

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**Purificação parcial e caracterização das proteinases digestivas de  
*Dysdercus peruvianus* (Hemiptera - Pyrrhocoridae):  
papel na hidrólise da urease de *Canavalia ensiformis***

**Juliana De Marco Salvadori**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS,  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre

Setembro de 2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. O trabalho realizado teve suporte financeiro da CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que,  
de uma forma ou de outra,  
contribuíram para o meu crescimento  
profissional e pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Célia R. Carlini, pela paciência e dedicada orientação. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e confiança.

Aos professores Carlos Termignoni e Márcio Castro Silva-Filho, integrantes da minha comissão de acompanhamento, pelas sugestões.

Aos professores e alunos do PPGBCM, pela convivência e colaboração.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP.

A Silvia e ao Luciano, pela disponibilidade e bom humor.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas: Vander, Deiber, Angela M., Martha, Angela P., Fernanda S., Melissa, Fernanda M., Rafael, Anne, Vanessa, Diogo, Arlete, German e Fábio, pela colaboração técnica e coleguismo. Pelos momentos de descontração, na grande maioria, acompanhados de um café ou de um mate.

Aos meus pais José Roberto e Tânia, e a minha irmã Carina, pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldade.

Ao Rodrigo, pela compreensão e companheirismo.

Aos meus amigos e familiares, pela torcida.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Carlos Termignoni

PPGBCM – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr<sup>a</sup>. Márcia Margis-Pinheiro

PPGBCM – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Ceará

---

Dr. Júlio Xandro Heck

Laboratório de Biotecnologia do ICTA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorvância  
Abz: ácido *o*-aminobenzóico  
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indocil fosfato  
DFP: diisopropilfluoro  
DTT: ditioneitol  
EDDnp: *N*-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina  
EDTA: ácido etilenodiamino-tetracético  
E64: L-trans-epoxy succinil-L-leucylamido(4-guanidino)-butano  
FPLC: fast purification liquid chromatography  
IgG: imunoglobulina G  
kDa: quilodaltos  
KM: constante de Michaelis-Menten  
MCA: 7-amido-4-metilcumarina  
mU: miliunidade  
MW: marcador de massa molecular  
NBT: azul de nitrotetrazolina  
*p*-Na: *p*-nitroanilida  
*p*-OHMB: *p*-hidroximercuribenzoato de sódio  
Pep-A: pepstatina A  
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil  
PVDF: difluoreto de polivinilideno  
RFU: unidade relativa de fluorescência  
SDS: dodecil-sulfato de sódio  
SDS-Page: gel de poliácridamida para eletroforese com dodecil-sulfato de sódio  
TCA: ácido tricloroacético  
TLCK: Na-*p*-tiroxil-lisina-clorometil cetona  
TTBS: tris-HCl salino contendo 0,05% de tween 20  
U: unidade  
V<sub>max</sub>: velocidade máxima

## RESUMO

A cultura algodoeira tem significativa participação na economia mundial. O algodão (*Gossypium hirsutum*) é predado por uma grande variedade de insetos, entre eles o percevejo manchador *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). O hábito alimentar deste inseto provoca danos nas sementes e fibras depreciando-as para a utilização comercial. Como alternativa para o aumento da resistência das plantas ao ataque de insetos predadores, estratégias biotecnológicas vêm sendo consideradas. A *Canavalia ensiformis* é fonte de proteínas com atividade inseticida como a urease, a canatoxina e a concanavalina-A. Tanto a canatoxina como a urease exercem efeitos tóxicos em ninfas deste percevejo, causando mortalidade e atraso no desenvolvimento dos insetos sobreviventes. De maneira análoga a outros modelos de insetos já estudados, a toxicidade em *D. peruvianus* dependeria da ativação proteolítica das proteínas por enzimas digestivas (catepsinas) do inseto e formação de um peptídeo tóxico. Neste trabalho, estudos de hidrólise *in vitro* na presença de inibidores seguidos por SDS-page e Western-blot confirmaram a ativação proteolítica da urease por enzimas do tipo catepsina-B. O homogeneizado de intestinos de ninfas hidrolisa também substratos típicos para catepsinas, como hemoglobina e Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, e a atividade proteolítica é bloqueada por pepstatina-A e E-64, inibidores específicos para aspártico e cisteíno proteinases, respectivamente. Duas cisteíno proteinases (DpQ-NR e DpQ-E) de intestinos de ninfas de *D. peruvianus* foram parcialmente purificadas e caracterizadas. Ambas apresentaram pH ótimo de atividade proteolítica entre 4,5 e 6,5, na presença de DTT e foram totalmente inibidas por E-64. No entanto o perfil de inibição evidencia a presença de outras enzimas nas frações. Ensaio de especificidade da fração DpQ-NR revelaram a preferência da enzima por substratos contendo resíduo hidrofóbico em P<sub>2</sub>, enquanto a enzima DpQ-E tem preferência por substratos contendo aminoácidos básicos em P<sub>1</sub>. Assim, o trabalho desenvolvido sugere a presença de proteinases múltiplas no sistema digestivo de *D. peruvianus* e o possível envolvimento destas peptidases na ativação proteolítica da urease.

## ABSTRACT

Cotton (*Gossypium hirsutum*), an important agricultural commodity, is attacked by a number of pests, such as the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) which may cause severe losses in cotton plantations. Bug feeding on the cotton seeds and stains the cotton fibers resulting in damage to the seed, besides being a vector for phytopathogenic bacteria and fungi. Biotechnology strategies focusing on plant defensive molecules are being considered as an alternative to increase host plant resistance against this pest. The jack bean *Canavalia ensiformis* is the source of proteins displaying insecticidal activity such as urease, canatoxin and concanavalin-A. Canatoxin and urease were shown to cause lethality and severe detrimental effects in surviving insects, delaying the development stages of *D. peruvianus*. As in other insect models studied previously, this would depend on the proteolytic activation of the protein by insect cathepsin-like digestive enzymes to produced toxic peptides. The *in vitro* hydrolysis of urease in the presence of inhibitors, followed by SDS-page and Wester-blot confirm the proteolytic activation by insect cathepsin B-like enzymes. A nymphal gut extract hydrolysed typical cathepsin substrates, such as hemoglobin and Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, and hydrolysis was blocked by pepstatin-A and E-64, specific inhibitors of aspartic and cysteine proteinases. Two cysteine peptidases (DpQ-NR and DpQ-E) of *D. peruvianus* nymphs were partially purified and characterized. Both enzymes showed maximum activities at pH 4.5-5.0 and 5.5-6.5 in the presence of dithiotreitol and were totally inhibited by E-64. However, the inhibition profile points out to the presence of other types of proteinases in both fractions. DpQ-NR preferentially hydrolysed substrate with hydrophobic amino acids in P2, while DpQ-E had preference for substrate with basic residues in P1. Therefore, our work suggests the presence of multiple proteinases with distinct biochemical properties in the digestive system of *D. peruvianus* and the potential involvement of these peptidases on the proteolytic activation of urease.



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A produção agrícola e o impacto da herbivoria	1
1.2. A cultura algodoeira no Brasil e no mundo	2
1.3. Biopesticidas	4
1.4. Mecanismos vegetais de defesa	5
1.5. Propriedades biológicas da urease e da canatoxina	6
1.6. Atividade inseticida da urease e da canatoxina	8
1.7. Nutrição e digestão dos insetos	11
1.8. As enzimas proteolíticas	13
1.9. O percevejo manchador do algodão	17
2. OBJETIVO	22
2.1. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Reagentes	23
3.2. Criação dos insetos	24
3.3. Obtenção do material biológico e preparo do extrato	24
3.4. Dosagem de proteína	26
3.5. Atividade proteolítica	26
3.6. Ativação proteolítica da urease de <i>Canavalia ensiformis</i>	28
3.7. SDS-Page	29
3.8. Western-blot	29
3.9. Fracionamento das enzimas digestivas presentes no homogeneizado	30
3.10. Caracterização das enzimas parcialmente purificadas	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Atividade proteolítica acídica sobre substrato proteico	33
4.2. Atividade proteolítica acídica sobre substrato sintético	35
4.3. Inibidores da atividade proteolítica sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp	35
4.4. Ativação proteolítica da urease de <i>Canavalia ensiformis</i>	39
4.5. Purificação das enzimas proteolíticas presentes no homogeneizado	43
4.6. Caracterização das enzimas proteolíticas parcialmente purificadas	51
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A produção agrícola e o impacto da herbivoria

O crescimento da população mundial e o acesso de maiores contingentes populacionais ao alimento e a bens de consumo, determinam uma contínua e crescente necessidade de aumento de volume e da eficiência na produção agrícola mundial. Na base deste aumento, estão as demandas pelo incremento no rendimento e na rentabilidade da agricultura. Um meio prático de atender a estas demandas é aumentar a produção e reduzir as perdas causadas por insetos, os quais são responsáveis por perdas de até 14% na atividade agrícola global (Oerke e Dehne, 1997).

Insetos fitófagos não são apenas responsáveis por perdas diretas de produtividade resultantes da herbivoria, mas também por perdas indiretas, pois alguns sugadores agem como vetores de patógenos. Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera constituem as três maiores ordens de insetos-praga da agricultura. Os danos, diretos e indiretos, resultantes da alimentação dos insetos e os recursos despendidos para a implementação de estratégias de controle, estão entre as maiores causas de perdas econômicas na agricultura, comprometendo cerca de 37% da produção. Aproximadamente 13% destas perdas estão relacionadas a danos que ocorrem ainda no campo (Gatehouse *et al.*, 1992).

As estimativas de perdas causadas por ácaros e insetos fitófagos na agricultura brasileira chegam a 7,3% nas grandes culturas (algodão, arroz, café, milho, soja, trigo, etc.), 6,7% em frutíferas (abacaxi, banana, citrus, maçã,

pêssego, uva, etc.) e 5% nas culturas olerícolas (alho, batata, cebola e tomate) (Bento, 1999).

Apesar da ampla utilização de defensivos agrícolas (inseticidas, acaricidas, fungicidas, etc.) nos processos produtivos e na conservação de estoques, enormes perdas ainda ocorrem na agricultura (Hilder e Boulter, 1999). Avaliações de produtividade na ausência de tratamentos químicos chegam a estimar perdas de até 84% nas culturas de algodão, 58% de soja e 83% de arroz (Oerke e Dehne, 1997). O controle químico, entretanto, traz consigo efeitos prejudiciais a longo prazo, como por exemplo a contaminação do meio ambiente e a eliminação de parasitóides e predadores, agentes de controle biológico das pragas. Além disso, centenas de espécies de insetos desenvolvem resistência à um ou mais inseticidas devido a pressão seletiva. Para conciliar a necessidade de produção de grãos com um controle seguro dos insetos-praga e a sustentabilidade do meio ambiente, a sociedade têm exigido o desenvolvimento de métodos de controle de pragas alternativos, caracterizados pelo menor impacto ambiental, menor risco para a saúde humana e que se enquadrem dentro de estratégias de manejo integrado de pragas.

## **1.2. A cultura algodoeira no Brasil e no mundo**

A produção comercial mundial de algodão (*Gossypium* sp.) abrange uma área de 54 milhões de hectares, distribuindo-se em 68 países (Barreto *et al.*, 1999). Entre os maiores produtores mundiais estão os Estados Unidos e a China, revezando-se na posição de líder, seguidos pela Índia e o Paquistão, enquanto a

China, a Indonésia e a União Européia destacam-se como os maiores importadores (Barreto *et al.*, 1999).

A produção brasileira corresponde a 379 mil toneladas de algodão em pluma, oriundas de 650 mil hectares cultivados (Barreto *et al.*, 1999). A cotonicultura tem significativa participação na economia nacional, tanto na produção agrícola como no processamento, fiação, tecelagem e confecção têxtil. Do lado da demanda de insumos, o cultivo do algodão exige significativas quantidades de fertilizantes e corretivos de solo e, além disso, incrementa a demanda por implementos agrícolas e defensivos (Santos, 1993; Moraes, 1997; Luttrell *et al.*, 1994). No Brasil, o algodão é cultivado em uma grande amplitude geográfica, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Pará e Bahia (Ramalho, 1994).

A planta de algodão é conhecida mundialmente como uma das mais sujeitas ao ataque de pragas, muitas delas extremamente nocivas à cultura. O algodoeiro atrai e hospeda um complexo significativo de insetos e ácaros, os quais podem atacar raízes, caules, folhas, botões florais, maçãs e capulhos. Os danos provocados pelas pragas podem reduzir a produtividade, como também afetar certas características das sementes e da fibra, depreciando-as consideravelmente para a utilização comercial (Luttrell *et al.*, 1994; Santos, 1999; Gallo *et al.*, 2002).

As espécies de insetos mencionadas como pragas principais do algodão no Brasil são: a broca-da-raíz *Eutinobothrus brasiliensis* (Coleoptera: Curculionidae), os pulgões *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), os tripses *Thrips tabaci* e *Frankliniella* sp. (Thysanoptera: Thripidae), os percevejos (Hemiptera) *Scaptocoris castanea* (Cydnidae), *Horcias nobilellus* (Miridae) e

*Dysdercus* spp. (Pyrrhocoridae), as lagartas (Lepidoptera) *Pectinophora gossypiella* (Gelechiidae), *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda* e *Alabama argillacea* (Noctuidae), e o bicudo *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) (Ramalho, 1994; Gallo *et al.*, 2002).

Quando não são aplicadas medidas de controle, o complexo de percevejos manchadores do algodão, gênero *Dysdercus* pode ser responsável por até 49% da perda da produção de algodão (Ramalho, 1994).

### **1.3. Biopesticidas**

O uso de biopesticidas de origem microbiana e vegetal como um componente no manejo integrado de pragas e como estratégia de proteção ao meio ambiente vem ganhando aceitação no mundo inteiro. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é considerado o principal agente microbiano utilizado como biopesticida no controle de insetos, pela vantagem de apresentar toxicidade seletiva para alguns insetos, não gerar resíduos poluentes e não atingir outros organismos da cadeia alimentar (mamíferos, pássaros, e etc.) (Gatehouse, 2002). Os produtos baseados na toxina de *B. thuringiensis* representam os bioinseticidas mais utilizados no mundo, empregados há mais de 50 anos no controle de pragas, principalmente de lepidópteros (Musser e Shelton, 2003). No entanto, o surgimento de insetos resistentes e a existência de insetos não suscetíveis às conhecidas toxinas de *Bt*, despertaram o interesse para o estudo de outras proteínas inseticidas que possam ser usadas isoladamente ou em associação com outras já descritas, no controle de insetos-alvo (McGaughey e Whalon, 1992; Tabashnik, 1994; Gatehouse, 2002).

A busca de alternativas para as toxinas *Bt* tem se concentrado, com algumas exceções, em proteínas entomocidas derivadas de plantas. Ao longo de milhões de anos de evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa efetivos contra insetos predadores. Diversas classes de proteínas de plantas demonstram ter algum efeito tóxico ou antimetabólico para insetos. Entomotoxinas de origem vegetal se enquadram nesta nova alternativa de controle em função do surgimento de resistência e a existência de insetos não suscetíveis às toxinas bacterianas.

#### **1.4. Mecanismos vegetais de defesa**

De forma geral, as plantas possuem diversos mecanismos de defesa contra insetos, sejam eles de natureza física ou química. As leguminosas, por exemplo, são particularmente ricas em nitrogênio e sintetizam uma variedade de compostos defensivos de natureza proteica, como inibidores de proteases e de glicohidrolases, lectinas, arcelinas e proteínas inativadoras de ribossomos. Outros componentes proteicos envolvidos no mecanismo de defesa das plantas são as tiaminases, quitinases, vicilinas modificadas e as ureases (Ryan, 1990; Felton, 1996; Bolter e Jongsma, 1997; Koiwa *et al.*, 1997; Stotz *et al.*, 1999; Follmer *et al.*, 2004a; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

A semente de *Canavalia ensiformis*, uma leguminosa conhecida pelo nome popular de feijão-de-porco, altamente resistente ao ataque de insetos, é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a urease e a concanavalina A (Sumner e Howell, 1936), inibidores de tripsina (Ubatuba, 1955) e a canatoxina (Carlini e Guimarães, 1981). A urease de *C. ensiformis* foi a primeira

enzima cristalizada e também a primeira enzima níquel-dependente caracterizada (Sumner, 1926; Dixon *et al.*, 1975). A forma mínima da enzima ativa é um trímero de cadeias de 90 kDa, encontrada na forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991).

Carlini e Guimarães (1981) isolaram das sementes de *C. ensiformis* a canatoxina, uma toxina proteica que induz convulsão e causa morte de camundongos e ratos quando injetada intraperitonealmente ( $DL_{50}$ = 0,5 a 2,0 mg/kg). A proteína também é ativa por via intravenosa, intramuscular e subcutânea, no entanto não é capaz de induzir efeitos letais quando administrada por via oral, provavelmente devido à sua instabilidade em meio ácido (Carlini *et al.*, 1984; Carlini e Guimarães, 1991). Comparações de seqüências parciais indicaram um alto grau de homologia (cerca de 85%) desta proteína com a urease da *C. ensiformis*. Estudos posteriores demonstraram que a canatoxina é uma isoforma de urease, possuindo de 30 a 40% da atividade ureolítica da forma majoritária na semente (Follmer *et al.*, 2001). A forma ativa da canatoxina apresenta um peso molecular de 184 kDa quando analisada por gel-filtração. Em SDS-PAGE, em meio redutor ou não, seu peso molecular é de cerca de 95 kDa, indicando que a forma nativa da proteína é um dímero ligado por forças não covalentes (Follmer *et al.*, 2001).

### **1.5. Propriedades biológicas da urease e da canatoxina**

Estudos sobre o mecanismo de ação da canatoxina mostraram que a proteína apresenta potente efeito secretagogo em vários tipos de células de mamíferos, ativando a produção de eicosanóides e as vias de lipoxigenases, e

induzindo as alterações dos níveis e fluxos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a e 1991b; Ghazaleh *et al.*, 1992; Ghazaleh *et al.*, 1997). A canatoxina induz em ratos bradicardia, hipertensão e hipotermia, fenômenos que precedem o fenômeno convulsivo tônico-clônico, característico da ação tóxica (Carlini *et al.*, 1984). Com exceção da toxicidade intraperitoneal em camundongos, efeito característico da canatoxina, a urease majoritária de *C. ensiformis* parece compartilhar todas as outras propriedades farmacológicas descritas para a canatoxina (Follmer *et al.*, 2001). A exemplo de outras toxinas proteicas (Eidels *et al.*, 1983), a urease e a canatoxina comportam-se como lectinas monovalentes ligando-se a glicoderivados complexos, como gangliosídeos e fetuína (Carlini e Guimarães, 1991; Follmer *et al.*, 2001).

Buscando uma provável função protetora contra fitopatógenos e insetos fitófagos, o papel fisiológico da canatoxina na planta também foi investigado. Proteínas canatoxina-like e ureases foram detectadas em diversas leguminosas, através de ensaios de imunoreatividade com anticorpos policlonais anti-canatoxina, sugerindo um processo de conservação evolutiva dos determinantes antigênicos (Carlini *et al.*, 1988). Além disso, relatos de que os conteúdos da toxina e da urease aumentam progressivamente durante a maturação das sementes, reforçam a idéia de que as proteínas desempenham um importante papel de defesa da planta (Barcellos *et al.*, 1993). Estudos mais recentes demonstraram a atividade fungicida e fungistática, sobre fungos filamentosos inclusive fitopatogênicos, tanto da canatoxina como da urease de soja (*Glycine max*) (Oliveira *et al.*, 1999; Becker-Ritt, 2005).



## 1.6. Atividade inseticida da urease e da canatoxina

A canatoxina foi testada por via oral em espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae), *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Os resultados apontaram uma relação entre a ação tóxica da proteína e as enzimas digestivas dos insetos (Carlini *et al.*, 1997). *C. maculatus*, *R. prolixus*, *N. viridula* e *D. peruvianus*, insetos suscetíveis a canatoxina, possuem o trato digestório ácido e as enzimas proteolíticas do tipo catepsina, sugerindo que a especificidade da ação tóxica estaria diretamente relacionada com o sistema digestivo dos insetos (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Stanisçuaski *et al.*, 2005a). Já os insetos resistentes, possuem trato digestório alcalino e enzimas do tipo tripsina (Terra e Ferreira, 1994; Carlini *et al.*, 1997). Estudos posteriores mostraram que formas adultas de *R. prolixus* e *D. peruvianus* são resistentes aos efeitos tóxicos da urease e da canatoxina, contrastando com a suscetibilidade das formas jovens (Ferreira-DaSilva, 2002; Stanisçuaski *et al.*, 2005a).

Gombarovits (1999) demonstrou que a canatoxina não tem efeito inibitório sob as principais proteases e amilases de *C. maculatus* e *R. prolixus*. Descartada uma ação inibitória sobre as enzimas digestivas, a hipótese de ativação proteolítica da toxina pelas proteinases do trato digestório dos insetos foi avaliada. Estudos com *R. prolixus* mostraram que a administração da canatoxina

juntamente com inibidores clássicos de catepsinas, como pepstatina-A e E-64, aumentava significativamente a taxa de sobrevivência dos insetos (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Assim, a ativação da toxina envolveria enzimas acídicas (tipo aspártico e cisteíno-proteinases) e o efeito tóxico seria decorrente da formação de peptídeos inseticidas. Essa hipótese foi comprovada pela hidrólise *in vitro* da canatoxina com enzimas obtidas de *C. maculatus*: os peptídeos gerados mostraram efeito inseticida em *R. prolixus* e a administração conjunta dos inibidores não foram capazes de impedir a mortalidade dos insetos (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000).

Os fragmentos entomotóxicos gerados foram separados por gel-filtração (os mais ativos possuíam massa molecular entre 8 e 12 kDa) dentre os quais o mais ativo, denominado pepcanatox, foi purificado e teve a seqüência N-terminal determinada (Gombarovitz, 1999; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). O peptídeo recombinante, batizado jaburetox 2-Ec, equivalente ao pepcanatox e derivado uma das isoformas de urease, obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, mostrou potencial para uso como bioinseticida (Pires-Alves, 2002; Mulinari, 2004). Ensaio biológico com a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), inseto resistente a canatoxina devido à característica alcalina de suas enzimas digestivas, mostrou-se suscetível ao peptídeo recombinante (Ferreira-DaSilva, 2002), comportamento também relatado para o percevejo *Dysdercus peruvianus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005a).

Follmer *et al.* (2004b) avaliaram as propriedades biológicas das ureases vegetais (*C. ensiformis* e soja, *Glycine max*) e microbiana (*Bacillus pasteurii*) em *D. peruvianus*. A urease de *C. ensiformis* mostrou-se tão tóxica quanto a

canatoxina, enquanto ambas na concentração de 0,052% p/p apresentaram-se três vezes mais potentes que a urease de soja. O fato da urease de *B. pasteurii* não apresentar atividade inseticida, provavelmente, está relacionado com a ausência nessa molécula de parte da seqüência correspondente ao peptídeo entomotóxico.

Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) e Stanisçuaski *et al.* (2005a) relataram diferenças na susceptibilidade à canatoxina entre formas adultas e jovens dos percevejos *R. prolixus* e *D. peruvianus*. Diferenças na resposta para toxinas durante o ciclo de vida de alguns insetos já foram relatadas. Keller *et al.* (1996) relataram resistência aumentada para a toxina CryIC, de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), nas últimas fases larvais de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) em relação às formas mais jovens, fato atribuído a um processamento enzimático diferenciado da proteína ingerida. Alterações na permeabilidade da membrana intestinal durante o ciclo de vida do inseto também poderiam ter um papel importante na toxicidade da canatoxina. Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) demonstraram que após um repasto de sangue de coelho, ninfas de *R. prolixus* apresentavam na hemolinfa imunoglobulinas de coelho intactas e fragmentadas, no entanto um padrão diferenciado foi constatado na hemolinfa de adultos. Variações na permeabilidade intestinal e no processo digestivo de acordo com a fase de vida do inseto poderiam explicar a falta de efeito da urease e da canatoxina intacta em hemípteros adultos.

## 1.7. Nutrição e digestão dos insetos

A classe Insecta é composta por um grupo incrivelmente diverso de animais com mais de um milhão de espécies (Gallo *et al.*, 2002). Considerando todos os animais existentes hoje na Terra, cerca 67% são insetos (Buzzi e Miyazaki, 1999).

Os insetos alimentam-se de substâncias orgânicas, sejam elas de origem animal ou vegetal. Alguns consomem madeira, folhas, sementes, frutos ou fungos, enquanto outros se alimentam de tecidos animais, lã, sangue e até de outros membros do filo Arthropoda. Assim, com relação aos hábitos alimentares praticados, os insetos podem ser classificados como fitófagos, zoofágos, incluindo predadores e parasitos, e saprófagos (Buzzi e Miyazaki, 1999).

A nutrição diz respeito aos componentes químicos necessários a um organismo para a manutenção dos tecidos, crescimento e reprodução, além da energia necessária para manter estas funções (Chapman, 1998). Os nutrientes necessários para o pleno desenvolvimento dos insetos podem provir do alimento ou de outras fontes, como tecidos de reserva (vitelo e corpo gorduroso), microrganismos simbiotes (bactérias, protozoários e fungos) ou da síntese do próprio inseto (vitaminas) (Buzzi e Miyazaki, 1999).

Grande parte do alimento ingerido pelos insetos é macromolecular, na forma de polissacarídeos e proteínas, já os lipídeos são ingeridos na forma de glicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos. A digestão é um processo pelo qual o alimento em sua forma ingerida é degradado em componentes assimiláveis. O processo acontece no trato digestivo, através da ação hidrolítica das enzimas digestivas secretadas pelo intestino médio e glândulas salivares (Buzzi e Miyazaki,

1999). O sistema digestório dos insetos compreende o tubo digestivo e as partes acessórias: glândulas salivares, cecos gástricos e túbulos de Malpighi. O tubo digestivo está dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Chapman, 1998).

Para que os processos de desenvolvimento e a reprodução das espécies sejam bem sucedidos, os insetos requerem os mesmos aminoácidos essenciais que os mamíferos: arginina, lisina, leucina, isoleucina, triptofano, fenilalanina, histidina, metionina, valina e treonina (Murdock e Shade, 2002). A ausência de certos nutrientes pode afetar o desenvolvimento dos insetos, comprometendo o crescimento e as ecdises. Além disso, também podem ocorrer alterações na coloração e na distribuição de castas nos insetos sociais (Chapman, 1998; Buzzi e Miyazaki, 1999).

A diversidade de fontes de alimento dos insetos resultou em modificações profundas do tubo digestivo e dos processos enzimáticos em certas espécies. As enzimas que efetuam a digestão dos alimentos exibem diversidade correspondente e variam com a natureza dos mesmos (Murdock e Shade, 2002). Devido ao reduzido conteúdo proteico dos tecidos vegetais, a obtenção de nitrogênio é fator limitante na nutrição dos insetos fitófagos. Assim, a eficiência na hidrólise das proteínas ingeridas na dieta é fundamental na sobrevivência destas espécies.

A ampla distribuição de proteínas de defesa nas plantas reflete a importância do processo de proteólise para os insetos predadores, pois a ingestão de inibidores de proteases interfere diretamente na biodisponibilidade de

aminoácidos necessários para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (Broadway e Duffey, 1986; Broadway, 1995; Koiwa *et al.*, 1998; Zhu-Salzman *et al.*, 2003).

Possivelmente, a diversidade das enzimas proteolíticas descritas em insetos fitófagos seja uma resposta para a presença abundante de inibidores de protease nos tecidos vegetais.

### **1.8. As enzimas proteolíticas**

As proteinases constituem a classe mais numerosa das enzimas, abrangendo uma grande variedade de mecanismos de ação e especificidades.

De acordo com a posição da ligação peptídica clivada, as enzimas proteolíticas podem ser classificadas como endo ou exopeptidases. As endopeptidases clivam ligações peptídicas nas regiões internas da proteína, enquanto as exopeptidases agem nos extremos da cadeia proteica, seja na porção amino (N) ou carboxi (C)-terminal.

Atualmente, são reconhecidas seis classes de enzimas proteolíticas ([www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)): proteinases aspárticas, proteinases glutâmicas, metaloproteinases, proteinases cisteínicas, proteinases serínicas e proteinases treonínicas. Os mecanismos utilizados nos processos catalíticos das proteinases envolvem a ativação de uma molécula de água (como é o caso das peptidases aspárticas, glutâmicas e metaloproteinases), que adquire caráter nucleofílico e é capaz de atacar a carbonila da ligação peptídica, ou pela formação de um

intermediário covalente onde as cadeias laterais dos aminoácidos (peptidases cisteínicas, serínicas e treonínicas) são os próprios nucleófilos.

### **1.8.1. Proteinases aspárticas – Família A1**

As proteinases aspárticas são compostas por 7 clãs (AA, AB, AC, AD, AE, AF, A-) divididas em 14 famílias. A peptidase representante da família A1 é a pepsina A de *Homo sapiens*.

Peptidases desta classe possuem dois resíduos de ácido aspártico no sítio ativo e exercem atividade catalítica máxima em pH ácido (na faixa de 3,5 a 5,0) (James, 2004). Assim como a maioria das enzimas da família A1, a catepsina D, age como endopeptidase clivando preferencialmente entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, mostrando uma especificidade secundária por aminoácidos hidrofóbicos em P<sub>2</sub>. O inibidor característico usado na identificação desta classe de enzimas é a pepstatina-A (Marciniszyn *et al.*, 1976), no entanto outros inibidores proteicos como o inibidor de pepsina de *Ascaris*, o inibidor de catepsina D de batata e a saccharopepsina também podem ser utilizados.

### **1.8.2. Proteinases glutâmicas – Família G1**

As proteinases glutâmicas compreendem um único clã (GA). A enzima representante desta família (G1) é a peptidase do fungo *Scytalidium lignicolum*.

A enzima possui resíduos de glutamato e glutamina no sítio catalítico (Fujinaga *et al.*, 2004), exerce sua atividade proteolítica máxima em pH ácido e é inibida por 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrofenoxi)-propano (Oda, 2004).

### **1.8.3. Metaloproteinases – Família M1**

As metaloproteinases são compostas por 15 clãs (MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP, MQ e M-) divididas em 53 famílias. A peptidase representante da família M1 é a aminopeptidase N de *Homo sapiens*.

O sítio ativo da proteinase compreende os resíduos de histidina, de ácido glutâmico e de tirosina, além de um íon metálico divalente. Todos os membros desta família atuam na região N-terminal de polipeptídeos e grande parte agem como aminopeptidases. Bestatina e amastatina são inibidores efetivos, assim como EDTA e 1,10-fenantrolina.

### **1.8.4. Proteinases serínicas – Família S1**

As proteinases serínicas são compostas por 7 clãs (SB, SC, SE, SF, SH, SJ, SK) divididas em 41 famílias. A peptidase representante desta família é a quimotripsina A do bovino *Bos taurus*.

Peptidases desta família possuem a tríade catalítica composta por histidina, ácido aspártico e serina. Todas as peptidases com atividade de quimotripsina possuem atividade endopeptidásica e a especificidade das enzimas é dependente do resíduo posicionado em P<sub>1</sub>. Assim, três tipos principais de enzimas compõem este grupo: tripsinas que preferem arginina ou lisina, quimotripsinas que preferem resíduos hidrofóbicos e elastases que preferem alanina em P<sub>1</sub>. Inibidores naturais e sintéticos desta família incluem ovomucóide, aprotinina, Bowman-Birk, serpinas, PMSF, DFP, leupeptina e TLCK.



### 1.8.5. Proteinases cisteínicas – Família C1

As cisteíno proteinases são compostas por 7 clãs (CA, CD, CE, CF, CH, CL e C-) divididas em 61 famílias. A peptidase representante da família C1 é a papaína extraída da planta de mamão, *Carica papaya*.

Cisteíno proteinases da família C1 requerem um ambiente redutor levemente ácido (no intervalo de pH entre 3,0 e 6,5) para sua atividade ótima. São endopeptidases em sua maioria e a especificidade pelo substrato é determinada pela região S<sub>2</sub> da enzima que preferencialmente é ocupada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Ménard *et al.*, 1993; Storer e Ménard, 1994) como é o caso das catepsinas B, S, K e L. Substratos sintéticos cromogênicos e fluorogênicos contendo Phe-Arg-(pNA ou MCA) são amplamente utilizados na detecção da atividade endopeptidásica de catepsinas de mamíferos (B, L, S, K, V, F e O) (Brömme *et al.*, 2004). Em algumas famílias desta classe, somente a díade cisteína-histidina parece ser essencial para a catálise. No entanto, outras proteinases possuem um resíduo de asparagina envolvido na orientação do grupamento imidazol da histidina. Estas enzimas têm o sítio catalítico composto pela tríade cisteína-histidina-asparagina.

E-64 é um inibidor específico para cisteíno proteinases (Hanada, 1978), entretanto sua utilização não permite distinguir as várias enzimas desta classe. Proteinases cisteínicas são ainda inibidas por reagentes que oxidam o grupo tiol, como metais pesados, agentes alquilantes e oxidantes, como o *p*-hidroximercuribenzoato de sódio.

### **1.8.6. Proteinases treonínicas – Família T1**

As proteinases treonínicas compreendem um único clã (T), dividido em quatro famílias. A proteinase representante da família T1 é componente do proteassoma bacteriano de *Thermoplasma acidophilum*.

A quimostatina inibe a atividade quimotripsínica, enquanto a leupeptina inibe a atividade tripsínica do proteassoma. Compostos de origem bacteriana como a lactacistatina, a epoxomicina e a eponemicina também são capazes de inativar a treonina catalítica do proteassoma.

### **1.9. O percevejo manchador do algodão**

Os percevejos manchadores (*Dysdercus* sp., especialmente *Dysdercus peruvianus*) são insetos cosmopolitas, considerados importantes pragas do algodoeiro.

De acordo com Gallo *et al.* (2002), o ciclo biológico dos percevejos manchadores tem início no solo e dura 45 dias, variando de 25 a 69 dias, na faixa térmica de 18 a 30°C. Após a cópula, as fêmeas ovipositam em escavações ou aberturas naturais do solo próximas ao algodoeiro, cobrindo ligeiramente os ovos com terra. Os ovos são esbranquiçados e adquirem coloração amarelo-claro brilhante à medida que ocorre o desenvolvimento embrionário. Após o período de incubação (cerca de 10 dias) dá-se a eclosão das ninfas que, inicialmente de coloração rosada, vão tornando-se avermelhadas ao longo da passagem por cinco instares. A partir do 4º instar é possível constatar a presença das tecas alares. As ninfas sobem pela planta e aglomeram-se sobre as maçãs e capulhos atingindo a

semente. Aproximadamente 30 dias após a postura dos ovos, surgem os adultos, que apresentam coloração marrom-escura. Tanto ninfas como adultos penetram, preferencialmente, entre as fibras dos capulhos abertos onde sugam as sementes.

Em decorrência da atividade alimentar (picadas) do percevejo manchador podem resultar os seguintes danos (Milano *et al.*, 1999): a) perda de peso da semente e do teor de óleo; b) redução no desenvolvimento e queda das maçãs novas; c) abertura defeituosa dos capulhos quando as maçãs são atacadas durante seu desenvolvimento, provocando sua deformação; e d) manchas e podridão das fibras dos capulhos pela entrada de bactérias e fungos.

Follmer *et al.* (2004b) e Stanisçuaski *et al.* (2005a) descreveram os efeitos tóxicos da urease e da canatoxina (Figura 1 A e B) em *D. peruvianus*. Diferente das formas adultas do percevejo, as ninfas de 3º e 4º instares mostraram-se sensíveis a canatoxina. As atividades proteolíticas identificadas em homogeneizados de intestinos de adultos e ninfas revelaram um predomínio de enzimas acídicas do tipo catepsina. No entanto, as atividades detectadas variaram quanto aos valores de pH máximos e a sensibilidade à inibidores classe-específicos, sugerindo diferenças na expressão das enzimas proteolíticas durante o ciclo de vida do inseto (Figura 2) (Stanisçuaski *et al.*, 2005a).

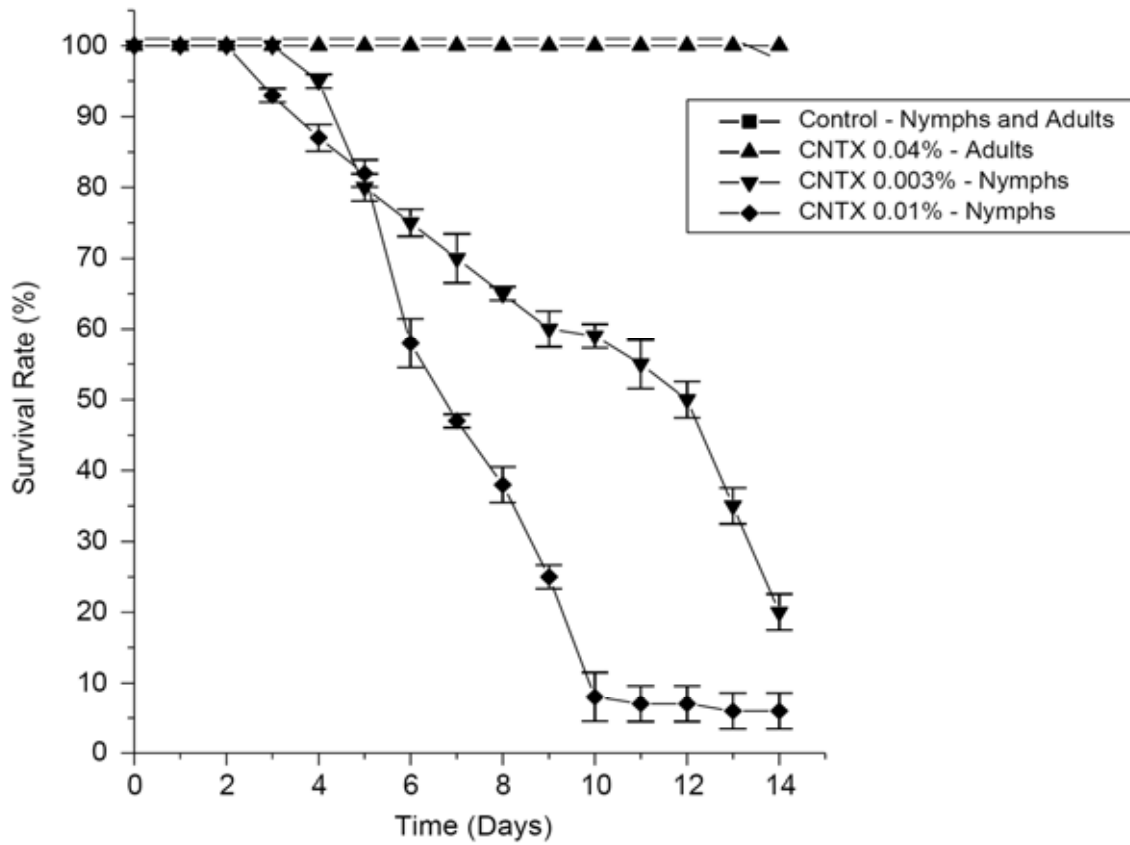


Figura 1A – Efeito inseticida da canatoxina em ninfas de 3<sup>o</sup> instar e adultos de *Dysdercus peruvianus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005a).

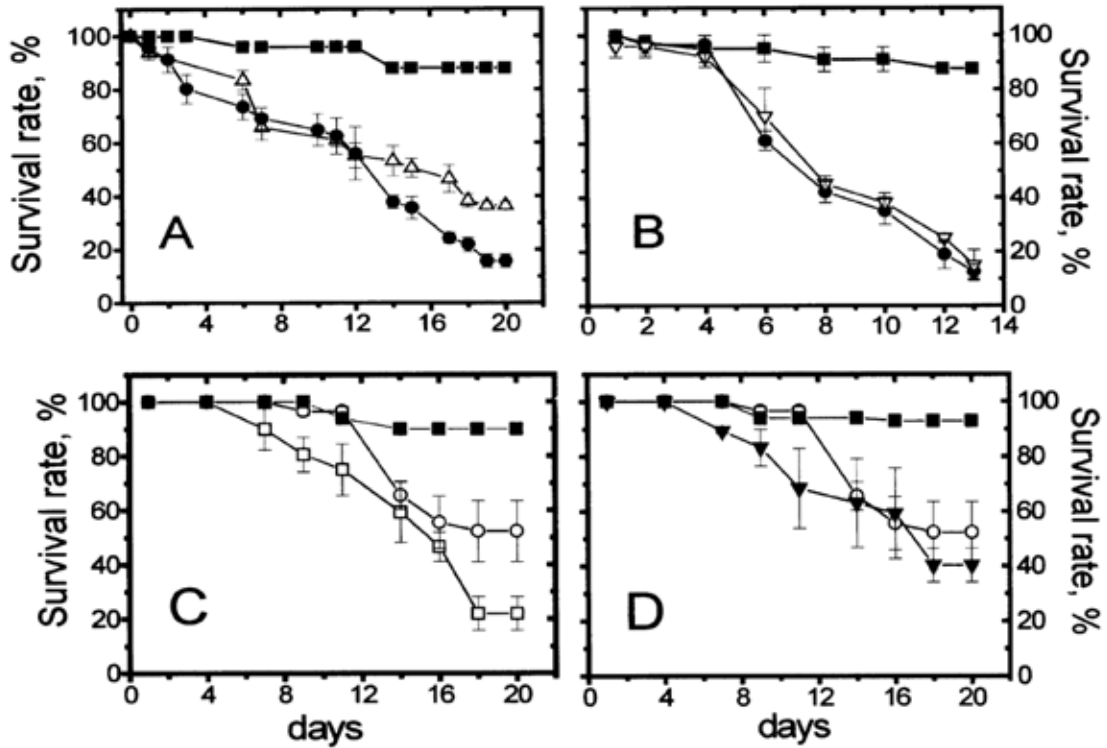


Figura 1B - Efeito inseticida da urease de *C. ensiformis* e *G. max* em ninfas de 2<sup>o</sup> instar de *Dysdercus peruvianus* (Follmer *et al.*, 2004b). A. Efeito inseticida da urease de *C. ensiformis* (△ 0,02%; ● 0,05%; ■ controle). B. Efeito inseticida da urease de *C. ensiformis* tratada com *p*-OHMB (●0,05%; ▽ 0,05% com *p*-OHMB; ■ controle). C. Efeito inseticida da urease de *G. max* (□ 0,1%; ○ 0,05%; ■ controle). D. Efeito inseticida da urease de *G. max* tratada com *p*-OHMB (○ 0,05%; ▼ 0,05% com *p*-OHMB; ■ controle).

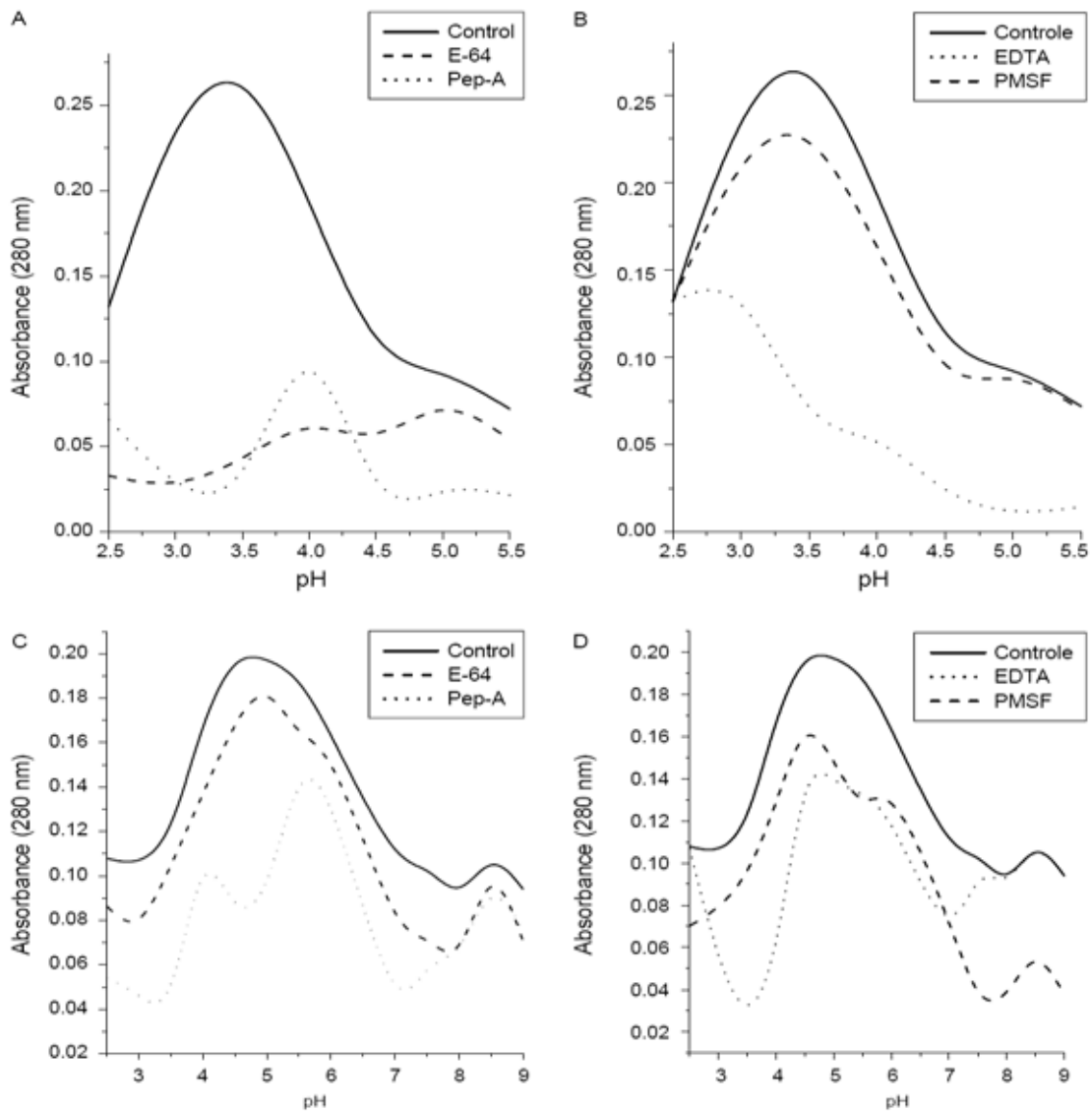


Figura 2 – Efeito de diferentes inibidores na atividade hemoglobinolítica de homogeneizados de ninfas (A-B) e adultos (C-D) de *Dysdercus peruvianus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005a).

Com base nessas observações, Stanisçuaski *et al.* (2005a) lançaram a hipótese de que diferenças no processamento das ureases pelas enzimas digestivas de ninfas e adultos de *D. peruvianus* poderiam estar relacionadas à sensibilidade dos insetos às proteínas.

## 2. OBJETIVO

A compreensão do mecanismo de ação das ureases de *Canavalia ensiformis* e de peptídeos derivados com potencial inseticida, além de esclarecer o papel fisiológico destas proteínas nas plantas, contribuirão para o desenvolvimento de produtos e estratégias biotecnológicas visando o controle de insetos-pragas fitófagos, com menor impacto ambiental e risco para a saúde humana, além de toxicidade seletiva para alguns insetos, em relação aos métodos convencionais atualmente em uso. Entre os diversos aspectos que ainda precisam ser esclarecidos, está a diferença de suscetibilidade estágio-dependente dos insetos. Desta forma, o objetivo do trabalho realizado foi a identificação e a caracterização das principais proteinases digestivas de formas jovens (ninfas de 4<sup>o</sup> instar) de *Dysdercus peruvianus* potencialmente envolvidas na ativação proteolítica da urease de *C. ensiformis*.

### 2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar as principais proteinases presentes em homogeneizados de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus* utilizando substratos protéicos e sintéticos, e inibidores classe-específicos.
- Identificar proteinases capazes de hidrolisar as urease de *C. ensiformis* e formar peptídeos reconhecidos pelo anticorpo anti-jaburetox 2-Ec.
- Separar as enzimas potencialmente envolvidas na hidrólise de urease de *C. ensiformis* e caracterizá-las sob um aspecto bioquímico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Os substratos fluorogênicos marcados com metilcumarina (MCA), substratos proteicos (hemoglobina bovina e azocaseína), inibidores (pepstatina-A, E-64, EDTA, PMSF, leupeptina, TLCK, *p*-OHMB), ditioneitol, anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina e os reagentes para reação de cor da fosfatase, foram adquiridos da Sigma Chemicals Company (Saint Louis, Estados Unidos da América). A resina Sephacryl S-200 HR e a coluna Source 15Q PE4.6/100 foram adquiridas da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia), e a membrana Hybond-P (PVDF de poro 0,45  $\mu$ m) da Amersham Biosciences (Little Chalfont, Inglaterra). Os marcadores de massa molecular (BenchMark Protein Ladder e Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis) foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (California, Estados Unidos da América) e da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). O substrato sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp foi sintetizado pelo Dr. Luis Juliano, Depto. Biofísica da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil).

A urease de *C. ensiformis* foi purificada conforme descrito por Follmer *et al.* (2004a).

Anticorpos policlonais anti-jaburetox 2-Ec foram obtidos mediante imunização de coelhos com o peptídeo recombinante jaburetox 2-Ec (Mulinari, 2004). A purificação do peptídeo e a produção do anticorpo foram conduzidas no



Laboratório de Proteínas Tóxicas, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **3.2. Criação dos insetos**

A colônia de *Dysdercus peruvianus* foi estabelecida a partir de indivíduos gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Peres Silva (Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goitacazes, RJ, Brasil). A colônia é mantida em sala climatizada sob condições adequadas de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $70\% \pm 5\%$ ) e fotoperíodo (14 horas) (Milano *et al.*, 1999). O desenvolvimento completo dos insetos ocorre ao longo de 30-35 dias; o período de incubação dos ovos é de 6 a 9 dias, após o qual eclodem as ninfas que se desenvolvem através de cinco estágios ninfais. Tanto os adultos como as formas jovens do percevejo alimentam-se de sementes lintadas de algodão (*Gossypium hirsutum*). Os insetos são acondicionados em potes plásticos transparentes, cobertos com tela branca de malha fina, contendo bebedouros plásticos apoiados sob uma camada de aproximadamente 3,0 cm de areia.

### **3.3. Obtenção do material biológico e preparo do extrato**

Ninfas de *D. peruvianus* de 4° instar (Figura 3A), não submetidas a jejum prévio, foram imobilizadas por hipotermia e dissecadas sob lupa estereoscópica em 20 mM de acetato de sódio pH 4,0. Os tubos digestórios (Figura 3B) foram retirados e estocados à  $-20^{\circ}\text{C}$  em tampão 20 mM de acetato de sódio pH 4,0, 0,02% azida sódica, na proporção de 100 intestinos por mL.

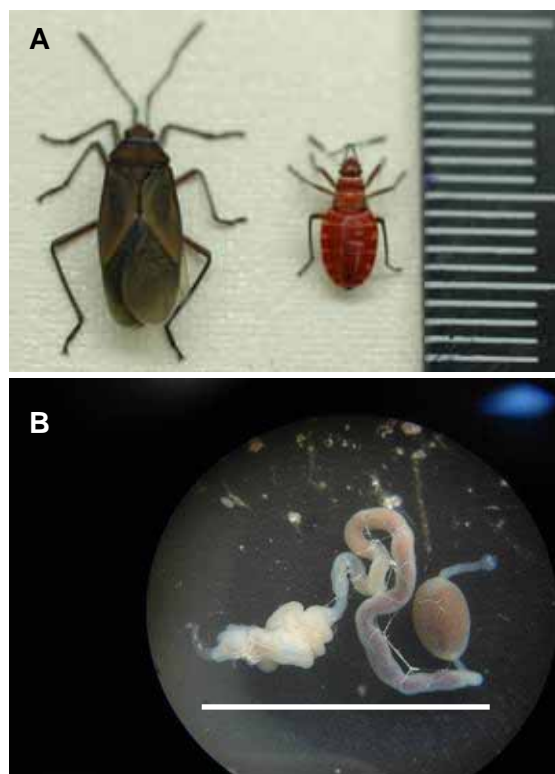


Figura 3 – (A) Adulto macho e ninfa de 4º instar de *D. peruvianus*. A barra indicada corresponde a 10 mm. (B) Tubo digestório de *D. peruvianus*. A barra indicada corresponde a 4 mm.

Para o preparo do extrato, os intestinos foram macerados (20 mM de tampão acetato de sódio pH 4,0, azida sódica 0,02%) em Potter-Elvehjem de vidro sob banho de gelo, mantendo-se a proporção do armazenamento. O homogeneizado foi rapidamente centrifugado (16.000 x g por 2 minutos) para retirada de material insolúvel. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado (10.000 x g por 20 minutos, à temperatura de 4°C). O segundo sobrenadante foi filtrado à temperatura ambiente com filtro não-estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  e recolhido em gelo.

### **3.4. Dosagem de proteína**

A quantificação de proteína no extrato bruto foi determinada segundo Layne (1957), pelas leituras da absorvância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em espectrofotômetro (UV/Vis Spectrophotometer Hitachi, California, Estados Unidos da América). A concentração de proteínas das frações eluídas das cromatografias foi estimada por absorvância em 280 nm.

### **3.5. Atividade proteolítica**

#### **3.5.1. Zimograma**

Intestinos de ninfas de 4° instar foram processados em 0,5 mL de tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 7,0 contendo 0,02% de azida sódica. O extrato foi diluído em tampão de amostra para eletroforese (não-redutor e sem SDS) segundo Laemmli (1970), e mantido a temperatura de 4°C. As amostras foram aplicadas em gel nativo de poliacrilamida 8% copolimerizado com hemoglobina bovina (0,1%). A migração eletroforética foi conduzida em aproximadamente 180 min, sob voltagem constante de 90 V e temperatura de 4°C. Após a separação, o gel foi incubado a 37°C por 16 horas em 100 mM do tampão de reação. Os tampões formiato de amônio (pHs 2,0 e 3,0), acetato de sódio (pHs 4,0 e 5,0) e fosfato de sódio (pH 6,0) foram utilizados na detecção das atividades. Ao final da incubação, o gel foi corado com coomassie blue R-250 e descorado com ácido acético 7,5% até o aparecimento das bandas de degradação (Seixas *et al.*, 2003). As áreas claras demonstram a hidrólise do substrato pelas enzimas proteolíticas ativas presentes no homogeneizado.

### **3.5.2. Atividade proteolítica sobre azocaseína**

A atividade do homogeneizado foi determinada sobre azocaseína (0,2%) em pH 5,6, a 37°C, durante 3 horas na presença de 5 mM de DTT (Lemos *et al.*, 1990; Terra *et al.*, 1988; Silva e Xavier-Filho, 1991). Ao final da reação, a atividade foi interrompida pela adição de TCA 8% e quantificação em 420 nm dos azopeptídeos solúveis em NaOH 1,5 M.

Para os ensaios, as amostras foram previamente incubadas no tampão de atividade durante 15 min; outros 30 min de incubação foram necessários após adição de DTT. O efeito de inibidores específicos na atividade proteolítica também foi avaliado. Os inibidores (E-64, pepstatina-A, EDTA, PMSF) foram adicionados à reação e incubados por mais 30 min antes da adição do substrato. As pré-incubações foram mantidas à temperatura ambiente.

Uma mU de atividade azocaseinolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover um aumento de 0,001  $A_{420\text{nm}}$ /hora nas condições de ensaio acima descritas.

### **3.5.3. Atividade proteolítica sobre substratos sintéticos**

A atividade proteolítica do homogeneizado e das frações resultantes das etapas de purificação também foi estimada com os substratos fluorogênicos Abz-AIAFFSRQ-EDDnp e de metilcumarina (MCA). Quando hidrolisado entre as ligações peptídicas, o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp emite a fluorescência do grupamento Abz, mantida apagada pelo grupamento EDDnp na molécula intacta. Substratos contendo MCA possuem este fluoróforo ligado ao aminoácido ( $P_1$ ) por ligação amida suscetível a clivagem proteolítica, emitindo fluorescência quando

hidrolisado. Os ensaios foram conduzidos mediante a incubação das amostras com os tampões seguidos da adição do substrato.

A taxa de hidrólise dos substratos foi monitorada por fluorimetria em leitor de microplacas *f*<sub>max</sub> (California, Estados Unidos da América) a 37°C, nos comprimentos de onda de excitação e emissão 320-430 nm e 370-460 nm, para Abz-AIAFFSRQ-EDDnp e substratos cumarínicos, respectivamente. Uma mU de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de gerar uma mRFU por minuto nas condições de ensaio descritas.

### **3.6. Ativação proteolítica da urease de *Canavalia ensiformis***

A hidrólise *in vitro* da urease por enzimas proteolíticas presentes no extrato de intestinos de ninfas de 4º instar foi realizada na proporção de 1 mU de atividade azocaseinolítica para cada 4 µg de urease purificada, conforme descrito por Carlini *et al.* (1997). A digestão *in vitro* da urease foi realizada ao longo de 24 horas e interrompida por congelamento e liofilização das amostras.

A reação de hidrólise da urease também foi conduzida nas mesmas condições de pH e temperatura anteriormente descritas, na presença de DTT (5 mM) e de inibidores de catepsinas B e D (10 µM de E-64 e 10 µM de pepstatina-A).

As amostras submetidas à reação de hidrólise foram suspendidas em 25 µL de tampão de amostra para eletroforese não-redutor com SDS e fervidas a 100°C durante 5 min. O material foi aplicado em gel de poliacrilamida (4% para o gel de

empilhamento e 12% para o de separação) contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970).

### **3.7. SDS-Page**

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970). As eletroforeses foram conduzidas em aproximadamente 90 min, sob voltagem constante de 200 V e temperatura de 4°C. Os géis foram submetidos à coloração com prata (Wray *et al.*, 1981).

### **3.8. Western-blot**

A técnica empregada foi baseada na metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979). Depois de separadas por SDS-Page, as proteínas do gel foram transferidas por gravidade para membrana de PVDF em tampão tris-glicina-SDS pH 8,3 contendo 20% de metanol. Após 16 horas de transferência à temperatura ambiente, a membrana foi bloqueada por 2 horas com 5% de leite desnatado em TTBS sob agitação constante. Seguiu-se a incubação com 1,5% de leite desnatado em TTBS contendo o anticorpo primário anti-jaburetox 2-Ec na diluição de 1:10.000 e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:25.000. As incubações também foram mantidas sob agitação ao longo de 2 horas. Entre as etapas de bloqueio e em cada uma das incubações, a membrana foi lavada com TTBS durante 10 minutos. A revelação foi feita com NBT 0,03%, BCIP 0,015% em tampão contendo 10 mM tris-HCl pH 9,6, 100 mM NaCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

### **3.9. Fracionamento das enzimas digestivas presentes no homogeneizado**

#### **3.9.1. Cromatografia de gel-filtração em Sephacryl S-200**

O homogeneizado (0,5 mL) foi aplicado em coluna de gel-filtração Sephacryl S-200 1 cm x 41 cm (25 mL de gel), em temperatura ambiente e fluxo contínuo de 0,75 mL/min, com auxílio de bomba peristáltica (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia). A coluna foi equilibrada com 20 mM de tampão acetato de sódio pH 4,0 e 0,02% de azida sódica. As frações (0,95 mL) foram monitoradas por absorvância em 280 nm. A atividade das frações foi determinada sobre os substratos Abz-AIAFFSRQ-EDDnp e N-Cbz-Phe-Arg-MCA em pH 4,5. As frações ativas sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA foram reunidas e o conjunto denominado pool S-200.

#### **3.9.2. Cromatografia de troca iônica em Source 15Q**

O pool S200 foi dialisado e aplicado em gel de troca iônica Source 15Q PE 4.6/1000 (1,7 mL de gel), em temperatura ambiente e fluxo contínuo de 1,5 mL/min, em sistema de FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suécia). A coluna foi equilibrada com 20 mM de tampão acetato de sódio pH 5,4 e 0,02% de azida sódica. As proteínas foram eluídas no mesmo tampão através de um gradiente contínuo de 0-1 M de NaCl e monitoradas por absorvância em 280 nm. As frações coletadas (1 mL) foram ensaiadas para hidrólise do substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA em pH 4,5.

### **3.10. Caracterização das enzimas parcialmente purificadas**

#### **3.10.1. Determinação de pH ótimo**

A determinação do pH ótimo para a atividade enzimática das frações sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA foi realizada no intervalo de pH entre 3,0 a 7,0 utilizando os tampões (100 mM) formiato de amônio (pH 3,0 e 3,5), acetato de sódio (pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5) e fosfato de sódio (pHs 6,0, 6,5 e 7,0). Os ensaios foram conduzidos incubando-se por 15 min a amostra com o tampão de reação à temperatura ambiente seguidos pela adição do substrato.

#### **3.10.2. Efeito de ditioneitol**

O efeito do DTT na atividade enzimática das frações sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA foi determinada no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0. Os ensaios de atividade enzimática incluíram pré-incubação da amostra por 15 min com o tampão de reação, outros 15 min de incubação com 5 mM DTT.

#### **3.10.3. Efeito de inibidores classe-específicos**

O efeito dos inibidores classe-específicos sobre a atividade enzimática das frações foi determinado no intervalo de pHs entre 4,5 e 6,5. Os ensaios de atividade enzimática incluíram pré-incubação da amostra à temperatura ambiente por 15 min com o tampão reacional, 15 min com 5 mM de DTT, seguidos de outros 30 min com os inibidores, nas concentrações: 10  $\mu$ M de E-64, 10  $\mu$ M de



pepstatina-A, 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA, 10  $\mu$ M de leupeptina, 10  $\mu$ M de TLCK, 200  $\mu$ M de *p*-OHMB.

#### **3.10.4. Determinação da especificidade pelo substrato**

A atividade proteolítica das frações foi ensaiada com três substratos cumarínicos diferentes: N-Cbz-Phe-Arg-MCA N-t-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA e  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Cap-Leu-Phe-MCA. O meio reacional continha a amostra em teste em 100 mM de tampão, 5 mM de DTT e 2  $\mu$ M de substrato.

#### **3.10.5. Determinação de KM e Vmax**

A determinação dos valores de KM e Vmax das amostras foi conduzida utilizando o substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA no intervalo de concentração de 0,1  $\mu$ M a 30  $\mu$ M. As amostras foram previamente incubadas com o tampão de reação (100 mM) por 15 min e com 5 mM de DTT durante outros 15 min. Os resultados foram calculados mediante análise de regressão não-linear pelo programa Graphpad Prism 3.0 Software (San Diego, Estados Unidos da América).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Atividade proteolítica acídica sobre substrato proteico

A atividade proteolítica do extrato de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus* foi detectada em diferentes valores de pH através de gel de poliacrilamida não-desnaturante copolimerizado com hemoglobina bovina (Figura 4). O zimograma consiste de migração eletroforética e incubação no tampão de reação. Ao longo da incubação, as enzimas ativas hidrolisam o substrato proteico permitindo a visualização de bandas translúcidas no gel posterior à coloração com coomassie blue R-250.

Os resultados na Figura 4 demonstram que o extrato possui proteases ativas nos valores de pH testados, no entanto a atividade enzimática em meio ácido é majoritária. Em pH 2,0 e 3,0 são visualizadas quatro bandas distintas de degradação da hemoglobina. Na medida em que o pH se aproxima da neutralidade, há uma redução na intensidade e no número de áreas claras, confirmando a característica de atividade acídica do homogeneizado de intestinos de ninfas de *D. peruvianus* sobre hemoglobina.

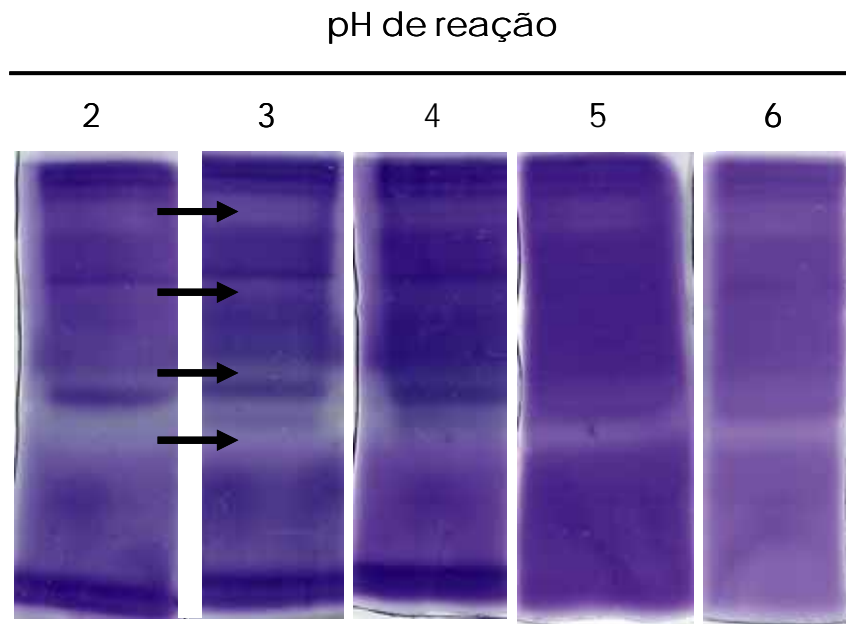


Figura 4 – Zimograma. Atividades proteolíticas do homogeneizado de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus* detectadas em gel copolimerizado com hemoglobina. Alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, copolimerizado com 0,1% de hemoglobina bovina. Após a migração, realizada em cuba com temperatura controlada de 4°C, o gel foi incubado a 37°C por 16 horas, corado com coomassie blue e descorado com ácido acético. As setas indicam as regiões de degradação do substrato.

#### **4.2. Atividade proteolítica acídica sobre substrato sintético**

A atividade proteolítica do extrato de intestinos de ninfas de 4º instar de *D. peruvianus* também foi avaliada com o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp no intervalo de pH entre 2,0 e 9,0.

A Figura 5 mostra que à medida em que o pH passa de 2,0 para 3,0 a atividade enzimática aumenta aproximadamente 7 x, no entanto a hidrólise é reduzida cerca de 15 x quando o pH passa de 3,0 para 6,0. Os resultados demonstram predomínio de atividade enzimática acídica, atingindo valores máximos em pH 3,0. Depois de uma queda substancial (com mínimo em pH 6,0), detecta-se atividade enzimática minoritária numa faixa de pH mais alcalina (entre 8,0 e 9,0).

#### **4.3. Inibidores da atividade proteolítica sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp**

A atividade proteolítica do extrato também foi medida na presença de inibidores de proteinases classe-específicos. Os dados da Tabela 1 revelam a intensa inibição por pepstatina-A, inibidor de proteinases aspárticas, no intervalo de pH de 2,0 a 5,0 (99%) enquanto o inibidor de cisteíno proteinases, E-64, inibe parcialmente a atividade entre o intervalo de pH entre 3,0 e 7,0 (18 a 32%). Em pH 7,0 detecta-se isoladamente uma maior inibição por EDTA (42%). A atividade proteolítica é praticamente extinta na faixa de 7,0 a 9,0 (96%) na presença de PMSF, inibidor de serino proteinases. Observa-se um paralelismo de inibição tanto por E-64 quanto por PMSF em pH 3,0 (18 e 22%) e 4,0 (17 e 25%). Estes resultados apontam para a prevalência de enzimas tipo aspártico e cisteíno-proteinases (catepsina-like), no entanto proteinases serínicas (tripsina-like) e

metaloproteinases também foram detectadas, ainda que em menor proporção, no homogeneizado de intestinos de ninfas de *D.peruvianus*.

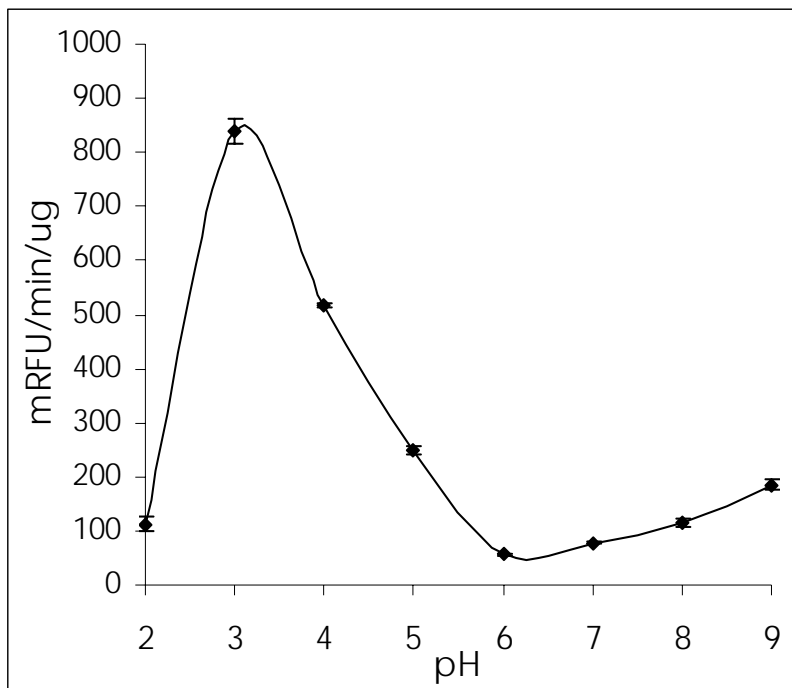


Figura 5 – Perfil de atividade proteolítica do homogeneizado de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus* sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Alíquotas foram pré-incubadas com o tampão de reação a temperatura ambiente durante 15 min. A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato na concentração final de 20  $\mu$ M. Os valores representam médias de triplicatas.

Tabela 1 – Perfil de inibição da atividade proteolítica do homogeneizado de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus* sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp.

Inibição da Atividade Enzimática (%)				
pH	E-64	PepA	EDTA	PMSF
2,0	0	100	0	8
3,0	18	100	9	17
4,0	22	99	17	25
5,0	32	98	10	18
6,0	23	85	4	42
7,0	32	33	42	98
8,0	0	0	0	95
9,0	0	0	3	95

Alíquotas foram pré-incubados a temperatura ambiente com os tampões de reação (15 min) e inibidores (30 min). A reação foi iniciada pela adição do substrato numa concentração final de 20  $\mu$ M. A concentração final dos inibidores no ensaio enzimático foi: 10  $\mu$ M de pepstatina-A, 10  $\mu$ M de E-64, 1 mM de PMSF e 1 mM de EDTA. Os valores representam médias de triplicatas.

#### 4. 4. Ativação proteolítica da urease de *Canavalia ensiformis*

Carlini *et al.* (1997) e Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) demonstraram que o efeito tóxico da canatoxina sobre *R. prolixus* dependia da hidrólise da proteína por catepsinas digestivas. Considerando a presença majoritária de cisteíno e aspártico proteinases no trato digestório de ninfas de *D. peruvianus* e a sensibilidade das formas jovens a urease de *C. ensiformis*, a capacidade de ativação proteolítica da urease pelas proteinases do percevejo foi investigada.

Inicialmente, a atividade proteolítica do extrato foi estimada sobre 0,2 % de azocaseína em pH 5,6, à 37°C, durante 3 horas, com 5 mM DTT, na ausência e na presença de inibidores. O perfil obtido revelou inibição predominante por E-64 (78%) e pepstatina-A (54%) sobre a atividade azocaseinolítica total, ainda que uma redução de 27 e 18% tenha sido promovida por PMSF e EDTA (dados não mostrados). Conforme descrito por Carlini *et al.* (1997), a hidrólise *in vitro* foi conduzida na proporção de 1 mU azocaseinolítica para cada 4 µg de urease purificada, em pH 5,6 e 37°C, durante 24 horas.

Os resultados (Figuras 6 e 7) sugerem que enzimas presentes no homogeneizado são capazes de promover a fragmentação da urease na condição de ensaio proposta. O uso de inibidores específicos para catepsinas B e D (cisteíno e aspártico proteinase) mostrou que o E-64 exerce efeito protetor na hidrólise, enquanto a adição de pepstatina-A não impede o processamento da proteína.

O perfil proteico, obtido a partir da separação eletroforética, demonstrou o desaparecimento da banda correspondente a urease (90 kDa) e a formação de



fragmentos de menor massa molecular, evidenciando a hidrólise da proteína (Figura 6). A hipótese de ativação proteolítica, pelas enzimas digestivas das ninfas do inseto, foi confirmada através de Western-blot (Figura 7). Para tanto, utilizou-se o anticorpo desenvolvido para o peptídeo inseticida recombinante, jaburetox 2-Ec, equivalente ao liberado da canatoxina pelas enzimas de *C. maculatus* (Ferreira-DaSilva, 2002; Mulinari, 2004). Os resultados obtidos permitiram classificar a enzima envolvida na hidrólise da urease como uma cisteíno-proteinase, além de evidenciarem a formação de um fragmento, produto da hidrólise, de massa molecular estimada em 16-18 kDa reativo para o anticorpo anti-jaburetox-2Ec.

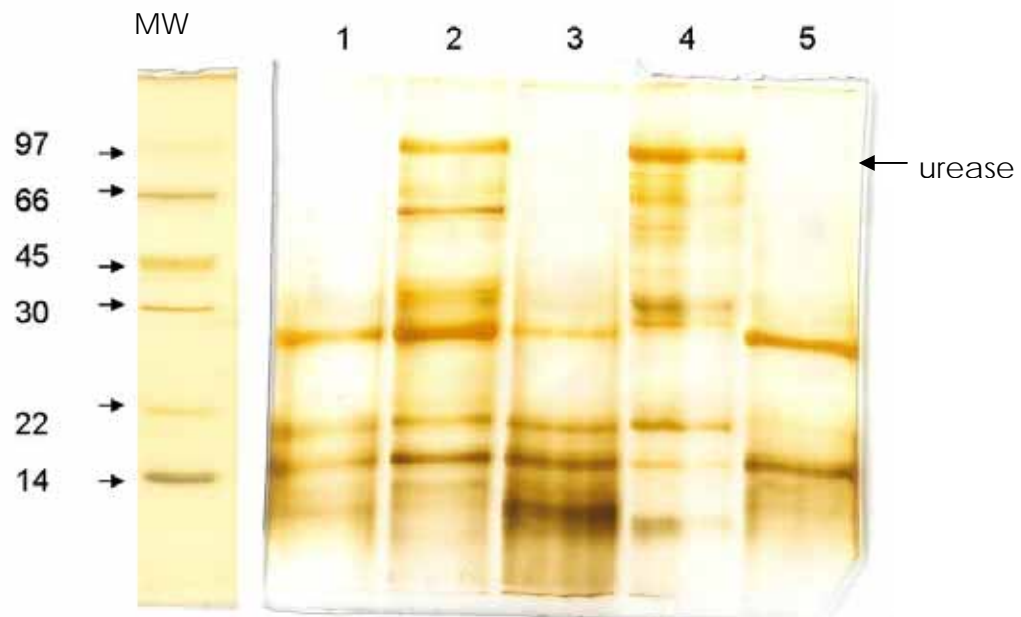


Figura 6 – Hidrólise da urease por enzimas do homogeneizado de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus*. Alíquotas equivalentes a 1 mU de atividade azocaseinolítica foram incubadas em pH 5,6 na presença de 5 mM DTT por 24 horas, com 4 μg de urease purificada de *C.ensiformis*, na ausência e na presença de 10 μM de pepstatina-A e de E-64. As reações foram interrompidas por congelamento e liofilização. As amostras foram suspensas em 25 μl de tampão de amostra para eletroforese, submetidos a SDS-PAGE 12% e reveladas com coloração de prata. (1) Homogeneizado + urease após reação de digestão *in vitro*, (2) Homogeneizado + urease + 10 μM de E-64, (3) Homogeneizado + urease + 10 μM de pepstatina-A, (4) Urease de *C. ensiformis* e (5) Homogeneizado de *D. peruvianus*. MW: Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis.

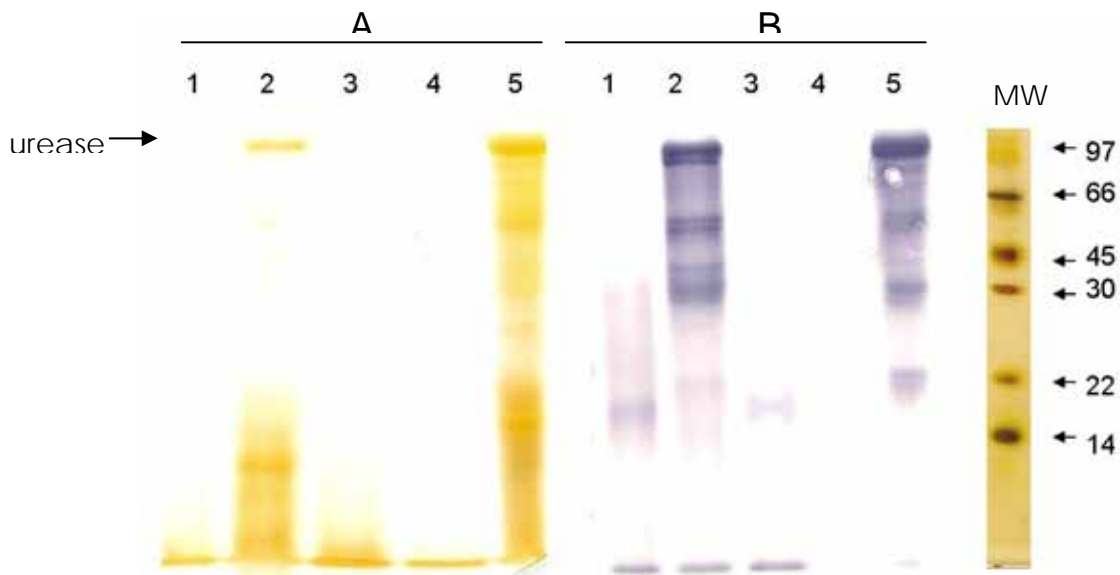


Figura 7 – Hidrólise da urease pelas enzimas do homogenado de intestinos de ninfas de *D. peruvianus*. Análise por Western-blot. Aliquotas equivalentes a 1 mU atividade azocaseinolítica foram incubadas em pH 5,6, com 5 mM DTT, por 24 horas, com 4  $\mu$ g de urease purificada de *C.ensiformis*, na ausência e na presença de 10  $\mu$ M pepstatina A e de E-64. As reações foram interrompidas por congelamento e liofilização. As amostras foram suspensas em 25  $\mu$ l de tampão de amostra para eletroforese, submetidos a SDS-PAGE 12%. Lado A: Gel corado com prata. Lado B: Western blot. Anticorpo primário: IgG de coelho anti-jaburetox-2Ec na diluição de 1:10.000; Anticorpo secundário: anti IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:25.000. O blot foi revelado com NBT e BCIP. (1) Homogeneizado + urease após reação de digestão *in vitro*, (2) Homogeneizado + urease + 10  $\mu$ M de E-64, (3) Homogeneizado + urease + 10  $\mu$ M de pepstatina-A, (4) Homogeneizado de *D. peruvianus* e (5) Urease de *C. ensiformis*. MW: Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis.

#### **4.5. Purificação das enzimas proteolíticas presentes no homogeneizado**

A metodologia utilizada para a obtenção das enzimas compreendeu duas etapas cromatográficas: gel-filtração e troca iônica.

A etapa de gel-filtração em Sephacryl S-200 mostrou bastante eficiência na separação das frações, pois a atividade proteolítica sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (substrato desenvolvido para catepsina D de mamíferos) ficou distribuída em 10 mL e localizada numa faixa de baixa concentração de proteína. O fracionamento resultante da gel-filtração permitiu descartar grande parte das proteínas contaminantes (82% do conteúdo protéico total) e recuperar apenas 18% da proteína submetida à cromatografia contendo as proteinases ativas (Figura 8A). As frações foram reunidas e a atividade testada na presença dos inibidores classe-específicos. Os resultados (não ilustrados) evidenciaram uma inibição majoritária de 81% com E-64, 59% com pepstatina A, 48% com PMSF e 5% com EDTA. A atividade residual determinada em pH 4,5 evidencia a presença de diversas proteinases capazes de utilizar Abz-AIAFFSRQ-EDDnp como substrato, no entanto o elevado percentual de inibição obtido com E-64 sugere que a enzima predominante no pool é uma proteinase cisteínica.

Um novo homogeneizado foi submetido à cromatografia de gel-filtração, no entanto as frações resultantes foram testadas com o substrato sintético N-Cbz-Phe-Arg-MCA, amplamente utilizado na caracterização de cisteíno-proteinases. A Figura 8B mostra que o uso deste substrato, restringiu a atividade proteolítica a aproximadamente 5 mL. A fração de atividade máxima sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, eluída com 17,3 mL, coincide com o pico de atividade majoritária observado com o substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA em pH 4,5 (Figura 8 A e B). As

frações ativas sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA foram reunidas e o pool designado S-200. Em seguida, a atividade residual do pool S-200 foi quantificada na presença de inibidores (dados não mostrados), resultando uma maior inibição por E-64 (90%) e menor inibição por pepstatina-A (17%).

A etapa seguinte de purificação consistiu de uma cromatografia de troca catiônica. O pool S-200 foi dialisado em tampão 20 mM acetato de sódio pH 5,4. Após a diálise, o material foi centrifugado para remoção de material precipitado e o sobrenadante aplicado na coluna Source 15Q. A Figura 9A ilustra o fracionamento que resultou em duas frações ativas distintas: uma proveniente do material não retido na cromatografia (denominada DpQ-NR) e outra eluída com 0,15 M NaCl (denominada DpQ-E).

A fração DpQ-NR foi recromatografada na mesma resina de troca iônica (as condições do tampão de equilíbrio e de eluição não foram alteradas). A obtenção de uma nova fração não-retida comprovou que não houve excesso de proteína aplicada na coluna (figura 9B).

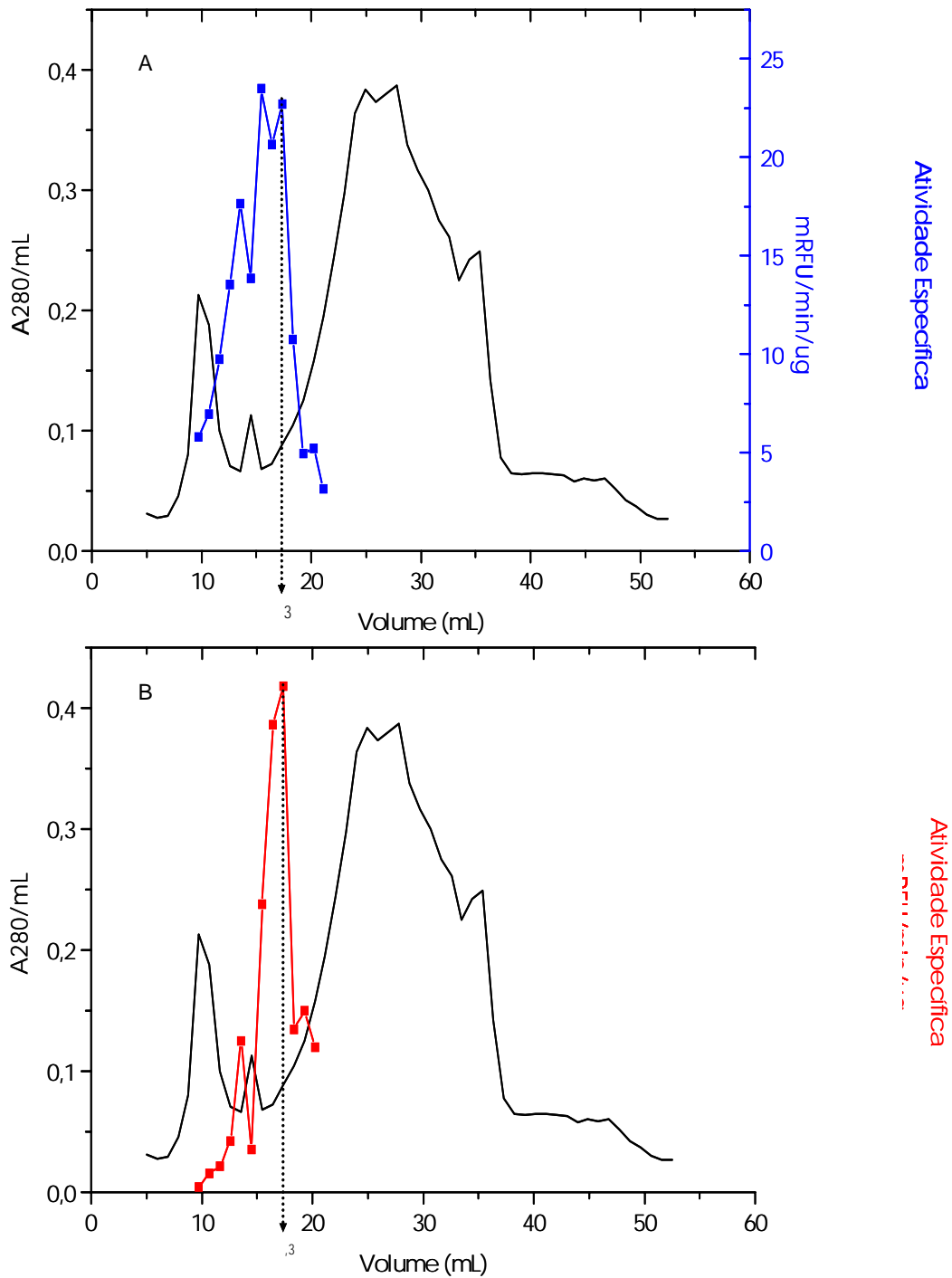


Figura 8 – Cromatografia de gel-filtração em Sephacryl S-200. Aliquotas de 0,5 mL foram aplicadas em uma coluna de Sephacryl S-200 (1 cm X 41 cm), equilibrada em tampão 20 mM de acetato de sódio pH 4,0 e 0,02% de azida sódica. As frações (0,9 mL) foram analisadas em A<sub>280</sub> para o conteúdo proteico (—) e atividade proteolítica sobre (—) Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (A) e (—) N-Cbz-Phe-Arg-MCA (B) em pH 4,5.

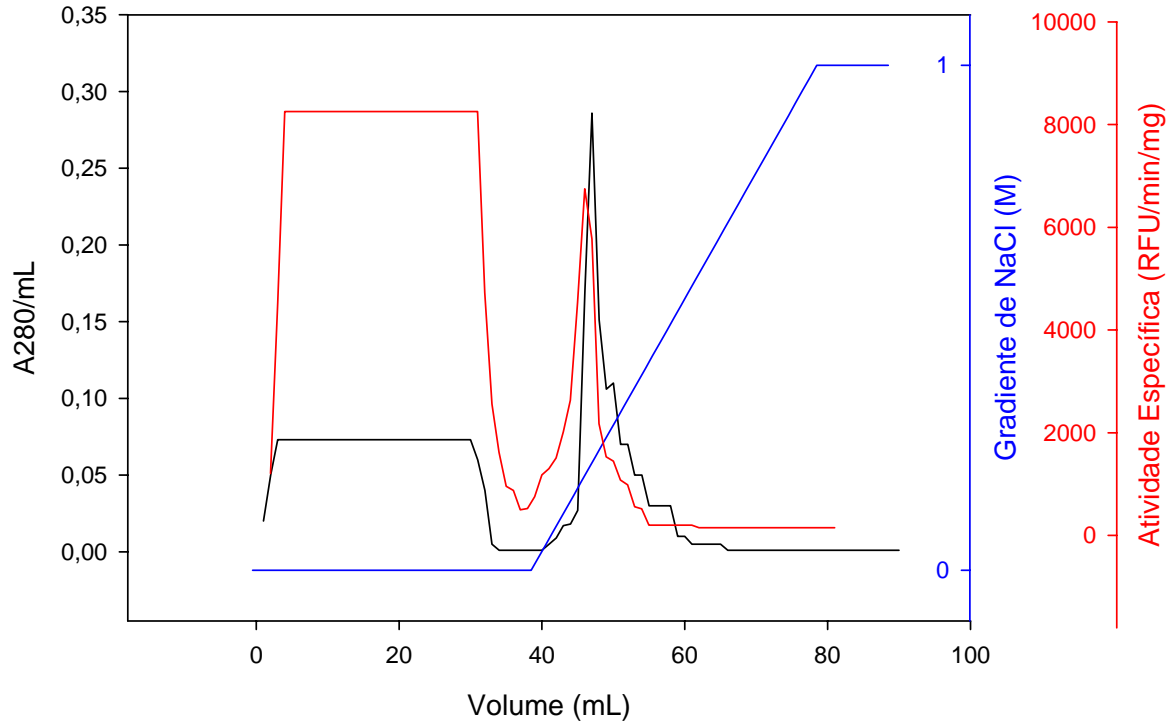


Figura 9A – Cromatografia de troca iônica em Source 15Q 4.6/100. O pool S-200 foi submetido à cromatografia em coluna equilibrada com tampão 20 mM de acetato de sódio pH 5,4 e azida 0,02%. As proteínas foram eluídas no mesmo tampão através de um gradiente contínuo de 0 a 1 M de NaCl (—). As frações resultantes foram analisadas em A<sub>280</sub> para o conteúdo proteico (—) e para atividade proteolítica sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA (—) em pH 4,5.

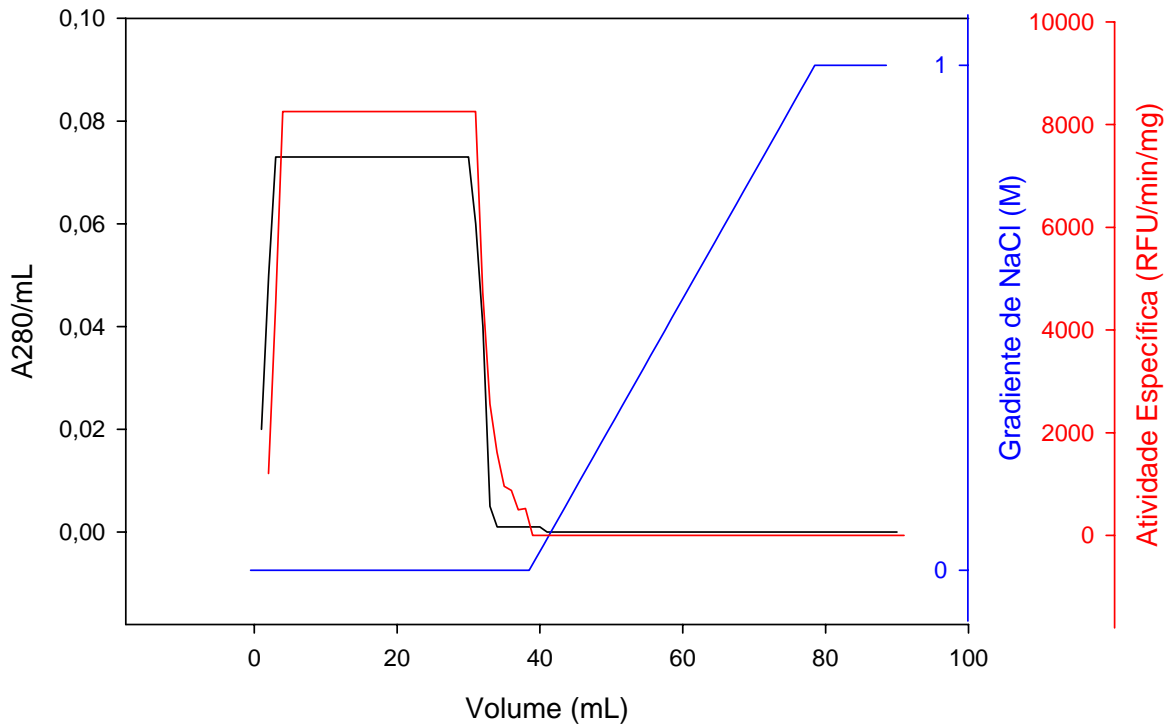


Figura 9B – Cromatografia de troca iônica em Source 15Q 4.6/100. A fração DpQ-NR foi recromatografada com tampão 20 mM de acetato de sódio pH 5,4 e azida 0,02%. As proteínas foram eluídas no mesmo tampão através de um gradiente contínuo de 0 a 1 M de NaCl (—). As frações resultantes foram analisadas em A<sub>280</sub> para o conteúdo proteico (—) e para atividade proteolítica sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA (—) em pH 4,5.



O protocolo de separação utilizado permitiu purificar as enzimas DpQ-NR e DpQ-E 11,8 X e 11,6 X, respectivamente.

Após a cromatografia de troca iônica observa-se aumento do rendimento enzimático, fato que pode ser atribuído aos processos intermediários de alteração de pH, diálise e centrifugação. Modificações de pH podem promover redução no efeito auto-catalítico de algumas proteinases, preservando-as. Além disso, as etapas de diálise e centrifugação podem ser importantes para a retirada de moléculas que estejam controlando a atividade das enzimas proteolíticas. A Tabela 2 mostra o índice de purificação e os rendimentos enzimático e proteico obtidos para cada uma das enzimas separadas.

Em SDS-Page é possível observar a presença de poucas proteínas em cada uma das frações. A Figura 10 mostra o perfil proteico das frações parcialmente purificadas (DpQ-NR e DpQ-E) após as etapas cromatográficas de gel-filtração e troca iônica.

Tabela 2 – Tabela de purificação das cisteíno proteinases de *Dysdercus peruvianus*.

<b>Etapas</b>	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Rendimento proteico %	Enzima U/mL	Enzima * total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento enzimático %	Índice de purificação
<b>EB</b>	5,5	77,7	100	27.180	149.490	1.941	100	1
<b>S-200</b>	68	10,81	14	1.022	69.503	6.387	46,5	3,3
<b>NR</b> Source Q	60	4,4	5	1.678	100.656	22.986	67	11,8
<b>E</b> Source Q	10	1,6	2	3.603	36.036	22.523	10	11,6

\* Atividade enzimática sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA em pH 4,5. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como uma RFU/hora a 37°C.

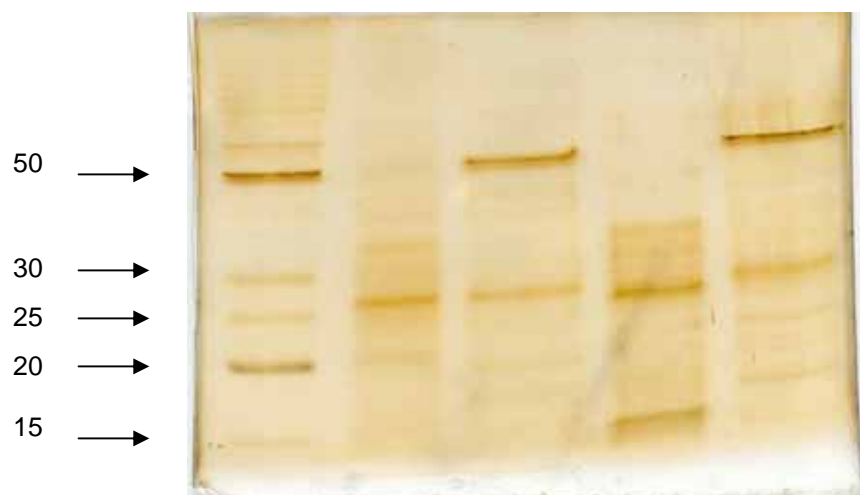


Figura 10 – Perfil proteico das frações com atividade de cisteíno proteinase. Alíquotas de 2  $\mu$ g de proteína das frações obtidas após a cromatografia de troca iônica em Source 15Q foram submetidas a SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com prata. (1) MW BenchMark Protein Ladder, (2) Fração DpQ-NR, (3) Fração DpQ-E, (4) Fração DpQ-NR tratada com 250 mM 2-mercaptoetanol; (5) Fração DpQ-E, tratada com 250 mM 2-mercaptoetanol.

#### **4.6. Caracterização das enzimas proteolíticas parcialmente purificadas**

Para distinguir as duas atividades cisteínicas, os seguintes parâmetros foram determinados: pH ótimo, efeito de ditioneitol e de inibidores classe-específicos, especificidade pelo substrato,  $K_M$  e  $V_{max}$ .

##### **4.6.1. Determinação do pH ótimo**

A atividade proteolítica das frações foi avaliada no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0. Os resultados mostrados na Figura 11 sugerem a presença de duas atividades proteolíticas em cada uma das frações. No pool DpQ-E, é possível identificar dois máximos de atividade sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA, em pH 3,5 e 7,0. De forma similar, na fração DpQ-NR máximos de atividade foram detectados em pH 4,0 e no intervalo entre 6,0 e 6,5.

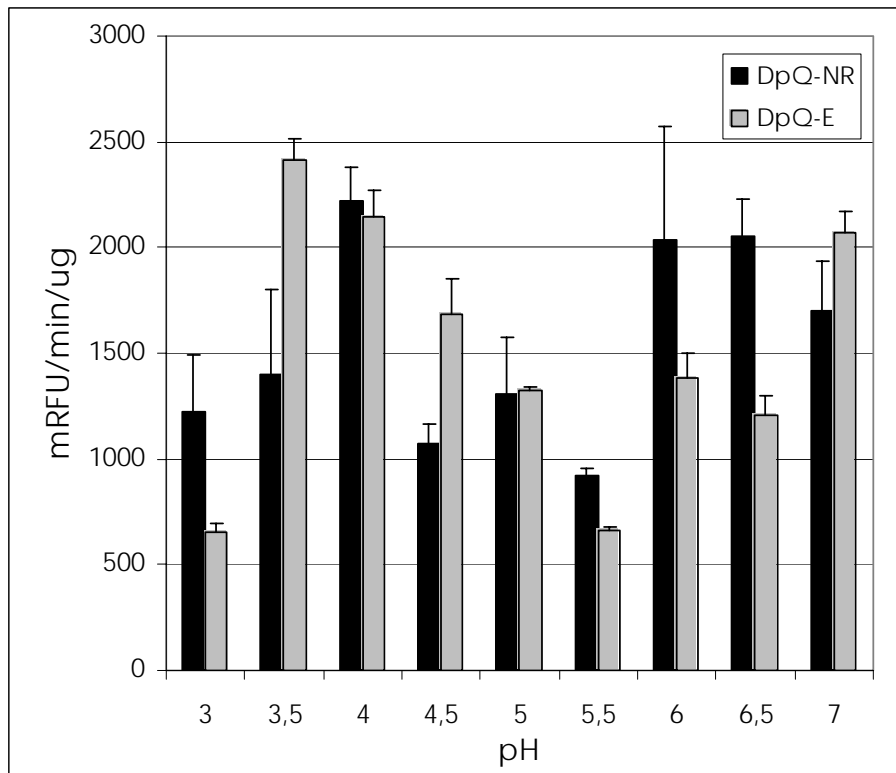


Figura 11 – Efeito do pH na atividade proteolítica das frações DpQ-NR e DpQ-E sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA. A concentração final de substrato correspondeu a 2  $\mu$ M. Os valores representam médias de triplicatas.

#### 4.6.2. Efeito de DTT na atividade enzimática

Tratando-se da busca e caracterização de cisteíno proteases, a utilização de DTT como molécula ativadora da proteólise foi avaliada. Para a fração DpQ-NR, os dados na Figura 12A mostraram ativação discreta em pH 3,0, no entanto em pH 4,5, 5,0 e 5,5 houve um aumento de 7, 6,5 e 6 x sobre as atividades detectadas na ausência de DTT. Observa-se que o aumento do pH reduz sensivelmente o efeito do ativador diminuindo em 50% a atividade nos pHs 6,0 e 6,5. No entanto, novamente em pH 7,0 observa-se ativação enzimática de 5 x.

Os resultados obtidos com DpQ-E estão representados na Figura 12B. O efeito ativador do DTT é menor em pH 3,0 e 3,5, enquanto nos pHs 4,5 e 5,5 a atividade proteolítica sofre um acréscimo de 3 e 4 x sobre a atividade sem DTT. Em pH 6,0, o efeito ativador do DTT sobre a proteólise diminui, no entanto continua a ser observado em pH 7,0 (2,4 x).

Comparando as faixas de pH em que ocorre a atividade ótima na ausência (Figura 11) e na presença de DTT (Figura 12), observa-se que o agente redutor melhorou a performance das enzimas acídicas, formando platôs de atividade máxima que se estendem de 3,5-4,5 (DpQ-E) ou 3,5-5,0 (DpQ-NR).

Resultados de ativação da atividade proteolítica por DTT, aliados à inibição por E-64 e faixa de pH ótimo em meio ácido (pH 3,5 a 5,0) confirmam a presença de cisteíno proteinases nos pools DpQ-NR e DpQ-E. A ativação causada pelo DTT no intervalo de pH de 4,5 e 5,5 para a DpQ-NR (cerca 6 X) e na faixa de pH 5,5 e 6,5 para a DpQ-E (cerca de 4 X), sugerem que nessas condições a atividade das cisteíno-proteinases é prevalente. Por essa razão, estudos

comparativos dessas atividades foram realizados nesses intervalos de pH na presença de 5 mM de DTT.

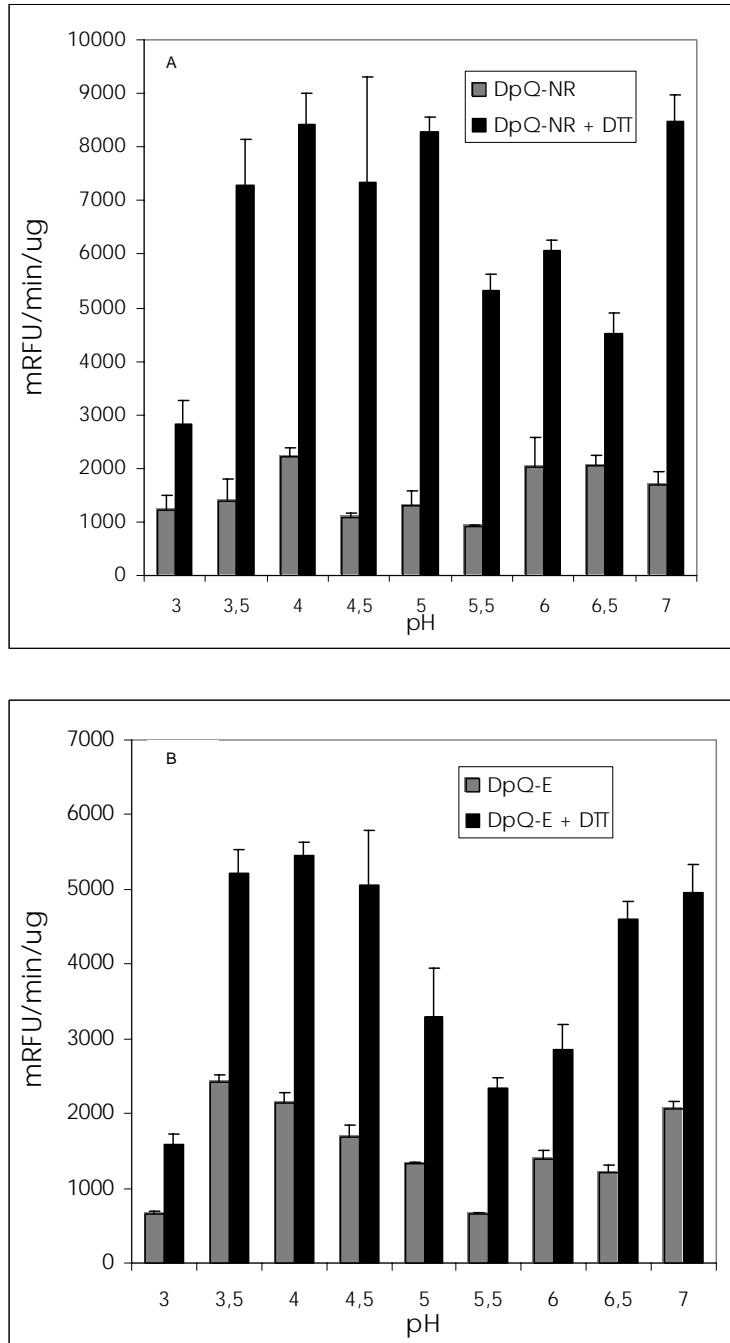


Figura 12 – Efeito de DTT sobre as atividades proteolíticas das frações DpQ-NR (A) e DpQ-E (B) sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA. A concentração final do substrato correspondeu a 2  $\mu$ M. Os valores representam médias de experimentos realizados em triplicata.



#### **4.6.3. Sensibilidade aos inibidores classe-específicos**

A atividade enzimática da fração DpQ-NR foi avaliada na presença de inibidores em pH 4,5, 5,0, e 5,5, faixa em que ocorre máxima ativação por DTT (Figura 12A). Os resultados na Figura 13A demonstram que os inibidores de aspártico e metaloproteinases foram pouco efetivos na redução da atividade enzimática, inibindo 16 e 20% a atividade total com EDTA, 40 e 34% na presença de pepstatina-A. Já com o E-64, a atividade proteolítica foi completamente abolida, indicando a presença de uma proteinase cisteínica na fração. A inibição (49 e 42%) por PMSF na concentração de 1 mM é sugestivo de uma serino proteinase em DpQ-NR, ativa em pHs 4,5-5,5, ainda que o PMSF também possa atuar como inibidor de cisteíno-proteinases em concentrações mais elevadas. No conjunto, os dados indicam a presença de no mínimo 3 atividades enzimáticas na fração não-retida, uma cisteíno proteinase, uma aspártico-proteinase, e uma metalo-proteinase com pH ótimo mais deslocado para lado alcalino.

A atividade enzimática da fração DpQ-E também foi avaliada na presença dos mesmos inibidores no intervalo de pH entre 5,5, 6,0 e 6,5 (Figura 13B). Observa-se que o E-64 promove intensa inibição da atividade no intervalo de pH testado, cerca de 95%. Diferentemente, o EDTA aumenta a atividade enzimática em pH 5,5, e a inibe levemente (20%) em pH 6,5.

Tanto a pepstatina-A como o PMSF não mostraram efeito inibitório sobre a atividade proteolítica de DpQ-E na faixa de pH 5,5-6,5. O perfil de inibição obtido sugere a presença de uma proteinase ativa com pH de atividade máxima em 5,5 inibida por E-64 e ativada por EDTA, e outra ativa em pH 6,5 inibida por PMSF, E-64 e EDTA. O uso de pepstatina-A não demonstrou efeito inibitório sobre a

atividade proteolítica de DpQ-E na faixa de pH entre 5,5 e 6,5. De forma semelhante, o PMSF foi ineficiente em promover inibição em pH 5,5 e 6,0. No entanto, em pH 6,5 foi capaz de reduzir em 90% a atividade enzimática.

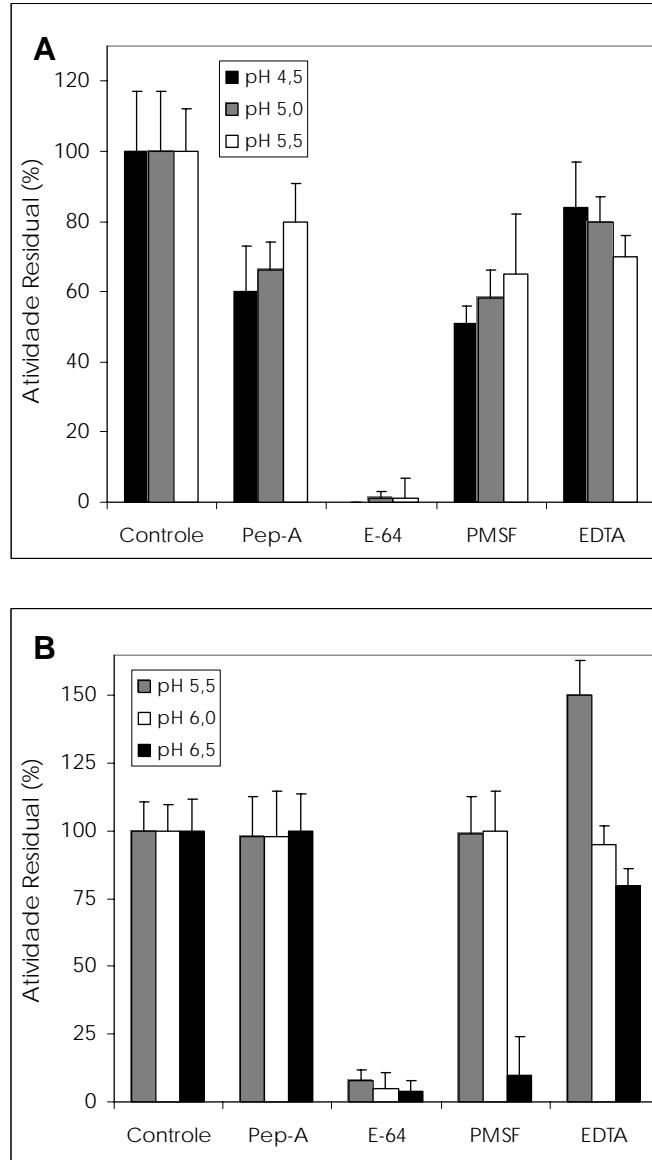


Figura 13 - Efeito de inibidores nas frações DpQ-NR (A) e DpQ-E (B). Alíquotas das frações nos diferentes pHs, em presença de 5 mM DTT, foram pré-incubadas com os inibidores por 30 min antes da adição de 2  $\mu$ M N-Cbz-Phe-Arg-MCA. Concentrações finais dos inibidores: 10  $\mu$ M de E-64, 1 de mM PMSF, 10  $\mu$ M de pepstatina-A, 1 mM de EDTA. Os valores representam médias de experimentos realizados em triplicata.

Para confirmar a presença de cisteíno-proteinases das frações DpQ-NR e DpQ-E, outros inibidores foram utilizados para complementar a caracterização das enzimas (Tabela 3). Os resultados mostram os maiores percentuais de inibição da fração DpQ-NR no pH 5,0 quando comparados com os valores obtidos em pH 4,5 com leupeptina, TLCK e *p*-OHMB. De forma semelhante, também se observa grande inibição da fração DpQ-E em pH 5,5 e 6,5 com leupeptina e TLCK. No entanto, esta fração demonstrou ser menos sensível ao *p*-OHMB em pH 6,5, sugerindo a presença de uma enzima do tipo tripsina ativa em pH próximo a 7,0.

Tabela 3 – Efeito dos inibidores sobre a atividade proteolítica das frações DpQ-NR e DpQ-E.

Inibidor	% de atividade residual			
	NR pH 4,5	NR pH 5,0	E pH 5,5	E pH 6,5
Leupeptina, 10 $\mu$ M	15	6	13	5
TLCK, 10 $\mu$ M	6	0	0	5
<i>p</i> -OHMB, 200 $\mu$ M	12	0,5	0	30

Efeito de inibidores nas frações DpQNR e DpQ-E. Alíquotas das frações nos diferentes pHs, em presença de 5 mM DTT, foram pré-incubadas com os inibidores por 30 min antes da adição de 2  $\mu$ M N-Cbz-Phe-Arg-MCA. Os valores representam médias de triplicatas.

#### 4.6.4. Especificidade das enzimas para diferentes substratos

Com a finalidade de distinguir as cisteíno-proteinases encontradas nas frações DpQ-NR e DpQ-E, a especificidade das enzimas para substratos cumarínicos contendo diferentes resíduos de aminoácidos foi investigada. Dois dos substratos utilizados continham arginina em P<sub>1</sub>, fenilalanina e/ou arginina em P<sub>2</sub>. O terceiro possuía fenilalanina em P<sub>1</sub> e leucina em P<sub>2</sub>.

Comparando-se com o substrato N-CBz-Phe-Arg-MCA, a alteração do resíduo P<sub>1</sub> para fenilalanina e P<sub>2</sub> para leucina reduziu a taxa de hidrólise de 82 e 85% para a fração DpQ-NR em pH 4,5 e 5,0 e aboliu a atividade de DpQ-E em pH 5,5 e 6,5 (Figura 14). Da maneira similar, a modificação do resíduo P<sub>1</sub> para arginina resultou em queda da atividade enzimática em 90% para a fração DpQ-E em pH 5,5, e de 77% em pH 6,5. Para este substrato, praticamente nenhuma atividade proteolítica foi detectada para DpQ-NR em pH 4,5 e 5,0. Os substratos N-t-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA e  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Cap-Leu-Phe-MCA mostraram-se menos suscetíveis à proteólise, revelando a preferência das enzimas contidas em DpQ-NR por substratos com característica hidrofóbica em P<sub>2</sub>. Na fração DpQ-E, as enzimas ativas em pH 5,5 e 6,5 demonstraram preferência por resíduo básico em P<sub>1</sub>, sendo que o resíduo em P<sub>2</sub> pode ser hidrofóbico ou básico, sendo que nessa última situação há redução de 90 a 77 % da atividade total.

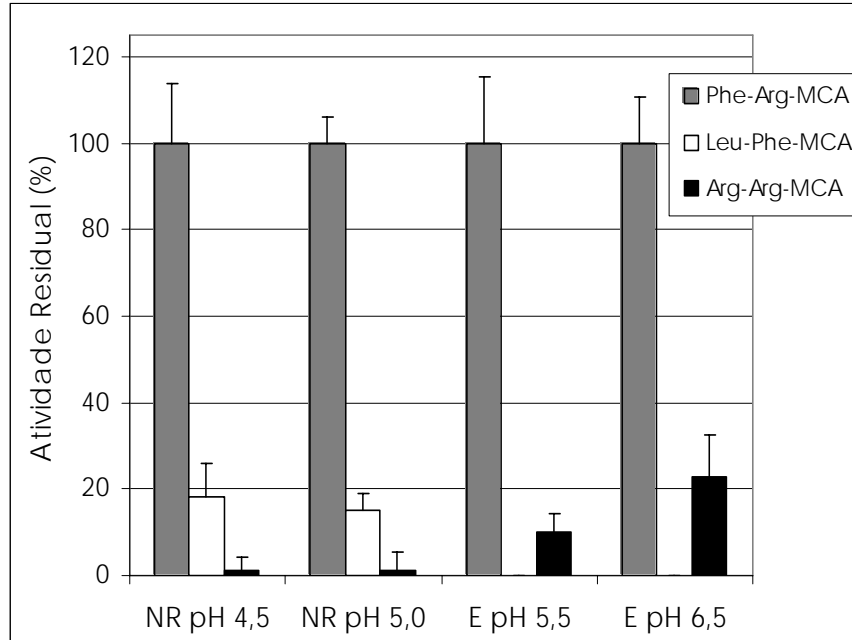


Figura 14 – Especificidade das atividades enzimáticas sobre diferentes substratos. Alíquotas das frações nos diferentes pHs, em presença de 5 mM DTT, foram ensaiadas com os diferentes substratos na concentração final de 2  $\mu$ M. Os valores representam médias de experimentos realizados em triplicata.

#### 4.6.5. Determinação dos valores de KM e Vmax

Os parâmetros cinéticos, KM e Vmax, das frações DpQ-NR e DpQ-E sobre o substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA também foram determinados.

Tabela 4 – Comparação dos valores de KM e Vmax obtidos para as enzimas

	KM ( $\mu\text{M}$ substrato)	Vmax (mRFU/min/ $\mu\text{g}$ )
DpQ-NR pH 4,5	1,011 $\pm$ 0,1663	19301 $\pm$ 923,9
DpQ-E pH 5,5	0,8457 $\pm$ 0,1116	3617 $\pm$ 141,2
DpQ-E pH 6,5	0,7582 $\pm$ 0,1013	8269 $\pm$ 322,5

Substrato: N-Cbz-Phe-Arg-MCA – 0,1 a 30 $\mu\text{M}$

Os dados mostram que apesar da diferença na preferência por resíduos em P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>, as cisteíno-proteinases em DpQ-NR e DpQ-E apresentaram valores de KM equivalentes para o substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA. A atividade específica da fração não retida, que apresentou menor número de bandas no SDS-PAGE (Figura 7), é cerca de 2-5 vezes maior.

## 5. DISCUSSÃO

A digestão é o processo fisiológico pelo qual o alimento em sua forma ingerida é degradado em componentes assimiláveis. O processo acontece no trato digestivo de animais, através da ação hidrolítica das enzimas digestivas secretadas pelo intestino médio e glândulas salivares (Terra e Ferreira, 1994).

Considerando que os insetos utilizam peptidases para a digestão das proteínas e obtenção de aminoácidos essenciais, as enzimas proteolíticas digestivas são alvos bastante interessantes no que se refere à possibilidade de uso como estratégias de controle de uma grande diversidade de insetos-pragas (Jongsma *et al.*, 1997; Fabrick *et al.*, 2002; Gatehouse e Gatehouse, 1998).

As enzimas proteolíticas presentes no aparelho digestório dos insetos incluem aminopeptidases, carboxipeptidases, proteinases aspárticas e cisteínicas, além de serino e metaloproteinases (Terra e Ferreira, 1994; Bown *et al.*, 1997; Girard e Jouanin, 1999; Patankar *et al.*, 2001; Murdock e Shade, 2002; Ferry *et al.*, 2004). Esta ampla diversidade implica em múltiplas funções para as enzimas, como o envolvimento nos processos de desenvolvimento do inseto além das interações com os componentes alimentares.

Enzimas proteolíticas de hemípteros de diferentes hábitos alimentares (hematófagos, fitófagos e zoófagos) são predominantemente acídicas, da classe das aspártico e cisteíno peptidases (Houseman, 1978; Houseman e Downe, 1981; Houseman e Downe, 1982a e 1982b; Houseman e Downe, 1983). O papel assumido por estas enzimas, geralmente intracelulares, na digestão extracelular de proteínas nos insetos (Houseman *et al.*, 1984; Terra e Ferreira, 1994;



Cristofolletti *et al.*, 2003) pode ser resultante da evolução das espécies (Houseman *et al.*, 1985; Cristofolletti *et al.*, 2003). O primeiro evento evolutivo estaria envolvido com a perda das enzimas tripsina-like após uma adaptação do antecessor da ordem Hemiptera, Auchenorrhyncha. O segundo estaria relacionado à utilização de proteinases lisossomais, na complementação da digestão, por insetos sugadores que teriam retomado uma dieta baseada em proteínas (Houseman e Downe, 1983). As enzimas utilizadas são evolutivamente de origem lisossomal, sintetizadas nas células epiteliais do intestino e secretadas para o lúmen (Billingsley e Downe, 1985; Billingsley e Downe, 1988).

A hipótese é consistente com observações de que o pH intestinal dos hemipteros é ligeiramente ácido, no entanto o conteúdo enzimático mostra-se diferente nas glândulas salivares e em insetos pertencentes a outras ordens (Terra e Ferreira, 1994). Alguns coleópteros cucujiformes possuem enzimas digestivas cisteínicas (Murdock *et al.*, 1987), sendo que essa adaptação permitiu alguns desses insetos alimentarem-se de sementes que contém grandes quantidades de inibidores de serino proteinases (Terra e Cristofolletti, 1996). Análises imunohistoquímicas e bioensaios com fitocistatinas mostraram que proteinases cisteínicas, do tipo catespina L, exercem um papel importante na digestão de *Sitophilus* sp. e *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera) (Matsumoto *et al.*, 1997; Koiwa *et al.*, 2000). Da mesma forma, atividades predominantemente cisteínicas foram identificadas nas formas jovens de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Fabrick *et al.* 2002).

Laurema *et al.* (1985) relataram a presença de enzimas ácidas e alcalinas nas glândulas salivares de *Lygus rugulipennis* (Hemiptera, Miridae). Kumar *et al.*

(1978 e 1980) identificaram estruturas similares a lisossomos em tecidos glandulares de *Dysdercus koenigii* e em percevejos da família *Lygaeus*, localizando a origem das enzimas acídicas. Outros estudos apontaram a prevalência de serino proteinases na maioria dos heterópteros (Goodchild, 1952; Cohen, 1993; Agusti e Cohen, 2000; Colebatch *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003), enquanto outros revelaram ausência de atividade proteolítica na saliva de *Poecilopsus lineatus* e *Dysdercus peruvianus* (Cohen e Wheeler, 1998; Silva e Terra, 1994). Ainda que a secreção de saliva esteja envolvida no início do processo digestivo, este é completamente executado no intestino.

Mediante o uso de substratos proteicos e sintéticos, o presente trabalho possibilitou a caracterização das principais enzimas proteolíticas do trato digestório de ninfas de *D. peruvianus*, identificando o predomínio de proteinases acídicas dos tipos aspártico e cisteíno proteinases. Stanisçuaski *et al.* (2005a) obtiveram dados semelhantes mostrando predomínio de catepsinas B e D nas formas jovens e adultas do inseto, variando quanto às proporções e valores de pH máximos de atividade enzimática. As atividades proteolíticas detectadas a partir de homogeneizados de intestinos de ninfas sobre caseína e hemoglobina evidenciaram um pico de atividade na faixa de pH entre 3,0 e 4,0 extensamente inibido por E-64 e pepstatina-A. Apesar de também terem sido identificadas nas formas adultas, as atividades proteolíticas máximas detectadas entre 4,5 e 5,5, mostraram-se menos sensíveis ao E-64 e suscetíveis a pepstatina-A, apontando uma menor participação de cisteíno proteinases ativas nesta faixa de pH. Tal fato poderia explicar a sensibilidade das ninfas à canatoxina e a ausência de efeitos tóxicos nos adultos machos, hipótese aqui reforçada pela demonstração de que o

processamento da urease de *Canavalia ensiformis* é realizado por cisteíno proteinases digestivas de ninfas do percevejo *D. peruvianus*.

Silva e Terra (1994) identificaram regiões com atividades hidrolíticas distintas no tubo digestório de adultos fêmeas de *D. peruvianus*: aminopeptidase e amilase na porção V1, cisteíno proteinase e fosfatase ácida em V2 e fosfatase alcalina na porção V3. No mesmo relato, os autores também diferenciaram as hidrolases provenientes da dieta (sementes de *Gossypium hirsutum*) das enzimas originalmente intestinais do percevejo. Da mesma forma, para descartar a hipótese de que as atividades proteolíticas identificadas no homogeneizado de intestinos de ninfas pudessem ser provenientes da dieta, ensaios enzimáticos com extrato de sementes algodão foram conduzidos. Os resultados mostraram que as enzimas contidas no extrato são incapazes de hidrolisar o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp no intervalo de pH entre 2,0 e 9,0 (dados não mostrados).

Catepsinas B, L e D foram descritas nas fases larvais de *Hypera postica* (Wilhite *et al.*, 2000). Outros insetos fitófagos, como *Lygus hesperus* (Hemiptera), *Nilaparvata lugens* (Homoptera) e *Helicoverpa armigera* (Coleoptera) possuem predominantemente serino proteinases ativas no tubo digestório (Agusti e Cohen, 2000; Foissac *et al.*, 2002). Apesar de amplamente utilizado na detecção de cisteíno proteinases, a hidrólise do substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA na faixa de pH entre 8,0 e 9,0, associada a inibidores específicos indicaram a predominância de serino proteinases em *N. lugens* (Foissac *et al.*, 2002).

O uso cada vez mais freqüente de ferramentas de biologia molecular, destacando a clonagem e a obtenção de bibliotecas de cDNA, tem facilitado a

caracterização molecular de cisteíno peptidases, incluindo catepsinas B e L de heterópteros, como *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, e de homópteros como *Acysthosiphon pisum*, *Aphis gossypii* e *Nilaparvata lugens* (Lopez-Ordoñez *et al.*, 2001; Kollien *et al.*, 2004; Cristofolletti *et al.*, 2003; Deraison *et al.*, 2004; Foissac *et al.*, 2002). Análise do transcriptoma de *D. peruvianus* adultos revelaram transcritos correspondentes a serino proteinase, dados que confirmam a presença de serino proteinase em ninfas (Bifano e Terra, 2006).

Diferentes respostas durante o ciclo de vida de alguns insetos frente a toxinas já foram descritas. A exemplo da toxina de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), as fases larvais de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera) são mais resistentes à toxina CryIC, fato atribuído a um processamento enzimático diferenciado da proteína ingerida dependente do estágio de desenvolvimento do inseto (Keller *et al.*, 1996). Em 1973, Garcia *et al.* demonstraram que 21 dias após a ingestão de sangue, ninfas de *R. prolixus* ainda apresentavam alta atividade proteolítica no trato intestinal, supostamente associada a ecdise. Nas mesmas condições, os níveis de atividade enzimáticos nos adultos já haviam voltado para os níveis basais. Estudos posteriores com *R. prolixus* revelaram que os efeitos tóxicos da canatoxina são estágio-dependentes, destacando diferenças importantes na permeabilidade na membrana intestinal e nos perfis de atividade enzimática de ninfas e adultos (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). O conjunto de dados justificaria a toxicidade da canatoxina apenas para as formas jovens do triatomídeo.

Desta forma, a toxicidade estágio-dependente da canatoxina em *D. peruvianus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005a) foi atribuída a diferenças no processamento proteolítico da proteína por enzimas também estágio-específicas.

Assim, a caracterização das enzimas digestivas de adultos de *D. peruvianus* também vem sendo realizada pelo grupo de pesquisa. Inibidores clássicos de enzimas proteolíticas (pepstatina-A, E-64, EDTA, PMSF e benzamidina) evidenciaram a presença majoritária de serino proteases no homogeneizado de intestinos de percevejos adultos. Embora os resultados demonstrem a hidrólise da urease de *C. ensiformis* pelo homogeneizado de intestinos de adultos machos, fragmentos de baixa massa molecular reconhecidos pelo anticorpo anti-jaburetox-2Ec não são visualizados (Piovesan *et al.*, 2006). Assim, os perfis enzimáticos diferenciados nas fases jovem e adulta do inseto confirmam a capacidade de formação de peptídeos reativos ao anticorpo anti-jaburetox-2Ec justificando a seletividade estágio-específica da urease e da canatoxina.

Assim como ocorre no processamento das toxinas *Bt*, o mecanismo de ação da urease e da canatoxina envolve proteólise limitada destas proteínas por enzimas digestivas dos insetos suscetíveis. Trabalhos de Carlini *et al.* (1997) e Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) com *R. prolixus* concordam com a ativação proteolítica da urease de *C. ensiformis* por proteinases cisteínicas de *D. peruvianus* suscetíveis ao inibidor E-64.

Apesar da presença confirmada de catepsinas tipo D no homogeneizado de intestinos de ninfas do fitófago, a pepstatina-A não foi capaz de impedir a hidrólise da urease. Este resultado contrasta com dados anteriores, os quais demonstraram que a pepstatina-A não só protegia *R. prolixus* do efeito letal da canatoxina, como retardava o processamento da proteína no intestino do inseto (Carlini *et al.*, 1997). Além disso, outros dados do grupo mostram que uma aspártico proteinase sensível à pepstatina-A parece ser responsável pela ativação proteolítica da

canatoxina por homogeneizados de larvas do bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005b). O conjunto de resultados sugere que tanto aspártico como cisteíno proteinases oriundas de diversas espécies de insetos são capazes de liberar peptídeos entomotóxicos a partir das ureases de *C. ensiformis*. Análises de seqüência revelam que a urease possui regiões sensíveis a estas enzimas proteolíticas (DpQ-NR e DpQ-E), flanqueando a seqüência do peptídeo entomotóxico jaburetox 2-Ec.

Neste trabalho, substratos proteicos foram inicialmente utilizados para a caracterização preliminar das proteinases, enquanto substratos peptídicos de fluorescência apagada foram utilizados para o estudo de propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas parcialmente purificadas.

Pelo menos duas cisteíno proteinases (DpQ-NR e DpQ-E) com propriedades bioquímicas distintas foram parcialmente purificadas de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *D. peruvianus*. Além do comportamento diferencial na cromatografia de troca iônica, as frações possuem diferenças quanto ao pH ótimo de atividade, na especificidade pelo substrato e na suscetibilidade ao efeito do ditiotreitol e inibidores. A grande maioria das cisteíno proteinases, entre elas a catepsina L, tem a especificidade pelo substrato determinada através da região S<sub>2</sub> da enzima, que preferencialmente é ocupada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Storer e Ménard, 1994). A catepsina B é a única que também aceita aminoácidos básicos, como arginina, em P<sub>2</sub> devido à presença de um resíduo de ácido glutâmico em S<sub>2</sub> (Hasnain *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1995). De forma semelhante a catepsina B, enzimas tipo tripsina clivam substratos com arginina ou lisina em P<sub>1</sub>.

A caracterização da peptidase DpQ-NR mostrou similaridade com a catepsina L do coleóptero *Diabrotica virgifera* descrita por Bown *et al.* (2004). Ambas as enzimas apresentaram pH ótimo de atividade proteolítica em 4,5, além de ativação por compostos redutores e inibição por E-64 e PMSF. Dados de caracterização cinética também puderam ser comparados: enquanto o  $K_M$  da enzima DpQ-NR sobre N-Cbz-Phe-Arg-MCA foi de 1  $\mu\text{M}$ , o valor de  $K_M$  obtido para catepsina L do coleóptero foi de 34  $\mu\text{M}$ .

Ensaio de especificidade da fração DpQ-NR revelaram a preferência da enzima por substratos contendo resíduo hidrofóbico em  $P_2$ , sugerindo ser esta atividade devido a uma catepsina L. Bifano *et al.* (2005), descreveram em extratos de intestino médio (porções V2 e V3) de adultos de *D. peruvianus* uma catepsina L ativa sobre N-CBz-Phe-Arg-MCA ativa em pH 6,0. A preferência por resíduo hidrofóbico em  $P_2$  também foi evidenciada na caracterização da catepsina L de *Diabrotica virgifera* (Bown *et al.*, 2004). A hidrólise do substrato  $\epsilon\text{-NH}_2\text{-Cap-Leu-Phe-MCA}$  aliada à inibição por pepstatina-A em pH ácido indica a presença de catepsina D na fração DpQ-NR, além da cisteína peptidase já relatada. Na fração DpQ-E, a hidrólise do substrato N-t-Boc-Gly-Arg-Arg-MCA e o efeito de inibidores sugerem a presença de catepsina B, no entanto não se pode descartar a presença de uma enzima do tipo tripsina ativa em pH 6,5 nesta fração.

A ocorrência de enzimas com diferentes especificidades de pH, inibidores e substratos implica na expressão de uma ampla variedade de enzimas que possuem mecanismos similares, mas diferem nas propriedades funcionais. Whitworth *et al.* (1998) e Patankar *et al.* (2001) relataram a expressão seletiva de

enzimas de *Solenopsis invicta* e de *Helicoverpa armigera* dependentes do estágio de desenvolvimento e da fonte de proteína digerida. Dados demonstram que alguns insetos são capazes de promover uma expressão diferencial das enzimas além de variar mecanismos de especificidade das mesmas, revelando grande complexidade na regulação dos processos digestivos. Aumento na expressão de cisteíno proteinases mediante grandes quantidades de inibidores contidos na dieta têm sido relatado nos coleópteros fitófagos *Leptinotarsa decemlineata* e *C. maculatus* (Gruden *et al.*, 2004; Zhu-Salzman *et al.*, 2003). Paulillo *et al.* (2000) relataram a capacidade adaptativa do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* alterando a expressão de enzimas digestivas do tipo tripsina após ingestão crônica de uma dieta rica em inibidores de proteinases.

Assim, o trabalho desenvolvido sugere a presença de diversas proteinases no sistema digestivo de *D. peruvianus*. Esta complexidade estaria diretamente relacionada a mecanismos adaptativos do inseto, visando à manutenção e nutrição dos tecidos ou envolvidos no processamento e inativação de proteínas tóxicas de defesa produzidas pela planta (Peumans e Van Damme, 1995). Inibidores de proteinases (Ryan 1990) também podem favorecer a síntese e a expressão de proteinases insensíveis aos inibidores (Jongsma *et al.*, 1995).



## 6. CONCLUSÕES

- Identificou-se atividade proteolítica em homogeneizados de intestinos de ninfas de 4<sup>o</sup> instar de *Dysdercus peruvianus*, composta por enzimas aspárticas, cisteínicas, serínicas e metaloproteinases.
- As enzimas contidas no homogeneizado são capazes de hidrolisar substratos protéicos e sintéticos, onde se destaca a atividade enzimática acídica.
- Cisteíno proteinases foram capazes de hidrolisar *in vitro* a urease de *Canavalia ensiformis* e formar fragmentos de baixa massa molecular reconhecidos pelo anticorpo anti-jaburetox 2-Ec.
- Duas cisteíno proteinases foram separadas através de um protocolo de purificação composto de duas etapas cromatográficas.
- As frações DpQ-NR e DpQ-E foram purificadas 11,8 x e 11,6 X, respectivamente.
- A fração DpQ-NR possui pH ótimo de atividade em pH 4,0 e no intervalo entre 6,0 e 6,5. A máxima ativação com DTT concentrou-se no intervalo de pH entre 4,5 e 5,0.
- A fração DpQ-E possui pH ótimo de atividade em pH 3,5 e 7,0. A máxima ativação com DTT foi identificada no intervalo de pH entre 5,5 e 6,5.
- As enzimas DpQ-NR e DpQ-E apresentaram sensibilidade a inibidores típicos de cisteíno proteinases, como E-64, leupeptina, TLCK e *p*-OHMB.
- A enzima DpQ-NR apresentou preferência por substratos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P<sub>2</sub>.

- A enzima DpQ-E apresentou preferência por substratos contendo resíduos de aminoácidos básicos em P<sub>1</sub>.
- Os dados obtidos sugerem que cisteíno-proteinases são responsáveis pelo processamento da urease de *C. ensiformis* e pela formação de fragmentos de baixa massa molecular potencialmente tóxicos. No entanto, estudos de permeabilidade de membrana nos intestinos de ninfas e adultos ainda deverão ser conduzidos, com o intuito de esclarecer aspectos da toxicidade da urease e da canatoxina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agusti, N., Cohen, A.C. (2000). *Lygus hesperus* and *L. Lineolaris* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: Evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes. *Journal of Entomological Science*, 35(2): 176-186.

Barcellos, G.B.S., Almeida, L.A., Moreira, R.A., Sousa-Cavada, B., Oliveira, J.T.A., Carlini, C.R. (1993). Canatoxin-cross reactive, concanavalin A-cross reactive, and canavalin-cross reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Planta*, 189(3): 397-402.

Barja-Fidalgo, T.C., Guimarães, J.A., Carlini, C.R. (1991a). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, 29(4-5): 453-459.

Barja-Fidalgo, T.C., Guimarães, J.A., Carlini, C.R. (1991b). Canatoxin, a plant protein, induces insulin secretion from isolated pancreatic islets. *Endocrinology*, 128(2): 675-679.

Barja-Fidalgo, T.C., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation*, 16 (1): 1-12.

Barreto, A.N., Beltrão, N.E.M., Vieira, D.J., Nobrega, L.B. (1999). Manejo cultural. O algodão brasileiro em relação ao mundo: situação e perspectivas. In Beltrão, N.E.M. O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília: Embrapa-CTT/EMBRAPA-CNPA. v.2, p.511-527

Becker-Ritt, A.B. (2005). Ureases de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: expressão em tabaco [*Nicotiana tabacum* (L.)] e atividade fungicida e/ou fungistática. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Bento, J.M.S. (1999). Perdas por insetos na agricultura. *Ação ambiental* II, 4: 19-21.

Bifano, T.D., Ornelas, C.C., Tamaki, F.K., Lopes, A.R., Terra, W.R. (2005). Distribution, isolation and partial characterization of cysteine proteinase of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). XXXIV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, SP.

Bifano, T.D., Terra, W.R. (2006). Analysis of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut transcriptome. XXXV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, SP.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R. (1985). Cellular-localisation of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae) during blood digestion. Cell and Tissue Research, 241(2): 421–428.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R. (1988). Ultrastructural-localization of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae) during blood digestion. International Journal of Insect Morphology & Embriology, 17(4-5): 295-302.

Bolter, C., Jongsma, M.A. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology, 43(10): 885-895.

Bown, D.P., Wikinson, H.S., Gatehouse, J.A. (1997). Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive proteases genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are member of complex multigene families. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27(7): 625-638.

Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Jongsma, M.A., Gatehouse, J.A. (2004). Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34(4): 305-320.

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

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

Brömme, D., Nallaseth, F.S., Turk, B. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods*, 32(2): 199-206.

Buzzi, Z.J., Miyazaki, R.D. (1999). *Entomologia didática*. Editora da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 262 p.

Carlini, C. R., Guimarães, J. A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19(5): 667-675.

Carlini, C. R., Gomes, C., Guimarães, J.A., Markus, R.P., Sato, H., Trolin, G. (1984). Central nervous effects of the convulsivant protein canatoxin. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 54(3): 161-166.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Ribeiro, J.M.C. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein - Evidences for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 84 (2): 551-560.

Carlini, C.R., Barcellos, G.B.S., Baeta-Neves, A.D.V., Guimarães, J.A. (1988). Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry*, 27(1): 25-30.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A. (1991). Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 29(7): 791-806.

Carlini, C.R., Oliveira, A.E.A., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *Journal of Economic Entomology*, (90)2: 340-348.

Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11): 1515-1539.

Chapman, R.F. (1998). *The insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, 770 p.

Cohen, A.C. (1993). Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous Heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology*, 39(10): 823–829.

Cohen, A.C., Wheeler, A.G.J. (1998). Role of saliva in the highly destructive fourlined plant bug (Hemiptera: Miridae: Mirinae). *Annals of The Entomological Society of America*. 91(1): 94–100.

Colebatch, G., East, A., Cooper, P. (2001). Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5): 415–423.

Cristofolletti, P., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y., Terra, W. R. (2003). Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 49(1): 11-24.

Deraison, C., Darboux, I., Duportets, L., Gorojankina, T., Rahbé, Y., Jouanin, L. (2004). Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. *Insect Molecular Biology*, 13(2): 165-177.

Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., Zerner, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of The American Chemical Society*. 97(14): 4131-4133.

Eidels, L., Proia, R.L., Art, D.A. (1983). Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiological Reviews*. 47(4): 596-620.

Fabrick, J., Behnke, C., Czapla T., Bala, K., Rao, A.G., Kramer, K.J., Reeck, G.R. (2002). Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(4): 405-415.

Felton, G.W. (1996). Nutritive quality of plant protein: Sources of variation and insect herbivore responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32(1): 107-130.

Ferreira-DaSilva, C.T. (2002). Efeitos da canatoxina e peptídeos derivados em diferentes insetos: uma proposta de bioinseticida. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(4): 162-171.

Ferry, N., Edwards, M.G., Gatehouse, J.A. (2004). Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2): 155-161.

Foissac, X., Edwards, M.G., Du, J.P., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. (2002). Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae) – identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(9): 967-978.

Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., Carlini, C.R. (2001). Canatoxin, a toxic protein of Jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.15). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, 360(1): 217-224.

Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R. (2004a). Separation of jackbean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*, 167(2): 241-246.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Oliveira-Severo, D., Carlini, C.R. (2004b). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271(7): 1357-1363.

Fujinaga, M., Cherney, M.M., Oyama, H., Oda, K., James, M.N. (2004). The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10): 3364-3369.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti-Filho, E. Parra, J.R., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002). Entomologia agrícola. Piracicaba, 920 p.

Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A. (1992). Control of insect pests by plant genetic-engineering. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh – Biological Sciences, 99B(3-4): 51-60.

Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. (1998). Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. Pesticide Science. 52(2): 165-175.

Gatehouse, J.A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. New Phytologist, 156(2): 145-169.

Garcia, E. S., Macarini, J. D., Garcia, M. L. M. (1973). O ciclo da atividade proteolítica intestinal em larvas e adultos de *Rhodnius prolixus*. Revista Brasileira de Biologia, 33: 315-320.

Ghazaleh, F.A., Araujo C.F., Barja-Fidalgo C., Carlini, C.R. (1992). Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 25(10):1033-1035.

Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovitz, M.E., Carlini, C.R. (1997). Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: Methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. Archives of Biochemistry and Biophysics, 339(2): 362-367.

Girard, C., Jouanin, L. (1999). Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29(12):1129-1142.

Gombarovits, M.E.C. (1999). Peptídeos entomotóxicos da canatoxina: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.



Goodchild, A.J.P. (1952). A study of the digestive system of the West African cacao capsid bugs (Hemiptera: Miridae). *Proceedings of The Zoological Society of London*, 122(3): 543-572.

Gruden, K., Kuipers, A.G.J., Guncär, G., Slapar, N., Strukelj, B., Jongsma, M.A. (2004). Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(4): 365-375.

Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I. (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(3): 523-528.

Hasnain, S., Hiram, T., Huber, C.P., Mason, P., Mort, J.S. (1993). Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. The importance of Glu 245 in the S<sub>2</sub>-P<sub>2</sub> specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1): 235-240.

Hilder, V.A., Boulter, D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*, 18(3): 177-191.

Houseman, J. (1978). A thiol-activated digestive protease from adults of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*, 56(5): 1140–1143.

Houseman, J.G., Downe, A.E.R. (1981). Identification and partial characterization of digestive proteinases from *Triatoma phyllosoma pallidipennis* (Hemiptera, Reduviidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 70B(4): 713-717.

Houseman, J.G., Downe, A.E.R. (1982a). Identification and partial characterization of digestive proteinases from two species of bedbug (Hemiptera: Cimicidae). *Canadian Journal of Zoology*, 60(8): 1837-1840.

Houseman, J.G., Downe, A.E.R. (1982b). Characterization of an acidic proteinases from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry*, 12(6): 651-655.

Houseman, J.G., Downe, A.E.R. (1983). Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B(3): 509-512.

Houseman, J.G., Macnaughton, W.K., Downe, A.E.R. (1984). Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Euschistus euschistoides* (Hemiptera: Pentatomidae). *Canadian Journal of Entomology*, 116(10): 1393-1396.

Houseman, J.G., Morrison, P.E., Downe, A.E.R. (1985). Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* Stal (Hemiptera: Phymatidae). *Canadian Journal of Zoology*, 63(6): 1288-1291.

James, M.N.G. (2004). Catalytic pathway of aspartic peptidases. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A.J., Rawlings, N.S., Woessner, J.F.). Elsevier, London, p 12-19.

Jia, Z., Hasnain, S., Hiramata, T., Lee, X., Mort, J.S., To, R., Huber, C.P. (1995). Crystal structure of recombinant rat cathepsin B and cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47): 5527-5533.

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. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92(17): 8041-8045.

Jongsma, M.A., Stiekema, W.J., Bosch, D. (1996). Combating inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends in Biotechnology*, 14(9): 331-333.

Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Konez, C., Schell, J., Zilberstein, A. (1996). Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(4): 365-373.

Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Oda, J., Yamada, Y., Sato, F. (1997). Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant and Cell Physiology*, 38(7): 783-791.

Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., Subramanian, L., Murdock, L.L., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1998). Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal*, 14(3): 371-379.

Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urso, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2000). A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS letters*, 471(1): 67-70.

Kollien, A.H., Waniek, P.J., Nisbet, A.J., Billingsley, P.F., Schaub, G.A. (2004). Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Molecular Biology*, 13(6): 569–579.

Kumar, D., Ray, A., Ramamurty, P.S. (1978). Hystophysiology of the salivary glands of the red cotton bug *Dysdercus koenigii* (Pyrrhocoridae – Heteroptera) – histological, histochemical, autoradiographic and electron-microscopic studies. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92(1): 147-170.

Kumar, D., Ray, A., Ramamurty, P.S. (1980). Studies on the salivary glands of *Lygaeus* sp. (Lygaeidae – Heteroptera) – histological, histochemical, autoradiographic and electron microscopic investigations. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 94(4): 669-695.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Laurema, S., Varis, A., Miettinen, H. (1985). Studies on enzymes in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry*, 15(2): 211-224.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods of Enzymology*, 3: 447-454.

Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J. (1990). Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56(3): 219-227.

- Lopez-Ordoñez, T., Rodriguez, M.H., Hernández-Hernández, F.D.L.C. (2001). Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Molecular Biology*, 10(5): 505–511.
- Luttrell, R.G., Fitt, G.P., Ramalho, F.S., Sugonyaev, E.S. (1994). Cotton pest-management: A world perspective. *Annual Review of Entomology*, 39: 517-526.
- Marciniszyn, J.Jr., Huang, J.S., Hartsuck, J.A., Tang, J. (1976). Mechanism of intramolecular activation of pepsinogen. Evidence of an intermediate delta and the involvement of the active site of pepsin in the intramolecular activation of pepsinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 251(22): 7095-7102.
- Matsumoto, I., Emori, Y., Abe, K., Arai, S. (1997). Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. *Journal of Biochemistry*, 121(3): 464–467.
- McGaughey, W.H., Whalon, M.E. (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1451-1455.
- Ménard, R., Carmona, E., Plouffe, C., Brömme, D., Konishi, Y., Levebvre, J., Storer, A.C. (1993). The specificity of the S<sub>1</sub>' subsite of cysteine proteases. *FEBS Letters*, 328: 107-110.
- Milano, P., Cônsoli, F.L., Zério, N.G., Parra, J.R.P. (1999). Exigências térmicas de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae), o percevejo manchador do algodoeiro. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28(2): 233-238.
- Moraes, N.C. (1997). Competitividade do algodão brasileiro no mercado internacional e implicações da integração ao mercosul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Mulinari, F. (2004). Jaburetox 2-Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H., Wolfson, J.L. (1987). Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87B(4): 783-787.

Murdock, L.L., Shade, R.E. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22): 6605-6611.

Musser, F.R., Shelton, A.M. (2003). Bt sweet corn and selective insecticides: Impacts on pests and predators. *Journal of Economic Entomology*, 96(1): 71-80.

Oda, K. Sedolisin. (2004). In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A.J., Rawlings, N.S., Woessner, J.F.). Elsevier, London, p 1886-1887.

Oerke, E.C., Dehne, H.W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection - Current situation and future trends. *European Journal of Plant Pathology*, 103(3): 203-215.

Oliveira, A.E.A., Gomes, V.M., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Carlini, C.R., Xavier-Filho, J. (1999). The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) Dc] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Biologia*, 59: 59-62.

Patankar, A.G., Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Sainani, M.N., Deshpande, V.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. (2001). Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5): 453-464.

Paulillo, L.C.M.S., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T. Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C. (2000). Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinases inhibitors. *Journal of Economic Entomology*, 93(3): 892-896.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (1995). Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2): 347-352.

Piovesan, A.R., Stanisçuaski, F., Carlini, C.R. (2006). Differences in the proteolytic processing of plant urease in adults and nymphs of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). XXXV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, SP.

Pires-Alves, M. (2002). Genes de ureases na *Canavalia ensiformis*: caracterização de um novo membro (JBURE-2). Potencial como bioinseticida. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ramalho, F.S. (1994). Cotton pest- management: A brazilian perspective. Annual Review of Entomology, 39: 563-578

Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology, 28: 425-449.

Santos, C.M. (1993). Influência do controle do crescimento, do uso de fungicidas, e da frequência de colheita, nos caracteres agronômicos e na qualidade da fibra e da semente do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Tese de Doutorado. Universidade federal de Viçosa, Viçosa.

Santos, W.J. (1999). Monitoramento e controle de pragas do algodoeiro. In: Cia, E., Freire, E.C., Santos. W.J. Cultura do algodoeiro. Piracicaba: Potafós. p 133-179.

Seixas, A., Dos Santos, P.C., Velloso, F.F., Da Silva Vaz Jr, I., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. (2003). A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitology, 126: 155 -163.

Silva, C.P., Xavier-Filho, J. (1991). Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 99B(3): 529-533.

Silva, C.P., Terra, W.R. (1994). Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 24(5): 493-505.

Stanisçuaski, F., Ferreira-DaSilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C.R. (2005a). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45(6): 753-760.

Stanisçuaski, F. Postal, M., Carlini, C.R. (2005b). Proteolysis of Canatoxin: Characterization Of *Callosobruchus maculatus* Digestive Enzymes Involved In The Process, XXXIV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia, SP.

Storer, A.C., Menárd, R. (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:486-500.

Stotz, H.U., Kroymann, J., Mitchell-Olds, T. (1999). Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(4): 268-272.

Sumner, J.B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, 69: 435-441.

Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936). The identification of the hemagglutinin of the jackbean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 32: 227-237.

Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39: 47-79.

Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S. (1988). Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*, 18(5): 423-434.

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

Terra, W.T., Cristofolletti, P.T. (1996). Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Molecular Biology*, 113B(4): 725-730.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9): 4350-4354.

Ubatuba, F.B. (1955). Occurrence of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Revista Brasileira de Biologia*, 15: 1-8.

Whitworth, S.T., Blum, M.S., Travis, J. (1998). Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta*: isolation and characterization of four serine endoproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23): 14430-14434.

Wilhite, S.E., Elden, T.C., Bzrin, J., Smigocki, A.C. (2000). Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(12): 1181-1188.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 115(1): 197-203.

Zeng, F., Zhu, Y.C., Cohen, A. (2002). Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. *Comparative Biochemistry and Molecular Biology*, 131B(3): 453–463.

Zerner, B. (1991). Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry*, 19(1): 116-131.

Zhu, Y. C., Zeng, F., Oppert, B. (2003). Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinases activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(9): 889-899.

Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A., Shade, R.E., Ahn, J.-E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 12(2): 135-145.