



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Daniel Alexandre

Investigação sobre a Adaptação do Inseto Praga de  
Cereais *Tenebrio molitor* a Inibidores de Proteinases  
Digestivas

Dissertação Apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
visando à obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva

**Florianópolis, setembro de 2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

A3811 Alexandre, Daniel  
Investigação sobre a adaptação do inseto praga de cereais  
*Tenebrio molitor* a inibidores de proteíases digestivas  
[dissertação] / Daniel Alexandre ; orientador, Carlos Perea  
Silva. - Florianópolis, SC, 2010.  
97 p.: il., graf., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Inseto. 3. Digestão. 4. Interação  
animal-plantas. 5. Inibidores de proteases. I. Silva,  
Carlos Perea. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente aos meus pais Genico Alexandre e Ivete Mercedes Alexandre, que me apoiaram mesmo a distância e sempre me encorajaram a seguir em frente.

Ao meu orientador Dr. Carlos Peres Silva, pela paciência e incentivo ao abrir as portas do seu laboratório para eu fazer um estágio ainda no período em que era aluno especial e posteriormente por me fornecer a bolsa a que foi contemplado no CNPq e por ser em muitas ocasiões meu único amigo.

À Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, que abriu as portas do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFSC.

Ao Dr. Hernán Terenzi, quem sempre disponibilizou os aparelhos e seus alunos para me auxiliar em diversas etapas do desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Javier Vernal, pela paciência e tempo dispensado para ensinar os procedimentos das cromatografias, que foram tão importantes para a conclusão deste trabalho.

À Dr. Célia Regina Carlini que coordena o programa PROCAD na região Sul, que me permitiu realizar algumas etapas do trabalho em seu laboratório e a toda a sua equipe que tão bem me recebeu, especialmente ao Dr. Diogo Demartini quem me auxiliou diretamente nas tarefas desenvolvidas.

À professora Marlei Primon, que me iniciou e me preparou para todo o caminho que percorri, sem ela eu não chegaria aqui.

Aos meus irmãos Jefersson Alexandre, Kátia Cilene Alexandre e Carina Cristina Alexandre que me apoiaram e me incentivaram e sei que sempre continuarão a me incentivar.

Aos meus tios Dirceu Gonçalves e Maria Ilaria Gonçalves e meus primos, que me acolheram aos finais de semana em que estive no Rio Grande do Sul.

Ao meu compadre Robson Douglas Tomazini e sua família pelas palavras de apoio e alegria quando mais precisei.

A todas aquelas pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram sendo nos trabalhos que realizei ou com alguma palavra de conforto e incentivo.

O meu sincero **OBRIGADO**.

## Lista de abreviaturas

APS.....	persulfato de amônio
ApTI.....	inibidor de tripsina de <i>Adenantha pavonina</i>
BCA .....	ácido bicinconínico
BTI.....	inibidor de tripsina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
DTT.....	ditiotreitól
E-64.....	trans-epoxisuccinil 4- guanidino butano
HCl.....	ácido clorídrico
IA.....	intestino            médio anterior
IP.....	intestino            médio posterior
mFRU.....	mli            unidade            de fluorescência relativa
SBI.....	inibidor de tripsina e quimotripsina de soja

SDS.....dodecil sulfato de sódio

STI.....inibidor de tripsina de soja

suc-AAPF-pNA.....succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanina-p-nitroanilina

bz-R-pNA.....benzoil-arginina-p-nitroanilina

z-RR-MCA.....N- $\alpha$ -carboxibenzil-arginil-arginina-7-amido-4-metilcumarina

z-PR-MCA.....N- $\alpha$ -carboxibenzil-fenilalanil-arginina-7-amido-4-metilcumarina

z-GGR-MCA.....N- $\alpha$ -carboxibenzil-glicinil-glicinil-arginina-7-amido-4-metilcumarina



## Lista de figuras e tabelas

Figura /Tabela	Página
Figura 1 – Esquema da digestão da larva do <i>T. molitor</i> e a relação com inibidores	26
Tabela 1 – Determinação de proteínas solúveis em intestino-médio de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> alimentadas em diferentes dietas.	50
Figura 2- Padrão de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com farinhas de diferentes sementes	53
Figura 3- Comparação entre os padrões de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com farinha de semente do feijão comum ( <i>P. vulgaris</i> ) e com dietas contendo inibidores purificados	54
Tabela 2 – Atividade dos homogeinizados	55

intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> e inibição <i>in vitro</i> das atividades	
Figura 4 - Atividade proteolítica dos homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com diferentes inibidores	60
Figura 5 - Comparação entre os padrões de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> mantidas em jejum e alimentadas com farelo de trigo e com dietas contendo inibidores purificados	61
Figura 6 - Curso temporal da indução de proteinases em <i>T. molitor</i> após a alimentação com inibidor	63
Figura 7 - Atividade proteolítica dos homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> após alimentação com o inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI)	64
Figura 8 - Fracionamento em coluna de troca iônica de homogeneizado intestinal de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com BTI	67

Figura 9 - Atividade das frações cromatográficas em coluna de troca iônica frente a diferentes substratos	70
Figura 10 - Perfil da filtração em Gel	71
Figura 11 - Fracionamento por eletroforese bidimensional de homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com farelo de trigo (controle, painel A) e com BTI (painel B)	72
Figura 12 - Zimograma bidimensional	73



## RESUMO

Nas larvas de *Tenebrio molitor* (verme do trigo) são encontrados variados tipos de proteinases digestivas serínicas e cisteínicas, quando alimentados com uma dieta controle de farinha de trigo. Quando alimentados com farinha do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), pelo menos cinco proteinases apresentam atividade mais elevadas, enquanto a expressão de três enzimas pré-existentes foi reprimida. A indução dessas proteinases ocorreu entre 30 min e 1 h após a alimentação. Aqui nós relatamos o fracionamento das proteinases envolvidas na adaptação de *T. molitor* a inibidores de proteinases em sementes de leguminosas incorporadas em uma dieta controle usando cromatografia de troca iônica e filtração em gel, seguida pela caracterização das enzimas com substratos e inibidores naturais e sintéticos. Os inibidores utilizados neste estudo (todos incorporados na concentração de 0,4% no farelo de trigo) foram: inibidor de tripsina de soja (STI), inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI), inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina* (ApTI) e o inibidor de tripsina de *P. vulgaris* (BTI). As atividades proteolíticas foram ensaiadas para azoalbumina, para os substratos fluorogênicos z-PR-

MCA, z-RR-MCA e succinil-GGR-MCA e os substratos cromogênicos suc-AAPF-pNA e benzoil-R-pNA. As atividades também foram monitoradas através de zimogramas e de fracionamento em géis bidimensionais. Dos quatro inibidores testados, o ApTI foi capaz de inibir as enzimas proteolíticas majoritárias sem induzir enzimas insensíveis a este inibidor, enquanto os outros inibidores além de inibir as proteinases constitutivas causaram indução de um conjunto diferente de proteinases serínicas. Entre as proteinases induzidas, uma era de interesse particular, pois foi induzida após sessenta minutos após a ingestão de SBI, STI e BTI. Esta proteinase teve sua atividade caracterizada como uma quimotripsina através de análise eletroforética bidimensional seguida de sequenciamento por espectrometria de massas.

Palavras chaves: digestão em insetos, interação inseto planta, inibidores de proteinases, indução de proteinases.

## ABSTRACT

*Tenebrio molitor* (the yellow mealworm) larvae possess several digestive serine and cysteine type proteinases when fed on a control diet of wheat flour. When fed on the common bean (*Phaseolus vulgaris*) flour, at least five proteinases were shown to have higher activities, while three pre-existing enzymes were found to be down-regulated. The induction of these proteinases occurred between 30 min and 1 h post-feeding. Here we report the fractionation of the *T. molitor* proteinases implicated in the adaptation of *T. molitor* to proteinase inhibitors from legume seeds incorporated in a control diet using ion-exchange chromatography and gel filtration, followed by characterization of the enzymes with synthetic substrates and inhibitors. The following inhibitors were used in this study (all incorporated at the concentration of 0.4% in wheat bran): Soybean trypsin inhibitor (STI), soybean trypsin and chymotrypsin inhibitor (SBI), *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor (ApTI) and *Phaseolus* trypsin inhibitor (BTI). Proteolytic activities were carried out toward azoalbumin, the fluorogenic substrates z-PR-MCA, z-RR-MCA and z-GGR-MCA, and

the chromogenic substrates suc-AAPF-pNA and benzoyl-R-pNA. Activities were also monitored through zymograms and fractionation on two-dimensional gel electrophoresis. Of the four tested inhibitors, only ApTI was capable of inhibiting the major proteolytic enzymes, while the other inhibitors caused induction of a different set of serine proteinases. Among the induced proteinases, one was of particular interest, because it was up regulated by SBI, STI and BTI. This chymotrypsin-like proteinase is currently being further characterized through bidimensional electrophoresis followed by mass spectrometry sequencing.

Key words: digestion of insects, interaction insect interaction, proteinase inhibitors seeds, induction of the proteinases.



## Sumário

	<b>Página</b>
1 – Introdução .....	21
1.1 - Considerações iniciais .....	21
1.2 - Organização da digestão em insetos....	23
1.3 -Adaptação dos insetos a inibidores de enzimas digestivas de origem vegetal .....	27
2. – Objetivos .....	34
2.1. – Objetivos específicos.....	34
3. – Matérias e reagentes utilizados.....	35
3.1. – Colônia de insetos.....	36
3.2. – Preparação de amostras.....	38
3.3. – Condições dos ensaios de hidrolases e determinação de proteínas ....	39

3.4. – Ensaio de atividade in gel (Zimograma).....	42
3.5. – Análise proteômica bidimensional do conteúdo luminal das larvas de <i>T. molitor</i> ...	44
3.6. – Fracionamento por cromatografia.....	45
3.7 – Análise estatística dos dados obtidos	46
4. – Resultados .....	48
4.1 – Diferenças morfológicas nas larvas após alimentação .....	48
4.2 –Efeito da ingestão de inibidores na perfil de atividade proteolítica em larvas de <i>T. molitor</i> .....	51
4.3 – Curso temporal das atividades proteolíticas após alimentação com inibidores.....	62
4.4 – Fracionamento por cromatografia dos homogeneizados intestinais de larvas de <i>T. molitor</i> alimentadas com BTI.....	65

4.5 - Análise bi-dimensional.....	68
5 – Discussão.....	74
5.1 - Organização da digestão em larvas de <i>T. molitor</i> .....	74
5.2 - Indução de enzimas digestivas frente à ingestão de inibidores de origem vegetal.	76
6 – Conclusão.....	88
7 – Perspectivas.....	90
8 – Referências bibliográficas.....	91



## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Considerações iniciais**

As perdas anuais resultantes dos ataques de insetos às plantações chegam à cifra de 30%, resultando em danos relativamente maiores para as populações carentes (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). O agravamento da fome, nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, é um reflexo do crescimento exponencial da população, que não é acompanhado, na mesma escala, por aumento da produção de alimentos. Essas perdas em alimentos e energia em potencial podem ser reduzidas com o emprego em grande escala de inseticidas, mas essa estratégia tem se mostrado cada vez mais onerosa aos produtores e danosa ao meio ambiente. Além disto, raças resistentes têm sido selecionadas, o que gera um ciclo vicioso, no qual maiores doses de inseticidas se tornam necessárias. Meios de controle baseados na biologia dos insetos e das plantas, os chamados meios de controle biorracionais, têm recebido cada vez mais atenção, tanto nos meios de entomologia médica quanto agrônômica.

Estudos na área de interação inseto-planta têm revelado que as plantas defendem-se dos insetos

produzindo substâncias químicas que os repelem ou intoxicam, muitas vezes através da desorganização das suas funções digestivas (MOSOLOV *et al.*, 2001; TERRA & FERREIRA, 2005). Dentro deste enfoque, genes que levam à expressão de proteínas potencialmente tóxicas já foram inseridos em plantas de interesse econômico, que se tornaram resistentes aos insetos, como é o caso dos inibidores protéicos de tripsina de origem vegetal, entre outros (HILDER *et al.*, 1987; MOSOLOV *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

O maior desenvolvimento de meios de controle biorracionais, no entanto, está a requerer um melhor conhecimento do sistema digestório dos insetos, uma vez que a tecnologia de transferência de genes entre diferentes organismos já se encontra bem avançada, porém, o conhecimento de alvos para serem explorados ainda é reduzido. Provavelmente por causa disto, as duas últimas décadas do século passado mostraram um desenvolvimento das pesquisas em digestão de insetos sem paralelo nas décadas anteriores. Isto pode ser explicado pelo fato de que as funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações, seja do ponto de vista da fisiologia comparada, uma vez que a classe Insecta possui

representantes adaptados a uma multiplicidade enorme de habitats e hábitos alimentares, seja porque o sistema digestório represente uma das principais interfaces entre o meio interno do inseto e seu meio ambiente, e que por isto, se torne uma das mais promissoras fontes de alvos para serem explorados em técnicas de controle biorracional (TERRA & FERREIRA, 2005).

## **1.2 Organização da digestão em insetos**

O sistema digestivo dos insetos é adaptado às suas condições, sendo composto de boca com glândulas salivares, papo, cecos gástricos, estômago, intestino e ânus; a excreção é realizada por estruturas chamadas de "túbulos de malpighi", que filtram os fluídos do corpo e levam as excretas nitrogenadas até o intestino, sendo portanto, eliminada junto com as fezes.

O detalhamento ao nível molecular dos modelos propostos para a digestão entre os insetos necessita da ampliação nos conhecimentos existentes sobre as enzimas digestivas envolvidas, assim como da natureza química das membranas microvilares das células intestinais e da membrana peritrófica (estrutura anatômica quitino-protéica que reveste o alimento no interior do intestino nos insetos) (TERRA & FERREIRA,

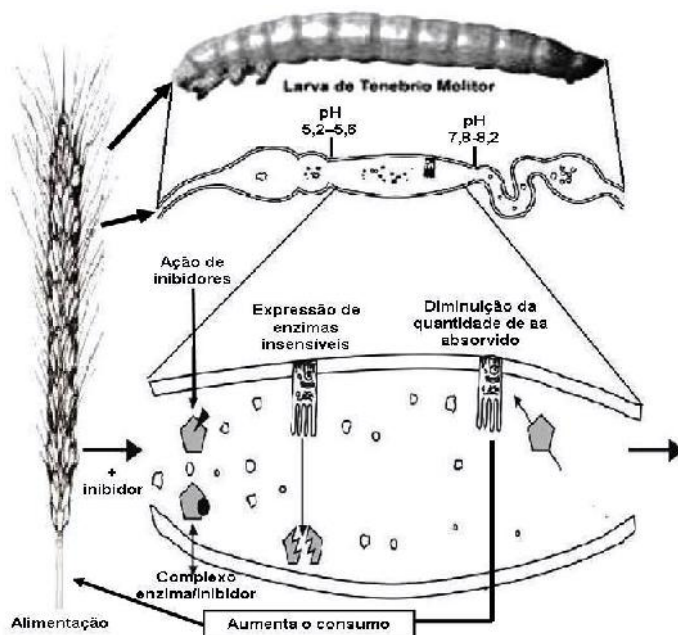
1979). Intestino médio de insetos contém grandes quantidades de enzimas proteolíticas que possuem um papel central na reposição e no fornecimento de aminoácidos livres essenciais para o desenvolvimento normal do inseto (MICHAUD *et al.*, 1995). Segundo Terra *et al.*, (1985) o pH do conteúdo luminal do inseto *T. molitor* varia entre 5,2-5,6 na parte anterior e passa para 7,8-8,2 na parte posterior. As enzimas digestivas são solúveis encontradas no lúmen intestinal são carboidrases e proteinases cisteínicas nos primeiros dois terços, que tem pH 5,6, e quimotripsina, tripsina e aminopeptidase microvilares no último terço que tem pH 7,9 (Terra *et al.*, 1985; Cristofolletti *et al.* 2005). Experimentos mostraram que as secreções de enzimas ocorrem no intestino anterior e absorção de água e nutrientes ocorrem na parte posterior do intestino médio (Terra *et al.*, 1985).

Segundo Tsybina *et al.*, (2005) na porção anterior do intestino médio do *T. molitor* encontra-se as proteinases cisteínicas, isso se deve ao pH ser mais ácido e na porção posterior do intestino médio encontram-se as proteinases serínicas onde o pH é mais alcalino. Segundo Silva *et al.*, (2008) as larvas de



*T. molitor* podem responder diferencialmente a ingestão de diferentes dietas devido a presença de inibidores na alimentação.

Seguindo este mesmo propósito do estudo da digestão em *T. molitor* apresenta-se na Figura 1, a organização espacial da digestão em larvas de *T. molitor* ao que se refere ao pH e a interação com o alimento. A larva de *T. molitor* alimenta-se de cereais em geral, em principal o trigo, que quando entra no túbulo digestivo é envolvido pela membrana perimicrovilar no intestino médio do *T. molitor*. Normalmente, o inseto se alimenta e digere o alimento a fim de repor suas reservas energéticas, mas, quando esta planta contenha um inibidor, inicialmente faz a inibição das enzimas pré-existentes. Isso leva a uma diminuição na quantidade de aminoácidos livres passíveis de serem absorvidos pelo *T. molitor* fazendo com que este aumente a quantidade de alimento ingerido, aumentando consideravelmente a quantidade de inibidor presente no aparelho digestório. De algum modo a larva de *T. molitor* reconhece o inibidor e deixa de expressar a enzima inibida pelo inibidor e passa a expressar novas enzimas insensíveis ao inibidor ingerido conseguindo assim repor sua reserva energética.



**Figura 1 – Esquema da digestão da larva do *T. molitor* e a relação com inibidores.** O desenho esquemático apresenta a organização da digestão da larva do *T. molitor* em sua dieta normal o trigo, apresenta o pH do conteúdo luminal do intestino médio e os possíveis efeitos quando esta dieta passa expressar inibidores de enzimas digestivas.

### **1.3 Adaptação dos insetos a inibidores de enzimas digestivas de origem vegetal**

Estudos vêm demonstrando que a exposição a inibidores de proteinases e amilases pode resultar na adaptação dos insetos, que passam a produzir proteinases e amilases digestivas parcial ou totalmente insensíveis aos inibidores (JONGSMA *et al.*, 1995; BROADWAY, 1996; SILVA *et al.*, 2001a, b; MOON *et al.*, 2004). A exemplo do que se observa com inseticidas convencionais, raças de insetos resistentes a proteínas usadas para transformação de plantas também têm sido descritas, como constatado na literatura através de relatos de que plantas transgênicas expressando proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (Bt toxinas) começam a não mais afetar os insetos alvo. Neste caso, a adaptação dos insetos envolve a seleção de mutantes nos quais a membrana das células do epitélio intestinal deixa de apresentar receptores para essas proteínas, levando ao aparecimento de raças resistentes às Bt toxinas (COATES *et al.*, 2007). Já a adaptação de insetos pragas a inibidores de proteinases pode envolver a expressão de proteinases capazes de

degradar o inibidor, pode envolver a sobre-expressão de proteinases pré-existentes ou a indução de proteinases insensíveis ao inibidor (CLOUTIER *et al.*, 2000; MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001; MOON *et al.*, 2004; BRIOSCHI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

O fenômeno da indução de enzimas digestivas em resposta à ingestão de inibidores foi descoberto em consequência dos estudos sobre adaptação de larvas de lepidópteros a plantas transgênicas, que expressavam inibidores de proteinases tipo tripsinas (JONGSMA *et al.*, 1995; BROADWAY, 1996). Apesar do grande impacto dessa descoberta, ainda não são conhecidos os detalhes dos mecanismos através dos quais os insetos reconhecem a presença dos inibidores no trato intestinal e como é desencadeado o processo de expressão de novos genes (BROADWAY, 1997; JONGSMA & BOLTER, 1997). Só recentemente foi demonstrado que a indução de tripsinas em lepidópteros se dá pela transcrição gênica (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001), o mesmo ocorrendo com a indução de proteinases tipo catepsina B no caruncho *Callosobruchus maculatus* (MOON *et al.*, 2004).

Também tem sido observado que não somente proteinases podem ser induzidas em insetos pragas, pois  $\alpha$ -amilases também são induzidas no caruncho *Zabrotes subfasciatus*, o qual ataca grãos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). A ingestão do inibidor de  $\alpha$ -amilase purificado de sementes de *P. vulgaris* ( $\alpha$ AI-1) por larvas de *Z. subfasciatus* provoca a indução de duas novas formas de amilases de baixa migração eletroforética (SILVA *et al.*, 2001a, c).

No caso da indução de amilases em larvas de *Z. subfasciatus*, embora o inibidor  $\alpha$ AI-1 iniba somente de forma parcial a amilase constitutiva do inseto em ensaios *in vitro*, sua presença na luz intestinal desencadeia a secreção de um dímero de amilases (SILVA *et al.*, 2001a, c). Há evidências de que o intestino do inseto produz uma proteinase serínica minoritária (cuja ocorrência já foi sugerida por ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996), a qual foi isolada e caracterizada em nosso laboratório (SILVA *et al.*, 2001b). Essa proteinase minoritária teria como função clivar o inibidor liberando peptídeos, que são reconhecidos por hipotéticos receptores no epitélio

intestinal ou em algum órgão interno, como o cérebro ou o corpo gorduroso. O reconhecimento dos peptídeos desencadearia uma cascata de sinalização, que culminaria com a síntese e secreção do dímero de amilases.

Mesmo depois de quinze anos após a descoberta da adaptação de insetos pragas à adição de inibidores de enzimas digestivas em suas dietas, os detalhes de como a indução das enzimas insensíveis ocorre ainda são desconhecidos. Uma provável explicação para este fato é que a sinalização possa envolver substâncias que são produzidas fora do próprio intestino médio, como neurotransmissores de origem cerebral, o que vem tendo pouca atenção até agora. Os ensaios biológicos envolvendo a alimentação dos insetos com inibidores purificados também limitam esses estudos, pois a quantidade dos inibidores, que são caros ou de difícil preparação, limita o número de tentativas nos experimentos.

Uma alternativa para os estudos envolvendo especificamente o modo pelo qual o inseto em estudo responde a uma determinada proteína em sua dieta é o uso de epitélios intestinais íntegros *in vitro*. O epitélio intestinal de insetos é composto por uma única camada

de células (epitélio simples), ao contrário do epitélio intestinal de mamíferos, que é estratificado. Trabalhos do final da década de 90 e outros mais recentes têm mostrado que as preparações de intestinos médios inteiros ou epitélios intestinais isolados de insetos se mantêm viáveis por mais de 24 horas, exercendo várias de suas funções normais, como secreção de enzimas digestivas, síntese de prostaglandinas, manutenção de pH luminal, interação com protozoários e até secreção de membrana peritrófica (BRAUN & KEDDIE, 1997; CLARK *et al.*, 1998; RANA & STANLEY, 1999; ZIELER & DVORAK, 2000; BÜYÜKGÜZEL *et al.*, 2002). O uso de modelos *in vitro* pode tornar possível a investigação sobre a indução de enzimas insensíveis a inibidores usando pequenas quantidades dos mesmos, ao invés de ter que alimentar os próprios insetos com quantidades maiores.

A participação de neurotransmissores no controle da secreção de enzimas digestivas tem sido mostrada inclusive com ensaios utilizando preparações de epitélios intestinais *in vitro*. Numa espécie de barata, *Diploptera punctata*, os neuropeptídeos alostatina e miosupressina foram capazes de induzir a secreção de amilase e  $\alpha$ -glucosidase em preparações de intestino

médio ou intestinos ligados (FUSÉ *et al.*, 1999). Peptídeos pertencentes a uma outra família de miosupressinas (SchistoFLRFamidas) foram capazes de modular a secreção de amilase e  $\alpha$ -glucosidase em preparações de intestinos isolados do gafanhoto *Locusta migratoria* (HILL & ORCHARD, 2005). Em outra espécie de barata, *Periplaneta americana*, foi demonstrado que a secreção de amilase e de protease é controlada pelo peptídeo cardioativo de crustáceo (CCAP), o qual é liberado após refeição. Intestino-médios de animais em jejum quando incubados com extrato de cérebro de animais alimentados foram capazes de produzir amilases e proteases (SAKAI *et al.*, 2006).

Diante do quadro mostrado acima, e para contrapor-se à enorme capacidade adaptativa dos insetos pragas, tem sido preconizada a introdução de múltiplos genes de resistência para a próxima geração de plantas transgênicas a ser desenvolvida. Tem sido observado, por exemplo, que há sinergismo quando se usa a combinação de inibidores de proteinases de diferentes classes sobre as enzimas digestivas de insetos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; AMIRHUSIN *et al.*, 2007). De modo análogo, o uso combinado e/ou



alternado de metabólitos praguicidas de origem vegetal para proteção de cultivos ou produtos agrícolas armazenados seria outra forma de evitar o desenvolvimento de resistência por parte das pragas. A busca de novas proteínas que sejam tóxicas para insetos pragas continua imperiosa, tanto quanto conhecer suas propriedades moleculares e seus mecanismos de ação, que são etapas imprescindíveis para a base do desenvolvimento biorracional.

## **2 - Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo geral contribuir para o entendimento dos mecanismos pelos quais insetos pragas conseguem se adaptar à ingestão de proteínas potencialmente tóxicas de origem vegetal, como inibidores de enzimas digestivas, culminando com a indução de enzimas insensíveis aos inibidores.

### **2.1. - Os objetivos específicos foram:**

- 2.1.1** - Verificar o efeito produzido pela presença de inibidores presentes na dieta e expressão diferencial de proteinases digestivas em larvas do coleóptero *Tenebrio molitor*.
- 2.1.2** – Esclarecer a mudança no padrão de atividade proteolítica frente a diferentes inibidores de leguminosas incorporados na dieta de larvas de *T. molitor*.
- 2.1.3** – Isolar e caracterizar as proteinases envolvidas na adaptação à presença de inibidores de proteinases em larvas de *T. molitor*.

### 3 - Materiais e Reagentes Utilizados

Os reagentes usados foram de grau analítico. Foram utilizados o inibidor de tripsina de soja – STI (Sigma®), o inibidor de tripsina e quimotripsina de soja – SBI (Sigma®), o inibidor de tripsina de feijão – BTI (Sigma®) e o inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina* – ApTI (gentilmente cedido pela Professora Maria Lígia Rodrigues Macedo da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul).

Os testes de atividade enzimática foram realizados com substratos protéicos como a azoalbumina (Sigma®) para as análises em tubo e gelatina para o zimograma em gel de eletroforese. Os seguintes substratos sintéticos foram utilizados no presente trabalho: succinil–alanil–alanil–prolil–fenilalanina–p-nitroanilida (suc-AAPF-pNa, Sigma®) e benzoil – arginina–p-nitroanilida (bz-R-pNa, Sigma®), estes cromogênicos e, N- $\alpha$ -carboxibenzil–arginil–arginina-7-amido–4-metilcumarina (z-RR-MCA, Sigma®), N- $\alpha$ -carboxibenzil–fenilalanil–arginina-7-amido–4-metilcumarina (z-PR-MCA, Sigma®), N- $\alpha$ -carboxibenzil–glicinil–glicinil–arginina-7-amido–4-metilcumarina (z-GGR-MCA, Sigma®) que são fluorogênicos. Como

efetores na atividade proteolítica foram utilizados ditioneitol (DTT, Sigma®) e trans-epoxisuccinil 4-guanidino butano (E-64, Sigma).

Nas eletroforeses foram utilizados os seguintes reagentes bis-acrilamida (Sigma®), acrilamida (BioRad), persulfato de amônio (APS, Sigma®), TEMED (Gibicobril), Tris (Vetec), ácido clorídrico HCl (Vetec) e dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma®) para compor os géis de separação e de empilhamento e tris (BioRad), glicina (Sigma®) e SDS (Sigma®) para compor os tampões de corrida. Os tampões de amostra utilizaram azul de bromofenol (Sigma®), tampão Tris/HCl, SDS e glicerol (Sigma®). Nos géis bidimensionais foi utilizada uma solução de anfólitos 30% pH 3 -10 (Sigma®) e soluções de hidróxido de sódio (NaOH, Vetec) e HCl (Vetec). Para a revelação utilizou-se o corante Coomassie blue R (Sigma®) em etanol (Vetec)/ ácido acético (Vetec).

### **3.1 Colônias de *Tenebrio molitor***

As larvas e adultos de *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) são mantidas no laboratório há cerca de 10 anos. Os animais são criados em viveiros de plástico transparente cobertos com retalhos de tela presos por

elásticos, sob condições de fotoperíodo natural, umidade relativa de 60-70% e temperatura de  $29 \pm 1$  °C. Os insetos são alimentados com farelo de trigo obtidos no comércio local.

Para alimentar os animais foram utilizados os cereais integrais: arroz, aveia e farelo de trigo bem como as farinhas dos feijões (*Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*), para identificar a mudança no padrão das proteinases frente às diferentes dietas.

Visando identificar as mudanças no padrão de proteinases em resposta a inibidores presentes em diferentes dietas, elaboramos uma dieta artificial, com a incorporação de 0,4% (m/m) de inibidor puro em farelo de trigo sendo dietas individuais contendo, inibidor de tripsina de soja (STI), o inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI), o inibidor de tripsina de feijão (BTI) e um inibidor isolado das sementes de uma planta típica do serrado brasileiro a *A. pavonina* (ApTI). Estes inibidores foram pesados isoladamente e incorporados nas proporções de farelo de trigo e mecanicamente homogeneizados no gral utilizando um pistilo, cuidadosamente para que o farelo de trigo não ficasse totalmente pulverizado.

As diferentes dietas foram oferecidas a diferentes grupos contendo dez animais, que passam por um período de sete dias em jejum antes de serem introduzidos na respectiva dieta e permanecerem pelo mesmo período de sete dias nestas dietas, antes de serem dissecados para isolamentos dos intestinos-médios. Após serem, dissecados cada lote passou por dosagem de proteína e os volumes foram adequados para que todos tenham a mesma concentração de proteínas por mililitro de solução. Foram analisados dez lotes de animais alimentados em cada dieta.

### **3.2 - Preparação de amostras**

Na preparação do homogeneizado de intestino-médio inteiro foram utilizadas larvas, sendo essas dissecadas em solução salina (NaCl 250 mM) para remoção do trato digestivo. A homogeneização foi feita em água destilada utilizando-se um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem munido de um pistilo de teflon, em movimentos manuais, mantendo-se o material constantemente em banho de gelo.

Para obtenção de homogeneizados de compartimentos intestinais, procedeu-se da seguinte forma. Após remoção do trato digestivo e separação do

intestino médio, o epitélio foi separado e lavado em salina, enquanto o conteúdo luminal depois de disperso em salina foi coletado com auxílio de um capilar e disperso em volume conhecido de água destilada. O epitélio foi homogeneizado em água destilada com auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem como descrito acima.

Para obtenção das frações solúvel celular e de membrana, o homogeneizado de epitélio foi centrifugado a 10.000 X g por 15 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante, que é considerado como fração solúvel celular.

### **3.3 - Condições dos ensaios de hidrolases e determinação de proteínas**

Nos ensaios com azoalbumina foram usados 0,05 mL de fonte de enzima mais 0,05 mL do substrato a 1 % (m/v) em tampão de proteólise citrato/fosfato pH 6,0, sendo esta mistura de reagentes incubada em tubos de Eppendorf. A reação foi parada pela adição de 0,05 mL de TCA 30 % (m/v) em quatro tempos (30', 60', 90' e 120') para a construção de uma curva de atividade, após os tubos foram deixados em repouso por 30 min em gelo até serem centrifugados a 10.000 X

g por 15 min à temperatura ambiente. Alíquotas de 0,1 mL dos sobrenadantes foram recolhidas e alcalinizadas com a adição de 0,1 ml de NaOH 2N e as absorbâncias resultantes foram lidas a 420 nm em placa de 96 poços transparentes no aparelho de leitura de placa Tecan (Infinite).

Nos ensaios com substratos que liberam p-nitroanilina (suc-AAPF-pNa e bz-R-pNa) foram usados 0,05 mL de fonte de enzima mais 0,05 mL do substrato a 1 % (m/v) em tampão de proteólise citrato/fosfato 50 mM, pH 6,0, sendo esta mistura de reagentes incubada em tubos de ensaio. A reação foi parada pela adição de 0,1 mL de ácido acético 30 % (m/v) em quatro tempos (30', 60', 90' e 120') para a construção de uma curva de atividade. Alíquotas de 0,15 mL dos sobrenadantes foram recolhidas e as absorbâncias resultantes foram lidas a 410 nm em placa de 96 poços transparentes no aparelho de leitura de placa Tecan (Infinite).

Para os ensaios das hidrólises de derivados de metilcumarina (z-RR-MCA, z-PR-MCA e z-GGR-MCA) foi utilizado o espectrofluorímetro Spectramax M5 para monitorar a liberação dos fluorocromos. A leitura da fluorescência foi feita no comprimento de onda de excitação de 380 nm e no comprimento de onda de



emissão de 440 nm para metilcumarina em placas de 96 poços opacas. Amostras de enzimas (0,02 mL) foram misturadas com 0,18 mL de 100 mM de tampão citrato/fosfato 50 mM contendo 1,5 mM DTT, pH 6,0. A reação foi iniciada pela adição de 2  $\mu$ L de 1 mM do substrato. Nestes ensaios repetiram-se as mesmas amostras com o acréscimo de 0,01 mL de E-64.

As reações foram incubadas em banho-maria a 30 °C por pelo menos quatro intervalos de tempo e foram calculadas as velocidades iniciais. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1  $\mu$ mol de substrato/min. Para azoalbumina, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma mudança de absorbância de 0,01 unidades/min a 410 nm. Para os ensaios com os derivados de p-nitroanilina construiu-se uma curva padrão com p-nitroanilina. As atividades dos derivados de metilcumarina foram expressos em mFRU da curva de cinética determinada pelo aparelho no tempo em a reação esteve linear.

As determinações de proteína foram feitas de acordo com o método descrito por Smith *et al.* (1985), com modificações propostas por Morton & Evans

(1992), utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma®) como padrão. Este procedimento baseia-se no fato do BCA (1% de BCA . Na<sub>2</sub>, 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> . H<sub>2</sub>O, 0,16% de tartarato de sódio, 0,4% de NaOH e 0,95% de NaHCO<sub>3</sub> acertando o pH para 11,25 com NaOH concentrado) produzir uma intensa cor púrpura na presença de íons Cu<sup>1+</sup> em meio alcalino, que são produzidos na reação de proteína com solução alcalina de cobre. Primeiramente foi preparado o reagente chamado Standard Working Reagent (SWR) formado da mistura do reagente de BCA com uma solução de sulfato de cobre 4% na proporção de 50 volumes do primeiro com 1 volume do seguinte. Prepara-se uma solução padrão de albumina sérica bovina 4 mg/mL diluída 20 vezes e se monta uma curva padrão. Nas amostras de interesse, coletam-se 20 µL e são acrescentados 200 µL do SWR. Incubam-se os tubos a 37°C por 30 minutos e faz-se a leitura da absorbância a 562 nm.

### **3.4 - Ensaio de atividade *in gel* (Zimograma)**

Os ensaios de atividade de proteinases *in gel* seguiram metodologias descritas por Campos *et al.* (1989) e Silva *et al.* (2001b). Homogeneizados intestinais foram fracionados em placas de géis de

poliacrilamida contendo SDS 0,1% (m/v). Amostras contendo quantidades apropriadas de proteína foram primeiramente diluídas 1:2 com o tampão de amostra (SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1% em tampão tris/HCl 200 mM, pH 6,8) e em seguida submetidas à eletroforese usando um sistema de mini-géis BioRad MiniProtean 3 (150 V por aproximadamente 90 minutos) sob refrigeração em gel de poliacrilamida 7,5 ou 12 % contendo 0,1% (m/v) de gelatina. Após migração, os géis foram transferidos para uma solução aquosa de Triton X-100 2,5 % (m/v) durante 20 minutos para renaturação das enzimas. Depois da renaturação com Triton X-100, os géis foram transferidos para uma solução com tampão de proteólise (100 mM de citrato/fosfato 1,5 mM DTT, pH 6,0) em diferentes tempos. A proteólise nos géis foi interrompida com uma solução corante (0,1 % m/v Coomassie Brilliant Blue R em 40 % v/v etanol/10 % v/v de ácido acético). Posteriormente, uma breve descoloração em 40 % v/v etanol/10 % v/v de ácido acético, as bandas claras com fundo azul indicam a localização da atividade de proteinases no gel.

### **3.5 - Análise proteômica bidimensional do conteúdo luminal das larvas de *T. molitor***

As análises proteômicas em duas dimensões consistem em separar inicialmente as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico da proteína e depois pelo tamanho. Para a primeira dimensão, preparou-se um gel de poli(acrilamida) 7% contendo 2% de anfólitos pH 3-10 (Sigma), após acrescentar o APS e TEMED, preencheram-se as placas do kit de mini gel da BioRad. Na superfície coloca-se uma mistura de água e anfólito (aproximadamente 0,5% v/v) para a superfície polimerizar sem ondulações. Após a polimerização monta-se a placa no sistema de eletroforese com o tampão anodo NaOH 250 mM e o tampão cátodo HCl 250 mM, com ajuste de fonte para 200 V constante a 4 °C até a amperagem atingir aproximadamente 5 mA. Após a focalização, prepara-se o gel empilhamento tradicional, tamponado com Tris-HCl, pH 6,8 sem SDS. Quando ocorre a polimerização, monta-se novamente o sistema de eletroforese com o tampão Tris-glicina sem SDS. A corrida deve acontecer a 200 V constante a 4 °C até que a frente de corrida ultrapasse toda a placa.

Na segunda dimensão utiliza-se um gel SDS-PAGE tradicional, que recebeu uma raia cortada do primeiro gel vindo da focalização isoelétrica das proteínas presentes na amostra. Esta segunda dimensão foi realizada tanto para análise proteômica, quanto para análise em zimograma de duas dimensões, neste caso foi co-polimerizado com o gel da segunda dimensão 1% de gelatina. Após duas horas de corrida a 150 V constante e a 4 °C, as proteínas foram renaturadas com triton X-100 por quinze minutos, seguidos de incubação em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 6 por duas horas a 30 °C. A revelação foi feita com o corante Coomassie Brilliant Blue R, que foi descorado até aparecerem bandas bem contrastadas.

### **3.6 – Fracionamento por Cromatografia**

Intestinos de larvas de *T. molitor* foram homogeneizados em água destilada, em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 X g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi ajustado para a concentração de 10 mM de imidazol, pH 6,0 e aplicado em uma coluna de troca iônica Hi Trap Q (GE Healthcare, 5 cm x 0,5 cm) utilizando o aparelho Äkta (GE Healthcare) equilibrada em tampão imidazol 10mM, pH 6,0. Em seguida foi feita uma

eluição isocrática com 8 mL de tampão imidazol para eluição das proteínas não retidas e, logo após esse procedimento, foram aplicados 20 mL de um gradiente linear com a concentração de cloreto de sódio crescendo de 0 a 1 M no tampão imidazol, seguidos de uma eluição isocrática com 5 mL de tampão imidazol contendo 1M de NaCl, pH 6,0. Foi utilizado um fluxo de 1,0 mL/minuto em todo processo e foram coletadas frações de 0,5 mL.

As frações foram ensaiadas usa atividade proteolítica e os picos obtidos foram concentrados por ultrafiltração em tubos tipo Amicon™. Após concentração, os picos de interesse foram aplicados em uma coluna de filtração em gel Superdex 75 (GE Healthcare, 10 cm x1cm) equilibrada e eluída em tampão imidazol 10mM, pH 6,0 a um fluxo de 0,5 mL/min. As frações continham 0,5 mL e foram ensaiadas contra substratos cromogênicos.

### **3.7 – Análise estatística dos dados obtidos**

Os dados obtidos após a leitura das absorvâncias e da fluorescência foram trabalhadas no programa Microsoft Excel e Origin Pro 7.0 para obtenção dos gráficos e figuras relacionadas. Para os dados estatístico utilizou-se o programa estatístico Graph Pad Prisma 5, sendo aplicados o teste T não

pareados para os dados e o ANOVA de uma via, considerando no  $P=0,05$  para significância estatística.

## **4 - Resultados**

### **4.1 - Diferenças morfológicas nas larvas após alimentação**

As larvas passaram por um jejum de sete dias e após este período grupos de dez larvas foram submetidos à alimentação com dietas de farelo de trigo contendo os diferentes inibidores purificados e, alternativamente, dietas com farinhas de sementes de leguminosas. No momento da dissecação, foram observados aspectos como tamanho das larvas, e se os intestinos estavam cheios de alimentos ou apresentavam o intestino vazio ou com escassez de alimento, sempre comparando com os intestinos dos animais que compõe o grupo controle.

As diferenças nas dosagens de proteínas solúveis em homogeneizados intestinais não foram significativas, salvo o grupo alimentado com ApTI incorporado na dieta que apresentou diferença estatística significativa (Tabela 1). Durante o período de alimentação com os inibidores ou com as farinhas de sementes não foi observada mortalidade das larvas. Estes resultados sugerem que os inibidores, nas dosagens usadas, não apresentam efeitos agudos



aparentes, o que não descarta os efeitos bioquímicos da inibição e posterior indução de proteinases insensíveis a estes inibidores.

Tabela 1 – Determinação de proteínas solúveis em intestino-médio de larvas de *Tenebrio molitor* alimentadas em diferentes dietas.

<b>Grupos</b>	<b>Proteínas (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Jejum	5,365 $\pm$ 0,98
Trigo	5,746 $\pm$ 0,76
BTI	5,828 $\pm$ 0,97
ApTI	7,381 $\pm$ 1,34 *
STI	5,842 $\pm$ 0,67
SBI	5,852 $\pm$ 0,45

As dietas continham os seguintes inibidores incorporados no farelo de trigo usado como excipiente: BTI (inibidor de tripsina de *Phaseolus vulgaris*), ApTI (inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina*), STI (inibidor de tripsina de soja), SBI (inibidor de tripsina e de quimotripsina de soja) (SEM  $\pm$  P < 0,05).

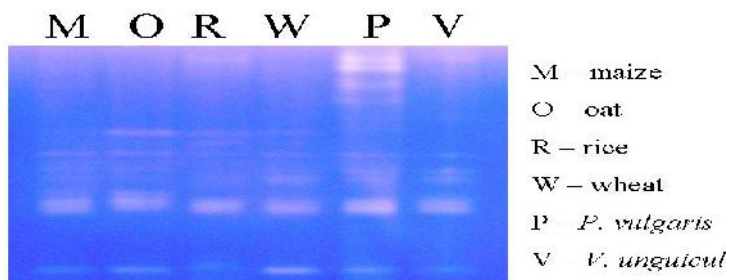
## **4.2 – Efeito da ingestão de inibidores no perfil de atividade proteolítica em larvas de *T. molitor***

Ao serem alimentadas com diferentes dietas, as larvas de *T. molitor* mudam seu padrão enzimático como um reflexo da alimentação que receberam. Na Figura 2, podemos observar que larvas de *T. molitor*, em resposta a diferentes dietas compostas por farinha de diferentes sementes (três cereais e duas leguminosas), diminuíram a expressão de algumas proteinases e passaram a expressar outras em maior quantidade de acordo com a dieta a que foram submetidas. De todas as dietas testadas, a ingestão de farinha de sementes de *P. vulgaris* (feijão comum) foi a que resultou em uma indução de proteinases mais evidente. Chama a atenção o aumento da expressão de quatro proteinases de menor migração eletroforética em comparação com as demais dietas, inclusive com a farinha de outro feijão (*V. unguiculata*).

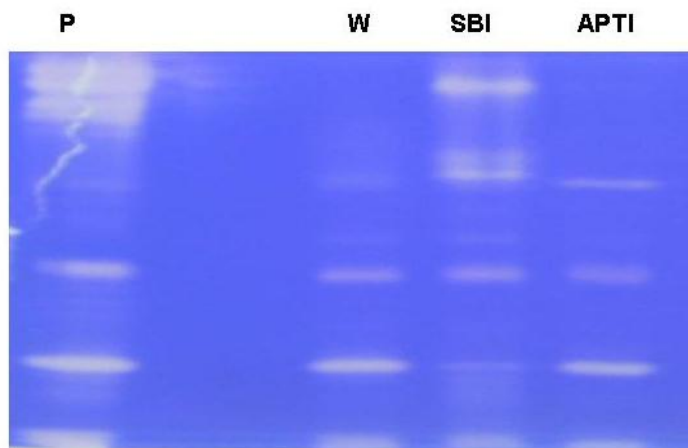
Em larvas de *T. molitor*, verificamos no zimograma apresentado na Figura 3, que a resposta de indução de proteinases também pode ser observada com a incorporação de inibidores purificados em uma dieta controle contendo somente o farelo de trigo.

Dentre os inibidores testados e fazendo-se uma comparação com a dieta controle e com a farinha de feijão comum, somente o inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI) resultaram em uma indução significativa de proteinases. Curiosamente a enzima que foi induzida também mostrou uma baixa migração eletroforética (ver raia SBI na Figura 3).

Os homogenizados das larvas alimentadas com os inibidores puros incorporados na dieta foram testados *in vitro* sua atividade e comparada com a adição dos inibidores para verificar se as enzimas induzidas são realmente insensíveis aos inibidores. Na Tabela 2 o resultados mostram que *in vitro* o SBI não é capaz de inibir as atividades proteolítica, já o ApTI inibe a atividade proteolítica em todos os homogenizados testados.



**Figura 2- Padrão de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com farinhas de diferentes sementes.** Diferenças na atividade de proteinases intestinais foram observadas quando as larvas foram alimentadas com diferentes dietas. Notar na raia P, que pelo menos quatro proteinases de baixa migração eletroforética mostram maior atividade do que as demais dietas. M, farinha de sementes de milho; O, farinha de sementes de aveia; R, farinha de sementes de arroz; W, farinha de sementes de trigo; P, farinha de sementes de feijão comum; V, farinha de sementes de feijão-de-corda.



**Figura 3-** Comparação entre os padrões de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com farinha de semente do feijão comum (*P. vulgaris*) e com dietas contendo inibidores purificados. Este zimograma mostra o padrão de proteinases em animais alimentados com farinha de *P. vulgaris* (**P**) em relação ao grupo controle alimentado com farelo de trigo (**W**) e em relação aos animais alimentados com inibidores puros incorporados na dieta controle (**SBI** e **ApTI**), foram repetidos seis lotes de alimentação com as mesmas dietas.

Tabela 2 – Atividade dos homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* e inibição *in vitro* das atividades.

<b>Dieta</b>	<b>Controle (Trigo)</b>		
Inibidores →	Sem inibidor	BTI	ApTI
↓ Substratos			
Azo albumina	4,27±0,63	4,42±0,84	2,22±0,61
Suc-AAPF- pNA	53,7±4,5	51,6±4	12,6±0,5
bz-R-pNA	30,97±1,7	25,1±3,2	20,2±1,9
<b>Dieta</b>	<b>SBI (Trigo+SBI)</b>		
Inibidores →	Sem inibidor	BTI	ApTI
↓ Substratos			

Azo albumina	2,38±0,57	2,52±0,57	1,73±0,55
Suc-AAPF-pNA	14,8±1,1	11,4±0,5	14±1,1
bz-R-pNA	16,7±1,7	17,6±0,9	19,2±1,9
<b>Dieta</b>	<b>ApTI (Trigo+ApTI)</b>		
Inibidores →	Sem inibidor	BTI	ApTI
↓ Substratos			
Azo albumina	4,66±0,75	3,67±0,86	2,75±0,55
Suc-AAPF-pNA	25±3,4	24±3,8	12±1
bz-R-pNA	18,2±1,1	20,7±3,6	19,1±0,3

Os homogeneizados intestinais de larvas alimentadas por sete dias com dietas artificiais contendo SBI incorporado na dieta e ApTI incorporado na dieta e a dieta controle trigo, em comparativo a atividade frente as substratos Azo

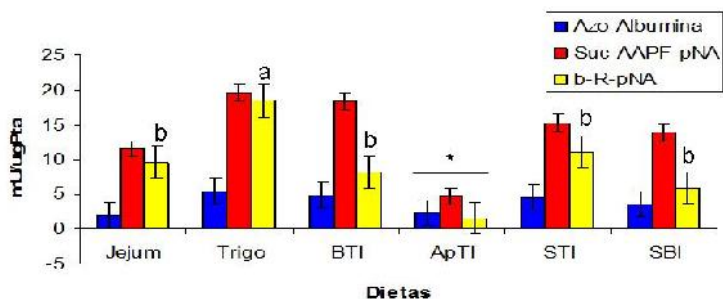


albumina, suc-AAPF-pNA e bz-R-pNA sem os inibidores *in vitro* e com cada um dos inibidores *in vitro*.

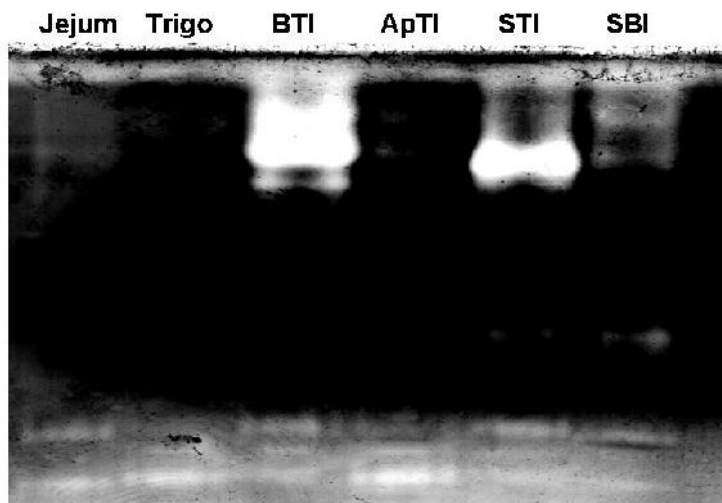
Figura 4 mostra a atividade proteolítica presente nos diferentes homogeneizados intestinais contra substratos cromogênicos e contra o substrato protéico azo-albumina. O grupo mantido em jejum apresentou baixa atividade para todos os substratos quando comparados com o grupo controle alimentados com o farelo de trigo, visto que as larvas não estavam se alimentando e a secreção de enzimas digestivas pode ter diminuído. O grupo BTI não demonstrou uma diferença significativa em atividade contra os substratos azo-albumina e suc-AAPF-pNA, porém, houve uma diminuição significativa quando a atividade foi testada com o substrato b-R-pNA. O grupo ApTI teve todas as atividades inibidas, inclusive quando comparado com o grupo mantido em jejum. Os animais alimentados com STI e SBI apresentaram uma queda na atividade com relação aos substratos sintéticos, mas não foi observada uma alteração na atividade com relação ao substrato protéico (azo-albumina) em relação ao grupo alimentado somente com o farelo de trigo.

Os ensaios em gel confirmaram as diferenças apresentadas nas atividades proteolíticas ensaiadas com os substratos sintéticos. A Figura 5 apresenta um

zimograma onde se destacam duas bandas majoritárias de baixa migração que possuem alta atividade proteolítica, principalmente nos grupos BTI, STI e SBI. Estes resultados mostram que a ingestão de diferentes inibidores resultou em diferentes padrões de atividade proteolítica em larvas de *T. molitor*.



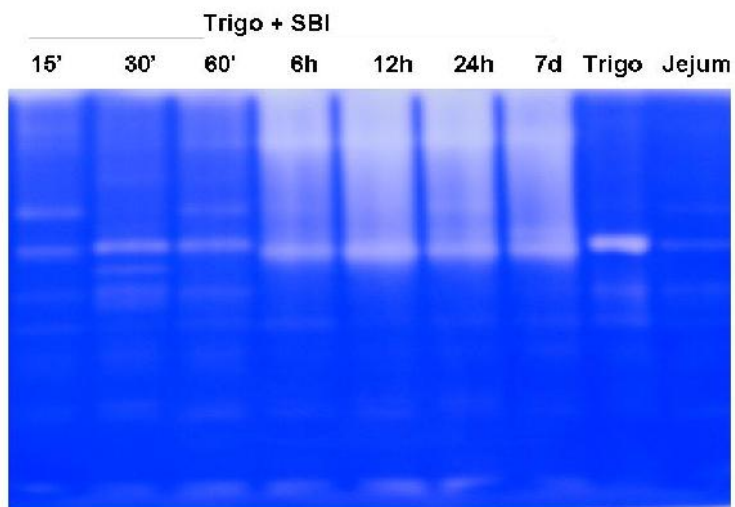
**Figura 4 - Atividade proteolítica dos homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com diferentes inibidores.** O grupo denominado jejum corresponde aos animais mantidos sete dias sem acesso a alimento; o grupo Trigo corresponde aos animais alimentados somente com farelo de trigo, enquanto os grupos BTI, ApTI, STI e SBI correspondem aos animais alimentados em dietas onde os inibidores foram incorporados (na concentração de 0,4% m/m) ao farelo de trigo usado como excipiente (teste T P < 0,05).



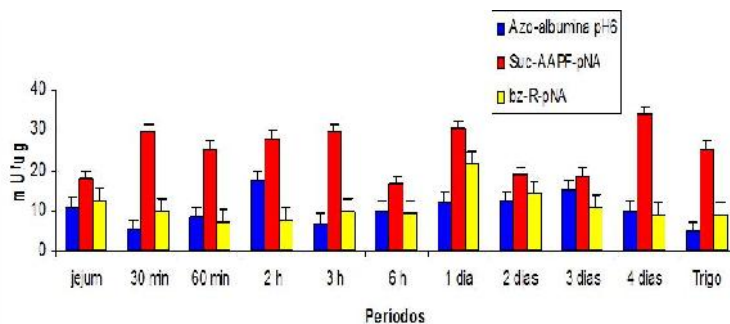
**Figura 5 - Comparação entre os padrões de atividade proteolítica de homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* mantidas em jejum e alimentadas com farelo de trigo e com dietas contendo inibidores purificados.** Os homogeneizados foram obtidos de larvas mantidas em diferentes dietas: jejum (J), trigo (Trigo), BTI (inibidor de tripsina de *Phaseolus vulgaris*), ApTI (inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina*), STI (inibidor de tripsina de soja), SBI (inibidor de tripsina e de quimotripsina de soja). Em cada raia as amostras possuíam a mesma quantidade de proteína.

### **4.3 – Curso temporal das atividades proteolíticas após alimentação com inibidores**

Constatado que diferentes inibidores incorporados nas dietas podem apresentar respostas diferentes, escolheu-se um dos inibidores para fazer o curso temporal de indução de atividade. O inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI) foi escolhido pelo fato dele provocar a indução de uma proteinase majoritária de baixa migração eletroforética (ver Figura 3). Na Figura 6, observa-se que o início da indução ocorre dentro de sessenta minutos após a ingestão da dieta contendo o inibidor e permanece com o passar do tempo em que as larvas permanecem na mesma dieta. Com relação aos substratos cromogênicos relatados na Figura 7, um padrão de aumento e diminuição das atividades proteolíticas com o passar do tempo que pode ser indicio do caráter adaptativo do animal para se adequar melhor as condições do alimento que lhe foi imposto.



**Figura 6 - Curso temporal da indução de proteinases em *T. molitor* após a alimentação com inibidor.** Zimograma SDS – PAGE apresenta as diferenças nas atividades proteolíticas em jejum, na alimentação com farelo de trigo e de acordo com o tempo de alimentação em dieta SBI (inibidor de tripsina e de quimotripsina de soja).



**Figura 7 - Atividade proteolítica dos homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* após alimentação com o inibidor de tripsina e quimotripsina de soja (SBI).** O gráfico apresenta as atividades em insetos alimentados após diferentes períodos de tempos de alimentação com o inibidor incorporado no farelo de trigo. O grupo jejum corresponde aos animais mantidos sete dias sem alimentação, e o grupo trigo corresponde aos animais alimentados apenas com o farelo de trigo.

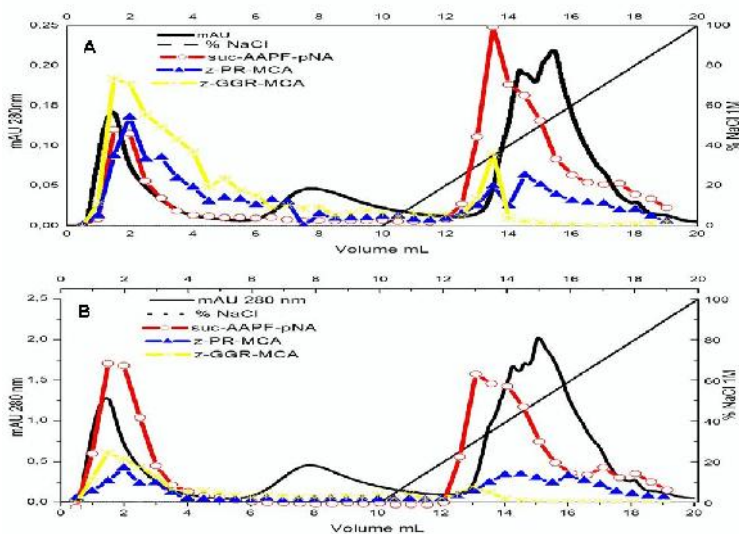


#### **4.4 – Fracionamento por cromatografia dos homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com BTI**

As frações oriundas das cromatografias foram testadas com diferentes substratos, um cromogênico o suc-AAPF-pNA e dois fluorogênicos o z-PR-MCA e o Z-GGR-MCA. Na Figura 8 observa-se que há uma diminuição na atividade do pico não retido na coluna de troca iônica do grupo alimentado com o inibidor BTI em relação ao grupo controle para os substratos fluorogênicos e um aumento na atividade sobre o substrato suc-AAPF-pNA. Nas frações que foram eluídas com o gradiente salino houve uma diminuição na atividade ensaiada com suc-AAPF-pNA e pouco alterou a atividade com os substratos fluorogênicos quando comparados com o grupo controle.

Com o objetivo de se verificar a classe mecanística das proteinases presentes nas frações cromatográficas, foram usados o inibidor de proteinases cisteínicas E-64 e o ativador DTT. Na Figura 9, podemos observar uma atividade maior na dieta controle frente aos substratos cromogênicos (Fig. 9 A e B), quando comparada nas mesmas condições da dieta contendo o

inibidor BTI. Na atividade com os substratos fluorogênicos há uma inversão de atividade, demonstrando uma atividade maior para o grupo alimentado com o inibidor BTI na dieta em relação ao controle. Isso poderia ser explicado pela presença do DTT, porém, ambos estavam nas mesmas condições e realmente os valores de atividades se inverteram (Fig. 9 C e E). Quando estas frações cromatográficas foram ensaiadas na presença de E-64 não houve alteração na atividade das frações que representam o pico não retido na coluna, havendo uma diminuição na atividade das frações eluídas com o gradiente salino (Fig.9 D e F). Esses resultados sugerem que serino proteinases são diferentemente expressas quando as larvas recebem o inibidor BTI incorporado em sua dieta.



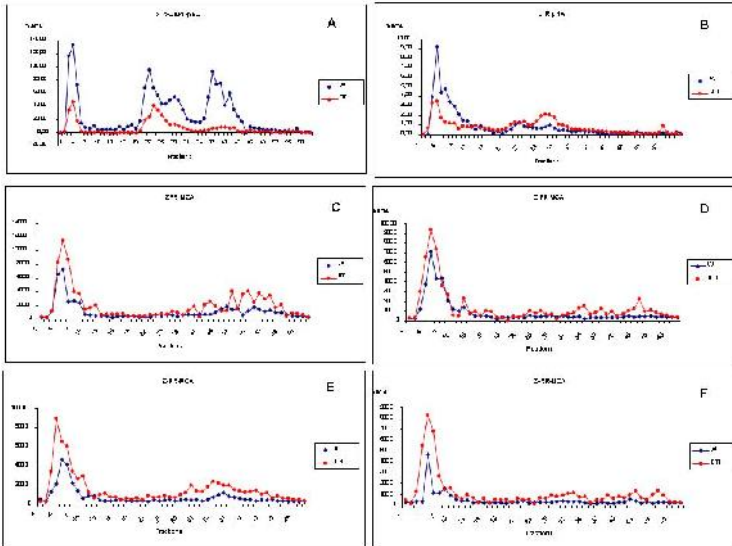
**Figura 8 - Fracionamento em coluna de troca iônica de homogeneizado intestinal de larvas de *T. molitor* alimentadas com BTI.** O perfil em destaque na cor preta corresponde a proteína nas frações, sendo em **A** – animais na dieta controle e **B** – com BTI incorporado na dieta controle. As atividades frente aos diferentes substratos estão em cores e símbolos diferenciados. Notar que há uma inversão na atividade sobre os substratos z-PR-MCA e z-GGR-MCA que se apresenta maior em A (controle) do que em B, que possui maior atividade para o substrato suc-AAPF-pNA.

As frações eluídas antes do gradiente salino foram concentradas e, em seguida, foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel. A Figura 10 apresenta o resultado da atividade das frações vindas da filtração em gel. Destacam-se as frações em torno de 10 mL que apresenta um pico bem definido e simétrico quase que separado dos demais com grande atividade sobre o substrato suc-AAPF-pNA, este volume de eluição de acordo com a curva de calibração da coluna com albumina sérica, hemoglobina e urease nos permite calcular uma massa aproximada de 66,5 kDa para a proteinase purificada.

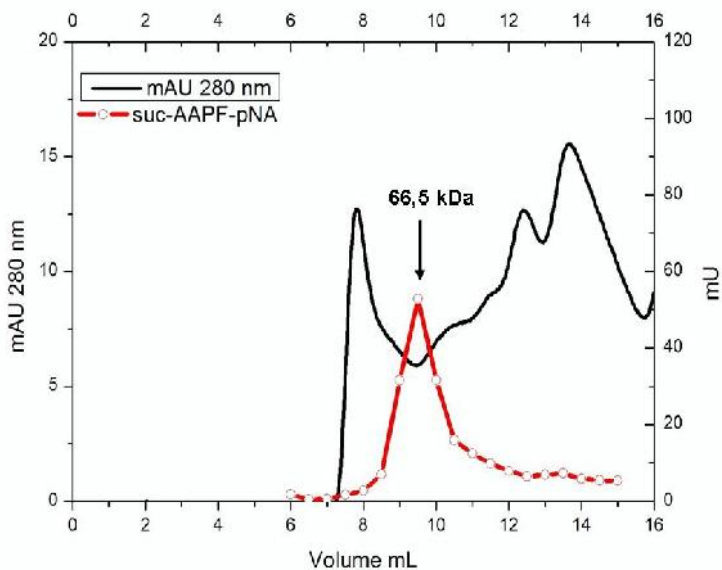
#### **4.5 - Análise Bi-Dimensional.**

A Figura 11 apresenta um gel bi-dimensional representativo dos extratos de animais alimentados com a dieta controle trigo e alimentados com BTI incorporado na dieta. Foram marcados os diferentes “spots” que podem também ser utilizados para seqüenciamento da proteína de interesse. Foram encontrados oito spots diferentes no proteoma de larvas alimentadas com farelo de trigo quando comparado com BTI incorporado no farelo de trigo e dez spots diferentes no proteoma de larvas alimentadas com farelo de trigo contendo BTI

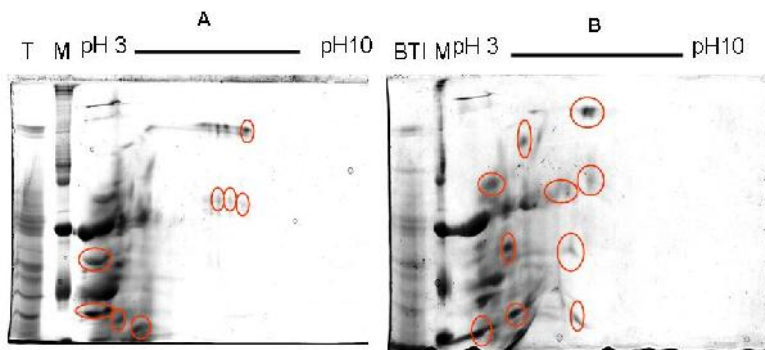
quando comparados com as que se alimentaram apenas com farelo de trigo. Como o foco do presente trabalho são as proteinases, foi feito um zimograma de atividade com as proteínas isoladas em um gel bi-dimensional. A Figura 12 apresenta os diferentes spots que correspondem a proteinases de extratos larvas de *T. molitor* nas dietas trigo e BTI, sendo encontrados apenas quatro diferenças em cada zimograma. Pode-se dizer que são quatro spots que deixam de ser expressos quando as larvas são alimentadas com BTI e outros quatro que aparecem quando as mesmas foram alimentadas com BTI.



**Figura 9 - Atividade das frações cromatográficas em coluna de troca iônica frente a diferentes substratos.** Os gráficos apresentam duas séries comparativas de atividades dos grupos controle que foi alimentado com farelo de trigo (Wheat) representado pela linha azul e alimentado com o farelo de trigo contendo o inibidor BTI representado em vermelho. Os substratos utilizados foram suc-AAPF-pNA em **A**, b-R-pNA em **B** e os fluorogênicos z-PR-MCA e z-RR-MCA contendo um indutor de atividade de proteinases cisteínicas DTT em **(C, D, E e F)**, sendo que em **D e F** foi acrescentado um inibidor de proteinases cisteínicas o E-64.

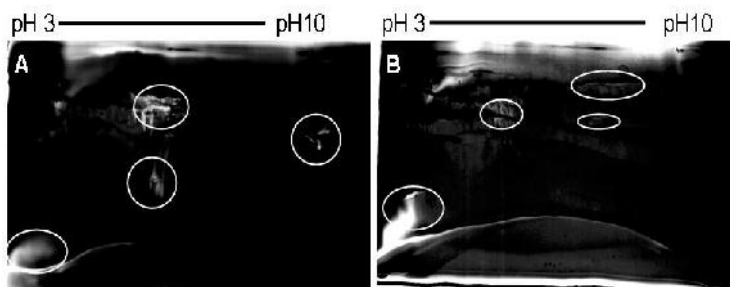


**Figura 10 - Perfil da filtração em Gel.** Após filtração em gel com a coluna superdex 75, as frações obtidas entre 6 mL e 16 mL de filtração em gel foram testadas frente ao substrato suc-AAPF-pNA, destaque para aumento de atividade em torno do pico formado em 9,5 mL de eluição que permitiu calcular uma massa aproximada de 66,5 kDa. Curva em preto representa o perfil protéico das frações (mAU 280 nm).



**Figura 11 - Fracionamento por eletroforese bidimensional de homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com farelo de trigo (controle, painel A) e com BTI (painel B). Destacam-se os diferentes “spots” encontrados no proteoma bi-dimensional no SDS – PAGE revelado por coomassie em extratos de conteúdo luminal de larvas alimentadas com trigo no gel A e o inibidor BTI incorporado no farelo de trigo em B (circundados em vermelho), nota-se que os “spots” se concentram na faixa de pH entre 3 e 7,5.**





**Figura 12 - Zimograma bidimensional.** Destacam-se os diferentes “spots” de proteinases (circundados) encontrados no gel de animais alimentados com trigo em A e alimentados com BTI incorporado no trigo em B.

## 5 – Discussão

### 5.1 – Organização da digestão em larvas de *T. molitor*

Insetos geralmente têm um amplo espectro de proteinases digestivas que são espacialmente e temporalmente expressas nos diversos sub-compartimentos do intestino médio. O conhecimento da composição das classes mecanísticas presentes e especificidade de todas as proteinases componentes do arsenal proteolítico de um inseto é uma informação essencial para o desenvolvimento de produtos eficazes no controle de pragas baseado em agentes biológicos, tais como o uso de inibidores de proteinases (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Existem poucos estudos bioquímicos dedicados ao detalhamento dos espectros de diferentes grupos de enzimas digestivas proteolíticas secretadas simultaneamente e que atuam na digestão no intestino do inseto (TERRA & FERREIRA, 2005; VINOKUROV *et al.*, 2006).

Estudos que utilizaram as larvas do besouro praga de cereais *T. molitor* estão entre os primeiros estudos sobre proteinases digestivas de insetos (TERRA *et al.*, 1985; TSYBINA *et al.*, 2005). A maioria

dos estudos foi dedicada às características e localização específica das enzimas do intestino médio de larvas, em especial de tripsinas e, em menor medida, de quimotripsinas e proteinases cisteínicas (TERRA *et al.*, 1985; TSYBINA *et al.*, 2005). Estes estudos precursores serviram como base para a compreensão da digestão inicial do inseto *T. molitor*, com detalhes ricos como o do pH do conteúdo do intestino médio das larvas que varia entre 5,2-5,6 no intestino anterior (IA) e passa para 7,8-8,2 no intestino posterior (IP) (TERRA *et al.*, 1985; VINOKUROV *et al.*, 2006) e que há uma distribuição espacial distinta entre proteinases serínicas e cisteínicas. As proteinases cisteínicas se localizam na porção anterior do intestino médio, onde o pH é mais ácido, enquanto as proteinases serínicas se localizam mais distalmente, onde o pH luminal é mais alcalino (TSYBINA *et al.*, 2005).

Autores como Michaud *et al.* (1995) e Cristofolletti *et al.* (2005) assumem as condições de pH 6,0 como a ideal para se testar a atividade enzimática com os diferentes substratos. Um estudo recente de fracionamento das enzimas digestivas do *T. molitor* mostrou a presença de tripsinas, sendo três com caráter aniônico e uma de caráter catiônico e de quimotripsinas,

sendo quatro de caráter aniônico e uma de caráter catiônico, obtidas alimentando-se as larvas de *T. molitor* com farelo de aveia (VINOKUROV *et al.*, 2006). Para a alimentação controle do presente trabalho utilizou-se o farelo de trigo, onde as larvas já são ambientadas há mais de sete anos no laboratório e quando acrescentou-se os diferentes inibidores na dieta controle (ApTI, BTI, STI e SBI) não houve diferenças significativas com relação à quantidade de proteínas solúveis presentes nos homogeneizados (Tabela 1).

Em um levantamento do transcriptoma do epitélio do intestino médio de larvas de *T. molitor* encontrou-se em números percentuais valores de 67% de sequências não proteolíticas, 1% de metaloproteinasas, 1% de proteinases cisteínicas, 5% de proteinases serínicas e 26 % de outras sequências (PRABHAKAR *et al.*, 2007). Esses dados demonstram que larvas de *T. molitor* apresentam um arsenal diverso de famílias gênicas que expressam diferentes proteinases digestivas, o que pode conferir ao inseto uma capacidade grande de adaptação frente a diferentes inibidores.

## **5.2 – Indução de enzimas digestivas frente à ingestão de inibidores de origem vegetal**

Há mais de três décadas atrás, Green & Ryan relataram que insetos herbívoros induzem o acúmulo de inibidores de proteinases (IPs) em folhas de tomate, uma descoberta que iniciou o conceito de que as defesas das plantas são resultado de processos dinâmicos de expressão de diferentes genes em resposta a estímulos físico-químicos e bióticos do ambiente (GREEN & RYAN, 1972). Suas descobertas iniciais revelaram também que um mecanismo essencial de defesa da planta é limitar a capacidade de um herbívoro de digerir e utilizar os nutrientes essenciais de sua planta hospedeira (FELTON, 2005).

Segundo Ahn *et al.* (2009), em resposta à herbivoria de insetos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa, incluindo as proteínas anti-nutricionais, tais como os inibidores de proteinases para debilitar a proteólise do inseto. Embora seja de grande promessa para o controle de insetos, a super-expressão de inibidores de defesa na planta, em cultivos transgênicos, em sido mal sucedida, devido à resistência aos inibidores de proteinases que parece ser um fenômeno comum entre os insetos.

Estudos mecanísticos de resistência a insetos têm conduzido a uma apreciação da notável diversidade

e plasticidade de proteinases digestivas de insetos, responsáveis pela digestão de proteínas do alimento e que são caracterizadas em serina, cisteína, aspártico e metalo-proteinases (TERRA & FERREIRA, 2005). Ao alimentar as larvas de *T. molitor* com diferentes dietas, observa-se que elas possuem grande resistência, uma vez que diferentes sementes são capazes de induzir diferentes inibidores, o que se torna um desafio para os insetos e eles apresentam uma boa resposta ao desafio a que lhes foi imposto. O fato da alimentação ter mudado pode também ter influenciado na expressão das enzimas digestivas, o que foi observado na Fig. 2. Pode-se dividir o zimograma ao meio (horizontalmente) e observar que da metade inferior em todas as dietas as atividades enzimáticas são equivalentes. Em dietas como milho e *V. unguiculata* ocorre o desaparecimento de bandas de média mobilidade eletroforética encontradas na região central, o que difere de dietas como aveia, arroz e trigo que apresentam duas bandas nesta mesma posição do gel, além disso, o grupo alimentado com arroz apresentou uma banda de baixa mobilidade eletroforética, que a difere das demais dietas. Quando as larvas de *T. molitor* foram alimentadas com farinha de *P. vulgaris*, as maiores

diferenças foram observadas. As duas bandas que aparecem na região central do gel nas dietas anteriores desaparecem e quatro outras bandas de baixa mobilidade eletroforética aparecem. Isso revela que as larvas de *T. molitor* responderam diferentemente com relação à dieta que lhe foi oferecida. Do ponto de vista da fisiologia comparada, as larvas desse inseto se mostraram como um ótimo modelo para se estudar a mudança de expressão de proteinases digestivas frente a diferentes dietas.

Segundo Mosolov & Valueva (2007), a adição de inibidores de plantas na dieta leva à alteração da composição de enzimas digestivas em diferentes insetos. Em comparação a isso, incorporou-se 0,4% de inibidor puro na dieta controle (farelo de trigo). Na Fig. 3 observamos quatro bandas de baixa mobilidade eletroforética, diferente da dieta controle e que volta a se repetir na dieta com o inibidor SBI. O inibidor ApTI não apresenta esta mesma resposta, o que sugere que este inibidor não só é capaz de inibir a ação de proteinases expressas no grupo controle, como também não levou a indução de proteinases insensíveis nas larvas. Uma provável explicação para a alta capacidade de adaptação das larvas de *T. molitor* é o fato que esses

insetos apresentam um sistema contendo simultaneamente proteinases serínicas e cisteínicas, o que leva a um sistema compensatório que reduz a mortalidade da espécie (OPPERT *et al.*, 2005).

Quando compararam-se as atividades dos extratos intestinais de larvas em jejum e que se alimentaram por sete dias com farelo de trigo contendo inibidores puros em relação à dieta controle (Fig. 4), observa-se que estatisticamente inibidores puros como BTI, STI e BTI não produzem diferenças significativas quando comparada com a dieta controle. Fato já aguardado, pois espera-se que o inseto seja capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, afim de compensar a atividade perdida pela ingestão do mesmo. O inibidor ApTI parece ser um ótimo inibidor com perspectiva de ser usado em controle de pragas, pois foi o único que diminuiu estatisticamente as atividades frente aos substratos testados, quando comparado com grupo controle. O mesmo fato pode ser visto *in vitro*, o ApTI consegue inibir as atividades das larvas alimentadas em todas as dietas inclusive quando as larvas são alimentadas com o próprio ApTI (Tabela 2). Segundo Mosolov & Valueva (2007), descobrir a sequência de um gene que confere resistência a plantas



permite se utilizar uma abordagem transgênica para que outras plantas produzam esta estrutura química como praguicida. Neste sentido, o inibidor ApTI seria um ótimo candidato para ser incorporado na produção de um cultivar transgênico. Ao analisar o zimograma da atividade dos homogeneizados intestinais de larvas de *T. molitor* alimentadas com os diferentes inibidores, foram observadas proteinases de baixa mobilidade eletroforética que aparecem nos grupos alimentados com BTI, STI e SBI quando comparados com o controle e inibição quando foi fornecido o inibidor ApTI na dieta (Fig. 5). Isso permitiu estipular que o inibidor ApTI causa inibição pela ausência das atividades em bandas presente no grupo controle trigo sem levar à indução, enquanto a ingestão dos demais inibidores usados neste trabalho culminou na indução de proteinases insensíveis a eles.

Segundo Jongsma & Bolter (1997), a seleção de insetos que expressam proteinases insensíveis a inibidores envolve um processo evolutivo que passa por gerações e, que se inicia com a planta desenvolvendo o inibidor até a adaptação do inseto. Em sentido contrário, demonstra-se no presente trabalho que a adaptação acontece com o contato do inseto com o inibidor (Fig. 6).

Apenas sessenta minutos após o início da alimentação com o inibidor, o inseto já é capaz de se adaptar e, essa adaptação persiste pelo menos no período que foi submetido à alimentação com o inibidor. Ensaios de atividade com diferentes substratos para testar a especificidade das enzimas induzidas demonstraram um padrão complexo de aumento e diminuição das atividades frente aos diferentes substratos, porém, a atividade frente ao substrato suc-AAPF-pNA é muito maior e sobrepõe a atividade apresentada no grupo controle (Fig. 7). Segundo Elpidina *et al.* (2005), quimotripsinas possuem afinidade pelo substrato suc-AAPF-pNA, sendo um bom substrato para utilização em reação de cinética enzimática. Estes dados sugerem que uma das enzimas diferentemente expressa com a dieta contendo o inibidor BTI pode ser uma quimotripsina.

Como ao trabalhar com homogeneizado intestinal tem-se uma mistura de enzimas ativas agindo cada uma em seu substrato e, portanto, esse tipo de amostra não é o mais indicado para se medir especificidade de enzima por substrato, se fez necessário o isolamento das proteinases. A combinação entre cromatografia de troca iônica e outras técnicas de

separação podem ser boas ferramentas para purificar as enzimas digestivas do *T. molitor* (TERRA & FERREIRA, 2005). As frações obtidas de uma cromatografia de troca iônica foram testadas contra diferentes substratos, como pode ser verificado na Fig. 8 A e B. O perfil cromatográfico é diferente na dieta controle (Fig. 8A) comparado à dieta contendo o inibidor BTI (Fig. 8B). As atividades contra dois substratos (z-GGR-MCA e z-PR-MCA) se mostraram mais altas nas frações controle quando comparados com o grupo alimentado com o inibidor (Fig. 8). Segundo Vinokurov (2006), bz-R-pNA é um substrato utilizado para indicar a presença de tripsinas. Como os substratos utilizados também possuem o aminoácido arginina, pode-se dizer que a atividade das tripsinas foi inibida ou deixou de ser expressa com a adição do inibidor BTI. O processo contrário foi visto com a atividade frente ao substrato suc-AAPF-pNA, principalmente nas frações eluídas antes do gradiente salino e na fração no início da gradiente salino, a atividade é maior frente a este substrato quando os insetos foram alimentados com a dieta contendo o inibidor BTI em relação à dieta controle. Estes resultados permitiram a escolha das frações eluídas antes do gradiente salino para

concentração e para um segundo passo de separação a fim de se obter a proteinase isolada e o substrato, suc-AAPF-pNA, como o melhor para se acompanhar a atividade enzimática das frações cromatográficas.

Em outros testes com as frações advindas da cromatografia de troca iônica, mediu-se a atividade com a adição dos efetores de atividade DTT e E-64. Segundo Vinokurov e colaboradores (2006), o DTT aumenta a atividade de proteinases cisteínicas, enquanto Tsybina *et al.* (2005) mostraram que o E-64 é um inibidor de proteinases cisteínicas das larvas de *T. molitor*. Ao se analisar a Figura 9, o fato mais relevante apresentado foi a não interferência do ativador e do inibidor de proteinases cisteínicas, o que leva a suposição que as enzimas diferentemente expressas são do tipo serínicas, não cisteínicas pois não houve inibição com E64. Segundo Prabhakar *et al.* (2007), proteinases serínicas são mais expressas no intestino posterior do *T. molitor* em relação ao intestino anterior.

Tsybina *et al.* (2005) utilizaram para purificar enzimas digestivas do *T. molitor* dois passos de cromatografia, sendo o segundo uma filtração em gel utilizando uma coluna Superdex 75. Ao realizar a filtração em gel das frações eluídas antes do gradiente

salino, obteve-se um perfil de proteínas que apresenta três picos e dois ombros, porém, a atividade máxima sobre o substrato suc-AAPF-pNA ocorre em um vale que foi eluído com 9,5 mL de volume de eluição (Fig. 10). Este volume permitiu calcular uma massa aproximada da proteína, 66,5 kDa, levando em conta a calibração da coluna superdex 75, quando eluídos nas mesmas condições albumina sérica, hemoglobina e urease. Com isso obteve-se uma fração bem enriquecida da proteinase diferentemente expressa nas larvas de *T. molitor*, quando este é alimentado com inibidor incorporado na dieta.

Em outra técnica de separação de proteínas, realizou-se a separação das proteínas com a técnica do gel bidimensional. Segundo Teutschbein *et al.* (2009), a separação de proteínas em duas dimensões, primeiramente pela focalização isoeétrica e depois por um SDS-PAGE, fornece um mapa das proteínas presentes na amostra, que estão enriquecidas o suficiente para passar pelo processo de digestão com tripsina e ser medida sua massa por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight spectrometry*). Neste caso em questão, o autor visou a identificação das proteínas presentes na sua

amostra, enquanto no presente trabalho, buscou-se a melhor técnica de separação para se obter a proteína pura. Ao observar as Figuras 11 A e 11 B, encontra-se um mapa protéico e em destaque os diferentes “spots” de proteínas presentes nos grupos, sendo oito do grupo controle (Fig. 11 A), que não aparecem no grupo alimentado com o inibidor BTI (Fig. 11 B) e dez diferentes “spots” de proteínas que aparecem no grupo alimentado com o inibidor BTI (Fig. 11 B), que não aparecem no grupo controle (Fig. 11 A). Apenas nesta análise protéica foram detectadas dezoito diferenças que podem ser apontadas como resposta à ingestão de inibidores de proteinases. O mais interessante foi descobrir quais destes “spots” correspondem a proteinases. Analisando o zimograma bidimensional (Fig. 12 A e 12 B), descobriu-se que dos dezoito “spots” diferentes entre os grupos (Fig 11 A e 11 B), apenas oito são referentes a proteinases, sendo quatro presentes no grupo controle e ausentes no grupo alimentado com o inibidor BTI (Fig. 12 A) e quatro que aparecem no grupo alimentado com BTI que não aparecem no grupo controle (Fig. 12 B). Estes valores foram obtidos comparando-se os pontos de digestão da gelatina (substrato protéico) nos géis da segunda dimensão.

Como a eletroforese bidimensional é um processo bem agressivo de separação de proteínas e as proteinases analisadas chegaram ativas ao final do processo de separação serve como parâmetro que indicam a estabilidade das proteinases do *T. molitor*, que o zimograma bidimensional seja um bom aliado na separação e identificação das diferentes proteinases.

## 6 – Conclusão

- 1- Não há alteração nas massas das larvas de *T. molitor* alimentadas com os diferentes inibidores pelo menos no período de um mês.
- 2- As diferenças encontradas estão relacionadas as atividades.
- 3- Não há diminuição em atividade geral nas diferentes dietas, exceto quando as larvas foram alimentadas com ApTI.
- 4- A ingestão dos inibidores BTI, STI e SBI incorporados nas dieta das larvas de *T. molitor* apresentam nas proteinases que são diferentemente expressas, onde a larva deixa de expressar umas e passa a expressar outras proteinases.
- 5- A indução de novas proteinases ocorre após sessenta minutos de alimentação com o inibidor SBI e permanece em todo o período de sete dias tempo final do curso temporal.
- 6- A atividade dos homogeinizados intestinas das larvas de *T. molitor* maior sobre o substrato suc-AAPF-pNA caracteriza a atividade de



quimitripsina, das proteinases diferentemente expressas.

- 7- A abordagem cromatográfica demonstrou a capacidade de separação das proteínas do extrato intestinal e a resistência da atividade proteolítica que continuou ativa após ter passado pelo processo de separação.
- 8- A filtração em gel permitiu calcular uma massa teórica de 66,5 kDa para a proteína eluída e que apresentou atividade sobre o substrato suc-AAPF-pNA.
- 9- O gel bi-dimensional também demonstrou ser eficaz na separação das proteínas, sendo o zimograma bi-dimensional um ótimo aliado no estudo de proteinases e da estabilidade das proteinases.
- 10- Como a proteinase induzida com a alimentação com o inibidor BTI se mostrou resistente é possível combinar as duas técnicas de separação de proteínas, cromatografia e gel bi-dimensional para obter um material enriquecido de proteinase e ativo sobre um substrato.

## 7 – Perspectivas

- 1- Seqüenciar o material purificado nas cromatografias e nos géis bi-dimensionais.
- 2- Realizar estudos cinéticos com a proteína purificada.
- 3- Partindo das sequências produzir primer para estudos de RT-PCR e Real Time RT-PCR.
- 4- Utilizar técnicas *in vitro* para compreender os processos fisiológicos que desencadeiam a indução de proteinases insensíveis a inibidores.

## 8 - Referências bibliográficas

- Amirhusin, B., Shade, R.E., Koiwa, H., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Murdock, L.L., Zhu-Salzman, K., 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology* 53, 734-740.
- Ahn, J.E., Salzman, K.Z., 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology* 55, 678–685
- Braun, L., Keddie, B.A., 1997. A new tissue technique for evaluating effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on insect midgut epithelium. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 92-104.
- Broadway, R.M., 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32, 39-53.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43, 855-874.
- Brioshi, D., Naldani, L.D., Bengstan, M.H., Sogayar, M.C., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and

chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1283-1290.

Büyükgüzel, K., Tunaz, H., Putnam, S.M., Stanley D., 2002. Prostaglandin biosynthesis by midgut tissue isolated from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 435–443.

Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.

Christofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 883–901

Clark, T.M., Koch, A. R., Moffett, D.F., 1998. Alkalinization by *Manduca sexta* anterior midgut in vitro: requirements and characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121A, 181–187.

Cloutier, C., Jean, C., Fournier, M., Yelle, S., Michaud, D., 2000. Adult Colorado potato beetles,

*Leptinotarsa decemlineata*, compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44, 69-81.

Coates, B.S., Sumerford, D.V., Hellmich, R.L., Lewis L.C., 2007. A  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase and brainiac/bre5 homolog expressed in the midgut did not contribute to a Cry1Ab toxin resistance trait in *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 346-355.

Elpidina, E.N., Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B., 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie* 87, 771—779

Felton, G.W., 2005. Indigestion is a plant's best defense. *PNAS*. V. 102, N. 52, 18771–18772.

Fusé, M., Zhang, J.R., Partridge, E., Nachman, R.J., Orchard, I., Bendena, W.G., Tobe, S.S., 1999. Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. *Peptides* 20, 1285-1293.

- Green, T. R. & Ryan, C. A. (1972) *Science* 175, 776–777.
- Hilder, V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D., 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160-163.
- Hill, S., Orchard, I., 2005. In vitro analysis of the digestive enzymes amylase and  $\alpha$ -glucosidase in the midguts of *Locusta migratoria* L. in response to the myosuppressin, SchistoFLRFamide. *Journal of Insect Physiology* 51, 1-9.
- Ishimoto, M., Chrispeels, M.J., 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology* 111, 393-401.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch D., Stiekema, W.J., 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8041-8045.
- Jongsma, M.A., Boulter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43, 885-895.

- Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R., 2001. Transcriptional induction of digestive midgut trypsin in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 645-657.
- Michaud, D., Bernier-Vadnais, N., Overney, S., Yelle, S., 1995. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (coleoptera: chrysomelidae). *Insect Biochemistry Molecular and Biology*. V. 25, n. 9, 1041-1048.
- Moon, J., Salzman, R.A., Ahn, J.E., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K., 2004. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 13, 283-291.
- Mosolov, V.V., L.I., Valueva, T.A., 2007. Proteinase inhibitors in plant biotechnology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. V. 44, n. 3, 233—240.
- Mosolov, V.V., Grigor'eva, L.I., Valueva, T.A., 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their

- inhibitors in plant protection (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37, 115–123.
- Oppert, B., Morgan, T.T.D., Hartzler, K., Kramer, K.J., Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 53–58.
- Prabhakar, S., Chen, M.S., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Smith, C. M., Marshall, J., Oppert, B., 2007. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm. *Insect Molecular Biology*. 16, 455–468
- Rana, R.L., Stanley, D.W., 1999. In vitro secretion of digestive phospholipase A<sub>2</sub> by midguts isolated from tobacco hornworms, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42, 149-187.
- Sakai, T., Satake, H., Takeda, M., 2006. Nutrient-induced  $\alpha$ -amylase and protease activity is regulated by crustacean cardioactive peptide (CCAP) in the cockroach midgut. *Peptides* 27, 2157-2164.



- Silva, C.P., Samuels, R.I., Ferreira, R.P., 2008. Induction of digestive proteinases in larvae of *Tenebrio molitor* in response to different diets. XXXVII Reunião Anual da SBBq, CD de resumos, D-22.
- Silva, C.P., Terra, W.R., de Sá, M.F.G., Isejima, E.M., Bifano, T.D., Almeida, J.S., 2001a. Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of the common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1. *Journal of Insect Physiology* 47, 1283-1290.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Lima, R.M., 2001b. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 18-28.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., de Sá, M.F.G., Isejima, E.M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., 2001c. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of  $\alpha$ -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 41-50.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. *Em Comprehensive Molecular Insect*

- Science, Vol. 4, Elsevier, Oxford, p. 171-224.  
Editado por Gilbert L.I., Latrou K. & Gill S.S.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Bastos, F., 1985. Phylogenetic consideration of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 15, 443–449.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Bianchi, A.G., 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25, 487-494.
- Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B., Elpidina, E.N., 2005. Digestive proteinases of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Larvae: purification and Characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, p. 300-305.
- Teutschbein, J., Amanianda, V., Albrecht, D., Clavaud, C., Pötsch, M., Latgé, J.P., Guthke, P., Brakhage, A.A., Kniemeyer, O., 2009. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus*

*fumigatus*. Journal of Proteome Research. 9, 3427–3442

Vinokurov, K.S., Elpidina, E.N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D.P., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., 2006. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 145, 138–146.

Vinokurov, K.S., Elpidina, E.N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D.P., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., 2006. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 145, 126–137

Zieler, H., Dvorak, J.A., 2000. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 11516–11521.