embora o pH de atividade ótima observado para ambos tenha sido na faixa alcalina. A atividade enzimática máxima foi observada em pH 8,0 quando o substrato L-TAME foi testado (Figura 16B) e na faixa de pH entre 8,0 e 9,0 quando testado o L-BApNA (Figura 16A). A redução da atividade enzimática com o aumento do pH foi mais acentuada com o substrato L-TAME; em pH 9,5 a atividade enzimática foi nula, comparada com cerca de 79% de atividade neste mesmo pH utilizando-se L-BApNA.

Os dados observados estão em concordância com o descrito para enzimas *tripsina-likes* isoladas do intestino de insetos, que normalmente apresentam maior atividade entre pH 8 e 9. Tripsinas de lepidópteras, no entanto, normalmente apresentam valores de pH de atividade ótima mais elevados, correspondendo ao elevado pH do lúmen intestinal destes insetos (Terra e Ferreira, 1994; Terra *et al.*, 1996). Por exemplo, tripsinas isoladas de *Sesamia nonagroides* (Novillo *et al.*, 1999), *Spodoptera littoralis* (Marchetti *et*

al., 1998) e *Helicoverpa armigera* (Telang et al., 2005) apresentaram atividade máxima em pH 10 a 11.

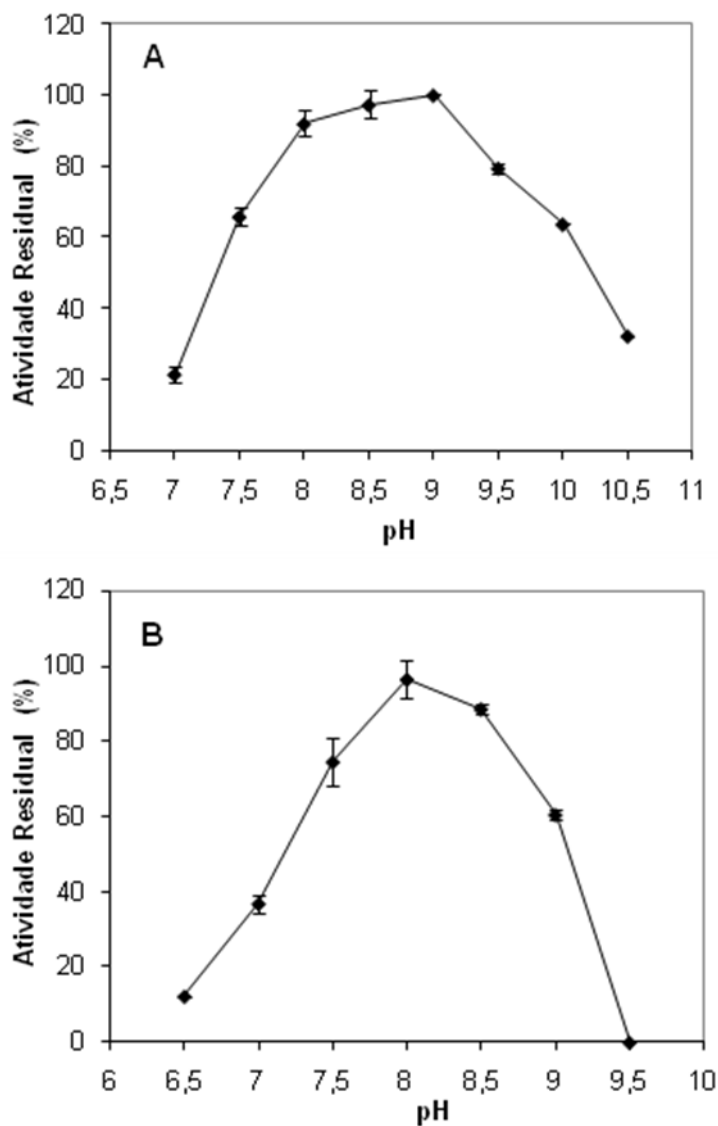


Figura 16: Efeito do pH na atividade da enzima solúvel *tripsina-like* de *A.gemmatalis* utilizando-se os substratos L-BApNA (A) e L-TAME (B). Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

O elevado pH do intestino destes insetos ajuda a proteger contra o efeito nocivo de taninos, normalmente presente na dieta. O tanino forma complexo insolúveis com as enzimas e proteínas da dieta afetando a digestão de proteínas. A formação de complexos tanino-proteínas é reduzida em pH alcalino (Nation, 2001). A atividade enzimática *tripsina-like* do extrato bruto do

intestino de *Anticarsia gemmatalis* apresentou pH de atividade ótima igual a 10, utilizando-se L-BApNA como substrato (Pereira *et al.*, 2005), se aproximando mais do que é descrito para lepidópteras. Já em amostras parcialmente purificadas, também de *A. gemmatalis*, o pH de atividade ótima observado para o substrato L-BApNA foi 8,5 e para o substrato L-TAME foi 8,0 (Oliveira *et al.*, 2005), semelhante ao observado neste trabalho. A diferença do pH ótimo observado, especialmente por Pereira e colaboradores (2005), provavelmente é decorrente da diferença na composição das amostras testadas, uma vez que não trabalharam com amostra pura.

#### **3.3.4.2- Efeito da temperatura**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado na faixa entre 20°C e 50°C, em pH 9,0, utilizando-se o substrato L-BApNA (Figura 17A) e entre 10°C e 40°C, em pH 8,0, utilizando-se o L-TAME (Figura 17B), conforme descrito anteriormente (item 3.2.7.4).

A atividade enzimática foi máxima aos 35°C quando o substrato testado foi o L-BApNA e aos 25°C quando testado o L-TAME, como observado nas figuras 17A e 17B, respectivamente. Uma maior perda de atividade com o aumento da temperatura foi observada com o substrato L-TAME. Aos 40°C a enzima reteve 74% de sua atividade máxima com o L-BApNA e apenas 14% com o L-TAME. De forma contrária, em temperaturas mais baixas a perda de atividade foi maior com o substrato L-BApNA.

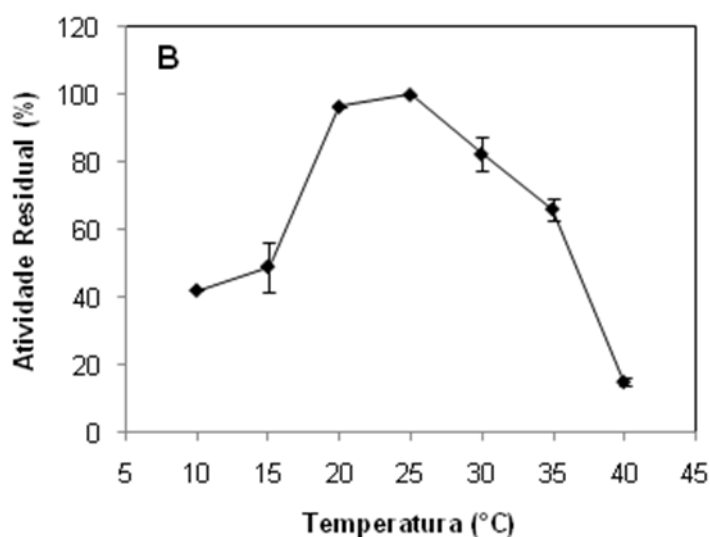
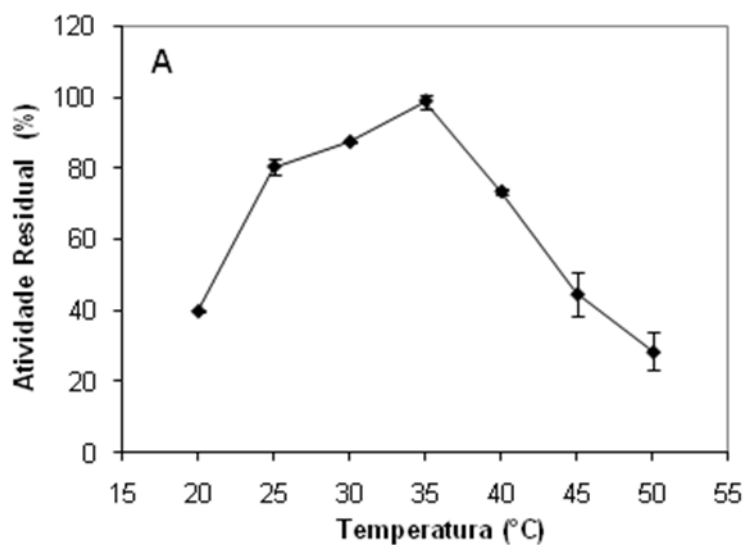


Figura 17: Efeito da temperatura na atividade da enzima *tripsina-like* de *A.gemmatalis* utilizando-se os substratos L-BApNA (A) e L-TAME (B). Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

A dependência da atividade enzimática *tripsina-like* da temperatura foi variável quando comparada entre algumas espécies de lepidópteras. A temperatura de atividade ótima de uma enzima *tripsina-like* purificada de *Ostrinia nubilalis* foi de 53°C (Bernardi *et al.*, 1996). Em *Spodoptera littoralis* tripsinas isoladas apresentaram temperatura de atividade ótima de 30°C com o substrato L-BApNA, sendo observado que as enzimas ainda mantiveram cerca de 30% da atividade máxima na temperatura de 5°C (Marchetti *et al.*, 1998). A

atividade de enzimas *tripsina-like* no extrato bruto de intestino de *Anticarsia gemmatalis* foi máxima aos 50°C (Pereira *et al.*, 2005), utilizando-se L-BApNA como substrato. Oliveira e colaboradores (2005), trabalhando com amostras de tripsinas parcialmente purificadas, também de *Anticarsia gemmatalis*, observaram temperatura ótima para o substrato L-BApNA de 35°C e para o substrato L-TAME de 30°C, semelhante ao observado neste trabalho, embora a perda de atividade em temperaturas mais baixas utilizando-se L-TAME tenha ocorrido de forma mais acentuada, sendo nula aos 20°C.

Por serem animais pecilotérmicos, diversos processos biológicos dos insetos, como crescimento, desenvolvimento e fecundidade são diretamente influenciados pela temperatura (Ascerno, 1991). Moscardi e colaboradores (1981) avaliaram o efeito da temperatura sobre a oviposição, eclosão de lagartas e longevidade de *A. gemmatalis* e observaram que a fecundidade e a capacidade de postura desses insetos foram maiores a 32,2°C. Uma maior atividade da enzima *tripsina-like* purificada foi observada em uma faixa de temperatura próxima a essa para ambos os substratos testados, BApNA e TAME. Esses dados coincidem com temperatura ambiente de regiões tropicais e subtropicais de onde a lagarta é nativa e está adaptada, e portanto, se desenvolve melhor (Bárbara, 2006).

#### **3.3.4.3-Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{máx}$ )**

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela *tripsina-like* solúvel de *A. gemmatalis* foi determinado utilizando-se os substratos sintéticos L-BApNA e L-TAME, conforme descrito no item

3.2.7.5. Ambos seguiram o modelo cinético de Michaelis-Menten nas concentrações de substrato testadas, e estão representados nas figuras 18 e 19, cujos valores de  $r^2$  são 0,985 e 0,961, respectivamente.

Os valores da constante cinética ( $K_M$ ) e da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para cada substrato são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da enzima solúvel *tripsina-like* de *A. gemmatalis*<sup>a</sup>

Substrato	$K_M$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
L-BApNA	120	5,40
L-TAME	49	66,20

A enzima apresentou capacidade de hidrolisar tanto ligações amida quanto éster, demonstrado pelo uso dos substratos L-BApNA e L-TAME, respectivamente, concordando com o que já foi descrito para serino proteinases (Perona e Craik, 1995).

Os parâmetros cinéticos observados assemelham-se aos descritos para enzima *tripsina-like* da própria *Anticarsia gemmatalis* descrito por Oliveira e colaboradores (2005) ( $K_M = 0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$  para BApNA e  $K_M = 52,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para TAME). O valor de  $K_M$  para o BApNA também está em concordância com o que foi descrito para enzimas *tripsina-likes* isoladas de *Sesamia nonagroides*,  $0,22 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,17 \text{ mmol.L}^{-1}$  (Novillo *et al.*, 1999) e *Bombyx mori*,  $0,47 \text{ mmol.L}^{-1}$  (Eguchi e Kuriyama, 1985), embora maior que o observado para quatro tripsinas de *Heliothis virescens*, cujos valores variaram entre  $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Brito *et al.*, 2001).

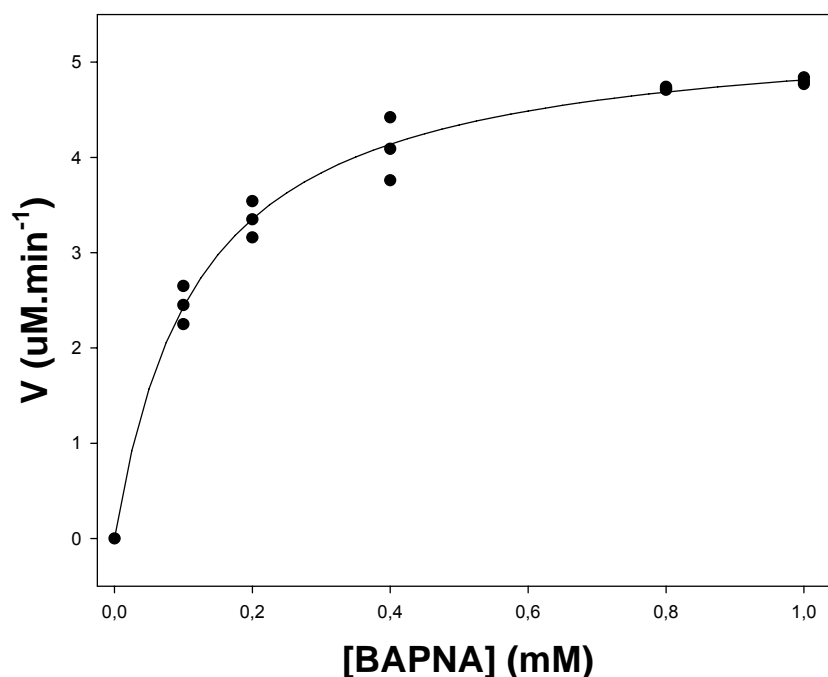


Figura 18: Efeito da concentração do substrato L-BAPNA na velocidade da reação catalisada pela enzima solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*.

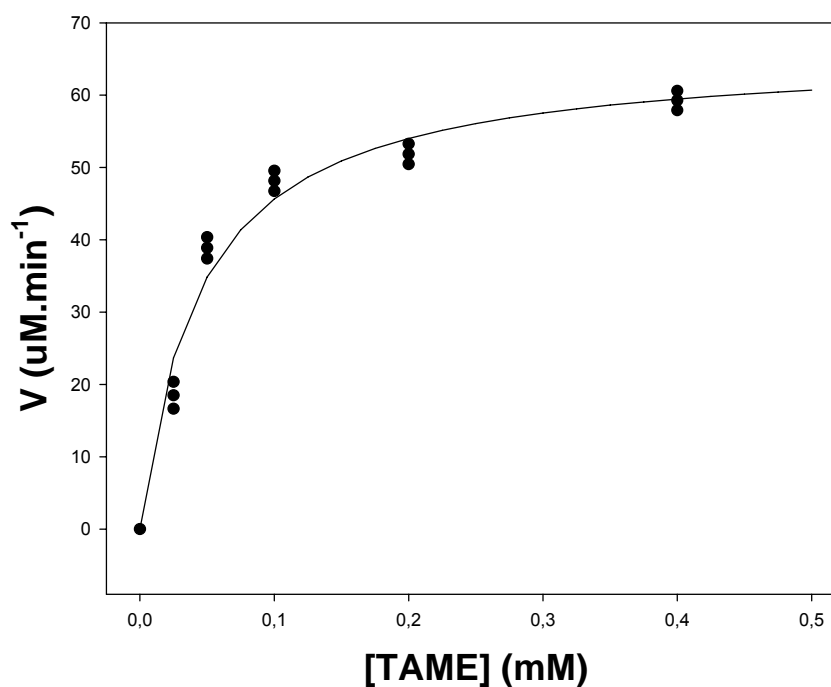
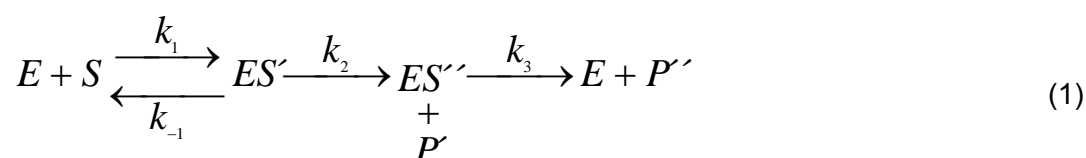


Figura 19: Efeito da concentração do substrato L-TAME na velocidade da reação catalisada pela enzima solúvel *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis*.

O menor valor de  $K_M$  e a maior relação  $V_{m\acute{a}x}/K_M$  para o substrato L-TAME em relação ao L-BAPNA é descrito na literatura. Ensaios realizados com substratos éster e amida demonstraram que substratos éster, como L-TAME,

normalmente apresentam maior eficiência catalítica em relação aos substratos amida. A diferença observada está relacionada com o mecanismo da reação catalisada por serino-proteinases, envolvendo diferenças na etapa limitante da reação para os substratos, Eq.1.



A etapa limitante da velocidade na hidrólise de ligações amida por enzimas *tripsina-likes* é a formação do complexo acil-enzima ( $k_2$ ), enquanto na hidrólise de ligações éster é a deacilação ( $k_3$ ), com a consequente formação do produto. No caso de um substrato éster específico  $k_2$  pode ser maior que  $k_3$  cerca de 1 a 3 ordens de magnitude (Inagami, 1972; Hedstrom, 2002).

#### 3.3.4.4- Avaliação do efeito de inibidores e de íons cálcio

A atividade enzimática da *tripsina-like* de *A.gemmatalis* foi testada na presença de inibidores, conforme metodologia descrita no item 3.2.8. Um resumo dos resultados obtidos é apresentado na Tabela 3.

Como esperado, a enzima foi sensível a inibição por PMSF, um inibidor clássico de serino proteinases (Barrett, 2001), por aprotinina (Laskowski e Kato, 1980) e por inibidores de tripsinas, TLCK (Shaw *et al.*, 1965), benzamidina (Mares-Guia e Shaw, 1965) e indicando o envolvimento do resíduo de serina e histidina em seu sítio ativo. No entanto, a inibição da enzima *tripsina-like* por PMSF foi menor que a observada por TLCK e

benzamidina. A inibição parcial por PMSF em relação a benzamidina foi também relatada em amostras do extrato do intestino de *Helicoverpa armigera*.

Tabela 3- Efeito de inibidores e cálcio na atividade da enzima solúvel *tripsina-like* de *A.gemmatalis* expressos em relação ao controle, na ausência do inibidor

Inibidores	Concentração	Atividade residual (%) <sup>a</sup>
PMSF	0,4 mM	74,8 ± 0,12
	0,8 mM	68,4 ± 0,06
	1,6 mM	53,1 ± 0,07
TLCK	5 µM	63,1 ± 0,24
	10 µM	41,1 ± 0,14
	20 µM	13,0 ± 0,07
TPCK	10 µM	101,5 ± 2,19
	50 µM	103,12 ± 4,41
	100 µM	103,12 ± 4,41
Benzamidina	1 µM	71,8 ± 0,04
	10 µM	49,0 ± 0,24
	100 µM	25,3 ± 0,27
Aprotinina	0,5 µM	71,4 ± 0
	1,0 µM	42,8 ± 0
	2,0 µM	21,4 ± 0
SBBI	0,5 µM	79,6 ± 0,46
	2,5 µM	29,4 ± 0,35
	5,0 µM	19,4 ± 0,07
SBTI	0,1 µM	77,0 ± 0,14
	0,5 µM	50,7 ± 0,07
	1,0 µM	22,9 ± 0,28
E-64	1 µM	75,0 ± 0,28
	5 µM	45,8 ± 0,14
	10 µM	32,6 ± 0,21
CaCl <sub>2</sub>	5 mM	101,1 ± 1,41
	10 mM	101,1 ± 1,41
	20 mM	98,2 ± 2,47

<sup>a</sup> Os valores representam a média de três determinações ± desvio padrão  
Substrato usado: L-BApNA

A benzamidina inibiu 98% da atividade da amostra testada e o PMSF (2 mmol.L<sup>-1</sup>) inibiu apenas 28% (Bown *et al.*, 1997). A atividade proteolítica do

extrato do intestino de *A. gemmatalis* foi inibida por PMSF com  $IC_{50}$  de  $1,39 \text{ mmol.L}^{-1}$  e pela benzamidina com  $IC_{50}$  de  $76 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , utilizando também o BApNA como substrato (Pereira *et al.*, 2005). Observação semelhante foi relatada por Xavier e colaboradores (2005). A diferença de sensibilidade entre os inibidores foi atribuída à não homogeneidade da amostra, uma vez que não utilizaram amostras puras. Entretanto, o PMSF é um inibidor irreversível de reação lenta, cuja inibição é tempo-dependente, podendo a inibição parcial ser decorrente do tempo de incubação (Barrett *et al.*, 2001).

A atividade enzimática não foi inibida pelo TPCK, um inibidor de quimiotripsina, reforçando sua classificação como uma enzima *tripsina-like*. O inibidor E-64, embora amplamente usado como padrão para identificação de cisteíno proteases (Sreedharan *et al.*, 1996) foi capaz de inibir a enzima *tripsina-like* de *A.gemmatalis* e a atividade enzimática não foi alterada na presença de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de DTT. Esta observação não surpreendeu, pois já é descrito que o E-64 atua inibindo tripsinas de várias espécies de lepidópteras (Jongsma *et al.*, 1996; Novillo *et al.*, 1997, 1999; Gatehouse *et al.*, 1997), bem como  $\beta$ -tripsina comercial por mecanismo de competição (Sreedharan *et al.*, 1996). Por modelagem computacional observou-se que a inibição da  $\beta$ -tripsina envolve duas interações eletrostáticas. Uma interação ocorre entre o cátion do butilguanidina do E-64 com o ânion carboxilato do aspartato no sítio S1 e a outra entre o carboxilato do C-2 do anel epóxido do E-64 com um resíduo de lisina (Sreedharan *et al.*, 1996). Em lepidópteras a inibição pode ser explicada pela interação do resíduo carregado Arg 73, extremamente conservado em

tripsinas tipo-I destes insetos, com o carboxilato do E-64, contribuindo para estabilizar o complexo (Díaz-Mendonza *et al.*, 2005).

A atividade da enzima *tripsina-like* não foi afetada pela presença de íons cálcio nas concentrações testadas (Tabela 3). O efeito de íons cálcio na atividade e estabilidade de tripsinas de inseto ainda não é conclusivo. Vários trabalhos indicam que as tripsinas de inseto não são afetadas por íons cálcio (Marchetti *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2006; Terra and Ferreira 1994, 2005), sendo descrito que o motivo de ligação de cálcio, normalmente observado em tripsinas de mamíferos, não ocorre na maioria das sequências de tripsinas de insetos (Lopes *et al.*, 2006). Entretanto, é também relatada a importância dos íons cálcio na atividade de tripsinas de alguns insetos (Wagner *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005; Budatha *et al.*, 2008).

Os inibidores de proteases de planta, SBTI (inibidor de tripsina da soja, tipo Kunitz (Song and Sun, 1998)) e SBBI (inibidor de tripsina da soja, tipo Bowman-Birk (Lin *et al.*, 1993)), também foram testados com a enzima obtida (Tabela 3). Ambos foram capazes de inibir a enzima *tripsina-like* de *A. gemmatilis*, reduzindo a atividade em até 80% na maior concentração testada, embora diferenças na arquitetura destes inibidores podem ter resultado na diferença de sensibilidade da enzima à inibição (Volpicella *et al.*, 2003). Ensaio *in vitro* têm demonstrado que ambos inibidores são bastante eficientes na redução da atividade de enzimas *tripsina-like* de lepidópteros. Cerca de 88% da atividade *tripsina-like* de *Spodoptera litura* foi inibida na presença de SBTI (McNanus e Burgess, 1996). Em *Spodoptera exigua* 45-72 % da atividade *tripsina-like* foi inibida por SBTI e SBBI (Jongsma *et al.*, 1996). Entre vários

inibidores proteicos testados em duas enzimas *tripsina-like* de *Sesamia nonagroides*, SBTI e SBBI foram os mais eficientes, uma vez que foram capazes de inibir as duas enzimas, apresentando o menor valor de IC<sub>50</sub>. Para uma das tripsinas testadas o valor IC<sub>50</sub> do SBBI foi 2 µmol.L<sup>-1</sup> e do SBTI 0,1 µmol.L<sup>-1</sup> (Novillo *et al.*, 1999). A manipulação da expressão endógena desses inibidores nas plantas de soja objetivando defesa anti-herbívora pode ser alcançada, entretanto, ensaios *in vivo*, realizados através da incorporação destes na dieta devem ser previamente realizados. Tem sido demonstrado que *in vivo* o efeito destes inibidores não corresponde às expectativas quando comparado aos efeitos *in vitro* devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos insetos (Broadway, 1995; Jongsma *et al.*, 1995; Bown *et al.*, 1997). Por exemplo, a atividade trípica do extrato de intestinos de *Helicoverpa zea* foi reduzida em 95% na presença de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> de SBTI comparados a apenas 2% de inibição utilizando a mesma concentração de inibidor após a larvas terem sido alimentadas com dieta suplementada com o SBTI (Volpicella *et al.*, 2003). Além disso, deve-se considerar que os ensaios *in vitro* normalmente são realizados em larvas do último instar e sabe-se que as tripsinas que participam da digestão não são as mesmas durante o todo o desenvolvimento dos insetos (Diáz-Mendonza *et al.*, 2005). Desta forma, para que um inibidor de protease seja selecionado ou projetado de maneira apropriada objetivando a proteção sustentável de culturas, o conhecimento da diversidade das proteases do inseto-alvo e de como o perfil da expressão dessas enzimas varia em resposta a presença do inibidor na dieta são ainda necessários (Telang *et al.*, 2005; Diáz-Mendonza, 2005).

### 3.3.4.5- Cromatografia de fase reversa

A amostra da enzima obtida após a cromatografia de troca-aniônica foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, conforme descrito no item 3.2.4.3, como última etapa de purificação com objetivo de preparar a amostra para realização de análises de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e seqüenciamento do N-terminal pelo método de Edman. O cromatograma obtido é apresentado na figura 20.

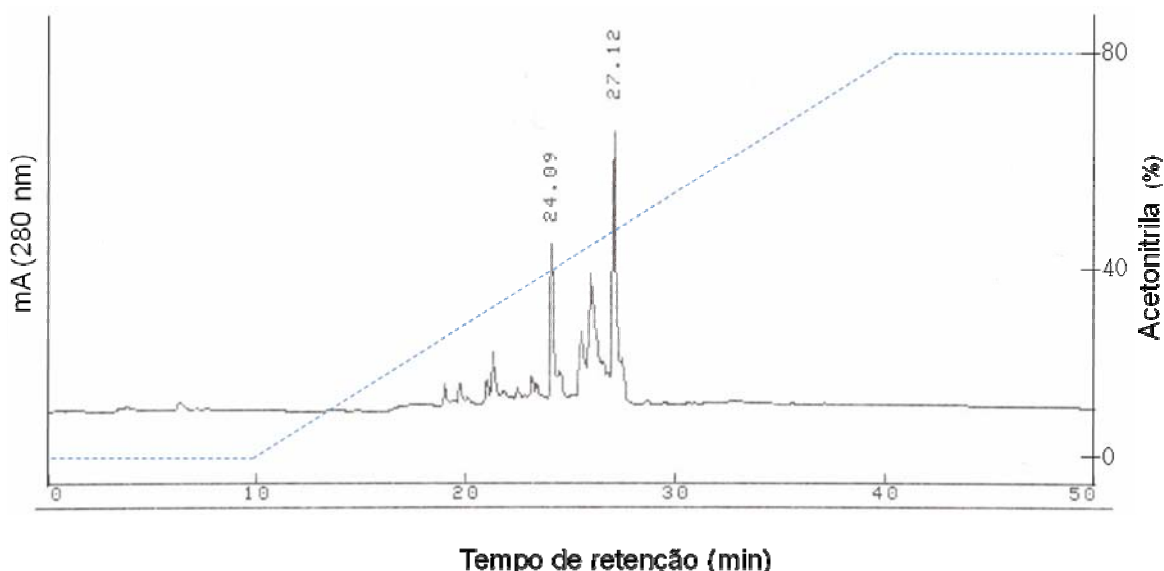


Figura 20: Cromatografia de fase reversa (LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)) da enzima solúvel *trypsina-like* do intestino de *A. gemmatalis*

Foram observados dois picos principais, sendo que um deles, com tempo de retenção de 24,09 minutos, eluiu em tempo idêntico ao observado na amostra da enzima de membrana (Capítulo 4, Figura 27B). Ambos foram coletados e submetidos às análises moleculares. Entretanto, não foram obtidos resultados satisfatórios. Alguns fatores podem ter contribuído para o insucesso das tentativas realizadas, como a quantidade de amostra e a presença de contaminantes. Além disso, sabe-se que diversas modificações pós-

tradicionais podem ocorrer no resíduo N-terminal da proteína, como metilação, acetilação, ciclização, entre outras, tornando-a inacessível para o seqüenciamento pelo método de Edman (Walling, 2006).

#### **3.3.4.6- Obtenção de peptídeos trípticos e análise por espectrometria de massa**

A amostra da enzima *tripsina-like* obtida após cromatografia de troca-aniônica foi separada por SDS-PAGE (item 3.2.5) e a fração do gel correspondente foi submetida à digestão tríptica *in situ*, como descrito no item 3.2.10. Os peptídeos trípticos obtidos foram analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e seu perfil (*peptide mass fingerprint*) está representado na figura 21.

As massas dos peptídeos trípticos obtidos foram confrontados com uma lista de massas teóricas de peptídeos obtidos pela digestão *in silico* de todas as proteínas disponíveis no banco de dados utilizado, MSDB, utilizando o programa MASCOT e respeitando os parâmetros de busca previamente determinados (item 3.2.10). Para cada proteína no banco de dados é obtido um *score*, que leva em consideração, por exemplo, o tamanho do banco de dados, o tamanho da proteína, a frequência de um determinado peptídeo dentro da proteína, etc. Desta forma, quanto maior o *score* obtido maior a possibilidade daquela proteína estar presente na sua amostra.

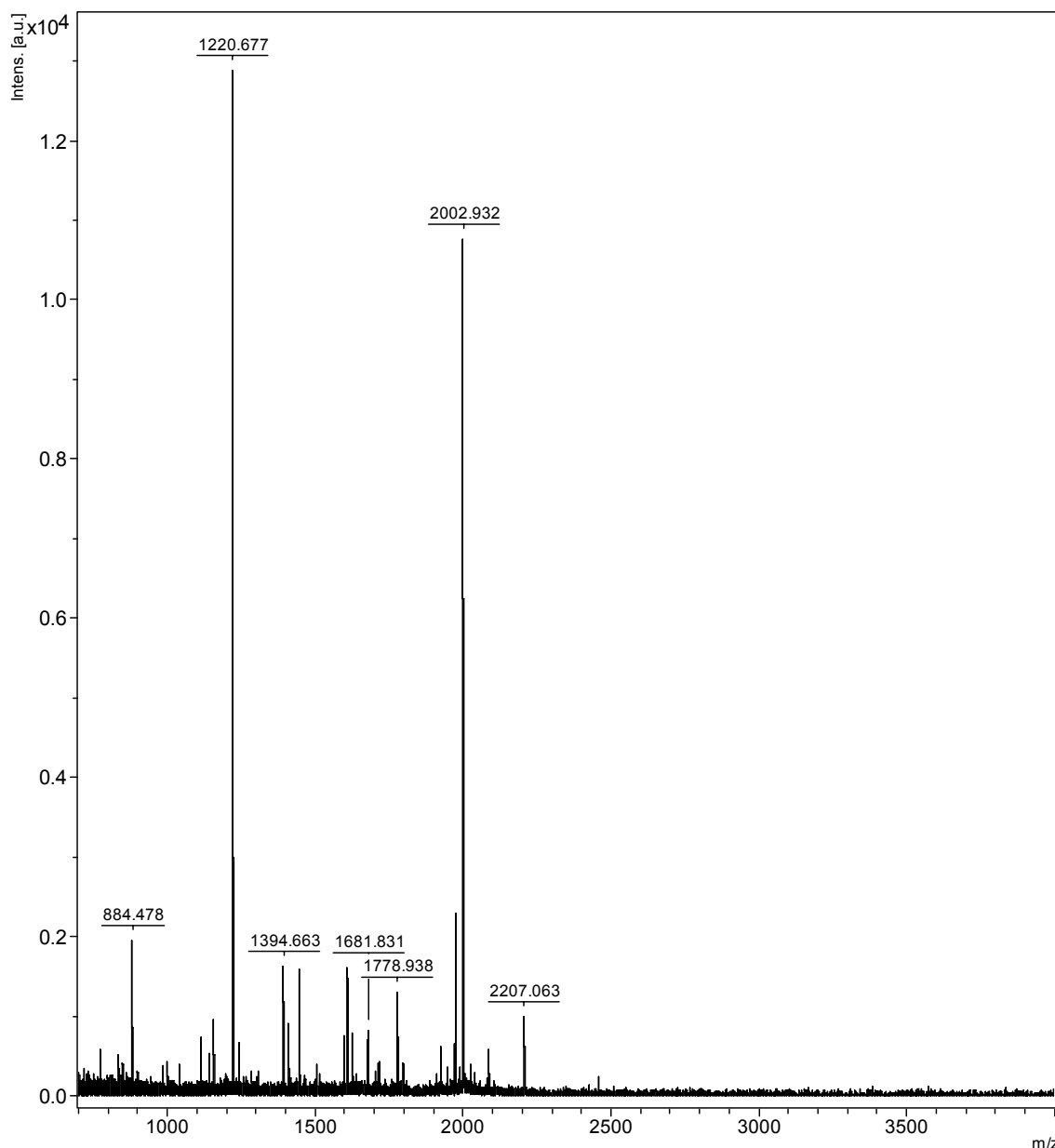


Figura 21: Perfil dos peptídeos trípticos da enzima *tripsina-like* de *Anticarsia gemmatalis* analisados por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Os peptídeos foram obtidos após separação da amostra oriunda da cromatografia de troca-aniônica por SDS-PAGE e digestão tríptica *in situ*.

Na análise dos dados, não foi observada nenhuma proteína cujo resultado tenha sido significativo, ou seja, apresentasse um *score* > 59, que foi definido pelo programa usado. A figura 22 ilustra a distribuição dos *scores* obtidos. Quando o *score* é significativo a probabilidade desta análise ser um efeito randômico é menor que 5%.

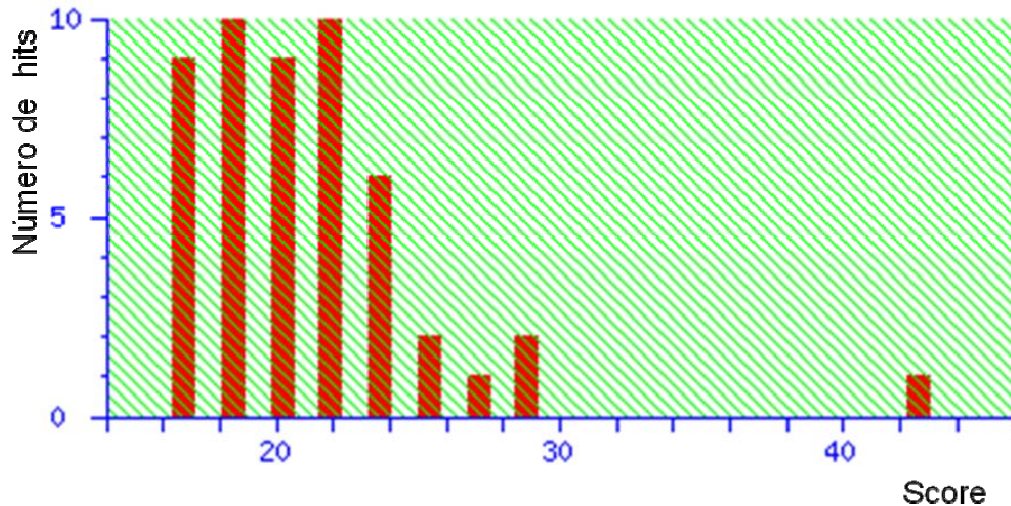


Figura 22: Distribuição do score na análise dos fragmentos trípticos da enzima solúvel *trypsina-like* de *A.gemmatalis* realizada pelo MASCOT

Entretanto, o maior score obtido (43) identificou o fragmento de 1394,66 Da, na sequência de uma enzima *trypsina-like* de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) (acesso Q6R561\_OSTNU), cuja massa é de ~27 kDa. É interessante também observar que o mesmo peptídeo foi identificado em outras proteínas, porém, com score muito menor do que o obtido com a enzima *trypsina-like*. A tabela 4 lista os dez maiores scores obtidos.

Embora esse fosse o resultado esperado, a identidade da amostra da enzima solúvel *trypsina-like* do presente trabalho não pôde ser estabelecida, pois seria necessário que pelo menos dois ou três peptídeos fossem coincidentes, representando a cobertura de 10 a 15% da sequência da proteína. Vários são os aspectos que podem influenciar na qualidade da busca por coincidência entre os dados experimentais e os teóricos, tornando a análise mais difícil. Por exemplo, eficiência de ionização dos peptídeos individuais, alguns peptídeos não co-cristalizam com a matriz, portanto não são ionizados e não aparecem no espectro; alguns sinais presentes no espectro não estão

presentes na sequência teórica obtida, como peptídeos modificados, splicing alternativo, presença de peptídeos contaminantes, etc (Liebler, 2002). Além disso, a ausência do genoma e de sequências de proteínas do gênero *Anticarsia* nos bancos de dados limita a qualidade da análise, mesmo obtendo um bom espectro de massas dos peptídeos tripticos.

**Tabela 4-** Resumo da análise dos fragmentos tripticos da enzima solúvel *tripsina-like* de *A. gemmatalis* pelo MASCOT

Massa do peptídeo observado	Proteína- identificação	Score
<b>1394,6626</b>	Trypsin-like proteinase T25.- Ostrinia nubilalis (European corn borer) - Q6R561_OSTNU	<b>43</b>
<b>1394,6626</b>	RE09982p.- Drosophila melanogaster (Fruit fly)- Q7YU28_DROME	29
1220,6768	RNA polymerase beta subunit (Fragment).- Bacillus thuringiensis- Q93QU0_BACTU	28
<b>1394,6626</b>	Glucose dehydrogenase [acceptor] precursor (EC 1.1.99.10)- DHGL_DROME	27
1220,6768	Hypothetical metallo-beta-lactamase superfamily protein.- Sulfolobus acidocaldarius -Q4JB02_SULAC	26
1220,6768	Dihydrolipoamide dehydrogenase.- Polaromonas sp. JS666- Q4AX08_9BURK	26
1220,6768	Dual specificity S/Y phosphatase.- Mimivirus- Q5UR74_MIMIV	24
<b>1394,6626</b>	Related to transport protein USO1 (Hypothetical protein NCU03578.1).- Neurospora crassa - Q873K7_NEUCR	24
1778,9384	RNA-dependent RNA polymerase (Fragment).- Eyach virus- Q8QVD1_9REOV	24
1220,6768	Exonuclease.- Pseudomonas fluorescens (strain Pf-5 / ATCC BAA-477)- Q4K8Z1_PSEF5	23

### 3.4- CONCLUSÕES

Uma protease digestiva solúvel *tripsina-like* de larvas de *Anticarsia gemmatalis* foi obtida através da combinação de uma cromatografia de afinidade e de uma cromatografia de troca-aniônica. A massa molecular estimada da enzima foi de 24,9 kDa (SDS-PAGE). A enzima apresentou maior

atividade em pH alcalino e em temperaturas entre 25°C e 35°C, para os substratos L-TAME e L-BApNA, respectivamente. A enzima foi capaz de hidrolisar substrato protéico em gel de substrato (caseína) e os substratos sintéticos éster (L-TAME) e amida (L-BApNA), cujos valores da  $K_M$  foram 0,12 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,049 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os íons cálcio não afetaram a atividade enzimática nas concentrações testadas. A enzima foi sensível à inibição por inibidores típicos de serino-proteinases e tripsina, como PMSF e benzamidina, respectivamente. Sua atividade não foi alterada pelo inibidor de quimiotripsina, TPCK, embora tenha sido reduzida pelo E-64, reforçando o questionamento do seu uso como diagnóstico de cisteíno-proteinases em lepidópteros. Os inibidores proteicos derivados da soja, SBTI e SBBI, foram eficientes na redução da enzima tornando-se candidatos a estudos posteriores *in vivo*, através da incorporação dos mesmos na dieta das larvas. Essa etapa é fundamental para uma avaliação adequada do potencial de inibição dessas substâncias frente às respostas adaptativas do inseto. A identidade da proteína não pôde ser estabelecida através da busca por homologia dos peptídeos trípticos em banco de dados, embora um fragmento tenha sido coincidente com uma enzima *tripsina-like* de outro inseto da mesma ordem. Além disso, a busca nos bancos de dados demonstrou a carência de informações sobre este inseto, que ainda é considerado uma das principais pragas da cultura da soja.

#### **4. PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA *TRIPSINA-LIKE* LIGADA À MEMBRANA DO INTESTINO DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA)**

##### RESUMO

A *Anticarsia gemmatalis* é uma das principais pragas que ataca a cultura da soja. Os enormes prejuízos causados pelo ataque da lagarta associados à importância econômica da soja para o Brasil, fomentam a busca por alternativas no controle deste inseto. O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque herbívoro utilizando genes de inibidores de proteases digestivas (PIs) tem sido considerado uma alternativa viável. O sucesso desta estratégia, porém, depende do conhecimento do processo digestivo básico do inseto alvo, das enzimas que compõe seu repertório proteolítico e da sensibilidade destas aos inibidores. Este trabalho descreve a purificação de uma enzima *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de larvas do 5º instar de *Anticarsia gemmatalis*. Após a amostra ter sido solubilizada com detergente (CHAPS) e separada por cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina) e de troca-aniônica (Resource- Q), uma única banda proteica foi observada em SDS-PAGE, com atividade proteolítica em gel de substrato. O rendimento deste processo foi de 11,16% e a atividade específica da enzima foi de 18,61  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  proteína. A massa molecular determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF) foi de 28.632 Da. A enzima de membrana apresentou semelhanças nos perfis cromatográficos e eletroforéticos com a forma solúvel sendo considerada a possibilidade da enzima de membrana ser precursora da enzima solúvel, como é descrito em outros insetos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Anticarsia gemmatalis*, enzima *tripsina-like* ligada à membrana, Lepidoptera, protease digestiva

#### 4.1- INTRODUÇÃO

Nos insetos, a digestão dos polímeros componentes da dieta é compartimentalizada pela presença da membrana peritrófica, que atua separando o conteúdo do lúmen intestinal das células digestivas epiteliais. As moléculas de enzimas, os nutrientes e os produtos da digestão são espacialmente separados nos espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, resultando em uma digestão seqüencial das moléculas poliméricas (Tellam, 1996). A digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico enquanto a digestão intermediária e final ocorrem no espaço ectoperitrófico e nas células epiteliais do intestino médio, respectivamente (Terra *et al.*, 1996).

As proteases digestivas são consideradas excelentes alvos de agentes inseticidas, especialmente por exercerem um papel crucial na ativação de toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* e por interagirem com os inibidores de proteases (Budatha *et al.*, 2005). Sabe-se que, tanto as toxinas produzidas por *B. thuringiensis*, quanto os inibidores de proteases ingeridos pelos insetos, interagem com seus alvos em regiões específicas do intestino médio e, em alguns casos, de maneira seqüencial. O conhecimento do processo digestivo do inseto alvo, envolvendo aspectos bioquímicos e morfológicos da compartimentalização da digestão, torna-se, portanto, um pré-requisito para que estratégias de controle que atuam via intestino sejam bem sucedidas (Terra *et al.*, 1996).

Através da combinação de procedimentos bioquímicos e citológicos, estudos da localização e dos mecanismos de secreção de tripsina nos insetos tem evoluído. Em *Musca domestica* foi demonstrado que a tripsina é

sintetizada ligada à membrana de vesículas secretórias e solubilizada durante a exocitose em função de uma modificação conformacional induzida pelo pH do lúmen intestinal (Jordão *et al.*, 1996). Em *Tenebrio molitor*, a tripsina ocorre na forma de um precursor solúvel, em pequenas vesículas próximas a região apical da membrana plasmática das células da região posterior do intestino médio, sugerindo secreção por exocitose, seguida de ativação (Cristofolletti *et al.*, 2001). Em Lepidoptera há evidências de que a tripsina solúvel seja derivada de uma tripsina ligada à membrana de vesículas secretórias (Eguchi *et al.*, 1982). Através de ensaios de imunolocalização de tripsina em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) foi sugerido um modelo de secreção para a enzima. A tripsina seria sintetizada ligada à membrana de vesículas secretórias e, por meio de secreção apócrina as vesículas seriam liberadas no lúmen intestinal. Posteriormente, parte da enzima seria processada (proteólise ou dissolução da membrana por efeito do pH alcalino) tornando-se solúvel e, parte, ainda ligada à membrana das vesículas, seria incorporada à membrana peritrófica. Essa incorporação é significativa, representando 18% da atividade triptica do lúmen do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999). A presença de atividade *tripsina-like* ligada à membrana do intestino foi também relatada em *Anticarsia gemmatalis* (Xavier *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005) motivando esse trabalho com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre as enzimas digestivas desta espécie e desta forma contribuir para que novas estratégias de controle atuando vias sistema digestivo sejam desenvolvidas.

## 4.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais empregados na purificação da enzima *tripsina-like* ligada à membrana foram os mesmos descritos no Capítulo I, referentes à purificação da enzima solúvel (criação dos insetos- item 3.2.1; ensaios enzimáticos e de determinação de proteína- item 3.2.3; purificação enzimática- item 3.2.4; eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)- item 3.2.5; eletroforese em gel de substrato- item 3.2.6). As metodologias que diferiram são descritas a seguir.

### 4.2.1- Obtenção do extrato enzimático

Larvas do 5º instar previamente imobilizadas no gelo tiveram os intestinos extraídos e mantidos a -20°C em solução de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> pH 3,0, na proporção de 5 intestinos por mL de solução. Os intestinos foram submetidos a um processo de lise celular através de ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 37°C (Oliveira *et. al.*, 2005). A suspensão obtida foi centrifugada a 100.000 g por 45 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado. O pellet foi ressuspenso em solução de HCl 1 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 3,0 contendo 0,5% de CHAPS (Sigma). O CHAPS foi o detergente de escolha por ter sido eficiente na solubilização de enzimas *tripsina-like* de membrana de outros insetos (Jordão *et al.*, 1999; Cristofolletti e Terra, 1999) e por não absorver em 280 nm. Após 16 horas a 4°C o material foi centrifugado a 44.800 g por 60 minutos. O sobrenadante foi separado e

posteriormente concentrado por ultrafiltração em um dispositivo Amicon 8400 utilizando-se uma membrana com poro limite de 10 kDa (Millipore®). Este material (extrato não-solúvel concentrado, ENSC), foi conservado a -20°C para uso posterior como fonte de enzima para purificação

#### **4.2.2- Determinação da massa molecular por espectrometria de massa**

A amostra da enzima *tripsina-like* proveniente da cromatografia de fase reversa foi incorporada a uma solução saturada da matriz ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (1:3; v: v), aplicada em uma placa de MALDI e deixada secar a temperatura ambiente por 15 minutos. A massa da proteína foi obtida em um espectrômetro de massa MALDI-TOF AUTOFLEX III (Bruker®) no modo linear positivo, com calibração externa, usando o padrão de calibração de proteínas II (Bruker®) para calibração de moléculas por espectrometria de massa: tripsinogênio  $[M+ H]^+ = 23982$ ; proteína A  $[M+ H]^+ = 44613$ ; albumina-bovina  $[M+ H]^+ = 66431$ ; protein A  $[M+ 2H]^{2+} = 22306$ , albumina-bovina  $[M+ 2H]^{2+} = 33216$  (Bruker Daltonics®). A interpretação do espectro de massa foi realizada utilizando-se o Software FlexAnalysis (Bruker Daltonics®).

### 4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1- Purificação da enzima digestiva *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

A enzima *tripsina-like* ligada à membrana foi obtida após duas etapas cromatográficas a partir do extrato não solúvel concentrado (ENSC), de maneira semelhante à enzima solúvel, esquematizado na figura 8. É importante ressaltar que a obtenção do extrato envolve o processo de lise celular através de ciclos de congelamento-descongelamento o que evita a contaminação do material do pellet com a tripsina solúvel durante a centrifugação. Moléculas de tripsina solúvel que eventualmente estão associadas frouxamente à membrana peritrófica ou glicocálice ou mesmo presentes no interior de vesículas secretórias nas células intestinais são liberadas para a fração solúvel (Terra e Ferreira, 1994; Jordão *et al.*, 1996). Durante as etapas de purificação a atividade enzimática foi determinada utilizando-se o substrato L- BApNA, e o teor proteico determinado pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico, como descrito no item 3.2.3. Um resumo das etapas de purificação é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5- Etapas de purificação da enzima *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total <sup>a</sup> ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Atividade específica <sup>a</sup> ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}/\text{mg}$ )	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato concentrado (ENSC)	47,58	6	0,13	1	100
Afinidade(p-aminobenzamidina agarose)	0,69	3,52	5,10	39,23	58,66
Troca-aniônica (Resource-Q)	0,036	0,67	18,61	143,15	11,16

<sup>a</sup>Substrato usado: L-BApNA

O perfil cromatográfico da primeira etapa da purificação está representado na Figura 23.

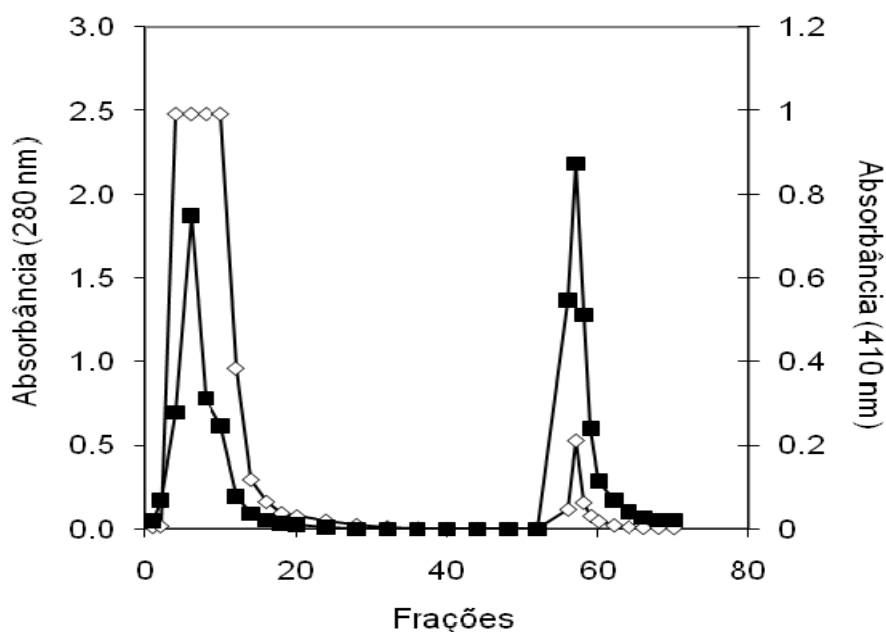


Figura 23: Perfil cromatográfico do extrato não solúvel concentrado do intestino de *Anticarsia gemmatalis* em coluna de p-aminobenzamidina-agarose equilibrada com Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5. As proteínas foram eluídas em glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 3,0. Substrato usado: L-BApNA. Absorvância em 410 nm (■); absorvância em 280nm (◇).

O perfil assemelha-se ao observado pela amostra da enzima solúvel (Figura 9), observando-se também dois picos de atividade para o substrato testado. As frações ativas correspondentes ao pico retido na coluna foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de troca-aniônica, em uma Resource Q (item 3.2.4.2). O perfil cromatográfico desta etapa está representado na Figura 24.

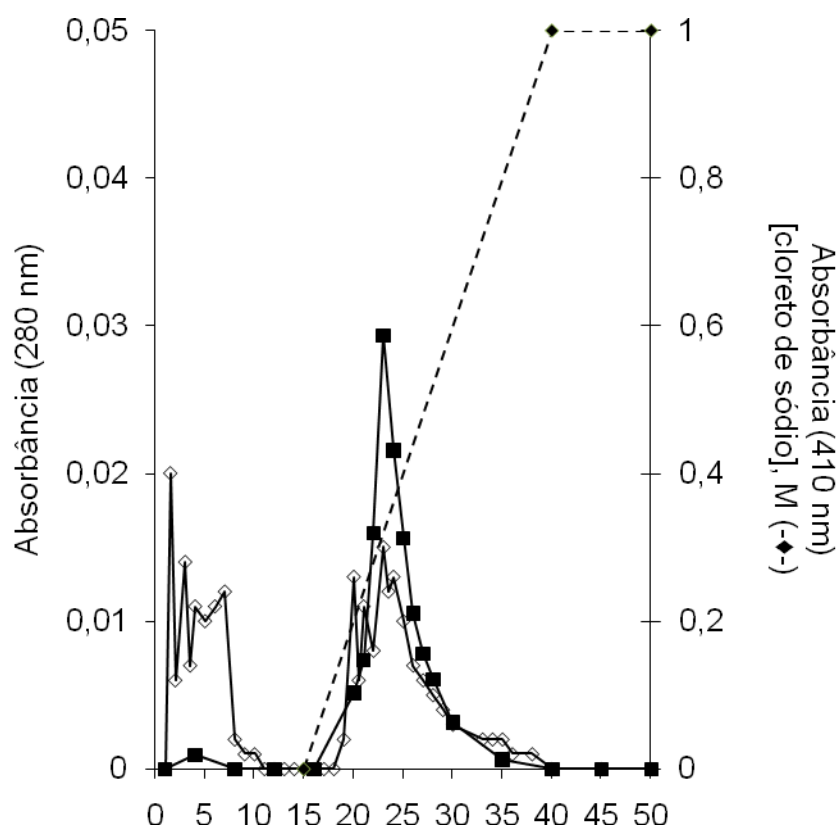


Figura 24: Perfil cromatográfico da troca-aniônica em Resource Q da fração enzimática ligada à membrana do intestino de *Anticarsia gemmatalis* pós- cromatografia de afinidade. A coluna foi equilibrada com tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6. As proteínas foram eluídas por um gradiente salino crescente de 0 a 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl em tampão glicina 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,6. Substrato usado: L-BApNA. Absorbância em 410 nm (■); absorbância em 280nm (◇); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (---).

A eluição da amostra ligada à membrana após a troca iônica também foi semelhante ao observado pela fração solúvel. Um pico proteico aniônico com atividade foi eluído com aproximadamente 0,3 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl. As frações mais ativas deste pico foram reunidas e ao final deste processo o fator de purificação da enzima foi de 143 vezes, apresentando um rendimento de 11,16%, menor que o obtido pela amostra solúvel, coerente com o descrito na literatura. A solubilização e recuperação da tripsina ligada à membrana do intestino de *Musca domestica* foi menor que a observada pela maioria de outras proteínas intrínsecas da membrana (Jordão *et al.*, 1996). Em *Spodoptera frugiperda* apenas 1,3% da tripsina do intestino médio foi recuperada da fração ligada à

membrana (Jordão *et al.*, 1999). Como conseqüência do baixo rendimento e atividade específica a caracterização cinética não foi realizada.

A eficiência das etapas de purificação foi acompanhada através da separação das respectivas amostras por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, sob condições desnaturantes, conforme descrito no item 3.2.5. O perfil de migração das proteínas presentes em cada etapa está representado na Figura 25 A.

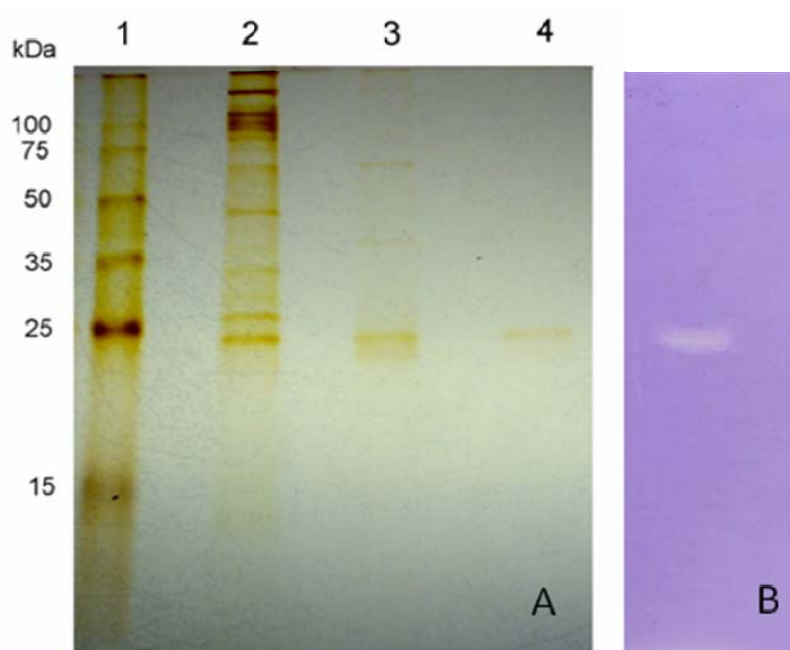


Figura 25: (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12,5 %) das etapas de purificação da enzima *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. 1- marcadores de massa molecular; 2- extrato não solúvel concentrado; 3- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose); 4- fração enzimática pós cromatografia de troca aniônica (Resource-Q). As amostras foram coradas pelo método da prata; (B) Atividade proteolítica da amostra correspondente a linha 4 (A) após separação em SDS-PAGE (12,5%) e incubação com solução de caseína 2%. O gel foi corado por Comassie.

Uma única banda foi observada na fração pós-troca aniônica, tanto no gel corado pela prata (Figura 25A) quanto na fração correspondente após ensaio de atividade em gel de substrato, indicando sua atividade proteolítica (Figura 25B)

As semelhanças observadas nos perfis cromatográficos e eletroforético entre as amostras das enzimas *tripsina-like* solúvel e de membrana de *Anticarsia gemmatalis* estão em concordância com o descrito na literatura. Proteases solúvel e de membrana do intestino médio de *Bombyx mori* apresentaram semelhanças no perfil de migração em Sepharose 6B e em propriedades imunológicas (Eguchi *et al.*, 1982; Eguchi e Kuriyama, 1985). Em *Musca domestica*, as tripsinas solúvel e de membrana do intestino apresentaram propriedades cinéticas e físicas semelhantes, como pH ótimo,  $K_M$ ,  $k_i$ , entre outras (Lemos e Terra, 1992). Em ambos os casos foi sugerido que as proteases presentes no lúmen intestinal seriam derivadas de amostras ligadas à membrana. Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), foi evidenciado por imunolocalização que a forma solúvel de tripsina também é derivada de uma forma ligada à membrana (Jordão *et al.*, 1999), o mesmo podendo ocorrer em *Anticarsia gemmatalis*.

#### **4.3.2. Determinação da massa molecular por SDS-PAGE**

A massa molecular da enzima *tripsina-like* ligada à membrana foi estimada em SDS-PAGE de maneira semelhante ao descrito para a enzima solúvel (item 3.3.2). A distância percorrida pela enzima *tripsina-like* no gel foi de 46 mm, o que resultou em valor estimado de massa molecular de aproximadamente 24,9 kDa (Figura 26).

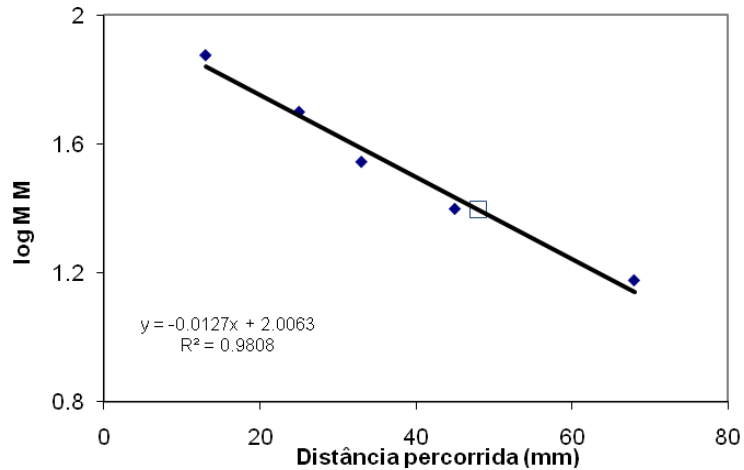


Figura 26: Determinação da massa molecular da *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. Marcadores de massa molecular (♦), amostra (□).

A massa molecular estimada para ambas as formas de tripsina (solúvel e ligada à membrana) de *A. gemmatalis* foi idêntica, semelhante ao observado com as tripsinas do intestino de *Musca domestica* (Lemos e Terra, 1992; Jordão *et al.*, 1996). De acordo com o modelo de secreção da tripsina em *Musca domestica* proposto por Jordão e colaboradores (1996) a tripsina estaria ancorada à membrana de vesículas secretórias por meio de um peptídeo hidrofóbico que seria mantido após a solubilização por meio de uma alteração conformacional induzida pelo pH intestinal durante o processo de exocitose, explicando a mesma massa molecular observada. Em lepidópteras, no entanto, foi proposto um modelo de secreção microapócrina, onde a tripsina também estaria ancorada à membrana por um peptídeo hidrofóbico, porém a solubilização poderia ocorrer por efeito do pH intestinal ou por proteólise limitada (Jordão *et al.*, 1999).

#### 4.3.3- Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A amostra a ser analisada por espectrometria de massa foi previamente concentrada, utilizando-se Centricon (Millipore®) e posteriormente submetida a uma cromatografia de fase reversa em uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) (Merck®), conforme descrito no item 3.2.4.3. O perfil cromatográfico desta etapa está representado na figura 27A. No perfil representado pela figura 27B a amostra foi previamente liofilizada, ressuspensa em 0,1% TFA e submetida à cromatografia de fase reversa, como descrito, com um gradiente de eluição de 30 minutos.

O tempo de retenção da amostra na coluna, 42,29 minutos (Figura 27A), correspondente a concentração de aproximadamente 43% de acetonitrila, foi semelhante ao observado por uma  $\beta$ -tripsina bovina (45,15 minutos) nas mesmas condições de análise (Figura 28). A diferença no caráter hidrofóbico entre a tripsina bovina e a enzima de *A. gemmatalis* pode estar relacionada a diversidade na sequência de tripsinas de insetos (Lopes et al., 2004). Foi observado também semelhança com o tempo de retenção da enzima solúvel (Figura 20), quando ambas as formas foram separadas utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila de 30 minutos (Figura 27 B).

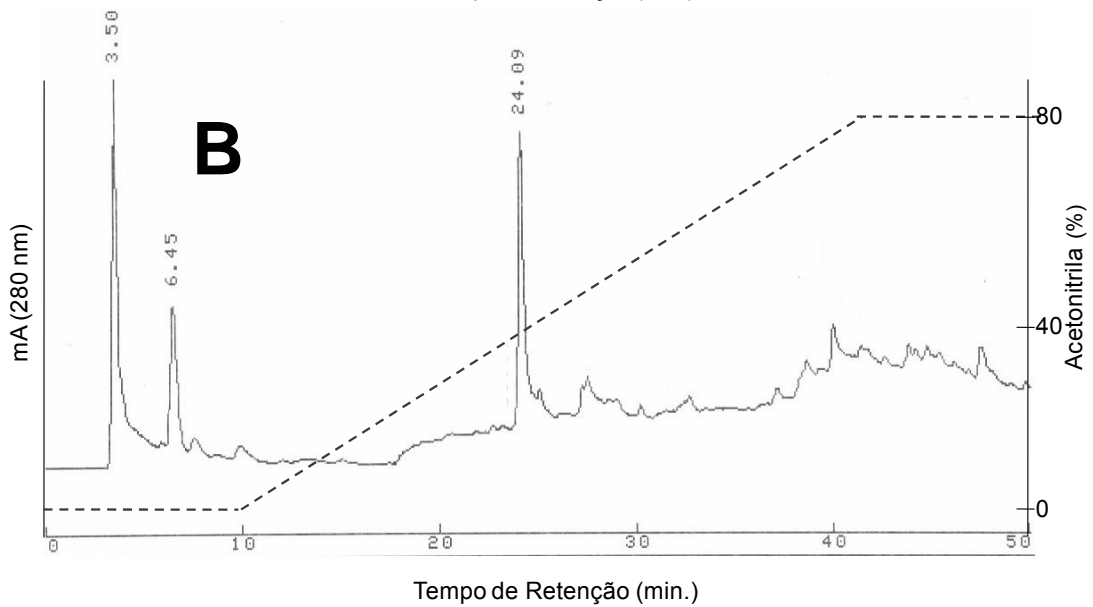
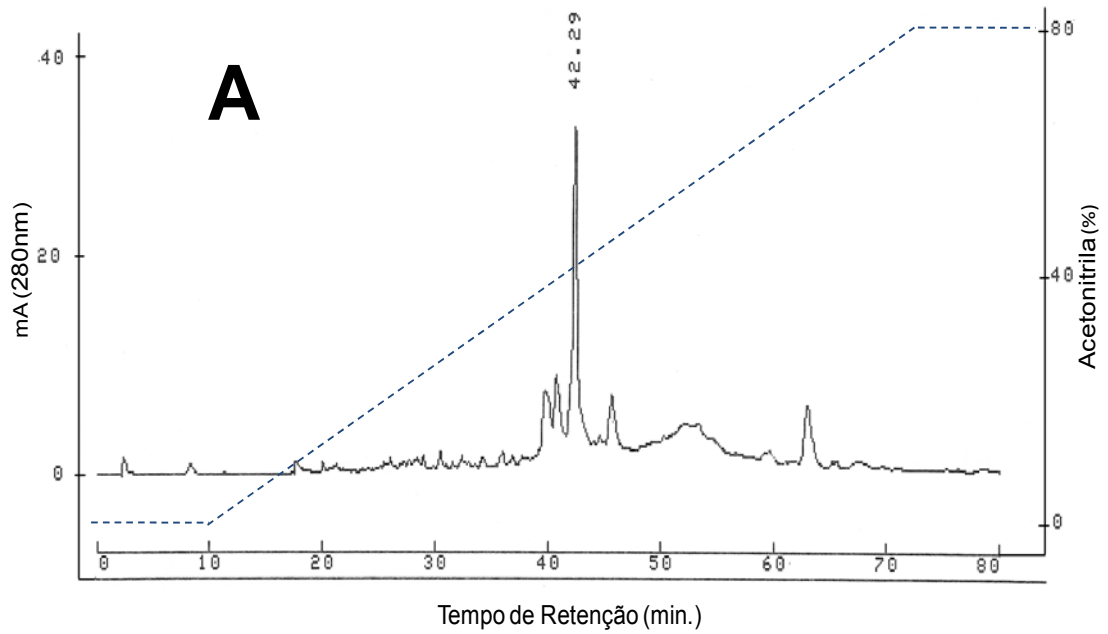


Figura 27: Cromatografia de fase reversa (coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 $\mu$ m)) da enzima *tripsina-like* ligada à membrana do intestino de *A. gemmatalis*. A: gradiente de 60 minutos; B: gradiente de 30 minutos.

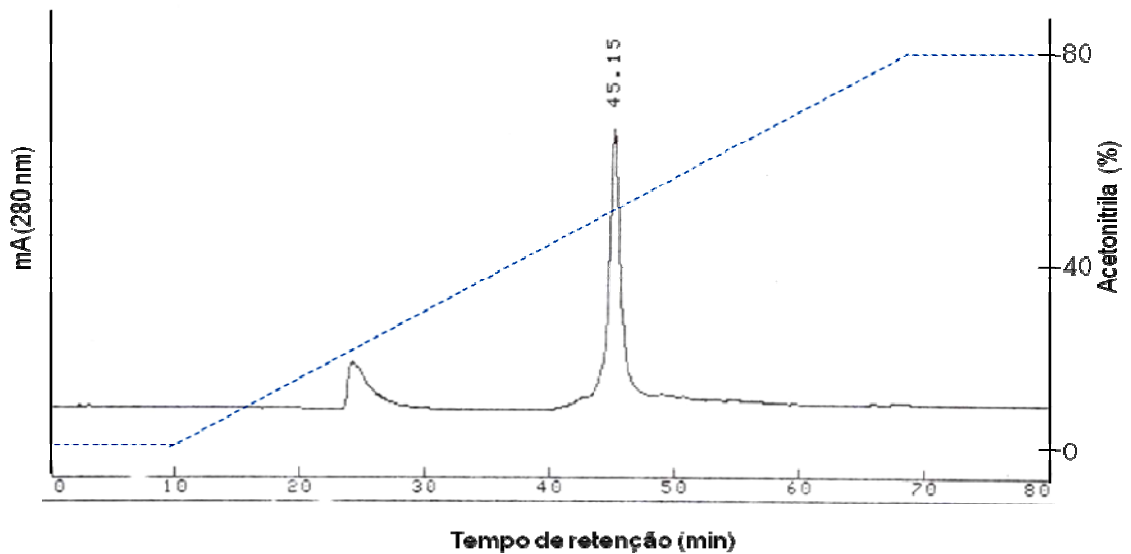


Figura 28: Cromatografia de fase reversa (LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)) da β-tripsina bovina (Castro, T.S, 2008- dado não publicado)

A amostra da enzima de *A. gemmatalis* correspondente ao pico eluído em 42,29 minutos na fase reversa foi concentrada em centrífuga com vácuo Univapo® 100 H (Uniequip) e analisada por espectrometria de massas conforme descrito no item 3.2.2. O espectro obtido é apresentado na figura 29.

A análise do espectro evidencia a presença de um pico de 7.058,26 Da, um de 14.139,51 Da e um de 28.632,90 Da, sendo notável a diferença na intensidade do sinal entre os mesmos, com a predominância do pico de 14.139,515 kDa.

A interpretação imediata do espectro sugere que a proteína tenha massa molecular de 14.139,515 Da. A observação do pico de 28.632,906 Da, contudo, sugere que a proteína pode ser um dímero composto por duas subunidades de 14.139,515 Da que se dissociaram sob as condições experimentais utilizadas na preparação da amostra e análises. Pode-se considerar também que a proteína seja um monômero de 28.632,906 Da e, nesse caso, o pico de 14.139,515 Da representaria sua dupla carga  $(M + 2H)^+$ . No entanto, a

interpretação adequada do espectro deve ser feita em conjunto, considerando-se algumas características do método de ionização usado, da amostra em questão e também dos resultados complementares.

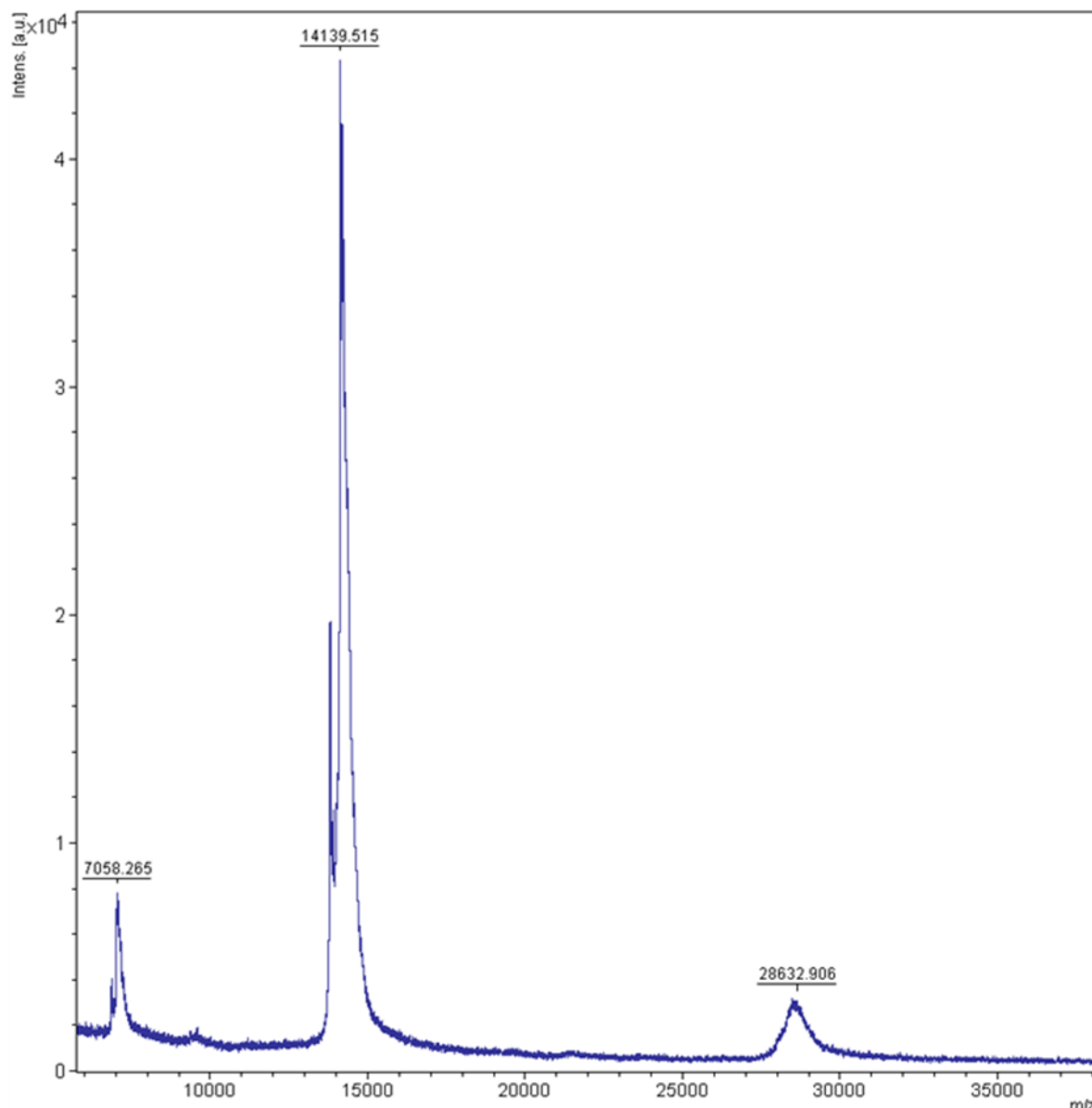


Figura 29: Espectro de massa (MALDI-TOF) da enzima *trypsin-like* ligada à membrana do intestino de *A. gemmatalis*

A ionização das moléculas pelo método usado, MALDI, é considerada “suave” e resulta predominantemente na geração de íons monocarga ( $M + H$ )<sup>+</sup>, sendo observado traços de íons dupla carga e de formas diméricas (Trauger *et al.*, 2002). Entretanto, é descrito que íons de proteínas de múltiplas cargas

podem ser observados pelo método MALDI-TOF dependendo das condições experimentais. Por exemplo, a escolha da matriz, a solução da matriz, a relação matriz/ amostra, as condições de cristalização e o método de deposição da amostra na placa, são fatores que podem interferir na ionização da amostra (Liu e Schey, 2008). Foi observado que matrizes com elevada energia de ionização, como ácido- $\alpha$ -ciano-4- hidroxí-cinâmico, usado neste trabalho, promovem a formação muito maior de cargas múltiplas de proteínas. A própria carga e a intensidade do sinal estão relacionadas com a maneira como a amostra é preparada e depositada na placa de análise, dificultando relacionar a altura do pico com a quantidade de amostra (Liu e Schey, 2008). Desta forma, o pico de ~14 kDa observado no espectro de massas do presente trabalho, não representa necessariamente a monocarga ou a espécie mais abundante da amostra.

A massa molecular de enzimas *tripsina-like* da maioria dos insetos varia entre 20 kDa e 35 kDa (Terra e Ferreira, 1994), embora tenha sido descrita uma tripsina digestiva de 17,000 Da em *Locusta migratoria* (Lam et al., 2000) e em *Heliothis virescens* (Brito et al., 2001), além de uma tripsina ligada à membrana do intestino de *Bombyx mori* de 12,8 kDa (Eguchi e Kuriyama, 1985). A estrutura de tripsinas é bastante conservada entre vertebrados e invertebrados, e consiste basicamente de uma única cadeia polipeptídica. Uma diferença importante observada entre essas tripsinas é o número de resíduos de cisteína, conseqüentemente, o número e a localização das pontes dissulfeto. As enzimas do *tripsina-likes* de diversas espécies de vertebrados comumente apresentam seis pontes dissulfeto, enquanto alguns insetos e

crustáceos apresentam apenas três em posições conservadas, pois ficam próximas do sítio ativo da enzima (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Não foram observados resíduos de cisteína livres conservados nas sequências de tripsinas tipo I ou III de lepidópteras, embora dois resíduos de cisteína livres sejam conservados nas tripsinas tipo II de *Sesamia nonagroides*. Entretanto, estes resíduos estão situados muito longe um do outro para formar uma ponte dissulfeto (Díaz-Mendonza *et al.*, 2005). Não há registro na literatura da ocorrência de tripsinas de insetos formadas por mais de uma subunidade, entretanto, já foi relatada a formação de oligômeros de tripsinas e serino-proteinases de insetos em determinadas condições (Oppert, 2006; Wagner *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2001; Jordão *et al.*, 1996). Em *Heliothis virescens* foi observada a formação de oligômeros (dímeros e trímeros) de tripsinas SDS-resistentes em larvas alimentadas com inibidores de serino-proteinases. O caráter mais hidrofóbico dos monômeros de tripsina de 17 kDa e 29 kDa, teria resultado na formação de oligômeros mais estáveis (Brito *et al.*, 2001).

É proposto que em alguns insetos a enzima *tripsina-like* ligada à membrana esteja ancorada à mesma por um peptídeo hidrofóbico que seria mantido após a solubilização da enzima (Jordão *et al.* 1996, 1999). Considerando-se que a amostra da figura 29 é uma proteína de membrana, podendo conter, portanto, o peptídeo hidrofóbico de ancoragem, é possível supor que interações hidrofóbicas poderiam levar à formação de dímeros SDS-resistentes, como observado por Brito e colaboradores (2001). Nesse caso, o pico de 14.139,515 Da observado no espectro de massa corresponderia ao monômero (ou subunidade) da proteína e a massa estimada em SDS-PAGE de

25 kDa corresponderia ao dímero, representado pelo pico de ~28,6 kDa (Figura 29). A baixa amplitude do pico de 28,6 kDa poderia ser explicada pelas condições de preparação da amostra e ionização, que poderiam romper a interação hidrofóbica, estabilizando a amostra principalmente na forma monomérica (14.139,515 Da). Entretanto, não é de se esperar que durante a corrida eletroforética as interações hidrofóbicas sejam mantidas mesmo após a amostra ter sido submetida à fervura e estar na presença de SDS. Considerando-se, porém, o resultado do SDS-PAGE, as características acima descritas das moléculas de tripsina de insetos, e também as particularidades do processo de ionização de proteínas pelo MALDI, também acima descritas, conclui-se que a massa molecular da enzima é 28.632,906 Da ( $M+H^+$ ). Os demais picos observados no espectro de massas representariam os íons dupla-carga (14.139,515 Da) e tetra-carga (7058.265 Da).

A diferença da massa em SDS-PAGE (~25 kDa) e a massa determinada por espectrometria de massa (28.632,906 Da) é relativamente grande, mas, sabe-se que um grande número de fatores pode influenciar a mobilidade eletroforética em SDS-PAGE e que, em função disto, o erro médio estimado na determinação da massa molecular por esta técnica é de  $\pm 10\%$  (Hames, 1990; Goetz *et al.*, 2004). Em *Locusta migratoria* (Lepidoptera) foi observada uma diferença de até 20% entre a massa de três tripsinas estimadas por SDS-PAGE e determinadas por MALDI-TOF (Lam *et al.*, 2000). Portanto, considera-se a massa determinada por MALDI-TOF, cuja resolução e acurácia variam normalmente entre  $\pm 0,2\%$  a  $0,005\%$  (Trauger *et al.*, 2002).

#### 4.4- CONCLUSÕES

Uma enzima *tripsina-like* presente na fração não solúvel do extrato de intestino de larvas de *A. gemmatalis* foi obtida após solubilização com detergente (CHAPS) e separação por cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina) e de troca-aniônica (Resource-Q). O processo de purificação resultou em baixo rendimento e atividade específica da enzima, comparada à forma solúvel. A massa molecular da enzima determinada pelo método de MALDI-TOF é de 28.632 Da. Foram observadas semelhanças nos perfis cromatográficos e eletroforéticos entre a enzima de membrana e a enzima solúvel. Ambas eluíram com praticamente o mesmo teor de NaCl na cromatografia de troca-aniônica, apresentaram tempo de retenção semelhante na coluna de fase reversa e a mesma massa molecular estimada por SDS-PAGE. Há a possibilidade da enzima de membrana ser precursora da enzima na forma solúvel. A realização de ensaios complementares além de elucidar a relação entre as duas formas da enzima podem contribuir para que a enzima de membrana se torne um alvo alternativo de agentes inseticidas atuando no controle deste inseto via intestino.

## 5. CONCLUSÕES

- Duas enzimas *tripsina-like*, uma solúvel e uma de membrana, foram obtidas a partir do extrato de intestino de larvas do 5° instar de *A. gemmatalis*; através da combinação de uma cromatografia de afinidade e de uma cromatografia de troca-aniônica
- A massa molecular estimada em SDS-PAGE para ambas as enzimas foi de 24,9 kDa
- A massa molecular da enzima de membrana (MALDI-TOF) é 28.632,906 Da
- As enzimas solúvel e de membrana apresentaram atividade proteolítica em gel de substrato (caseína) após separação por SDS-PAGE
- A enzima solúvel apresentou atividade esterásica e amidásica, demonstrada através da hidrólise dos substratos sintéticos L-TAME e L-BApNA, respectivamente
- A enzima solúvel apresentou atividade ótima em pH 9,0 e a 35°C utilizando-se o substrato L-BApNA e em pH 8,0 e a 25°C utilizando-se L-TAME
- A  $K_M$  determinada para o substrato L-BApNA foi 120  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e para o substrato L-TAME 49  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

- A atividade da enzima solúvel não foi afetada pela presença de íons cálcio nas concentrações testadas indicando que o motivo de ligação de cálcio não é conservado entre as tripsinas de insetos
- A atividade da enzima solúvel foi reduzida na presença do inibidor E-64, cujo uso na triagem de cisteíno-proteinases em amostras de lepidópteras deve ser analisado com cautela
- Os inibidores proteicos derivados da soja, SBBI e SBTI foram capazes de reduzir significativamente a atividade da enzima solúvel nas concentrações testadas
- A análise do perfil da digestão triptica da enzima solúvel pelo programa MASCOT não resultou em dados significativos, embora um dos fragmentos tenha apresentado um *score* elevado com uma enzima tipo-tripsina de *O. nubilalis* (Lepidoptera). A carência de sequências de genes e proteínas do gênero *Anticarsia* em bancos de dados pode ter contribuído para tal resultado
- Foi observado um baixo rendimento e atividade da enzima de membrana comparada à enzima solúvel
- As enzimas solúvel e de membrana apresentaram semelhanças nos perfis eletroforéticos e cromatográficos sugerindo a possibilidade da forma de membrana ser precursora da forma solúvel, como é descrito em outros insetos

## 6. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da ingestão dos inibidores SBTI e SBBI no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* através da incorporação de diversas concentrações destes na dieta das larvas
- Avaliar diferenças no perfil das proteínas e da atividade proteolítica do extrato do intestino em diferentes estágios de desenvolvimento de larvas alimentadas ou não com os inibidores
- Obter anticorpos a partir da enzima solúvel para realização de ensaios de imunolocalização
- Realizar a caracterização molecular das duas formas da enzima

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol.**,v.71, p.391-398, 2004.

ASCERNO, M.E. Insect phenology and integrated pest anagement. **Journal of Arboriculture**, v.17,p.13-15, 1991

BARBARA, K.A. **Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. Disponível em: <<http://creatures.ifas.ufl.edu>>, acessado em 13 de fevereiro de 2006.

BARRET, A.J. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: Beynon, R.; Bond, J.S., **Proteolytic Enzymes: a practical approach (2<sup>a</sup> ed.)**. Oxford University Press, Oxford, 1-21, 2001.

BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; DEMO,C.; MARTINI, E.S.; PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; BROD, C.S.; MONNERAT, R.G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis***. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.82, EMBRAPA, 2005. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp082.pdf>, acessado em 14 de fevereiro de 2006.

BERNARDI, R; TEDESCHI, G.; RONCHI, S.; PALIERI, S. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Htibner (Lepidoptera: Pyralidae). **Insect Biochem. Molec.Biol.**, v.26, p.883-889, 1996.

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

BODE, W.;HUBER, R. Natural protein inhibitors and their interactions with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v.204, p.433-451, 1992

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. 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**,v.27, p.625-638, 1997.

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be

mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Parte B, v.128, p.365-375, 2001.

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

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.855-874, 1997.

BUDATHA, M.; MEUR, G.; DUTTA-GUPTA. Identification and characterization of midgut proteases in *Achaea janata* and their implications. **Biotechnol. Lett.**, v.30, p.305-310, 2008.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic plants. **Trends in Plant Science**, v.11, p.302-308, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/PR/Soja%20Abril%202009.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2009.

CRISTOFOLETTI, P.T.; TERRA, W.R. Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p.807-819, 1999.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.47; p.143-155, 2001.

De LEO, F.; BOTTINO, M.B.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.593-602, 2001.

DIÁZ-MENDONZA, M.; ORTEGO, F.; LACOBÁ, M.G.; MAGAÑA, C.; de la POZA, M.; FARINÓS, G.P.; CASTÑERA, P.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v.35, p.1005-1020, 2005.

EGUCHI, M., KURIYAMA, K. Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from midgut tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Biochem.**, v.97, p.1437-1445, 1985.

EGUCHI, M.; IWAMOTO, A.; YAMAUCHI, K. Intercalation of proteases from the midgut lumen, epithelia and peritrophic membrane of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.72, p.359-363, 1982.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v.15, p.13-19, 2006.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion on Biotechnology**, v.15, p.155-161, 2004.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v.15, p.13-19, 2006.

GARCIA-CARREÑO, F.L.; DIMES, L.E.; HAARD, N.F. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v.214, p.65-69, 1993.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v.156, p.145-169, 2002.

GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. **Genetic engineering of plants for insect resistance**. [http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcigl\\_Chapter/GM\\_InsectResistant\\_Plants](http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcigl_Chapter/GM_InsectResistant_Plants), acessado em 31 de janeiro de 2006.

GATEHOUSE, L.; SHANONON, A.; BURGESS, E.; CHRISTELLER, J. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and change in gene expression in response to four proteinase inhibitors in diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.929-944, 1997.

GOETZ, H., KUSCHEL, M., WULFF, T., SAUBER, C., MILLER, C., FISCHER, S., WOODWARD, C. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, p.281-293, 2004.

HAMES, B.D. One-dimensional polyacrylamida gel electrophoresis. In: Hames, B.D., Rickwood, D. (Eds.), **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, 1990.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v.102, p.4501-4523, 2002.

HERRERO, S.; COMBES, E.; VAN OERS, M.M.; VLAK, J.M.; MAAGD, R.A.; BEEKWILDER, J. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.1073-1082, 2005.

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

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

INAGAMI, T. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K.; MURACHI, T.; NARITA, K. **Proteins structure and function**. Tokyo, Kodansha, p.1-83, 1972.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.885-895, 1997.

JONGSMA, M.A.; PETERS, J.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Characterization and partial purification of gut proteinases of *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v26, p.185-193, 1996.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.8041-8045, 1995.

JORDÃO, B.P.; CAPELLA, A.N.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**, v.45, p.29-37, 1999.

JORDÃO, B.P.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, A.F.; LEHANE, M.J.; FERREIRA, C. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p.337-346, 1996.

KREM, M.M.; ROSE, T.; DI CERA, E. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.28063-28066, 1999.

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

LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.85-94, 2000.

LASKOWSKI, M.JR., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual review of Biochemistry**, v.49, p. 593-626, 1980.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, p93-109, 2002.

LEMOS, F.J.A.; TERRA, W.R. A high yield preparation of *Musca domestica* larval midgut microvilli and the subcellular distribution of amylase and trypsin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.433-438, 1992a.

LEMOS, F.J.A.; TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.613-619, 1992b.

LIEBLER, D.C. **Introduction to proteomics. Tools for the new biology**. Totowa: Humana Press Inc., 2002. p. 198.

LIN, G.; BODE, W.; HUBER, R.; CHI, C.; ENGH, R.A. The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. **Eur. J. Biochem.**, v.212, p.549-555, 1993.

LIU, Z.; SCHEY, K.L. Fragmentation of multiply-charged intact protein ions using MALDI TOF-TOF mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, p.231-238, 2008.

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

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

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

MARCHETTI, S.; CHIABÁ, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PIOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, p. 449-458, 1998.

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

MAZUNDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.645-657, 2001.

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

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

McMANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MCGREGOR, P.G. Accumulation of the chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Res.**, v.3, p.50-58, 1994.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.14, p.71-81, 2002.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA GÓMES, D. R.; PARO, F. E., SOLDORIO, I. L.. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidade) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect. **Biol. Control**, v.20, p.247-253, 2001.

MOSCARDI, F.; BARFIELD, C.S.; ALLEN, G.E. Effects of temperature on adult velvetbena caterpillar oviposition, egg hatch and longevity. **Annals of Entomology Society of America**, v.74, p.167-171, 1981.

MUHLIA- ALMAZÁN, A.; SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCIA-CARREÑO, F.L. Invertebrate trypsins: a review. **J. Comp. Physiol. B**, v.178, p.655–672, 2008.

NATION, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry**, CRC Press, p.485, 2001.

NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P., ORTEGO F. Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p.247-254, 1997.

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

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

PAGE, M.J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, p.1220-1236, 2008.

PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOS, A.; HECKEL, D. G.; PREISS, S. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. **Journal of Proteome Research**, v.7,p.1629-1639, 2008.

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

PEREIRA, M.E.; DÖRR, F.A.; PEIXOTO, N.C.; LIMA-GARCIA, J.F.; DÖRR, F.; BRITO, G.G. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1633-1641, 2005.

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

PIUBELLI, G.C.; CAMPO, C.B.H.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, v.31, p.1509-1525, 2005.

PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. *Anticarsia gemmatalis*/ Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae:). Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006 (Série Documento, 196).

Protein Data Bank: banco de dados. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em 13 abr. 2009

SHAW, E.; MARES-GUIA, M.; COHEN, W. Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethylketone derived from N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine. **Biochemistry**, v.4, p.2219-2224, 1965.

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. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner.) **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p.67-74, 2002.

SILVA-FIALHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento**, v.12, p.38-42, 2000.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.15, p.76-85, 1985.

SONG, H.K.; SUH, S.W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. **J. Mol.Biol.**, v. 275, p.347-363, 1998.

SREEDHARAN S.K.; VERMA, C.; CAVES, L.S.D.; BROCKLEHURST, S.M.; GHARBIAS, S.E.; SHAH, H.N.; BROCKLEHURST, K. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido- (4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by minimization and molecular dynamics simulation of the E-64-  $\beta$ - trypsin complex. **Biochem.J.**, p.777-786, 1996.

SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.11, p.132-154, 2006.

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

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

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: Lehane, M.J.; Billingsley, R.F., **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall, London, p.86-114, 1996.

TERRA, W.R., FERREIRA, C.; BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: Lehane, M.J.; Billingsley, R.F., **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall, London, p.206-231, 1996a.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L.; IATROU, K.; GILL, S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science, Biochemistry and Molecular Physiology**. Oxford, Elsevier, 2005. v.4, p.171-224.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.109B, p.1-62, 1994.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B.P.; DILON, R.J. Digestive enzymes. In: Lehane, M.J.; Billingsley, R.F., **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall, London, p.154-194, 1996b.

TRAUGER, S.A.; WEBB, W.; SIUZDAK, G. Peptide and protein analysis with mass spectrometry. **Spectroscopy**, v.16, p.15-28, 2002.

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

WAGNER, W.; MÖRHEN, F.; SCHETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melontha melontha* (Coleoptera: Bostrichidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p.803-814, 2002.

WALLING, L.L. Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. **Current Opinion in plant biology**, v.9, p.227-233, 2006.

WARBURG, O; CHRISTINA, W. In: harris, D.A.; Bashford, C.L., **Spectrophotometry e spectrofluorimetry: a pratical approach**. Oxford, Washington, 1987.

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

ZAVALA, J.A.; PATANKAR, A.G.; GASE, K.; HUI, D.; BALDWIN, I.T. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. **Plant Physiology**, v.134, p. 1181-1190, 2004.

## APÊNDICE

Preparo da dieta artificial da lagarta, baseada na metodologia de Hoffmann-Campo e colaboradores (1985)

A dieta artificial é composta de feijão (mulatinho), levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Estes ingredientes são processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura é autoclavada por 1 hora à pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> 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) e água (1 L); até formar uma pasta homogênea que é então transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida é resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .