

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Lucas Offenbecker Guerra

**α -Amilases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*:
clonagem e seqüenciamento dos cDNAs correspondentes,
expressão e propriedades**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
06/03/2008

Lucas Offenbecker Guerra

**α -Amilases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*:
clonagem e seqüenciamento dos cDNAs correspondentes,
expressão e propriedades**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Orientadora: Dra. Clélia Ferreira

São Paulo
2008

Índice

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Abreviações.....	7
1- Introdução.....	9
1.1- Considerações Iniciais.....	9
1.2- O tubo digestório dos insetos.....	11
1.3- As α -amilases.....	13
1.4- α -Amilases de insetos.....	16
1.5- Inibidores de α -amilases.....	19
1.6- <i>Diatraea saccharalis</i>	21
1.7- Objetivos desse trabalho.....	22
2- Materiais e Métodos.....	23
2.1- Criação de animais.....	23
2.2- Dissecção de animais.....	23
2.3- Determinação do pH do lúmen intestinal de <i>D. saccharalis</i>	23
2.4- Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular.....	24
2.5- Desenho de iniciador degenerado específico para amilases de insetos.....	24
2.6- Desenho de iniciadores específicos para amplificação do cDNA completo das α -amilases de <i>D. saccharalis</i>	24
2.7- Desenho de iniciadores de expressão.....	25
2.8- Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR).....	26
2.9- Eletroforese em gel de agarose para DNA.....	27
2.10- Purificação de DNA do gel de agarose.....	27
2.11- Dupla digestão de DNA usando enzimas de restrição.....	27
2.12- Ligação de fragmentos de DNA a plasmídeos vetores.....	28
2.13- Preparação de bactérias competentes.....	29

2.14- Transformação de bactérias competentes.....	29
2.15- Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias.....	30
2.16- Reação de seqüenciamento de DNA.....	30
2.17- Análise e montagem das seqüências.....	31
2.18- Comparação das seqüências e montagem de um cladograma.....	32
2.19- Digestão do plasmídeo pGenT usando a enzima de restrição EcoRI.....	32
2.20- Digestão dos vetores de expressão com Sac I.....	32
2.21- Transformação e expressão de proteínas recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	33
2.22- Desenho de iniciadores específicos para PCR quantitativo.....	35
2.23- Desenho de iniciadores para clonagem de genes constitutivamente expressos.....	35
2.24- Amplificação dos cDNAs dos genes constitutivos.....	35
2.25- Determinação da concentração de proteínas.....	35
2.26- Diálises.....	36
2.27- Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	36
2.28- Detecção de proteína nos géis.....	36
2.29- Cromatografia de filtração em gel.....	36
2.30- Cromatografia de troca iônica em baixa pressão.....	37
2.31- Cromatografia de troca iônica em sistema de alta pressão.....	37
2.32- Detecção da atividade de α -amilase e α -glicosidase.....	38
2.33- Ensaio de estabilidade ao congelamento.....	38
2.34- Detecção da atividade inibitória de IC1.....	38
2.35- Determinação do pH ótimo das enzimas.....	39
2.36- Estabilidade ao pH.....	39
2.37- Inativação térmica das amilases.....	40
2.38- Modificação com EDC.....	40
2.39- Determinação da constante de Michaelis (K_m) para diferentes substratos.....	40
2.40- Medida da processividade (grau de ataque múltiplo).....	40

2.41- Cromatografia em camada delgada dos produtos de ação enzimática.....	41
2.42- Determinação da sensibilidade das amilases recombinantes a diferentes inibidores.....	41
2.43- Modelagem estrutural de DSA1.....	42
3- Resultados e discussão.....	43
3.1- Instalação da cultura de <i>D. saccharalis</i> no laboratório e verificação de seu crescimento em dietas modificadas.....	43
3.2- Determinação do pH do lúmen intestinal de <i>D. saccharalis</i>	45
3.3- Clonagem do cDNA codificante das α -amilases de <i>D. saccharalis</i> e seu sequenciamento.....	45
3.4- Construção dos vetores de expressão e transformação de <i>Pichia pastoris</i>	53
3.5- Expressão das α -amilases recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	55
3.6- Expressão dos inibidores de cana-de-açúcar recombinantes em <i>Pichia pastoris</i>	59
3.7- Clonagem de cDNAs codificantes de proteínas constitutivas.....	61
3.8- Estabilidade das amilases recombinantes.....	68
3.9- Semi-purificação de DSA1.....	68
3.10- Efeito de detergentes na atividade de DSA1.....	71
3.11- Efeito do pH e da temperatura nas α -amilases de <i>D. saccharalis</i>	71
3.12- Propriedades cinéticas das α -amilases de <i>D. saccharalis</i>	75
3.13- Modelagem molecular de DSA1.....	77
3.14- Comparação entre as seqüências das α -amilases de insetos.....	79
4- Considerações Gerais.....	81
5- Conclusão.....	82
6- Bibliografia.....	83
Curriculum.....	95

Agradecimentos

Agradeço,

Aos meus pais que sempre me apoiaram nas escolhas, nos momentos difíceis e em toda a vida.

À minha irmã, pelo amor e carinho.

À Dra. Clélia Ferreira, pela orientação e paciência durante todos os anos que estive no laboratório.

Ao Prof. Dr. Walter R. Terra, pelo apoio e conversas inspiradoras.

Ao Prof. Dr. J. R. P. Parra, por ter cedido as larvas de *D. saccharalis* para cultura.

Ao Dr. Alexandre H. P. Ferreira, que me ensinou os primeiros passos nos caminhos da ciência.

Ao Prof. Dr. Sandro Marana e ao Dr. Fernando A. Genta, que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, que me agüentaram e colaboraram imensamente.

Aos amigos, pela eterna companhia, alegria e força.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

(Guerra L. O.) **α -Amilases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*: clonagem e seqüenciamento dos cDNAs correspondentes, expressão e propriedades.** 2008. 96p. . Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* criada em dieta artificial há três α -amilases, sendo que uma delas tem maior atividade.

Utilizando uma biblioteca de expressão feita a partir do epitélio do intestino médio da larva, clonamos e seqüenciamos três cDNAs diferentes que codificam α -amilases.

As enzimas foram expressas em *Picchia pastoris* e recuperadas com atividade. Elas foram denominadas DSA1, DSA2 e DSA3.

DSA1, DSA2 e DSA3 possuem respectivamente massas moleculares calculadas a partir da sequência de 54.505; 54.488 e 54.522 e pls teóricos de 6,4; 5,5; e 6,4. Utilizando preparações semi-purificadas das enzimas recombinantes verificamos que elas têm afinidades semelhantes por amido, amilopectina e glicogênio. Seus pHs ótimos estão entre 8,0 e 9,0 e todas apresentam baixa processividade (entre 0,8 e 2,0), sendo classificadas como liquefadoras.

Inativações térmicas das três enzimas recombinantes e do material presente no intestino médio do animal mostraram que, nas condições em que a larva é criada, a amilase predominante é DSA1.

Um cladograma feito com seqüências de amilases de insetos mostrou que as três amilases de *D. saccharalis* são semelhantes a outras amilases de Lepidoptera e que as seqüências de DSA1 e DSA3 são mais parecidas entre si do que com DSA2. Isso se reflete em suas propriedades, que são mais próximas do que aquelas apresentadas por DSA2.

As três seqüências obtidas por nós podem ser usadas em futuros estudos sobre alteração na expressão de amilases devido a presença de diferentes inibidores na dieta.

Palavras-chave: amilase, enzimas digestivas de insetos, *Diatraea saccharalis*, clonagem, expressão.

Abstract

(Guerra L. O.) **α -Amilases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*: clonagem e seqüenciamento dos cDNAs correspondentes, expressão e propriedades.** 2008. 96p. . Masters Thesis ou PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry ou Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The larva of *Diatraea saccharalis* reared in artificial diet presents three α -amylases in their midguts. One of the enzymes is more active than the other two.

Using an expression library made from the midgut epithelium, we cloned and sequenced three cDNAs that code for three different α -amylases. The enzymes were expressed with activity in *Pickia pastoris* and named DSA1, DSA2 and DSA3.

DSA1, DSA2, and DSA3 have, respectively, predicted molecular weights and pIs of 54,505 (6.4); 54,488 (5.5) and 54,522 (6.4).

Using semi-purified enzymes, we showed that they have similar catalytical efficiency against starch, amylose and glycogen. They have optimum pHs between 8 and 9 and exhibit low processivity (from 0.8 to 2), thus being saccharifying amylases.

Thermal inactivation of the recombinant enzymes and of the soluble material present in midgut lumen reveals that the enzyme more stable at 50°C is DSA1 and that DSA1 is the main enzyme present in the midgut of larvae fed on artificial diets.

A cladogram was done using insect α -amylase sequences. It shows that the enzymes we expressed are similar to other Lepidoptera amylases and that DSA1 and DSA3 are more similar to one another than to DSA2. The same is true for their physical and catalytical properties.

The three sequences we obtained may be used in future studies to detect changes in their expression due to the presence of different amylase inhibitors in diets.

Keywords: amylase, insect digestive enzymes, *Diatraea saccharalis*, cloning, expression.

Lista de Abreviações

APS	persulfato de amônio
α AI1	inibidor tipo 1 de <i>Phaseolus vulgaris</i>
α AI2	inibidor tipo 2 de <i>Phaseolus vulgaris</i>
BLAST	"Basic Local Aligment Serch"
BMM	meio mínimo de cultura, tamponado, contendo metanol
BMMY	meio de cultura complexo, tamponado, contendo metanol
BSA	albumina sérica bovina
CAPS	(3-[ciclohesilamino]-1-ácido propanosulfônico)
Da	Dalton
DO	densidade óptica
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDC	1-etil-3(Dimetilaminopropil)Carbodiimida
g	gravidade
Gly	glicina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
IPTG	isopropiltiol beta D galactopiranosídeo
IT-1	inibidor comercial de trigo tipo 1 (SIGMA A1520)
IT-3	inibidor comercial de trigo tipo 3 (SIGMA A3535)
LB	meio de cultura de Luria-Bertani
MD	meio de cultura mínimo dextrose
MES	ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	reação em cadeia da polimerase
pb	pares de bases
pl	ponto isoelétrico
PIPES	piperazina-N'N'-bis(2-etano ácido sulfônico)
PM	peso molecular

SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão tris acetado EDTA
TAPS	ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-aminipropanosulfônico
T _m	temperatura de anelamento
U	unidades
UV	ultravioleta
V	volts
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indoil beta D galactopiranosídeo
YPD	meio de cultura dextrose, peptona, extrato de levedura
W	Watts

1- Introdução

1.1- Considerações Iniciais

Os insetos correspondem à cerca de 75% das espécies animais conhecidas (figura 1). Embora haja insetos benéficos, os demais causam grandes prejuízos ao homem. Os insetos são transmissores de doenças e causam danos a qualquer coisa que o homem tente cultivar ou construir. Devido a sua grande diversidade, eles ocupam os mais variados nichos ecológicos. Essa capacidade de viver nos ambientes mais variados se deve em parte a possibilidade que esses organismos tem de utilizarem diversos tipos de alimentos.

Pelo exposto acima, fica claro que o estudo dos insetos é interessante tanto do ponto de vista acadêmico (para conhecer as características que levaram a um sucesso tão grande) quanto prático (para conseguir controlar e minimizar os danos causados por esses organismos). Um exemplo disso foi a introdução de um parasitóide da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, no estado de São Paulo, que reduziu em 80% os prejuízos causados pela praga (Parra *et al.*, 2002).

Uma interessante abordagem nos estudos com insetos é o seu processo digestivo. Além de compreender melhor as estratégias fisiológicas que levaram os insetos a conseguir se adaptar a tamanha diversidade de alimentos, podemos desenvolver estratégias para o controle de pragas visando desorganizar alguma de suas funções digestivas. O tubo digestório é a mais frágil superfície de contato entre os insetos e o meio ambiente, por ser a única superfície do animal a não ser recoberta por quitina. Isso o torna um interessante alvo para controle. Sendo assim, suas características precisam ser conhecidas em detalhe. Um enfoque é o estudo das enzimas digestivas do animal. Conhecê-las nos permite atuar sobre a metabolização e absorção dos nutrientes da dieta. É possível inibir enzimas chaves através de inibidores protéicos ou agentes químicos, dificultando de inúmeras formas a captação de nutrientes.

Minimizar a ação de enzimas que atuam no início do processo digestivo certamente acarretará prejuízo ao inseto alvo. Como exemplo temos as α -amilases, que atuam na hidrólise do amido, fonte essencial de energia para

diversas espécies. Sem a ação dessa glucanase, as glicosidases responsáveis pela hidrólise das porções menores geradas por ela não poderiam atuar, reduzindo assim drasticamente a captação de glicose pelo animal, prejudicando seu desenvolvimento.

1.2- O tubo digestório dos insetos

Quando observamos o tubo digestório dos insetos, percebemos uma enorme diversidade morfológica (figura 2), apresentando diferenças entre as ordens maiores até que as observadas em mamíferos. Essa diversidade ocorre em inúmeras outras características, sendo sempre necessários estudos aprofundados para possibilitar qualquer generalização para o grupo. No tubo digestório dos insetos, a parte mais importante da digestão ocorre no intestino médio. Nesse é secretada a maior parte das enzimas digestivas. Ele é todo recoberto por uma membrana semi-permeável chamada membrana peritrófica, que divide o tubo intestinal em dois ambientes distintos, a região endoperitrófica e a ectoperitrófica. Essas duas regiões distintas apresentam composição de enzimas diferente porque algumas moléculas passam através dos poros da membrana peritrófica e outras não, dependendo de seu tamanho (ver Terra e Ferreira, 1994, 2005).

Nos Lepidoptera o intestino médio é um cilindro de igual diâmetro, chamado de ventrículo. O intestino médio dos Lepidoptera não possui cecos gástricos, que aparecem em algumas ordens de insetos (Figura 3). O pH do conteúdo intestinal de Lepidoptera é bastante alcalino. Foi proposto que essa alta alcalinidade teria o papel de evitar a ligação de taninos a proteínas dietéticas, o que reduziria a eficiência da digestão (Berenbaum, 1980). Como insetos tais como gafanhotos e besouros possuem pHs bem mais baixos e são resistentes a taninos (Bernays et al, 1981; Fox e Macauley, 1977), esse não deve ser o verdadeiro papel do pH alcalino. A real importância desse pH deve ser possibilitar a extração de hemi-celuloses de paredes vegetais, que são digeridas mesmo por insetos incapazes de hidrolisar celulose (Terra, 1988).

1.3- As α -amilases

As α -amilases são enzimas estudadas há muitos anos, provavelmente devido ao fato delas estarem amplamente distribuídas entre os seres vivos, tendo muitas vezes alta atividade.

No que diz respeito a aplicações práticas as amilases são enzimas que foram primeiro comercializadas e são atualmente utilizadas em vários processos. Elas tem sido utilizadas na indústria de massas há muitos anos, mas seu maior mercado é na produção de hidrolisados de amido para a indústria alimentícia. Essas enzimas são também utilizadas na indústria têxtil e de papel, onde produzem amido de baixa viscosidade que preenche os poros do tecido ou do papel, o que protege o material contra danos mecânicos durante a fabricação. As amilases estão também presentes em detergentes. Os detergentes que contém enzimas agem em condições mais brandas e não danificam roupas delicadas. As amilases são componentes de detergentes desde 1975 e pelo menos 90% de todos os detergentes líquidos mais modernos contém essa enzima (ver Gupta et al, 2003)

As α -amilases clivam ligações glicosídicas α -1,4, preferencialmente em glucanas de cadeias longas como amido ou glicogênio, catalizando uma endo-hidrólise das ligações. As exo-enzimas que agem sobre amido tem classificações distintas, chamando-se amilases maltogênicas (EC 3.2.1.133), maltotriohidrolase (EC 3.2.1.116), maltotetrahidrolase (EC 3.2.1.60) e maltohexahidrolase (EC 3.2.1.98), quando produzem α -maltose, maltotriose, maltotetraose e maltohexaose, respectivamente.

As α -amilases pertencem a família 13 e 57 das glicosídeo hidrolases (www.cazy.org, Coutinho e Henrissat, 1999). Na família 57 são encontradas somente enzimas de Archeae e bactérias, sendo que todas as α -amilases de eucariotos são membros da família 13.

A família 13 das glicosídeo hidrolases forma o Clã H, junto com as famílias 70 e 77. Em um clã encontram-se famílias que possuem a mesma estrutura tridimensional no módulo catalítico, embora as seqüências entre uma família e outra sejam bem diferentes (Mc Gregor, 2005). A família mais complexa do Clã H

é a família 13, contendo hidrolases, transferases e isomerases com 28 especificidades diferentes (Svenson et al, 2002).

Todas as enzimas do Clã H tem, no módulo catalítico, um $(\alpha/\beta)_8$ barril, também chamado de barril TIM, devido à primeira enzima em que ele foi descrito, a triose fosfato isomerase (Mc Gregor, 2005).

A estrutura das α -amilases é caracterizada pela presença de 3 domínios distintos: A, B e C. O domínio A, central, contém o N-terminal e consiste de um $(\alpha/\beta)_8$ barril e tem os resíduos do sítio ativo. O domínio B é formado quase exclusivamente por folhas β e exibe a maior variabilidade estrutural. Esse domínio forma uma grande parte da fenda de ligação do substrato e acredita-se que seja importante para a especificidade da enzima (ver, Nielsen e Borchert 2000).

O domínio C, situado do lado oposto ao domínio B, tem a conformação de chave grega e contém o C-terminal. O domínio C é o que possui a seqüência mais variável (Bayer et al, 1995). Esse domínio por muito tempo não teve uma função clara. Pensava-se que ele poderia estabilizar o domínio A, escondendo os resíduos do domínio A do solvente (ver Mc Gregor et al, 2001). Cada vez mais evidências apontam que esse domínio tem uma função importante por possuir um segundo sítio de ligação do substrato. A presença desse outro sítio de ligação do polímero já foi observado em vários tipos de glicosidases que possuem o sítio ativo em forma de fenda e não possuem domínios de ligação do carboidrato. Esses outros sítios de ligação do substrato foram observados em amilases (Robty e French, 1957; Bozonnet et al, 2007), β -agarase (Allouch et al, 2004), K-carragenase (Allouch et al, 2004) e β -1,3-glucanase (Genta et al, 2007).

Evidências recentes indicam que esses sítios adicionais são importantes para o grau de ataque múltiplo (ou processividade) apresentado pelas enzimas. O grau de ataque múltiplo (como é chamado em amilases) ou processividade (nome que o fenômeno recebe quando acontece em β -glucanases) é o número de ligações hidrolisadas após a primeira, durante a formação de um complexo enzima-substrato.

Na α -amilase de cevada, Bozonnet e colaboradores (2007) mostraram que a mutação de um resíduo de tirosina presente no sítio de ligação do amido do

domínio C leva a uma menor ligação de inibidores e a uma redução no ataque múltiplo. Genta et al (2007), mostraram que a processividade de uma β -1,3-glucanase é perdida quando o substrato está ligado tanto no sítio catalítico quanto nesse outro sítio.

Nas carboidrases, os sub-sítios de ligação de glicose são numerados a partir do local onde a ligação do substrato é quebrada. Aqueles que ficam em direção a porção não redutora do substrato são numerados com algarismos negativos, enquanto aos que ficam em direção a porção redutora do substrato são atribuídos valores positivos. Nos dois casos, os sub-sítios tem valores maiores em módulo, conforme eles estão mais distantes do ponto onde o substrato é hidrolisado (Davies et al, 1997). Nas α -amilases há dois ou três sub-sítios positivos (+1, +2, +3) e os negativos variam de dois a sete (ver Nielsen e Borchert, 2000).

As α -amilases são enzimas retentoras, ou seja, a configuração do carbono anomérico presente no substrato é conservada no produto. Nessas enzimas um dos grupos carbonila faz uma catálise ácida protonando o oxigênio glicosídico concomitantemente com a quebra da ligação. O outro grupo carbonila age como nucleófilo, formando uma glicosil-enzima intermediária. No segundo passo o carboxilato desprotona uma molécula de água que ataca o centro anomérico e desloca o açúcar (Zechel e Withers, 2000).

No mecanismo de catálise de α -amilases, atua uma tríade catalítica semelhante à descrita para proteinases. Na amilase de *Tenebrio molitor*, esses aminoácidos catalíticos são o Asp 185, Glu 222 e Asp 287 (Strobl et al, 1998). Glu 222 é o doador de prótons, Asp 185 o nucleófilo e Asp 287 é importante, mas não está diretamente envolvido na catálise. Tem-se proposto que seu papel é elevar o pK do doador de prótons (ver Nielsen, 2000).

Todas as α -amilases da família 13 cuja estrutura é conhecida, possuem um sítio de ligação Ca^{++} , localizado na interface entre os domínios A e B. O Ca^{++} é essencial para a estabilidade e atividade da enzima, tendo um papel na manutenção da sua estrutura (ver, Nielsen e Borchert 2000).

Muitas α -amilases possuem um sítio de ligação de cloreto no domínio A (D'Amico et al, 2000). Esse é formado por três resíduos que são, na amilase

pancreática humana, Arg 195, Asp 298 e Arg 337. Em algumas α -amilases dependentes de Cl^- , a Arg 337 é substituída por Lys (Numao et al, 2002). Os dois primeiros resíduos são conservados em muitas α -amilases não dependentes de cloreto, enquanto a ocorrência do terceiro resíduo básico é específico para todas as α -amilases animais dependentes de cloreto e portanto é o resíduo chave para a ligação do íon (D'Amico et al, 2000).

Mutações nos dois resíduos não essenciais para a ligação do cloreto (R195 e N298 na α -amilase pancreática humana), mostraram que a R195 tem papel crucial na orientação dos dois ácidos carboxílicos catalíticos, provavelmente modulando seus pKas. A N298 interage com resíduos do sítio ativo auxiliando na catálise (Numao et al, 2002). Provavelmente a importância desses papéis é que faz com que esses resíduos sejam muito conservados, mesmo nas α -amilases não dependentes de cloreto.

O papel do íon cloreto nas α -amilases não é muito claro. A presença do íon alarga o perfil de atividade versus pH da enzima, deslocando-o para o lado alcalino. Entretanto há organismos que tem α -amilases com pH ótimo alcalino e que não ligam cloreto.

Aghajari et al (2002) mutaram o resíduo chave para a ligação de cloreto na α -amilase de um microorganismo por Gln. Essa mutação levou a uma diminuição mas não a perda da atividade, o que levou os autores a concluir que a presença do íon não é essencial para a atividade da enzima.

O papel proposto para o cloreto é de neutralizar carga do resíduo básico que é seu principal ligante. Na ausência de cloreto esse resíduo (Lys ou Arg) formaria uma ponte salina com um dos resíduos ácidos catalíticos (Numao et al, 2002). Quian et al (2005) mostraram que a substituição do resíduo básico por Gln, como feito por Aghajari et al (2002) não leva a rotação do resíduo catalítico e portanto não o desposiciona. Desse modo, a conclusão que é o íon Cl^- não é essencial para a atividade das α -amilases dependentes de cloreto não é correta.

1.4- α -Amilases de insetos

As α -amilases são em geral encontradas solúveis nos espaços endo e ectoperitróficos. Elas também se localizam no papo e nos cecos gástricos anteriores, quando o tubo digestório tem essas regiões. A presença da membrana peritrófica permite um mecanismo que leva a uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas, entre elas amilase, que permite que as hidrolases de polímeros não sejam excretadas junto com o alimento (Terra e Ferreira, 1994, 2003, 2005). Por esse mecanismo, as enzimas digestivas ligam-se aos seus substratos na região anterior do espaço endoperitrófico e continuam nesse compartimento até que o tamanho do complexo enzima-substrato diminua e permita sua passagem para o espaço ectoperitrófico. Enquanto o bolo alimentar avança para as regiões posteriores do ventrículo, há um contra fluxo de fluidos no espaço ectoperitrófico, que leva as enzimas e os nutrientes para as regiões anteriores do ventrículo e/ou cecos gástricos e as despolimerases penetram no espaço endoperitrófico e ligam-se novamente a seus substratos (Terra e Ferreira, 1981).

Essa reciclagem leva a remoção de oligômeros do espaço ectoperitrófico, aumentando a eficiência da digestão, pois os oligômeros podem inibir a digestão dos polímeros. O aumento da eficiência da digestão inicial pela remoção de oligômeros foi confirmada utilizando-se sacos de diálise que continham o conteúdo luminal de larvas de *Spodoptera frugiperda* com o polímero a ser digerido. Esses sacos de diálise permaneciam envoltos por tampão com e sem agitação do meio de diálise e a atividade detectada foi comparada com aquela obtida em um tubo de ensaio que permaneceu pelo mesmo tempo nas mesmas condições. Quando a diálise foi feita com agitação a atividade foi 210% e sem agitação 160% daquela determinada no tubo de ensaio (Bolognesi, Terra e Ferreira, manuscrito em preparação).

Foi mostrado que a secreção de amilase em *Lepidoptera* ocorre em vesículas exocíticas comuns na região posterior e por um mecanismo secretor peculiar, que só ocorre na região anterior do ventrículo de *Lepidoptera* (Jordão et al, 1999; Bolognesi et al, 2001). Na porção anterior do ventrículo formam-se pequenas vesículas que caminham pelo interior das microvilosidades, brotam

lateralmente como vesículas de membrana dupla ou fundem-se ao topo das microvilosidades.

Utilizando um anticorpo anti-amilase de *T. molitor* que reage com amilase de *S. frugiperda* concluiu-se que a α -amilase desse organismo é secretada em parte ligada às membranas dessas pequenas vesículas e em parte solúvel em seu conteúdo (Bolognesi et al, 2001).

A utilização de anti-corpos gerados contra preparação de microvilosidades de intestino médio de *S. frugiperda* foram utilizados para varrer uma biblioteca de expressão (Ferreira et al, 2007). Os clones reativos foram seqüenciados e detectou-se a presença de três amilases semelhantes a transportadores de aminoácidos presentes nessas membranas (Ferreira et al, 2007).

Os transportadores de aminoácidos neutros são proteínas não catalíticas relacionadas à família das α -amilases do ponto de vista estrutural e evolutivo. (Janecek et al, 1997; Janecek, 2002). Esses transportadores não possuem o doador de prótons catalítico e pelo menos um dos resíduos que ligam Ca^{++} . Por outro lado, as três proteínas presentes nas microvilosidades intestinais de *S. frugiperda* possuem todos os resíduos necessários à uma α -amilase ativa (Ferreira et al, 2007). A atividade de α -amilase detectada nas membranas microvilares de *S. frugiperda* e seu modo de secreção precisam ser reavaliados para verificar qual a contribuição dessas amilases semelhantes a transportadores de aminoácidos.

Essas amilases são portanto diferentes de tudo o que já foi descrito até o momento, pois tem a estrutura dos transportadores que pertencem à família 13, mas com os aminoácidos catalíticos. Esses resultados indicam que a enzima de *Spodoptera* pode ser um intermediário na evolução das proteínas pertencentes à família 13.

As α -amilases de insetos tem massas moleculares na faixa de 48-60 kDa, pI entre 3,5 e 4,0 e valores de Km para amido solúvel ao redor de 0,1%. O seu pH ótimo normalmente corresponde ao encontrado no tubo digestório do inseto de onde ela foi isolada. Todas elas são dependentes de Ca^{++} e a maioria é ativada por cloreto (Terra e Ferreira, 1994, 2005). A única α -amilase de insetos cuja estrutura tridimensional já foi analisada é a do Coleoptera *T. molitor*, que possui

todos os resíduos responsáveis pela catálise e ligação de Ca^{++} e Cl^- . A maior diferença entre essa enzima e a enzima de mamíferos é a presença de alças adicionais na vizinhança do sítio ativo nas enzimas de mamíferos (Strobl et al, 1998). A maioria das amilases ativadas por cloreto possuem Arg no resíduo variável (ver item 1.3). As amilases de Lepidoptera possuem Gln nessa posição o que faz com que não sejam afetadas por esse ânion (www.cazy.org).

As poucas α -amilases presentes em outras ordens e que são descritas como independentes de cloreto precisam ser revistas (Terra e Ferreira, 1994). É possível que outro ânion esteja substituindo o cloreto como ativador, como mostrado para algumas amilases de Hemiptera (Hori, 1972).

O grau de ataque múltiplo foi determinado em poucas amilases de insetos. A enzima de *Rhynchosciara americana* tem um grau de ataque múltiplo intermediário entre o da amilase de *Bacillus subtilis* (1,7) e o da pancreática de porco (6). Amilases de larvas e adultos de *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius* e *Sitophilus oryzae* e a larva de *Bombyx mori* tem padrões de ação similares aos da amilase pancreática de porco (Terra e Ferreira, 2005).

1.5- Inibidores de α -amilases

Para se defenderem dos herbívoros, os vegetais produzem várias substâncias. Elas podem ser metabólitos secundários ou peptídeos e atuam nas mais diversas reações metabólicas e vias de sinalização vitais. Entre essas estão os inibidores de enzimas digestivas (como as α -amilases) que são, na sua maioria, protéicos. Como, para muitos insetos, a captação de glicose proveniente do amido é essencial para o seu desenvolvimento, inibidores de α -amilase são muito comuns em vegetais. São exemplos de vegetais que contêm esses inibidores o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e o trigo (*Triticum aestivum*) (Hilder e Boulter, 1999; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

Inibidores protéicos de plantas atuam de diferentes maneiras. Dados cristalográficos e ensaios de inibição mostraram que os inibidores de α -amilase sempre se associam ao sítio ativo da enzima e apresentam diferentes especificidades (Terra e Ferreira, 2005).

Há 6 classes de inibidores protéicos de α -amilases que são produzidos por vegetais. Eles são agrupados segundo sua estrutura terciária. São eles: 1) Os inibidores semelhantes as lectinas, isolados de feijões. São os melhores descritos e atuam sobre mamíferos, insetos e patógenos. 2) As proteínas que tem um dobramento de "knottin", onde pelo menos 3 pontes dissulfeto estão presentes. São os menores inibidores de α -amilases conhecidos e são muito semelhantes a proteínas presentes em toxinas de cobras e aranhas. 3) Os inibidores produzidos por cereais. 4) Os inibidores do tipo Kunitz. 5) Os inibidores semelhantes a taumatina, que atuam sobre insetos mas não sobre mamíferos e 6) Os inibidores semelhantes a γ -purotioninas, que atuam principalmente sobre insetos (Ver Franco et al, 2002; Svensson et al, 2004).

O estudo dos inibidores protéicos é interessante pois existe a possibilidade de se introduzir os genes codificantes deles no genoma de cultivares predados por pragas suscetíveis aos inibidores, tornando assim a planta resistente, ou menos nutritiva ao inseto (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

Diferentes inibidores afetam em variadas intensidades as amilases de um mesmo inseto. Por sua vez, as amilases presentes em diferentes insetos são afetadas em graus variados por um mesmo inibidor (Warchalewski et al, 2002).

A interação de α -amilases de insetos com inibidores produzidos por vegetais tem sido estudada em detalhe somente em Coleoptera (ver Franco et al, 2000, 2002).

Muitos inibidores de α -amilases não agem sobre as enzimas de Lepidoptera porque o pH vigente em seu tubo digestório é muito alcalino (Terra e Ferreira, 2005). Inibidores bem conhecidos, como aqueles presentes no feijão, não se ligam à enzima em pHs elevados (Kluh et al, 2005).

Assim, os inibidores de feijão α AI1 e α AI2, entre outros, não inibem amilases de Lepidoptera (Kluh et al, 2005), enquanto em trigo foram encontrados inibidores eficazes para α -amilases desses insetos (Markwick et al, 1996).

No trigo, três diferentes inibidores de α -amilases são encontrados. Eles são geralmente classificados pelo número de subunidades que os compõe (monomérica, dimérica e tetramérica). Já foi observado na literatura que esses

inibidores têm diferentes especificidades para as α -amilases de insetos e que diferentes lepidópteros têm sensibilidade variada a cada um desses inibidores (Gutierrez et al, 1993).

Embora muitos trabalhos tenham estudado a interação inseto-planta, o conhecimento existente sobre ela é ainda incipiente. Quanto mais ela for conhecida, mais fácil será o desenvolvimento de métodos efetivos de controle para combater insetos praga com produtos naturais, desenvolvendo novas variedades de plantas com defesas químicas aumentadas.

Os mecanismos fisiológicos (e moleculares) que permitem que alguns insetos consigam se alimentar de dietas contendo inibidores de α -amilases efetivos contra suas enzimas é outro aspecto ainda pouco estudado. Já foram observados casos onde o inseto é capaz de secretar uma enzima resistente ao inibidor presente na dieta (Silva et al, 2001). Também já foram observados casos onde ocorre a super expressão das α -amilases, quando inibidores para elas são adicionados na dieta (Markwick et al, 1998). Porém quais os mecanismos que controlam a expressão diferencial das α -amilases ainda não é conhecido.

Análise do transcriptoma da cana-de-açúcar mostrou que há inibidores de amilase que são expressos na folha e no colmo (Falco et al, 2001), onde se desenvolvem as larvas de *Diatraea saccharalis* (ver 1.6). Não se sabe se os inibidores não afetam esse inseto ou se ele desenvolveu alguma proteção que permite que ele continue ingerindo esse alimento.

1.6- *Diatraea saccharalis*

D. saccharalis é a principal praga da cana-de-açúcar. As lagartas alimentam-se inicialmente do parênquima das folhas, depois de sua bainha e então penetram no colmo pela gema. As larvas causam prejuízo direto pela abertura de galerias, que leva a perda de peso e morte das gemas. Os prejuízos indiretos são ainda maiores, uma vez que pelos orifícios abertos penetram fungos que danificam a planta.

As infestações por *D. saccharalis* diminuem muito utilizando-se parasitóides dessas larvas, que pertencem a ordem Díptera e Himenóptera (Gallo et al, 1988).

Como a indústria da cana envolve uma grande quantidade de dinheiro, qualquer pequeno decréscimo no ataque feito à planta representa um grande lucro.

1.7- Objetivos desse trabalho

As larvas de *Diatraea saccharalis* tem grande importância econômica. Elas apresentam em seu intestino várias amilases, embora alimentem-se do colmo da cana, que aparentemente expressa inibidores para essas enzimas.

Seria interessante verificar porque há expressão de mais de uma amilase. Elas podem ter especificidades diferentes preferindo cadeias mais longas ou oligossacarídeos menores. A presença de várias amilases pode também ocorrer por apresentarem respostas diferentes aos inibidores vegetais.

Nosso objetivo nesse trabalho é obter a seqüência das α -amilases intestinais de *D. saccharalis*, conseguir formas recombinantes ativas e iniciar a sua caracterização.

2- Materiais e métodos

2.1- Criação de animais

Inicialmente os animais estudados eram provenientes do laboratório do prof. J.R.P. Parra (ESALQ-USP). Alguns indivíduos foram trazidos para São Paulo e mantidos em ambiente climatizado (temperatura média de 25 °C, umidade do ar ambiente e fotoperíodo de 11 horas claro/13 escuro) para iniciar uma cultura. As larvas são mantidas em dieta descrita por Parra e Mishfeldt, 1992.

A fim de observar a indução da expressão de amilases algumas larvas foram mantidas em dietas variadas: dieta padrão contendo 1% de amido solúvel (m/v), dieta padrão com 2,5% de amido e dieta com 50% da sacarose padrão mais 2,5% de amido.

2.2- Dissecção de animais

Os animais foram anestesiados em gelo. O intestino médio foi retirado, e o epitélio separado da membrana peritrófica (com o conteúdo). O procedimento foi realizado usando uma solução de NaCl 125 mM. Esses materiais foram congelados a -20 °C até o uso. O material contendo membrana peritrófica mais conteúdo foi homogeneizado em água MilliQ gelada ou em tampão MES 20 mM pH 6.0, com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugado a 9.000 g por dez minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e centrifugado a 20.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e teve o volume final elevado com água MilliQ, de forma a se obter uma concentração de 20 animais por mL. Esse material foi acrescido de PMSF para uma concentração final de 1mM e mantidos a -20 °C até o uso. Nos experimentos com as diferentes dietas foram usados 20 animais em cada uma delas.

2.3- Determinação do pH do lúmen intestinal de *D. saccharalis*

O pH do lúmen intestinal de *D. saccharalis* foi medido a partir do conteúdo do intestino médio do animal dividido em três porções de tamanhos iguais: anterior, média e posterior. O material foi diluído em 100 µL de indicador de pH

universal Merk (pH 4,0 a 10,0), a coloração resultante foi comparada com escala colorida e o resultado determinado visualmente. Foram utilizados 10 animais.

2.4- Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular

Os meios de cultura para o crescimento de células e os tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular foram preparados como descritos por Sambrook et al. (1989) ou de acordo com o manual para “*Pichia* Expression Kit” (Invitrogen).

2.5- Desenho de iniciador degenerado específico para amilases de insetos

Foram selecionadas seqüências de nucleotídeos codificantes de α -amilases de outros insetos, depositadas em bancos de dados. Para isso foi feita uma consulta ao "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi realizado um alinhamento múltiplo, usando o programa Clustal X (1.64b) na sua condição padrão.

O iniciador específico para α -amilases de insetos foi desenhado a partir de região conservada nessas seqüências (figura 4).

A1- TGG TGG GAR MGS TAY CAR CC

2.6- Desenho de iniciadores específicos para amplificação do cDNA completo das α -amilases de *D. saccharalis*

Para amplificação dos cDNAs completos foram desenhados iniciadores baseados na região não codificante dos fragmentos (após o stop códon), região não conservada entre elas, sendo eles específicos para cada uma das α -amilases clonadas (figura 5).

A2- 5' GGT CTT GAT TCC TCA AAT TC 3'

A3- 5' ATA TGC GAA TAC ATT TAT TC 3'

A4- 5' CAG CCA ATT TGA ACA GGA TC 3'

2.7- Desenho de iniciadores de expressão

Três α -amilases de *D. saccharalis* partir de uma biblioteca de cDNA do intestino médio do inseto e tiveram suas seqüências depositadas em bancos de dados. São elas: DSA1 (AY330289), DSA2 (AY333762) e DSA3 (AY333761).

Foram identificadas em colaboração do Dr. Márcio de Castro Silva Filho da ESALQ-USP duas seqüências possivelmente codificantes de inibidores de α -amilases na cana-de-açúcar. Essas seqüências foram provenientes do Projeto Genoma Cana, e foram denominadas IC1 (SCEPSD2071B03.g) e IC2 (SCCCL6C03G01.g). Os clones contendo os cDNAs codificantes para essas seqüências foram adquiridas do Brazilian Clone Collection center (Jaboticabal).

Visando a expressão dessas seqüências, foram desenhados cinco pares de iniciadores, específicos para cada um dos cDNAs, sendo um iniciador para cada uma das extremidades. Neles foram introduzidas seqüências específicas das extremidades, sítios de ligação para enzimas de restrição e os prolongamentos indicados pelo fabricante das enzimas (New England Biolabs). Quando a enzima de restrição era a Xho I, uma porção do vetor de expressão era perdida, sendo esta também inserida no iniciador para manter a integridade do vetor após a construção.

Os iniciadores construídos foram:

Para a extremidade 3'de DSA1 e DSA2: 5' CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT TAC AAG AAT CCC CAC TAT GCA C 3'

Para a extremidade 5'de DSA1: 5' ATA AGA ATG CGG CCG CTT ACA GTC TTG ACT GAT CAC C 3'

Para a extremidade 5'de DSA2: 5' ATA AGA ATG CGG CCG CTT AAA GAC GAC TCT CAG TTC C 3'

Para a extremidade 3'de DSA3: 5' GGA ATT CTA CAA AAATCC CCA CTA TGC AC 3'

Para a extremidade 5'de DSA3: 5' ATA AGA ATG CGG CCG CTT ACA ACC TCG ACT CAT CAC C 3'

Para a extremidade 3'de IC1: 5' GGA ATT CAG GAC TAA CTG GTG CGA GCC AG 3'

Para a extremidade 5' de IC1: 5' ATA AGA ATG CGG CCG CTT AAT CGG TTG TTG TTT GTT C 3'

Para a extremidade 3' de IC2: 5' CCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT GCA GCG CTG CCG GTG TAC GAC 3'

Para a extremidade 5' de IC2: 5' GGA ATT CTT ACA GAA GCA CCG CTT CCG G 3'

2.8- Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01 % (p/v), Triton X-100 0,1 % (p/v), MgCl₂ 1,5 mM e dNTP 0,2 mM. Os iniciadores foram usados em uma concentração final de 1 µM juntamente com 5 U de Taq DNA Polimerase. As reações foram realizadas em um termociclador 9700 (Applied Biosystems). A reação é iniciada por um aquecimento por 2 minutos a 94 °C, seguida de trinta ciclos de 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos, e concluída com 10 minutos a 72 °C para finalizar o alongamento das fitas amplificadas. Como DNA molde foram usados biblioteca de cDNA de *D. saccharalis*, plasmídeos purificados onde o cDNA de interesse estava clonado, ou então a partir de colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento de DNA de interesse. Quando a biblioteca ou colônias eram usadas para a reação havia primeiro uma incubação de 10 minutos a 94 °C para promover a lise dos fagos ou das bactérias.

Quando foi utilizado o iniciador degenerado A1, foram usadas temperaturas variadas (45 à 55°C) para anelamento, buscando o produto mais específico. A1 foi usado em conjunto com um dos iniciadores T3 (5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3') e T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') que anelam nos braços do fago vetor da biblioteca nas vizinhanças do sítio múltiplo de clonagem.

Para a realização dos PCRs para clonagem do cDNA completo das amilases foram usados os iniciadores T3 e T7 e um dos iniciadores específicos (A2, A3 e A4).

Nos PCRs para clonagem em vetor de expressão o inserto de interesse foi amplificado usando os pares de primers específicos para cada um, descritos na

sessão 2.5.

2.9- Eletroforese em gel de agarose para DNA

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

Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

2.10- Purificação de DNA do gel de agarose

Os fragmentos de DNA foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração QIAEX II (Quiagen), o qual baseia-se na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA a uma resina de troca iônica. O DNA era eluído da resina de troca iônica usando 10 µL de água Milli-Q autoclavada, com pH previamente acertado para 7,0-8,0.

2.11- Dupla digestão de DNA usando enzimas de restrição

As seqüências dos cDNAs a serem clonados foram analisadas usando o programa Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>), permitindo a escolha de duas enzimas de restrição que agissem no sítio de clonagem do vetor, mas que não teriam ação nos cDNAs clonados.

A seqüência de nucleotídeos reconhecida pela enzima escolhida foi adicionada no iniciador específico, antes da região seqüência específica. Isso possibilita conseguir um cDNA contendo esses sítios de restrição nas duas pontas, e após digestão torná-la coesiva com o sítio de clonagem do vetor

digerido. Os produtos de PCR purificados de gel de agarose, e o plasmídeo pPIC9 sofreram digestão por duas enzimas de restrição simultaneamente.

Os produtos de PCR resultantes da amplificação dos cDNAs codificantes para DSA1 e DSA2, assim como 8 µg de pPIC9 foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição XhoI e NotI em tampão 3 contendo BSA (enzimas e tampão fornecidos pela New England BioLabs).

Os produtos de PCR resultantes da amplificação dos cDNAs codificantes para DSA3 e IC1, assim como 8 µg de pPIC9 foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição EcoRI e NotI em tampão para EcoRI contendo BSA (New England BioLabs).

O produto de PCR resultante da amplificação do cDNA codificante para IC2, assim como 4 µg de pPIC9 foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição XhoI e EcoRI em tampão para EcoRI contendo BSA (New England BioLabs).

Todas as digestões foram realizadas por 16 horas a 37 °C. Os produtos de digestão foram então resolvidos em gel de agarose 1 % (p/v) e purificados do gel como descrito anteriormente.

2.12- Ligação de fragmentos de DNA a plasmídeos vetores

Para clonagem de fragmentos de DNA obtidos de amplificações por PCR, sem fazer uso de extremidades coesivas, foi utilizado o Kit de ligação pGenT-Easy vector Sistem I (Promega). Nesse foi usada uma mistura que consistia em 1 µl de T4 DNA ligase, 1 µg de plasmídeo, o produto de PCR purificado e tampão apropriado. Essa mistura foi encubada por 16 h a 4 °C. O produto de ligação foi usado para transformar bactérias competentes.

Para ligação de fragmentos de DNA obtidos por dupla digestão com enzima de restrição, 4 ug de pPic9 e os fragmentos codificantes das proteínas a serem expressas, todos contendo extremidades coesivas, pois sofreram uma dupla digestão com as mesmas enzimas de restrição, foram ligados usando a enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs). Foi montada uma reação contendo uma proporção de plasmídeos: inserto de 1:1. A mistura de reação continha 200 U de T4 DNA ligase em tampão fornecido pela New England BioLabs juntamente com a

enzima. Essa mistura foi incubada por 16h a 37 °C. O produto de ligação foi usado para transformar bactérias competentes.

2.13- Preparação de bactérias competentes

Uma colônia isolada da *Escherichia coli* da linhagem XI1-Blue MRF' foi crescida em LB-Líquido durante 16h, a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida 400 mL de LB líquido eram inoculados em 4 mL desta cultura inicial e mantidos nas mesmas condições anteriores de crescimento até que atingisse uma DO à 600nm de até 0,375. As células eram então transferidas para tubos de centrifuga previamente resfriados e mantidos no gelo por 10 minutos. Em seguida, eram precipitadas por centrifugação (1.600x g; 7 minutos; temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células era ressuspensionado em 10 mL de solução previamente autoclavada de CaCl₂ 60mM em tampão PIPES 10 mM, pH 7,0 e contendo glicerol 15% (v/v). Esse material era novamente precipitado por centrifugação (1.000x g; 5 minutos; temperatura ambiente), o precipitado ressuspensionado em solução CaCl₂ descrita anteriormente e mantido no gelo por 30 minutos. Após essa incubação realizava-se uma nova centrifugação (1.000x g; 5 minutos; temperatura ambiente), as células eram ressuspensionadas em 2 mL de solução CaCl₂, alíquotadas e mantidas a -80 °C. Essas alíquotas continham células prontas para transformação

2.14- Transformação de bactérias competentes

Para a transformação de bactérias foi usada linhagem XL1-blue MRF' de *Escherichia coli* competente. Foi adicionado 30 µL de células competentes a um volume de 10 µL do meio de reação de ligação descrito acima. Essa mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos e retornavam ao gelo por mais 3 minutos. Adicionou-se então 200 µL de LB-líquido e as células foram mantidas a 37 °C por 1 h para a recuperação de sua parede celular e expressão do gene de resistência a ampicilina. Em seguida, 100 µL da mistura de células transformadas eram adicionados em placas de 100 mm de diâmetro contendo LB-ágar mais ampicilina

(50 mg/mL). As células foram espalhadas nas placas com auxílio de uma alça de Drigalski e mantidas a 37 °C durante 16 h.

2.15- Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias

As preparações em grande escala de plasmídeos eram feitas a partir de 100 mL de cultura, usando o protocolo Plasmid Midi Kit (QIAGEN). O rendimento e a pureza das amostras de plasmídeos eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

As preparações em pequena escala de plasmídeos foram preparados a partir de 3 mL de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, seguindo o protocolo "Wizard Miniprep" (Promega).

2.16- Reação de seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi feito usando o procedimento baseado no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxiribonucleotídeos (Sanger et al., 1977).

Os iniciadores usados para o seqüenciamento das construções em plasmídeos pGenT foram SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3') para um dos braços do plasmídeo e pGen (5' AAC GAC GGC CAG TGA ATT G 3') ou T7 para o outro. Para sequenciar a porção central dos cDNAs das amilases clonadas, foi desenhado durante o processo de clonagem, um iniciador (A5) complementar a uma região interna das sequencias, cuja seqüência é 5' GTG GGC CAG CTT CAG 3'.

No seqüenciamento dos plasmídeos pPIC9 com inserto, foram usados os iniciadores 3'AOX1 e 5'AOX1, conforme indicado no manual "Pichia Expression Kit" (Invitrogen) e mais A5 para a porção central dos insertos. A reação de seqüenciamento foi realizada em uma mistura de reação contendo: 1 µL de preparação de plasmídeo; 3 µL de iniciador na concentração de 3,2 µM; 2 µL de "Terminator Ready Reaction Mix" versão 3 (Applied Biosystems); 3 µL de tampão Tris-HCl 200 mM, pH 9,0; e 5 mM MgCl₂ para um volume final de 15 µL. As reações foram realizadas em termociclador em um método de 35 ciclos de

incubações seqüenciais de: 45 segundos a 96 °C, 30 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C.

Após reação de seqüenciamento, os produtos gerados foram precipitados adicionando-se 25 µL de acetado de sódio 110 mM, pH 5,2 e contendo 37 µg/mL de glicogênio em etanol 92 % (v/v). A solução foi agitada e mantida no gelo por 15 minutos. Em seguida o material foi centrifugado (2.000 x g, 30 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70 % (v/v) gelado. A centrifugação foi repetida (como anterior) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco colocando o tubo em placa aquecida a 90 °C por 1 minuto. As amostras eram então ressuspensas em 10 µL de formamida “High dye” (Applied Biosystems). As amostras ressuspensas foram submetidas ao seqüenciamento no aparelho 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nessa técnica de seqüenciamento automático cada um dos quatro dideoxiribonucleotídeos usados apresentavam-se ligados a grupos fluorescentes distintos, o que facilita a detecção dos produtos da reação de seqüenciamento na separação por eletroforese capilar.

2.17- Análise e montagem das seqüências

Os cromatogramas obtidos do seqüenciamento dos diversos clones foram processados automaticamente para definir a qualidade das bases seqüenciadas, remover as de baixa qualidade e o vetor. As seqüências de alta qualidade foram montadas usando o algoritmo Phred-Phrap (www.phrap.org/phredphrapconsed.html) (Edwin et al, 1998; Edwin e Green, 1998). Essa montagem consistiu basicamente no alinhamento de seqüências por similaridade. Alinhamentos só eram considerados se esses tivessem uma sobreposição de pelo menos 40 bases e uma identidade de pelo menos 95%. Dos alinhamentos de seqüências era então definida uma seqüência consenso (somatória de todas as seqüências presentes em um alinhamento) denominada de cluster. As seqüências resultantes eram comparadas com as depositadas em bancos de dados, e a porção do plasmídeo próxima ao inserto era comparada

com a sequência encontrada no manual, para assegurar a integridade das construções realizadas.

2.18- Comparação das seqüências e montagem de um cladograma

As seqüências obtidas nesse trabalho foram comparadas com outras presentes em banco de dados. Para isso, elas foram traduzidas usando o programa do expasy tools (www.expasy.org/tools/dna.html) e em seguida utilizou-se o programa Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov), nas condições do programa. Com esse procedimento podemos determinar as % de identidade e similaridade entre as seqüências.

Para a obtenção do cladograma foi utilizado o programa Mega 4 (www.megasoftware.net) (Tamura et al, 2007) e a montagem foi feita por “neighbor joining”.

2.19- Digestão do plasmídeo pGenT usando a enzima de restrição EcoRI

Amostras (1 µL da preparação de plasmídeos) foram digeridas com EcoRI (Promega) usando o tampão e o número de unidades indicadas pelo fabricante. A mistura de reação era incubada a 1 h a 37 °C e os produtos separados em gel de agarose 1 % (p/v).

2.20- Digestão dos vetores de expressão com Sac I

Os plasmídeos pPIC9 contendo os insertos de interesse (aproximadamente 20 µg) foram digeridos com 20 U de enzimas de restrição Sac I em tampão 1 contendo BSA (New England BioLabs). A digestão foi realizada por 16 horas a 37 °C. Em seguida foram adicionados mais 20 U de enzima de restrição e a mistura incubada por mais 2 horas a 37 °C. O produto de digestão foi purificado usando o “QIAquick PCR Purification Kit (250) (Quiagen)”. O Plasmídeo linearizado foi eluído em 10 µL de tampão TE. O produto de digestão purificado foi usado no protocolo de transformação de *Pichia pastoris*.

2.21- Transformação e expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*

A transformação e expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris* foi feita de acordo com o manual: “Pichia Expression Kit” (Invitrogen). Para a expressão de proteínas recombinantes foi usada a linhagem GS115 de *P. pastoris*. A transformação foi feita com auxílio de eletroporador Gene Pulser (Bio Rad) usando aproximadamente 20 µg de plasmídeo pPic-9 linearizado com a enzima de restrição Sac I. Foram usados plasmídeos contendo os cDNAs das três diferentes α -amilases clonadas de *D. saccharalis* e dos dois clones de inibidores da cana-de-açúcar.

Os cDNAs foram clonados ligando os sítios de restrição presentes nos iniciadores de expressão específicos, com os encontrados no plasmídeo pPic-9, em fase de leitura com o peptídeo de secreção do fator α , gerando leveduras transformadas que secretam a proteína codificada pelo inserto no meio, quando induzidas.

As colônias transformadas foram plaqueadas em meio mínimo sólido MD-ágar. As placas foram incubadas por 72 horas a 28 °C. Somente colônias transformadas se desenvolvem nesse meio, carente em aminoácidos essenciais, pois o plasmídeo pPIC9 usado na transformação codifica as enzimas responsáveis pela síntese de histidina (aminoácido que a levedura não transformada é incapaz de sintetizar).

Noventa e seis colônias de cada transformação foram repicadas para placas YPD-ágar contendo o antibiótico geneticina na concentração de 1 mg/mL. Essas placas eram quadriculadas e numeradas, de forma a identificar as colônias transformadas. Elas foram então incubadas por 48 horas a 30 °C. As colônias que cresceram nessa condição foram replaqueadas em uma placa YPD-ágar contendo geneticina em uma maior concentração (2 mg/mL). Esse procedimento foi repetido até atingir a concentração de 4 mg/mL.

As colônias expressando a proteína de interesse foram selecionadas através de protocolos de mini-expressão. Nesse, 10 tubos contendo 20 mL de meio líquido YPD foram inoculados com diferentes colônias transformadas com

pPic-9 contendo o fragmento de cDNA de interesse escolhidas ao acaso dentre os selecionados na maior concentração de antibiótico. Isso foi repetido para cada um dos cDNAs. O meio foi então incubado por cerca de 24 horas a 28 °C sob agitação em agitador orbital.

Após as células terem crescido (DO_{600} em cerca de 1.0), o meio de cultura foi centrifugado (1.900 x g, a temperatura ambiente). O precipitado foi ressuspense em água Milli-Q autoclavada e novamente centrifugado (como anteriormente). Esse último passo foi repetido por mais uma vez. Finalmente, as células precipitadas foram ressuspensas em 20 mL de meio líquido BMMY, foram adicionados 200 μ L de metanol 100% (v/v) e colocadas a 28 °C sob agitação em agitador orbital. A cada 12 horas foram adicionados mais 200 μ L de metanol 100% (v/v). Nesse mesmo período, a cada 24h foram retiradas alíquotas de 1 mL de meio. Essas alíquotas foram centrifugadas (8.000 x g, a 4 °C, por 5 minutos) e o sobrenadante (contendo azida 0,02%) usado para analisar a expressão da proteína de interesse. A indução foi acompanhada por 120 horas.

Depois de selecionada a colônia de *P. pastoris* expressando em maior quantidade a proteína de interesse, foi realizado protocolo de maxi-expressão, em meio rico (BMMY) e meio mínimo (BMM). Inicialmente foram inoculados 20 mL de meio líquido YPD. Esse meio foi incubado a 28 °C sob agitação até alcançar uma DO_{600} de 1.0-2.0. Esse meio foi usado para inocular mais 1 L de meio líquido YPD que, por sua vez, foi incubado por cerca de 16 horas a 28 °C sob agitação. Após incubação, o meio de cultura foi centrifugado (8.000 x g, a 4 °C, por 5 minutos). O precipitado foi ressuspense em água Milli-Q autoclavada e novamente centrifugado (como anterior). Esse passo foi repetido mais uma vez. Finalmente o precipitado foi ressuspense em 1 L de BMMY, adicionados 10 mL de metanol 100% (v/v) e colocado para crescer a 28 °C sob agitação. A cada 12 horas eram adicionados mais 10 mL de metanol 100% (v/v). Nesse mesmo período, a cada 24h foram retiradas alíquotas de 1 mL de meio. Essas alíquotas foram centrifugadas (8.000 x g, a 4 °C, por 5 minutos) e o sobrenadante (após adição de azida para uma concentração de 0,02%) usado para analisar a qualidade da expressão da proteína de interesse. Depois de 96 horas de indução, o meio de

cultura foi centrifugado (8.000 x g, a 4 °C, por 5 minutos) e o sobrenadante usado como fonte de proteína recombinante. Esse protocolo foi repetido usando como meio indutor o BMM. Ambos os meios foram testados nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0. Os materiais resultantes foram mantidos a –20 °C até o uso.

2.22- Desenho de iniciadores específicos para PCR quantitativo

As seqüências das três α -amilases foram alinhadas usando o programa ClustalX 1.83 (Thompson, 1997). As regiões escolhidas foram usadas no desenho de iniciadores que tiveram sua seqüência analisada no programa GeneRunner 3.05 (Lowe, 1994) para confirmar a qualidade do iniciador e sua T_m .

2.23- Desenho de iniciadores para clonagem de genes constitutivamente expressos

Foram buscadas seqüências depositadas em bancos de dados, de genes escolhidos como possíveis normalizadores na reação de PCR quantitativo. Aquelas pertencentes aos organismos mais próximos à *Diatraea saccharalis* foram alinhadas no programa ClustalX. Foram escolhidas regiões conservadas a uma distância de até 1500 bases da extremidade 3'. Essas foram usadas na construção de iniciadores degenerados cuja qualidade e T_m foram analisadas no programa GeneRunner (Hastings Software, Inc.).

2.24- Amplificação dos cDNAs dos genes constitutivos

A biblioteca de cDNA de *D. saccharalis* foi amplificada utilizando os iniciadores desenhados e T7. A reação de PCR foi realizada utilizando as condições padrões sugeridas no manual da enzima Taq DNA polimerase. Para cada iniciador foi realizado um gradiente de temperaturas de anelamento, de 47 até 58 °C.

2.25- Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteína presente na amostra foi feita usando o método descrito por Bradford (1976), com uma curva padrão de albumina de ovo.

2.26- Diálises

As diálises foram feitas para eliminar o sal presente nas amostras ou para alterar o tampão do meio. Essas foram feitas contra 200 volumes de água Milli-Q ou tampão apropriado por três horas, sendo realizadas três trocas da água ou tampão do banho. A membrana utilizada tinha o limite de exclusão de 12.000 Da.

2.27- Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras a serem separadas eletroforicamente, tiveram o sal retirado, foram liofilizadas em Speed Vac, ressuspensas em 40 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2 % p/v; 2- β -mercaptoetanol 0,36 M; glicerol 10 % v/v; azul de bromofenol 0.0025 % p/v) e, finalmente, mantidas por 3 min em banho em ebulição.

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS utilizando-se o sistema descontínuo de tampões descrito por Laemmli (1970). Foram usados géis de corrida na concentração de poliacrilamida de 12% e o gel de empilhamento na concentração de 4 %, ambos contendo SDS 0,1 %. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 200 V à temperatura ambiente. A eletroforese era terminada quando o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente, estivesse na borda inferior da placa.

2.28- Detecção de proteína nos géis

O gel a ser corado foi fixado em solução contendo metanol 50 % (v/v), ácido acético 12 % (v/v) e formaldeído 0,025 % (v/v) e submetidos ao método de coloração desenvolvido por Blum et al. (1987).

2.29- Cromatografia de filtração em gel

A fim de trocar o tampão onde se encontrava a proteína induzida, foi realizada uma cromatografia de filtração em gel, sendo o meio rico proveniente da indução de IC1 utilizado como amostra.

A cromatografia foi realizada manualmente, com o uso de seringas. Foi usada uma coluna HighTrap Dessalting e tampão CAPS 100mM pH 9,5 ou PIPES 100mM pH7,0. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão. Em seguida, 1,5 mL de amostra foi aplicada. Por fim foram aplicados mais 10 mL de tampão, para eluição, onde foram coletados os dois primeiros mililitros.

2.30- Cromatografia de troca iônica em baixa pressão

A cromatografia foi realizada em sistema AKTA (Pharmacia) à temperatura ambiente em tampão CAPS 20 mM, pH 10,5. Foi utilizada a coluna HighTrap Q (Amersham Biociences) de 5 mL de volume. A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão em quantidade igual a 5 volumes da coluna.

Após a aplicação da amostra no mesmo tampão, o material foi eluído com um gradiente de concentrações crescentes de NaCl. Primeiramente, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão inicial, sendo retiradas proteínas que não se ligaram à resina. Em seguida, o material retido foi eluído em um gradiente de 100 mL de 0 a 1 M de NaCl em tampão. Finalmente, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão contendo 1 M de NaCl no intuito de retirar qualquer proteína ainda ligada à coluna. Em todos os passos foram coletadas frações de 2 mL.

2.31- Cromatografia de troca iônica em sistema de alta pressão

A cromatografia foi realizada em sistema AKTA (Pharmacia) à temperatura ambiente em tampão CAPS 20 mM, pH 10,5. Foi utilizada uma coluna Resource Q (Pharmacia) de 1 mL de volume. A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão em quantidade igual a 5 volumes da coluna.

Após a aplicação da amostra no mesmo tampão, a coluna foi eluída com um gradiente de concentrações crescentes de NaCl. Essa cromatografia tem basicamente 4 fases. Na primeira a coluna foi lavada com 5 mL de tampão inicial, sendo retiradas proteínas que não se ligaram à resina. Na segunda, proteínas

foram eluídas com um gradiente de 22 mL de 0 a 500 mM de NaCl em tampão, aonde foi retirada da coluna a proteína de interesse. Em seguida, a coluna foi lavada com um gradiente de 3 mL de 500 mM a 1 M de NaCl. Finalmente, a coluna foi lavada com 5 mL de tampão contendo 1 M de NaCl no intuito de retirar qualquer proteína ainda ligada à coluna. Desde o momento da aplicação da amostra até o lavado final, todo material eluído da coluna foi coletado em frações de 0,4 mL.

2.32- Detecção da atividade de α -amilase e α -glicosidase

Ensaio de amilase foram realizados usando amido solúvel a 0,5% como substrato, NaCl 10 mM, CaCl_2 1mM e a concentração de tampão 100mM no pH apropriado. Foram realizados ensaios de 4 tempos ou um só tempo (para determinação de atividade após cromatografias), a 30 °C. A clivagem do substrato foi medida pela quantificação de grupos redutores formados, usando o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS; Noelting & Bernfeld, 1948).

A α -glicosidase foi ensaiada a 30°C, por quatro tempos, utilizando p-nitrofenil- α -D-glicosídeo 1,25 mM como substrato, em tampão Gly-NaOH pH 9,0. A reação foi interrompida como descrita por Terra et al (1979).

2.33- Ensaio de estabilidade ao congelamento

Meio mínimo proveniente da indução de DSA1 e DSA2 foram aliquotados em seis tubos. Esses foram congelados (-20 °C) e descongelados sucessivamente, de forma que cada um deles tenha sido congelado diferentes vezes (de zero a cinco). Ao término do procedimento a atividade remanescente foi medida em cada tubo.

2.34- Detecção da atividade inibitória de IC1

A atividade do inibidor expresso foi verificada ensaiando o meio proveniente da indução de IC1 após troca de tampão por cromatografia de filtração em gel com diferentes α -amilases. Foram elas: as amilases recombinantes de *D. saccharalis*

(DSA1, 2 e 3), α -amilase pancreática de porco, α -amilase salivar humana, e α -amilase bacteriana (*Bacillus sp*).

Os ensaios foram feitos em tampão CAPS pH 9,5 (DSA1) e PIPES pH 7,0 (as demais) usando as mesmas condições dos ensaios padrão de atividade. A quantidade de enzima usada foi tal que na ausência do inibidor (controle) a absorbância máxima obtida no ensaio seja 1,000. As enzimas foram diluídas no tampão apropriado e foram misturados 12,5 μ L de enzima com 12,5 μ L do inibidor. Isso foi incubado a 30 °C por uma hora. Em seguida foram adicionados 25 μ L de substrato (amido 1%, NaCl 20 mM e CaCl₂ 2mM em tampão CAPS ou PIPES) e a atividade amilásica foi medida. Todos os tampões tinham uma concentração de 100 mM.

Foi utilizado também meio de cultura proveniente da indução de IC1 concentrado duas vezes em membrana centriplus com limite de exclusão de 3.000 Da, após troca de tampão com uso de uma coluna HighTrap Dessalting para CAPS 100 mM, pH 9,5.

2.35- Determinação do pH ótimo das enzimas

Os ensaios para determinação do efeito do pH foram realizados com solução tampão 100 mM. Para valores de pH de 5,5 a 6,5 foi usado tampão MES; de pH 6,5 a 7,5 PIPES; de 7,5 a 8,0 HEPES; de 8,0 a 8,5 TAPS; de 8,5 a 10,5 Gly-NaOH ; de 10,0 a 11,0 CAPS. Os pHs dos tampões foram medidos nas misturas de reação a 30°C. Esse cuidado é necessário porque o pKa de alguns grupos são alterados pela temperatura.

2.36- Estabilidade ao pH

Para determinar a faixa de pH em que as enzimas estudadas são estáveis por um período de tempo que possibilite a realização dos experimentos, na temperatura em que esses são realizados, DSA1 e DSA3 foram incubadas em diferentes pHs, a 30 °C por 1,5 e 3 horas. Material proveniente da indução e previamente dialisado contra tampão 20 mM no pH ótimo foi diluído 2 vezes em

tampão 200 mM para os diferentes pHs, incubado, diluído no mínimo 10 vezes em tampão 100 mM no pH ótimo e ensaiado.

2.37- Inativação térmica das amilases

As enzimas recombinantes e a fração solúvel do conteúdo do ventrículo foram incubadas a 50°C em tampão Gly-NaOH 100mM pH 9,0. Após diferentes períodos de tempo alíquotas foram removidas e a atividade remanescente determinada.

2.38- Modificação com EDC

As enzimas recombinantes DSA1 e DSA3, assim como o homogeneizado do conteúdo do ventrículo do animal, após diálise, foram mantidos por diferentes períodos de tempo na presença de 1-etil-3-(dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC) 20 mM e glicina-etil-ester 100 mM. A reação de modificação foi interrompida pela adição de citrato de sódio 200 mM e teve a atividade residual determinada.

2.39- Determinação da constante de Michaelis (Km) para diferentes substratos

Em todas as determinações mediu-se a velocidade inicial de hidrólise em dez concentrações diferentes do substrato. Os valores da constante de Michaelis foram calculados pelo método dos mínimos quadrados usando o software Enzfitter 2.0 (LeatherBarrow, R.J., Elsevier-Biosoft, 1987). Os substratos usados foram amilose, amido e glicogênio. Como amilose é insolúvel em água, foi utilizado DMSO para solubilizá-la, estando o solvente presente em uma concentração final de 5%. Para efeitos de comparação, o Km para amido foi determinado na presença e ausência de DMSO.

2.40- Medida da processividade (grau de ataque múltiplo)

O grau de ataque múltiplo de uma glicosidase é definido como o número de ligações glicosídicas hidrolisadas após a primeira, durante a existência de um

único complexo enzima-polissacarídeo (Robyt and French, 1967). Ensaios realizados sobre amido de acordo com o item 2.32 foram misturados com 20 volumes de etanol. A mistura foi então incubada a -20°C por 1 hora, sendo então centrifugada a 4°C por 10 minutos a 15.000g. Separou-se o sobrenadante do precipitado e posteriormente evaporou-se o solvente dos materiais sob vácuo à temperatura ambiente. Após a liofilização, a quantidade de grupos redutores presentes em cada fração foi quantificada com a técnica do ácido dinitrossalicílico (Noelting e Bernfeld, 1948).

2.41- Cromatografia em camada delgada dos produtos de ação enzimática

Foi realizado ensaio enzimático das α -amilases recombinantes, usando amilose como substrato. Esses foram tratados como no item 2.40, sendo utilizada apenas a fração solúvel em etanol. O material liofilizado foi ressuspendido em 10 μL de água MilliQ, sendo aplicado 2 μL em uma placa de cromatografia delgada de sílica ALUGRAM® SIL G (MACHEREY-NAGEL, Germany). A fase móvel usada para a separação foi butanol:etanol:água 50/30/20 (v/v/v), sendo a cromatografia realizada em atmosfera saturada com a fase e ao longo de 15 cm da placa cromatográfica. Os carboidratos presentes foram evidenciados pela técnica do fenol-ácido sulfúrico (Stahl, 1969).

2.42- Determinação da sensibilidade das amilases recombinantes a diferentes inibidores

Foram utilizados αAl1 e αAl2 de feijão comum semi-purificados, cedidos pela prof. Fátima Grossi-de-Sá (CENARGEN). Também foram usados os inibidores de α -amilase do trigo (*Triticum aestivum*) tipo I (IT1) e tipo III (IT3), comprados da SIGMA. Os inibidores de feijão foram usados na concentração de 0,5 mg/mL e os de trigo 0,125 mg/mL.

As enzimas foram incubadas com os inibidores por uma hora a 30°C e em seguida teve a atividade de amilase medida. Para melhor ilustrar a atividade dos inibidores, foram realizados ensaios com as amilases salivar humana e pancreática de porco, da mesma forma que as com as enzimas expressas.

2.43- Modelagem estrutural de DSA1

A sequência de aminoácidos da proteína DSA1 de *D. saccharalis* foi analisada com o programa Signal IP (Nielsen et al, 1997), disponível no ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org), para predição de possíveis regiões de Clivagem para peptídeo sinal.

A sequência correspondente a proteína madura de DSA1 foi submetida à modelagem estrutural por homologia no SWISS-MODEL Protein Modelling Server (<http://swissmodel.expasy.org>), nas condições padrão do programa. O modelo gerado no formato pdb foi visualizado e analisado usando o programa Swiss-PdbViewer, disponível no mesmo servidor (Schwede et al (2003), Guex e Peitsch(1997) Peitsch (1995)).

3- Resultados e Discussão

3.1- Instalação da cultura de *D. saccharalis* no laboratório e verificação de seu crescimento em dietas modificadas

Os indivíduos provenientes de Piracicaba levaram aproximadamente 40 dias para atingir o estágio de pupa. Esse período é um pouco maior do que o observado em seu local de origem onde levam em torno de 30 dias. Isso pode ser explicado por uma diferença das temperaturas médias onde as culturas são mantidas. No laboratório ela é controlada e mantida próxima dos 25 °C. Em Piracicaba a temperatura é ambiente, podendo ser mais elevada.

As pupas transformaram-se em adultos saudáveis, que foram colocados em gaiolas para acasalamento. Os ovos depositados foram coletados e eclodiram em aproximadamente sete dias. As larvas foram colocadas em dietas normais, a fim de dar continuidade a cultura. Essa geração repetiu o padrão de desenvolvimento da anterior.

Larvas também foram criadas em dietas experimentais, visando observar se dietas com concentrações variadas de sacarose e amido alteram o padrão de desenvolvimento dos animais e a expressão de α -amilases. Os animais das diferentes dietas e controle foram retirados após 30 dias, anestesiados em gelo, pesados e dissecados. Foi contado o número de larvas e de pupas e foi determinado o peso das larvas e a atividade de amilase no seu intestino médio (Tabela 1).

Não há diferença significativa no peso das larvas e as diferenças observadas quanto ao número de pupas e de mortos não é muito grande. Esses resultados mais atividade de α -amilase estão apresentados na Tabela 1.

Aparentemente não houve grande diferença no desenvolvimento das larvas nas várias dietas. Quando o conteúdo luminal mais a membrana peritrófica foram homogeneizados em água, a atividade de amilase encontrada nas dietas com maior quantidade de amido foi menor que na dieta controle (Tabela 1). Entretanto, quando a homogeneização foi feita em pH 6,0, a atividade amilásica é claramente

dependente da quantidade de amido presente na dieta, não sendo influenciada pela diminuição da quantidade de sacarose (Tabela 1).

O homogeneizado feito em água estava na concentração de 20 intestinos médios por mL, o que provavelmente fez com que o pH ficasse perto do fisiológico, no qual as amilases interagem com o substrato e sedimentam junto com esse quando é feita a centrifugação. A recuperação de amilase no sedimento após centrifugação do conteúdo luminal já foi vista em *S. frugiperda* (Ferreira et al, 1994) e em *Musca domestica* (Terra et al, 1990). Quando o homogeneizado do intestino médio de *D. saccharalis* foi obtido em pH 6,0, provavelmente as enzimas não ligam-se mais ao substrato e são recuperadas na fração solúvel.

Embora nós não tenhamos utilizado essas dietas com amido para outros experimentos, quizemos deixar o resultado registrado para que o dado possa ser usado em experimentos futuros. O aumento na atividade amilásica pode ser vantajoso no laboratório, para experimentos feitos com esse animal, mas não parece causar nenhuma vantagem para o desenvolvimento das larvas. Talvez a possibilidade de obter mais energia da degradação do amido (e posterior absorção de glicose) seja contrabalançada por um aumento na viscosidade do bolo alimentar, o que dificultaria a sua digestão (Adeola e Bedford, 2004; Palander et al 2005).

3.2- Determinação do pH do lúmen intestinal de *D. saccharalis*

Os valores de pH encontrados para as três diferentes regiões do intestino médio de *D. saccharalis* foram: $8,7 \pm 0,6$ na porção anterior, $9,0 \pm 0,4$ na porção média e $8,7 \pm 0,3$ na porção posterior, coerente com o esperado em lepidópteros (Terra e Ferreira, 2005).

3.3- Clonagem do cDNA codificante das α -amilases de *D. saccharalis* e seu seqüenciamento

O alinhamento das seqüências de α -amilases de insetos depositadas em bancos de dados mostrou diversas regiões conservadas. Para o desenho do iniciador degenerado foi escolhida a região conservada mais próxima da

extremidade 5' da fita codificante das α -amilases de insetos (Figura 4), a fim de obter um fragmento de maior tamanho possível. Para tal, a extremidade 3' do iniciador está voltada para a extremidade 3' da fita codificante. O fragmento amplificado teria tamanho aproximado de 1500 pb, tendo como base a α -amilase de *T. molitor* (Strobl et al, 1997). O iniciador desenhado apresenta degenerações pois a região escolhida não é completamente conservada.

Na amplificação da biblioteca de *D. saccharalis*, usando os iniciadores A1 e os que anelam no braço do fago (T3 ou T7, pelo fato da biblioteca ser não direcional, estando o inserto ligado em ambos os sentidos) observou-se após eletroforese, um único material majoritário com tamanho próximo ao esperado (Figura 5).

O produto do PCR que se mostrou mais específico (usando o iniciador T7 e 53 °C de temperatura de anelamento) foi purificado do gel, ligado em plasmídeo pGenT e usado para transformação de bactérias competentes. Os plasmídeos foram purificados e digeridos com EcoRI. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose e mostrou a presença de insertos de diversos tamanhos. Foram selecionados para seqüenciamento insertos que apresentaram tamanhos próximos ao previsto (1500 pb) e aleatoriamente alguns de menor peso molecular (Figura 6).

Nas reações de seqüenciamento, foram usados os iniciadores que anelam no braço do plasmídeo SP6 e pGen, sendo uma reação para cada clone e para cada iniciador.

Dos fragmentos de cDNA seqüenciados, dez codificavam α -amilases diferentes. Entre eles, cinco codificavam uma delas, quatro codificavam outra e apenas um codificava a terceira sendo esse de tamanho menor (750 pb). Essas seqüências foram chamadas de DSA1, DSA2 e DSA3 respectivamente.

As seqüências de aminoácidos das proteínas que supostamente são codificadas por esses cDNAs foram comparadas entre si, levando a acreditar que realmente se tratavam de três proteínas diferentes já que mesmo as mais semelhantes apresentam apenas 95% de identidade e 97% de similaridade (Tabela 2).

Com base nos fragmentos obtidos, foram desenhados iniciadores específicos para cada uma das seqüências (Figura 7). Foram realizadas amplificações com os iniciadores específicos contra T3 e T7, usando como DNA molde alíquotas da biblioteca de *D. saccharalis*. O produto de PCR foi então separado em gel de agarose. Os cDNAs amplificados (Figura 8, raias R1 a R6) mostraram-se maiores que os fragmentos inicialmente clonados (raias C1 a C3), evidenciando que eles poderiam efetivamente conter a extremidade 5' do cDNA.

A banda mais evidente em cada amplificação com o iniciador T3 foi recortada do gel e purificada, para clonar apenas os produtos de interesse.

O produto da purificação foi usado para ligação em plasmídeo pGen-T e transformação de bactérias competentes. Após a transformação, parte das células das colônias selecionadas serviu de molde em um PCR para se verificar os insertos contidos em seus plasmídeos (Figura 8). Foram selecionados os insertos que teriam o tamanho esperado (aproximadamente 2000 pb) uma vez que teriam maior probabilidade de ser uma seqüência completa de cDNA codificante da α -amilase.

Outra parte das células das colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido (LB+ampicilina), tiveram seus plasmídeos purificados e então seqüenciados. Nesse seqüenciamento foram usados os iniciadores T7 e SP6.

Esse seqüenciamento resultou em três seqüências completas codificantes de α -amilases (Figura 9). Todas as α -amilases clonadas apresentam alta homologia com outras já seqüenciadas, principalmente de lepidópteros e demais insetos (Tabela 2). Quando comparadas com a seqüência da amilase de *T. molitor* (Stroebl *et al*, 1997) observamos que os resíduos catalíticos, bem como os de ligação a Ca^{++} são conservados. Já dentre os resíduos de ligação à Cl^- um dos resíduos de arginina de *T. molitor* é substituído por glutamina nas três amilases clonadas (Figura 9). Isso é um indicativo de que elas não sejam ativadas por esse íon, como já foi observado em outras amilases de Lepidoptera (Terra e Ferreira, 2005).

Para prever a massa molecular e o pI das proteínas a partir da seqüência foi utilizado o programa Compute pI/MW, do expasy tools. A massa molecular

predita a partir das seqüências é muito semelhante para DSA1, DSA2 e DSA3: 54.505; 54.488 e 54523, respectivamente. Os pls teóricos preditos foram de 6,44; 5,53 e 6,41 (DSA 1, 2 e 3 respectivamente). DSA2 não apresenta nenhum sítio de n-glicosilação, enquanto DSA1 apresenta 1 e DSA3 apresenta dois desses sítios.

3.4- Construção dos vetores de expressão e transformação de *Pichia pastoris*

Para assegurar a qualidade dos cDNAs usados como molde para amplificação com os iniciadores de expressão, foram realizados seqüenciamentos dos plasmídeos contendo os insertos de interesse. Eles estavam clonados no plasmídeo pGenT, que possui regiões para ligação dos iniciadores T7 e SP6, nas extremidades do inserto. Além desses iniciadores, também foi usado o iniciador A5, desenhado para amplificar a região interna dos cDNAs codificantes para as α -amilases, descrito anteriormente. Os insertos codificantes dos inibidores IC1 e IC2 estavam clonados em pSport1, e foram seqüenciados usando os iniciadores SP6 e T7. O cromatograma desses seqüenciamentos não se mostrou com qualidade confiável, porém demos continuidade aos experimentos.

Os plasmídeos que se mostraram íntegros foram então amplificados com os iniciadores de expressão por PCR. Os iniciadores de expressão desenhados para amplificar as α -amilases se mostraram eficientes. O produto do PCR com os pares de iniciadores específicos tendo o clone cujo cDNA codifica a enzima de interesse como DNA molde, apresentou uma única banda quando resolvido em gel de agarose (Figura 10). Os iniciadores de expressão desenhados para amplificar IC1 também se mostraram eficientes, porém IC2 apresentou diversas bandas, sendo então recortada do gel a de tamanho esperado para clonagem.

Para clonagem dos produtos em pPIC9, os mesmos foram resolvidos em gel de agarose e purificado do gel. O produto de PCR purificado e o plasmídeo pPIC9 sofreram uma dupla digestão e foram ligados. O produto da ligação foi usado na transformação de *E. coli*, que foram usadas para realizar preparações de plasmídeos. Esses foram seqüenciados e tiveram suas seqüências analisadas, sendo evidenciada a integridade da construção, estando a seqüência inserida em

fase correta de leitura e não apresentando mutações. Apenas na construção de IC2 foi seqüenciado um inserto que não correspondia ao cDNA de interesse, não sendo usado na transformação. Um esquema das construções geradas pode ser observado na figura 11. De cada tipo de célula transformada, 96 colônias foram repicadas em placas contendo o antibiótico geneticina, e tiveram a incorporação do inserto em seu DNA genômico confirmada por PCR utilizando as células lisadas e os mesmos iniciadores específicos que foram usados na clonagem.

3.5- Expressão das α -amilases recombinantes em *Pichia pastoris*

As colônias transformadas com cada uma das construções foram selecionadas com geneticina até a concentração de 4 mg/mL e então crescidas e induzidas em meio rico (mini-expressão). Os clones transformados com DSA1 e DSA2 apresentaram diversos transformantes com atividade em seu meio de cultura (Tabela 3). Essa atividade é proveniente da secreção da α -amilase expressa. Confirmamos a atividade α -amilásica através de um controle negativo (*P. pastoris* transformada com plasmídeo sem inserto), que não apresentou em seu meio de cultura atividade sobre amido. Para cada um dos grupos de clones, aquele que apresentou a maior atividade em seu meio, foi selecionado para uma maxi-expressão. Nesse processo as alíquotas retiradas tiveram a atividade medida e o total de proteína quantificado, para calcular a atividade específica (Tabela 4). Além disso as alíquotas foram resolvidas em SDS-PAGE (resultado não mostrado).

DSA1 é expressa tanto no meio mínimo quanto no meio rico em quantidades semelhantes. Decidimos utilizar para estudo dessa enzima a expressão em meio mínimo porque ela é obtida com o dobro da atividade específica (tabela 4). Para estudos cinéticos será utilizado meio após três dias de indução, período em que a atividade específica no meio chega no máximo.

Quando a levedura é transformada com cDNA que codifica DSA2, só foi possível encontrar atividade de α -amilase com expressão em meio rico de expressão. No meio mínimo toda a atividade é perdida, enquanto no meio rico a maior parte da atividade é mantida. Foi observada uma alta atividade enzimática

no meio rico após 5 dias de indução, porém observa-se uma maior contaminação de proteínas após o terceiro dia de indução, não sendo essa estratégia ideal para produzir proteína recombinante para estudo.

Visando melhorar o rendimento e qualidade das proteínas expressas, tentamos induzir a expressão em diferentes pHs. Tendo a informação do fabricante do kit de expressão que a levedura usada (*P. pastoris*) se desenvolve bem entre os pHs 6,0 e 8,0, foram realizados experimentos para verificar a quantidade de proteína expressa que se encontra ativa no meio de cultura durante a indução nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0. O pH das alíquotas foi medido assim como a atividade enzimática das α -amilases por 72 horas. Os pHs não se alteraram durante a indução, com exceção dos meios em pH 8,0, que estavam em torno de 7,5 após 72 horas de indução.

As medidas de atividade estão apresentadas na Tabela 5. DSA1 apresenta atividade tanto em meio rico quanto em mínimo, nos pHs 6,0 e 7,0, a partir de 24 horas de indução. Em pH 8,0 apenas após 72 horas é observada atividade. DSA2 apresenta atividade a partir de 24 horas de indução em meio rico pH 7,0, e nos demais a partir de 48 horas de indução, com exceção dos meios em pH 8,0 que não apresentaram atividade. Para ambas as enzimas o pH 7,0 foi aquele em que se observou maior atividade. Como em meio mínimo DSA2 se inativa após congelamento, mesmo ajustando o pH para 8,0 (onde foi verificada a estabilidade da enzima ao congelamento quando em meio rico) usaremos meio rico para DSA2 e meio mínimo para DSA1, ambos em pH 7,0, para obtenção das enzimas.

Os clones transformados com DSA3 não apresentaram atividade α -amilásica em seu meio. Isso pode ter ocorrido por alguma falha na construção usada na transformação, que não foi detectada na análise do seqüenciamento ou por expressão da proteína inativa. O protocolo foi repetido desde a clonagem no vetor de expressão, apenas para DSA3.

Nessa segunda tentativa, foram observados clones com atividade, e aquele com maior atividade foi escolhido para maxi-expressão. Como as três enzimas tem seqüência muito conservada, e provavelmente propriedades físicas semelhantes, foi feita a maxi-expressão em pH 7,0, pois foi o mais adequado para

as outras duas amilases, sendo testados tanto o meio rico quanto mínimo. Foi observada atividade muito maior (em torno de cinco vezes) em meio rico sendo então usado este, após três dias de indução, como fonte de enzima para os estudos posteriores.

Em todos os meios de cultura, após indução da expressão das amilases foi feito ensaio para detectar atividade de α -glicosidase com p-nitrofenil- α -glicosídeo. No ensaio utilizou-se uma concentração de enzima 100 vezes maior que a utilizada no ensaio de amilase e não foi detectada atividade.

3.6- Expressão dos inibidores de cana-de-açúcar recombinantes em *Pichia pastoris*

Os clones transformados com IC1 tiveram inicialmente sua expressão testada por um ensaio de inibição de α -amilases. Nenhuma das enzimas testadas foi inibida, nem com o inibidor concentrado. A ineficiência na inibição pode ter ocorrido por uma série de fatores, como baixa concentração de inibidor no meio, pH impróprio para a ligação enzima-inibidor, inespecificidade do inibidor para as enzimas testadas, ou expressão de inibidor inativo. Para confirmar a presença de proteína expressa, os meios de cultura induzidos foram resolvidos em SDS-PAGE (Figura 12). Como o meio usado na expressão é rico em proteínas de baixo peso molecular (proveniente da peptona), e como a proteína expressa teria massa molecular esperada de 14 kDa, não foi possível identificar com clareza a presença de uma banda correspondente ao inibidor.

Devido aos problemas durante a expressão, fizemos estudos mais aprofundados na sequencia (teórica) dos inibidores comprados e do plasmídeo recebido.

Foi realizado o alinhamento das sequências dos inibidores IC1 e IC2 com aquelas disponíveis em bancos de dados, afim de classifica-los dentro das diversas clases de inibidores de amilase. A partir destas análises foi possível observar que o inibidor IC1 é semelhante ao inibidor bifuncional encontrado em RAG1 (*Panicum miliaceum*). Esse inibidor é capaz de atuar sobre amilase e tripsina, incluindo as amilases de coleóptera (ver Strobl et al, 1998). A expressão

de IC2 é especialmente interessante, pois ele é um inibidor presente em caule (Falco et al 2001), que é fonte de alimento para a *D. saccharalis* e ele é um inibidor semelhante ao inibidor bifuncional RASI, presente em arroz (*Orizya sativa*), que atua em pH alcalino (Yamagata et al, 1998) e semelhante ao inibidor de trigo, que inibe amilases de lepidópteros (Markwick et al, 1996).

Na tentativa de analisar as sequências dos clones codificantes dos inibidores de cana-de-açúcar, as preparações de plasmídeos foram refeitas e resequenciadas. Novamente não conseguimos obter resultados de boa qualidade. Tentamos então excisar o inserto do plasmídeo por digestão com enzimas de restrição. Conseguimos apenas linearizar o plasmídeo. Em contato telefônico com o Brazilian Clone Collection center (Jaboticabal), recebemos a informação que alguns dos clones tiveram sua construção alterada, não sendo possível saber quais seriam as enzimas de restrição ou iniciadores que deveríamos usar. Com essa informação abandonamos os experimentos com os inibidores de cana-de-açúcar.

3.7- Clonagem de cDNAs codificantes de proteínas constitutivas

Com o intuito de quantificar a expressão das diferentes α -amilases de *D. saccharalis* no intestino médio, foram desenhados iniciadores específicos para cada uma das seqüências. Eles foram planejados respeitando os requisitos necessários para a realização de experimentos de PCR em tempo real. Todos os iniciadores devem ter temperatura de anelamento próximas, pois todas as reações são realizadas simultaneamente. Devem também amplificar um fragmento de tamanho entre 100 e 200 pares de base, e ser totalmente específicos, segundo recomendações do fabricante dos reagentes a serem utilizados (SYBR Green chemistry, Qiagen).

Foi difícil encontrar regiões distintas entre as seqüências codificantes das α -amilases, sendo que a maior diferença encontrada foi de quatro nucleotídeos ao longo de regiões onde se ligariam possíveis iniciadores. Por esse motivo optou-se por utilizar os iniciadores usados na clonagem, que se mostraram específicos para os diferentes cDNAs (uma vez que apenas um iniciador

específico seria suficiente para garantir a especificidade da reação), e um iniciador no interior da sequência, a uma distância adequada desse primeiro. Uma porção do alinhamento das duas seqüências mais parecidas (porção interna) pode ser observada na Figura 13, onde se nota pouca diferença entre elas, e regiões onde possíveis iniciadores se anelariam. Na Figura 13 se observa o alinhamento da extremidade 3' das seqüências, com as regiões onde ligam-se os iniciadores de clonagem e as regiões para onde os novos iniciadores foram desenhados.

Para realização dos experimentos de PCR em tempo real, é necessário conhecer a seqüência de genes que seriam expressos sem alteração nas diferentes condições estudadas. Esses genes seriam amplificados da mesma forma que os genes de interesse e seriam usados como normalizadores entre os diferentes experimentos. Poucos genes de *D. saccharalis* foram depositados em bancos de dados e nenhum deles seriam bons constitutivos, pois ou são regulados, ou são mitocondriais (o que não é interessante, já que estamos estudando genes nucleares), ou são ribossomais, que são expressos em quantidade muito maior que os genes estudados (aproximadamente 98% do RNA da célula é rRNA), dificultando assim a comparação.

Nessa situação foi necessária a clonagem de genes constitutivamente expressos de interesse. Os genes mais frequentemente usados nesse tipo de experimento descritos na literatura foram buscados em bancos de dados e alinhados (α e β -actina, β -tubulina). Eles não se mostraram muito conservados, o que tornaria difícil a construção de um iniciador degenerado que pudesse ser usado para amplificar o gene de interesse na biblioteca de *D. saccharalis*.

Partimos então para escolha de genes bastante conservados e que não sofressem regulação diferenciada nas diferentes condições de estudo. Foram escolhidos os genes codificantes das subunidades catalíticas das DNA polimerases envolvidas em síntese (DNA polimerases α , Δ e γ) e o gene codificante da proteína ribossomal S6 (RPS6), utilizado em experimentos de PCR semi-quantitativo em *Spodoptera frugiperda* por Bolognesi *et al.*, 2005. Foram buscadas nos bancos de dados as seqüências codificantes desses genes em

organismos mais próximos evolutivamente à *D. saccharalis* e alinhadas. As seqüências usadas nos alinhamentos de cada um dos genes e seus respectivos códigos de acesso podem ser observadas na Tabela 6. Regiões conservadas foram usadas no desenho de iniciadores degenerados. Essas regiões estão destacadas na Figuras 14. Os iniciadores desenhados e suas características são apresentados na Tabela 7.

Os iniciadores desenhados foram usados para amplificar uma biblioteca de cDNA de *D. saccharalis*. Foram observadas diferentes temperaturas de anelamento ótimas para cada um deles. Pol_α e RPS6 têm um Tm ótimo em 53 °C, pol_Δ de 50 °C e pol_γ 47 °C . Os iniciadores pol_Δ, pol_γ e RPS6 geraram uma única banda, pol_α gerou uma série de produtos de diferentes tamanhos (resultado não mostrado). As bandas de tamanho próximo ao produto previsto para pol_α, assim como as bandas geradas pelos demais iniciadores foram purificadas do gel e clonadas em plasmídeo pGenT. As construções foram usadas para transformação de bactérias competentes e as colônias transformadas foram seqüenciadas. Para evitar realizar inúmeras preparações de plasmídeos foram feitas reações de PCR usando as colônias como fonte de DNA e os produtos dessas reações usados como fonte de DNA no seqüenciamento. Este foi realizado da mesma forma que descrito no item 08 dos materiais e métodos, porém usando os iniciadores SP6 e pGem. As seqüências obtidas foram analisadas usando o programa phredPhrap e os contigs gerados comparados com o banco de dados do NCBI usando a ferramenta BlastX.

Apenas o iniciador RPS6 se mostrou específico para o gene alvo, gerando uma seqüência de 525 nucleotídeos, cuja seqüência deduzida de aminoácidos apresentou alta similaridade com os mesmos genes de outros insetos, principalmente lepidópteros (Figura 15). Os demais iniciadores não apresentaram um produto específico. Na tentativa de amplificar com sucesso os outros genes de interesse a reação de PCR deve ser realizada numa condição de anelamento mais específica.

Esse resultado, apesar de não ideal, já que apenas um dos genes constitutivos foi clonado com sucesso, nos permite iniciar os experimentos de

PCR em tempo real. Poderemos padronizar a técnica e, se o gene RPS6 se mostrar constitutivamente expresso, até mesmo obter os resultados de quantificação de expressão, já que muitos dos experimentos descritos na literatura usam apenas um gene normalizador (Loureço *et al.*, 2005; Claeys *et al.*, 2005).

Embora não tenhamos verificado a expressão diferencial das α -amilases de *D. saccharalis*, decidimos relatar o que foi feito e quais os resultados obtidos para auxiliar outras pessoas que desejem realizar esse tipo de estudo com algum gene de *D. saccharalis*.

3.8- Estabilidade das amilases recombinantes

DSA1 se apresentou bastante estável em meio mínimo, não tendo sua atividade alterada significativamente após vários congelamentos em diferentes pHs (Tabela 8). Já DSA2 mostrou-se muito instável em meio mínimo e com uma estabilidade maior em meio rico. Em pH 6,0 a estabilidade é baixa e a enzima não resiste ao congelamento. A estabilidade ao congelamento cresce a medida que o pH aumenta, chegando aquela apresentada pela DSA2 em pH 8,0 (Figura 16).

3.9- Semi-purificação de DSA1

Vários tipos de colunas cromatográficas foram tentadas para purificar a DSA1, sem resultado. Optamos por utilizá-la semi-purificada, o que é obtido satisfatoriamente após dois passos cromatográficos em coluna de troca iônica (Figura 17A e B). Após eluição da segunda cromatografia, observa-se após eletroforese uma banda majoritária de 57 kDa (Figura 17C). Esse valor é muito semelhante ao predito a partir da sequência para as três enzimas (cerca de 54.500 kDa). A SDS-PAGE não tem discriminação suficiente para que possamos dizer que o valor ligeiramente superior encontrado foi devido à glicosilações na enzima.

Deve-se ressaltar que nas diferentes raias da Figura 17C, foram aplicados volumes diferentes das frações da cromatografia, para normalizar a quantidade de proteína, e por isso a banda da amilase é praticamente igual em todas elas.

3.10- Efeito de detergentes na atividade de DSA1

Outros membros de nosso laboratório que estudaram tripsinas e quimotripsinas de lepidópteros verificaram que elas tem sua atividade estabilizada por SDS 1%. Além disso, as α -amilases ficavam ligadas à matriz de cromatografias hidrofóbicas, só sendo eluídas quando a coluna era lavada com detergentes (dados não mostrados).

Pelo exposto acima decidimos verificar o efeito de Triton X-100 e SDS nas amilases de *Diatraea saccharalis*, com o intuito de aumentar sua estabilidade e talvez facilitar a sua purificação.

Três amostras diferentes de sobrenadante de conteúdo luminal foram incubadas por cinco tempos diferentes com Triton X-100 ou SDS 0,1% ou 1%. Os resultados (não mostrados) revelaram que SDS 1% abole completamente a atividade da enzima, enquanto com SDS a atividade cai 30%. Esses resultados mostram que as amilases de *D. saccharalis* não se comportam como as proteinases de Lepidoptera. Triton X-100, nas duas concentrações testadas não afeta a atividade da enzima.

3.11- Efeito do pH e da temperatura nas α -amilases de *D. saccharalis*

DSA1 e DSA3 apresentaram um pH ótimo em torno de 9,0, enquanto para DSA2 esse valor está próximo a 8,0 (Figura 18). Levando-se em consideração o valor dos pHs luminiais, DSA1 e DSA3 apresentariam plena atividade, enquanto DSA2 teria cerca de 50 a 85% de sua atividade, dependendo da região do ventrículo que é considerada (ver item 3.2).

DSA1 aparentemente é um pouco mais estável a pHs extremos que DSA2 (Figura 19). DSA1 é perfeitamente estável no pH vigente no lúmen pelo menos até um período de três horas.

Uma inativação térmica das enzimas recombinantes a 50°C é mostrada na figura 20. A meia-vida de inativação para DSA1, DSA2 e DSA3 foi, respectivamente, de 115 min, 6 min e 45 min. Quando o mesmo experimento é feito utilizando-se o sobrenadante do conteúdo luminal, obtém-se a mesma curva que a apresentada por DSA1 (resultados não mostrados).

3.12- Propriedades cinéticas das α -amilases de *D. saccharalis*

As enzimas de *D. saccharalis* não foram inibidas pelos inibidores protéicos de feijão α AI1 e α AI2 como esperado, pois eles não atuam sobre enzimas de Lepidoptera devido ao pH do ensaio (Tabela 9) (Franco et al, 2002). DSA1 e DSA2 são inibidas de modo semelhante pelo inibidor de trigo IT1 (SIGMA A1520), que inibe menos DSA3 do que as duas outras amilases. IT3 (SIGMA A3535) é o único inibidor que tem efeito variado nas três enzimas, não afetando DSA1 e causando a maior inibição em DSA2 (ver tabela 9). A atividade dos inibidores do trigo contra α -amilases de lepidópteros já tinha sido descrita na literatura (Marwick *et al*, 1996; Gutierrez *et al*, 1993).

As enzimas de mamífero foram utilizadas como controle para verificar se a ação dos inibidores era a esperada. A amilase pancreática de porco é inibida pelo α AI1 (Konkiekolo et al, 1999) e não é inibida pelo α AI2 (Franco et al, 2002). Não conseguimos observar nenhuma inibição com os inibidores de feijão testados. O resultado obtido com a amilase salivar humana está de acordo com o descrito por Franco e colaboradores (2002), porém esse resultado é controverso pois também pode ser observado na literatura a sua inibição por ambos os inibidores de feijão (LeBerre et al, 1998). Foi observada a inibição das α -amilases de mamífero pelos inibidores de trigo IT1 e IT3, como esperado (Franco et al, 2002).

A afinidade apresentada pelas várias enzimas aos diferentes substratos não difere muito (Tabela 10). Os Kms para amido e glicogênio não diferem em nenhuma das amilases. Somente quando amilose é utilizada, um Km um pouco menor é observado para DSA2 e DSA3 e um pouco maior para DSA1.

O grau de ataque múltiplo apresentado pelas enzimas DSA1, DSA2 e DSA3 é bastante baixo (2,0; 1,5 e 0,8; respectivamente). Esses valores indicam que DSA1 e DSA2, em média, clivam 3 ligações quando há a formação do complexo enzima substrato, enquanto DSA3 cliva 2. Esses valores classificam essas amilases como liquefadoras. Essas enzimas são assim chamadas porque decrescem rapidamente o peso molecular do polímero e portanto a viscosidade da solução. As amilases que clivam várias ligações a cada formação do complexo enzima-substrato são chamadas de sacarificantes.

Quanto ao padrão de ação, as α -amilases de *D. saccharalis* são mais semelhantes as de *R. americana* (Diptera) do que as de *Sitophilus* (Coleoptera) ou mesmo a do Lepidoptera *B. mori* (ver introdução).

A partir da hidrólise do amido, DSA1 produz predominantemente maltose, maltotriose e maltotetraose, enquanto DSA2 forma, aparentemente maltotriose e maltotetraose (Figura 21). Enzimas que geram altas quantidades de maltose e maltotetraose supostamente possuem cinco sub-sítios para ligação de glicose (-3 a +2), o que foi muitas vezes confirmado por determinação da estrutura por raios X da enzima complexada a um oligossacarídeo ou inibidor e em alguns casos um sexto sub-sítio, na posição +3 pode ocorrer (ver McGregor et al, 2001). Desse modo, pelos resultados obtidos, DSA1 deve ter pelo menos 5 e DSA2 talvez tenha 6 sub-sítios de ligação de glicose.

3.13- Modelagem molecular de DSA1

Dados sobre estrutura tridimensional são encontrados principalmente para as amilases dependentes de Cl^- . Das 20 amilases que tiveram sua estrutura resolvida só são independentes de cloreto aquelas encontradas em cevada (*Hordeum vulgare*, GenBank AAA32929.1) e algumas de fungos e bactérias. Nenhuma amilase animal independente de cloreto teve sua estrutura resolvida.

A sequência de aminoácidos da proteína DSA1 de *D. saccharalis* foi analisada com o programa Signal IP (Nielsen, 1997), disponível no ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org), para predição de possíveis regiões de clivagem para peptídeo sinal. Foi previsto uma região de 16 aminoácidos que seria referente a um possível peptídeo sinal.

A sequência da α -amilase sem a porção referente ao peptídeo sinal previsto teve seu modelo estrutural gerado por homologia, com o uso do SWISS-MODEL Protein Modelling Server (<http://swissmodel.expasy.org>), nas condições padrão do programa. O modelo foi gerado baseado na estrutura das α -amilases de *T. molitor* e pancreática de porco. Os códigos das estruturas resolvidas e depositadas no formato de arquivo pdb que foram usadas na comparação são: 1viwA, 1jae, 1clvA,

1tmqA e 1ose. O modelo gerado foi analisado com o uso do programa Swiss-PdbViewer está apresentado na Figura 22.

A modelagem mostra que há grande identidade na estrutura geral das três enzimas, e os locais onde esta estrutura difere não são regiões críticas para a estabilidade e/ou função da enzima, tais como sítio ativo, sub-sítios de ligação do substrato, sítio de ligação de cloreto ou cálcio.

Entretanto, diferenças em menor escala podem ocorrer, tais como as relacionadas ao elevado pH ótimo da enzima de *D. saccharalis* em relação à de *T. molitor* e a ausência de ativação por cloreto na amilase da *D. saccharalis*.

3.14- Comparação entre as seqüências das α -amilases de insetos

A maioria das seqüências completas de α -amilases de insetos depositados em bancos de dados foram utilizadas para obter-se um cladograma, que está apresentado na Figura 23. Quando no banco de dados havia muitas seqüências pertencentes a um só gênero, elas não foram utilizadas.

Se o cladograma é feito incluindo a seqüência da α -amilase de *Spodoptera frugiperda* semelhante a transportador de aminoácidos de mamíferos (Ferreira et al, 2007), essa seqüência fica completamente separada das outras, indicando que ela realmente é uma proteína diferente de todas as outras α -amilases de insetos já seqüenciadas.

No cladograma apresentado na Figura 23, as seqüências de α -amilase de *Eurogryphus maynei* e de *Dermatophagoides pteronyssinus*, que são ácaros, foram utilizados para servirem de grupo externo.

As ordens principais estão agrupadas, principalmente os Coleoptera e os Lepidoptera. Entre os últimos, somente a separação da amilase de *S. frugiperda* de DSA1 e DSA3 não é confiável, uma vez que o valor da “bootstrap” é baixa (49). Por esse cladograma, DSA1 e DSA3 são mais semelhantes entre si e entre as demais amilases de Lepidoptera do que DSA2. A maior semelhança entre DSA1 e DSA2 já era esperada pela comparação das seqüências apresentada na Tabela 2. Entretanto, o resultado obtido em relação aos demais Lepidoptera não era tão evidente.

4- Considerações Gerais

Nesse trabalho nós clonamos três cDNAs que codificam α -amilases a partir da biblioteca de expressão feita com material proveniente do intestino médio da larva de *Diatraea saccharalis*. As respectivas proteínas foram expressas em sistema heterólogo, apresentando propriedades distintas. Quando o sobrenadante do conteúdo luminal do intestino da larva de *D. saccharalis* é submetido a uma cromatografia líquida em alta pressão (Resouse Q – Pharmacia), três atividades enzimáticas são separadas.

Esses resultados indicam que nós fomos capazes de obter de forma recombinante, todas as amilases expressas no intestino da larva criada nas condições descritas anteriormente, que podem ser utilizadas em estudos futuros.

Nós tentamos comparar algumas de suas propriedades com o intuito de desvendar qual o papel que poderia ser exercido por cada uma dessas enzimas.

Pelo menos nas características analisadas por nós não há diferenças marcantes e outros estudos precisam ser feitos para elucidar se essas enzimas desempenham um papel distinto no intestino médio da larva de *D. saccharalis*.

5- Conclusão

O intestino médio da larva *D. saccharalis* criada em dieta artificial expressa três amilases, sendo uma delas predominante.

A partir de uma biblioteca de expressão feita com o epitélio do intestino médio da larva de *D. saccharalis* é possível obter três cDNAs que codificam três amilases diferentes, chamadas DSA1, DSA2 e DSA3.

A amilase predominante no intestino médio da larva criada em dieta artificial é DSA1.

As três amilases recombinantes foram expressas e apresentam massas moleculares similares (em torno de 54.500 kDa) e pIs teóricos que variam entre 5,53 e 6,44.

As três amilases hidrolisam amido, amilose e glicogênio com afinidades semelhantes, possuem o pH ótimo entre 8.0 e 9.0 e apresentam baixa processividade (entre 0,8 e 2).

6- Bibliografia

- Aghajari N., Feller G., Gerday C., Haser R. (2202) Structural basis of α -amylase activation by chloride. *Protein Sci.* 11, 1435-1441.
- Allouch J., Hebert W., Henrissat B., Czizek M. (2204) Parallel substrate binching sites in a beta-agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose. *Struture* 12, 623-632.
- Adeola O., Bedford M.R. (2004) Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for white pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *Brit. J. Nutrition.* 92, 87-94.
- Berembaum M. (1980) Adaptative significance of midgut pH in larval Lepidoptera *Am. Natur.* 115, 138-146.
- Bernays E.A., Chamberlain D.J., Leather E.M. (1981). Tolerance of acridids to ingested Condensed tannin. *J. Chem. Ecol.* 7, 247-256.
- Blum H., Beir H., Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bolognesi R., Ribeiro A.F., Terra W.R., Ferreira C. (2001) The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 62-75.
- Bozonnet S., Jensen M.T., Nielsen M.N., Aghajari N., Jansen M.H., Kramhoft B., Willemoes M., Tranier S., Haser R., Svensson B. (2007) The pair of sugar tongs' site on the non – catalytic domain C of barley α -amylase participates in substrate binding and activity. *FEBS L.* 274, 5055-5067.

- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brayer G.D., Luo Y., Withers S.G. (1995) The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*, 4, 1730-1742.
- Buonocore V., Poerio E., Silano V., Tomasi M. (1976) Physical and Catalytic Properties of alpha-amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Biochemical Journal* 153, 621-627.
- Carlini C.R., Grossi-de-Sá M.F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potencialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.
- Claeys I., Simonet G., Breugelmans G., Soest S., Franssens V., Sas F., Loof A., Broeck J. (2005) Quantitative real-time RT-PCR analysis in desert locusts reveals phase dependent differences in neuroparsin transcript levels. *Insect Molec. Biol.* 14, 415–422.
- Coutinho P.M., Henrissat B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes An integrated database approach. In “Recent advances in carbohydrate bioengineering.” H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat, B. Svensson. Ed. The Royal Society of chemistry, Cambridge, pp 3-12.
- D’Amico S., Genday C., Feller G. (2000) Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α -amylases. *Gene*. 253,95-105.
- Davies G.J., Wilson K.S., Henrissat B. (1977) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem.* 321, 557-559.

- Edwin B., Hillier L., Wendl M., Green P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.
- Ferreira C., Capella A.N., Sitnik R., Terra W.R. (1994) Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 299-313.
- Ferreira A.H.P., Cristofolletti P.T., Lorenzini D.M., Guerra L.O., Paiva P.B., Briones M.R.S., Terra W.R., Ferreira C. (2007) Identification of midgut microvillar proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* by cDNA library screenings with antibodies. *J. Insect Physiol.* 53, 1112-1124.
- Edwin B., Hillier L., Wendl M., Green P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.
- Edwin B., Green P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-194.
- Falco M.C., Marbach P.A., Pompermayer P., Lopes F.C.C., Silva Filho M.C. (2001) Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Gen. Mol. Biol.* 24, 113-122.
- Fox L.R., Macauley B.J. (1977) Insect grazing on *Eucalyptus* in response to variation in leaf tannins and nitrogen. *Oecologia.* 29, 125-143.
- Franco O.L., Daniel J.R., Melo F.R., Bloch Jr C., Silva C.P., Grossi-de-Sá M.F. (2000). Activity of wheat α -amilase inhibitors towards bruchid α -amilases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267, 2166-2173.

- Franco O.L., Daniel J.R., Melo F.R., Grossi-de-Sá M.F. (2002). Plant α -amilase inhibitors and their interaction with insect α -amilases. *Eur. J. Biochem.* 269, 397-412.
- Gallo D., Nakano O., Silveira Neto S., Carvalho R.P.L., Batista G.C., Berti Filho E., Parra J.R.P., Zucchi R.O., Alves S.B., Vendramin J.D. (1988) *Manual de Entomologia agrícola*. Editora Agronômica Ceres. 649 pp.
- Genta F.A., Dumont A.F., Marana S.R., Terra W.R., Ferreira C. (2007) The interplay of processivity, substrate inhibition and a secondary substrate binding site of an insect α -D-glucanase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1774, 1079-1091.
- Guex N., Peitsch M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. (2003) Microbial α -amilase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38, 1599-1616.
- Gutierrez C., Garcia Casado G., Sanchez Monge R., Gomez L., Castanera P., Salcedo G. (1993) Inhibitor types from wheat endosperm are differentially active against α -amylases of Lepidoptera pests. *Entomol. Experim. Applicata* 66, 47-52.
- Hilder V.A., Boulter D. (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protec.* 18, 177-191.
- Hori K. (1972) Comparative study of a property of salivary amylase among various heteropterous insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 42B, 501-508.
- Janecek S., Svensson B., Henrissat B. (1997) Domain evolution in the α -amylase family. *J. Mol. Evol.* 45, 322-331.

- Janecek S. (2002) How many conserved sequence regions are there in α -amylase family? *Biologia Bratislava* 57 (suppl 11), 29-41.
- Jordão B.P., Capella A|.N., Terra W.R., Ribeiro A.F., Ferreira C. (1999) Nature the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45, 29-37.
- Koukiekolo R, Le Berre-Anton V, Desseaux V, Moreau Y, Rougé P, Marchis-Mouren G, Santimone M. (1999) Mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. *Eur J Biochem.* 265, 20-26.
- LeBerre A. V., Nahoum V., Santimone M. (1998) Interaction of the bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors with human α -amylase: structuram and funcional aspects. *Recent Advances of Reseach in Antinutritional Factor in Legume Seeds and Rapessed* 93, 131-135.
- Lourenço A.P., Zufelato M.S., Bitondib M.M.G., Simões Z.L.P. (2005) Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. and Molec. Biol.* 35, 541–552.
- Lowe T. (1994) A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* 18, 1757-1761.
- MacGregor A. (2005) An overview of cln GH-H and distantly related families. *Biologia Bratislava* 60, suppl 16, 5-12.
- Markwick N.P., Laing W.A., Christeller J.T., Reid S.J., Newton M.R. (1996) Alpha-amylase activities in larval midgut extracts from four species of Lepidoptera (Tortricidae and Gelechiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and *Streptomyces*. *J. Econ. Entomol.*, 89, 39-45.

- Markwick N.P., Laing W.A., Christeller J.T., Mchenry J.Z., Newton M.R. (1998) Overproduction of digestive enzymes compensates for inhibitory effects of protease and alpha-amylase inhibitors fed to three species of leafrollers (Lepidoptera : Tortricidae) J. Econ. Entomol., 91, 1265-1276.
- Mc Gregor E.A., Janecek S., Svensson B. (2001) Relationships of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. Biochim. Biophys. Acta 1546, 1-20
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10, 1-6.
- Nielsen J.E., Borchert T.V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amilases. Biochim. Biophys. Acta 1543, 253-274.
- Noelting G., Bernfeld P. (1948). Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amilase. Helv. Chim. Acta 31, 286-290.
- Numao S., Maurus r., Sidhu G., Wang Y., Overall M., Brayer G.D., Withers S.G. (2002) Probing the role of the Chloride ion in the mechanism of human pancreatic α -amylase. Biochemistry. 41, 215-225.
- Palander S., Nasi M., Jarvinen S. (2005) Effect of age of growing turkeys on digest viscosity and nutrient digestibility of maize, wheat, barley and oats fed as such or with enzyme supplementation. Arch. An. Nutrition 59, 191-203.
- Parra J.R.P., Mishfeldt L.J. (1992). Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer, In: Anderson, T.E., Leppla, N.C., (Eds), Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management, Westview Press, Boulder, CO.

- Parra J.R.P., Patermiani E., Marcos Filho J. e Machado Neto R. (2002). Ária of Agrarian sciences. In Science in Brazil, organized by Carvalho A.C.C., Campos D.A. e Bevilacqua L. Academ. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro.
- Peitsch M.C. (1995) Protein modeling by E-mail. BioTechnol. 13, 658-660.
- Qian M., Ajandouz E.H., Payan F., Nahoum V. (2005) Molecular basis of the effects of chloride ion on the acid-base catalyst in the mechanism of pancreatic α -amylase. Biochem. 44, 3194-3201.
- Robyt J.F., French D. (1967) Multiple attack hypothesis of amylase action. Action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* α -amylases. Arch. Biochem. Biophys., 122, 8-16.
- Sambrook J., Fristch E.F. & Maniatis T. (1989) Molecular cloning - A laboratory manual. 2 Ed., Sprig Harbor.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res. 31, 3381-3385.
- Silva C.P., Terra W.R., Sá M.F.G., Samuels R.I., Isejima E.M., Bifano T.D., Almeida J.S. (2001) Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus*(Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. J. of Insect Physiol. 47, 1283-1290.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- Stahl E. (1969) Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Berlin: Springer-Verlag. Sambrook J., Fristch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning - A laboratory manual. 2 Ed., Sprig Harbor.

- Strobl, S., Gomis-Ruth, E.-X., Maskos K., Frank, G., Huber, R., Glockshuber, R. (1997). The α -amylase from the yellow meal worm. Complete primary structure, cristallization and preliminary X-ray analysis. FEBS Lett. 409, 109-114.
- Strobl S., Maskos K., Wiegand G., Huber R., Gomis-Rüth F.X. e Glockshuber R. (1998) A novel strategy for inhibition of alpha-amylases: yellow meal worm α -amilase in complex with the RAGI bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. Struct. Folding 6, 911-921.
- Svensson B., Jensen M.T., Mori H., Bak-Jensen K.S., Bonsager B., Nielsen P.K., Kramhoft B., Pretorius-Ibba M., Mohr J., Juga N., Greffe L., Williamson G., Drigues H. (2002) Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glicoside family 13. Biologia Bratislava 57. Suppl 11, 5-19
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) Mega 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molec. Evol. 24, 1596-1599.
- Terra W.R., Ferreira C., Bianchi A.G. (1977) Action pattern, Kinetical properties and eletrophoretical studies af an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 56B, 201-209.
- Terra W.R., Ferreira C., De Bianchi A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic space and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. J. Insect. Physiol. 25, 487-494.
- Terra W.R., Ferreira C. (1981) The physiological role of the perithophic membrane and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. J. Insect. Physiol. 27, 325-331.

- Terra W.R., Lemos F.J.A., Jordão B.P. (1990) Enzyme depletion in insect feeding experiments: Fact or artifact? *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 59-61.
- Terra W.R., Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra W.R. (1998) Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 181-200.
- Terra W.R., Ferreira C. (2003) Digestive systems. In *Encyclopedia of Insects*. Ed. by Resh V.H., Cardé R.T.. Academic Press, New York. 313-326.
- Terra W.R., Ferreira C. (2005) Biochemistry of digestion. In In Gilbert L. I., Iatov K. e Gill S. (eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology*. Vol. 4, Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Oxford.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Warchalewski J.R., Gralik J., Winiecki Z., Nawrot J., Piasecka-Kwiatkowska D. (2002). The effect of wheat α -amilase inhibitors incorporated into wheat-based artificial diets on development of *Sitophilus granaries* L., *Tribolium confusum* Duv., and *Ephestia kuehniella* Zell. *J. Appl. Entomol.* 126, 161-168.
- Yamagata H. Kunimtsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T. (1998) Rice bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor: characterization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 978-985.

Zechel D.L., Withers S.G. (2000) Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* 33, 11-18.

Curriculum

DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Offenbecker Guerra

Local e data de nascimento: São Paulo, 27 de maio de 1982.

EDUCAÇÃO

Colégio Benjamin Constant, São Paulo, 1999.

Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2003, Bacharel em Ciências Biológicas.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, FAPESP, 2004 a 2006.

Pesquisador, Allergisa Pesquisa Dermatocosmética LTDA. 2006 até hoje.

PUBLICAÇÕES

Artigos Publicados

A.H.P. Ferreira, P.T. Cristofolletti, D.M. Lorenzini, L.O. Guerra, P.B. Paiva, M.R.S. Briones, W.R. Terra and C. Ferreira, Identification of midgut microvillar proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* by cDNA library screenings with antibodies, *Journal of Insect Physiology* (2007), doi:10.1016/j.jinsphys.2007.06.007

Resumos publicados em anais de congressos

GUERRA, L. O.; Marana S.; Genta F.A.; Ferreira, A. H. P. ; Ferreira, C. ; Terra, W. R.. Expression of two different alpha-amylases from *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera). In: XXXIV Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambú. XXXIV Reunião Anual Resumos, 2004.

GUERRA, L. O.; Ferreira, A. H. P. ; Ferreira, C. ; Terra, W. R. . Cloning and Sequencing Different Digestive alpha-Amylases from *Diatraea saccharalis*. In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambú. XXXIII Reunião Anual Resumos, 2004.

Ferreira, A. H. P. ; GUERRA, L. O. ; Terra, W. R. ; Ferreira, C. ; Paiva, P. B. ; Briones, M. R. S. . Identification of cDNAs encoding for proteins associated with microvillar membranes from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera) midgut. In: XXXII Reunião Anual da SBBq, 2003, Caxambú. XXXII Reunião Anual Programa e Resumos, 2003.

Ferreira, A. H. P. ; GUERRA, L. O. ; Terra, W. R. ; Ferreira, C. . Cloning cDNAs encoding for microvillar membrane proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* midgut. In: XXXI Reunião Anual da SBBq, 2002, Caxambú. XXXI Reunião Anual Programa e Resumos, 2002.

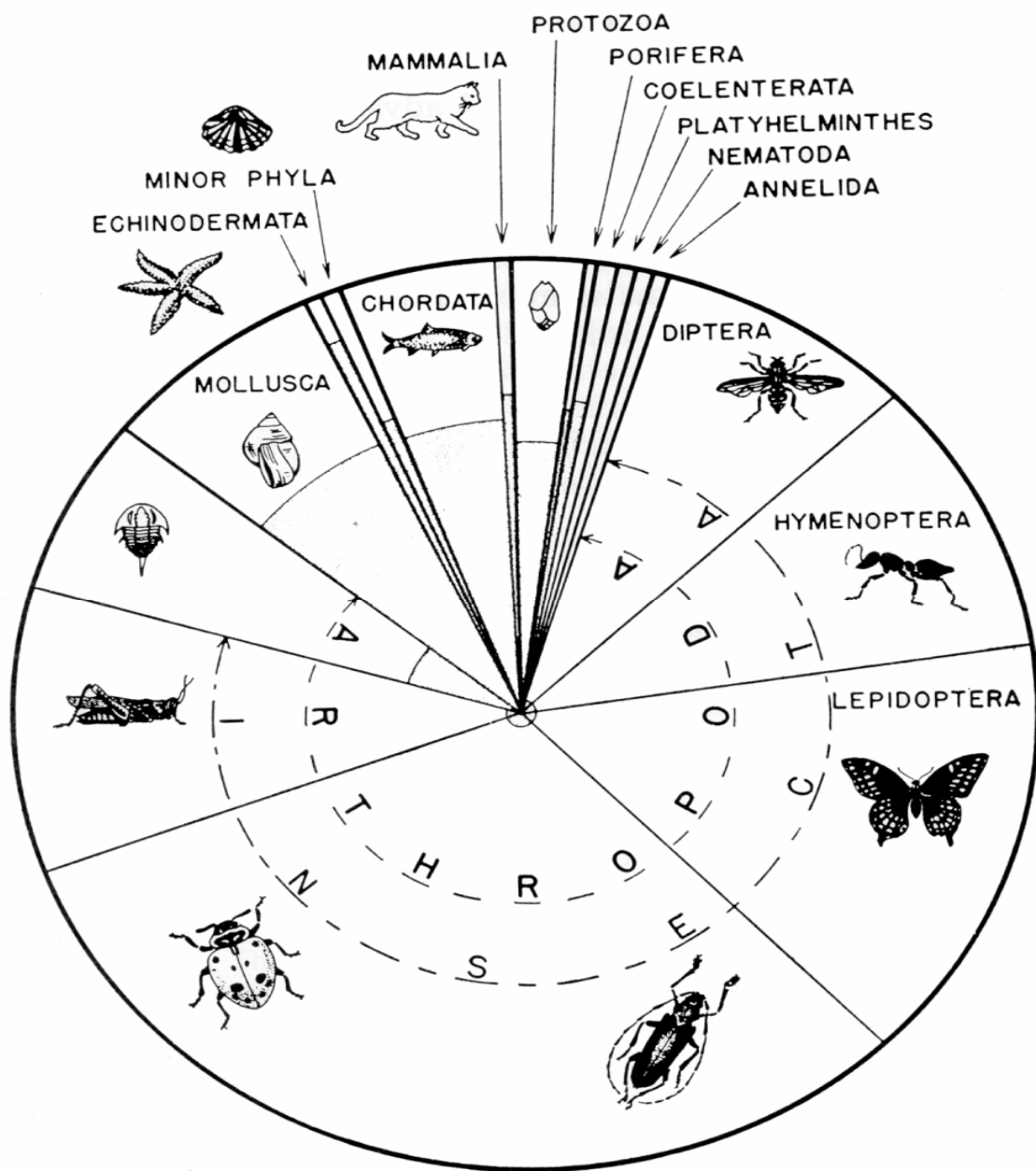


Figura 1 – Distribuição relativa do número de espécies em diferentes grupos animais.

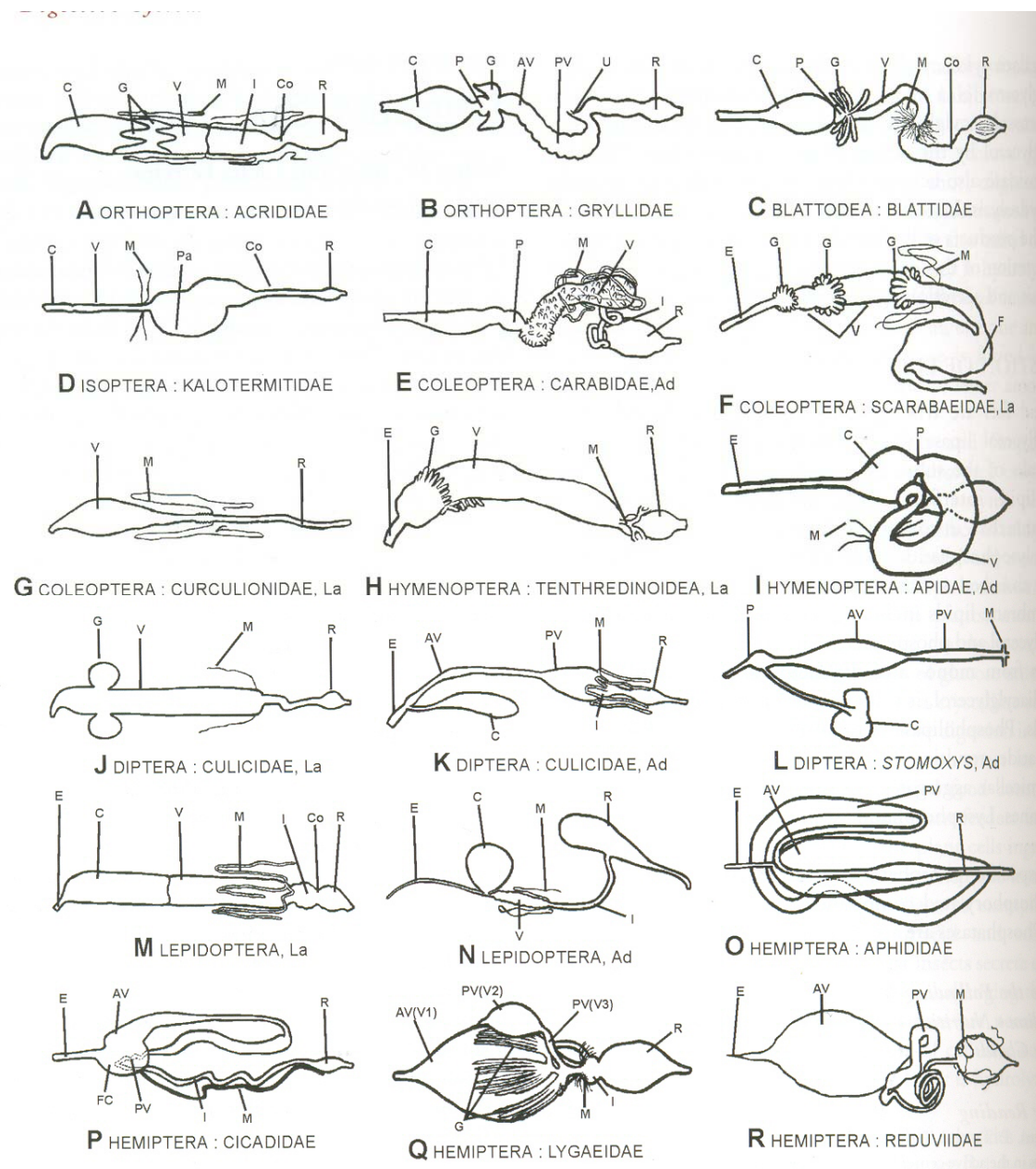


Figura 2- Morfologia do tubo digestório de diferentes insetos. AV, ventrículo anterior; C, papo; Co, cólon; E, esôfago; G, cecos gástricos; M, túbulos de Malpighi; PV, ventrículo posterior; R, reto; V, ventrículo. Retirado de: Terra e Ferreira (2005)

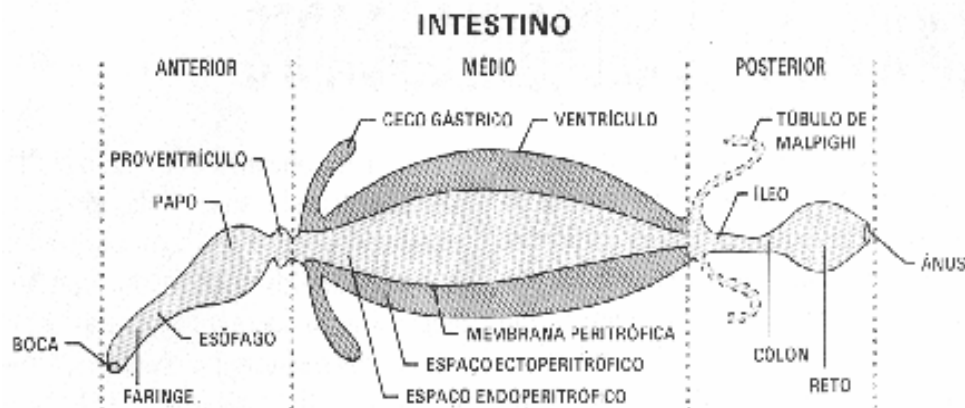


Figura 3- Esquema de um tubo digestivo geral de inseto (tirado de Terra e Ferreira, 2005). Nos Lepidoptera não há papo e o intestino médio é um cilindro com diâmetro regular, sem cecos gástricos.

Tabela 1- Efeito de diferentes dietas na atividade de α -amilase e no crescimento das larvas de *D. saccharalis*¹.

	Controle	+ amido 1%	+ amido 2,5%	com 50% sacarose + 2,5% amido
Massa (mg/animal)	165±20	178±46	135±26	145±33
Nº de mortos	5	9	8	5
Nº de larvas	24	20	20	22
Nº de pupas	1	1	2	3
Amilase (um/animal) – A ²	25±1	12±1	7,5±1	11±2
Amilase (um/animal) – B ²	40±8	70±7	100±10	110±4

1- 30 larvas recém eclodidas foram colocadas nas diferentes dietas e permaneceram por 30 dias antes de serem analisadas.

2- A atividade de amilase foi determinada no sobrenadante do conteúdo luminal mais membrana peritrófica homogeneizado em água (A) ou em tampão pH 6,0 (B).

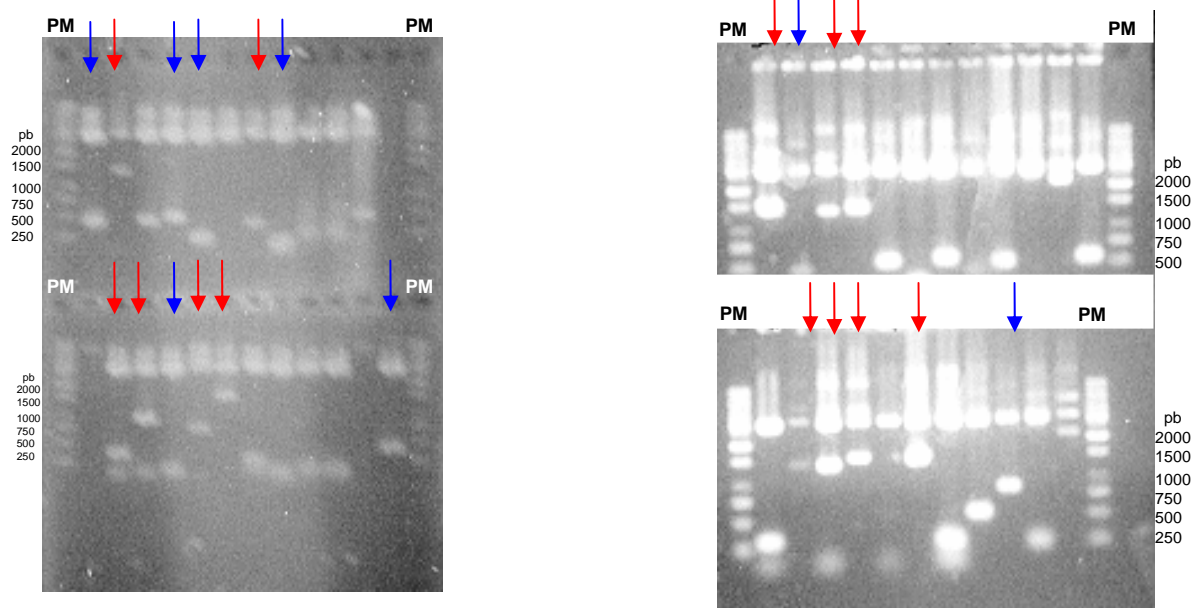


Figura 6- Eletroforese do produto de digestão de plasmídeos mais inserto com EcoRI para seleção dos clones. Setas vermelhas indicam os clones selecionados por tamanho e as azuis os escolhidos aleatoriamente.

Tabela 2- Porcentagens de identidade/similaridade entre DSA1(AAP92665.1), DSA2 (AAP97393.1) e DSA3 (AAP97394.1). Elas foram comparadas com outras α -amilases de insetos cujas sequencias encontram-se depositadas no GenBank, sendo: lepidópteros (*O. nubilaris* e *Spodoptera frugiperda* - AAO13754.1 e *Bombyx mori* - AAA17751.1), díptero (*Anopheles gambiae*), coleóptero (TMA-*Tenebrio molitor* - Swissprot PS6634). Também foram usadas as α -amilases pancreática de porco (PPA), salivar humana (HSA) e pancreática humana (HPA).

	DSA1	DSA2	DSA3
DSA1	———	75 / 85	95 / 97
DSA2	75 / 85	———	75 / 85
DSA3	95 / 97	75 / 85	———
<i>O. Nubilaris</i>	82 / 90	75 / 86	81 / 89
<i>S. frugiperda</i>	79 / 89	72 / 82	79 / 89
<i>Bombix mori</i>	75 / 85	67 / 80	75 / 85
<i>A. gambiae</i>	63 / 76	61 / 74	63 / 76
TMA	60 / 75	61 / 76	60 / 75
PPA	55 / 69	51 / 67	55 / 68
HSA	54 / 68	50 / 65	53 / 67
HPA	52 / 66	49 / 65	52 / 68


```

DSA1  GTTGGTAATGATGGTCGTGCTCACATATCCGTTGGAGCCAATGACTACGATATGATGCTTGCTATTTCATAGGGGTGATCAGTCAAGACTG
DSA3  GTTGGTAACGACGGTCGTGCTCACATCTCCGTTGGAGCTAATGACTACGATATGATGCTTGCCATTACAGGGGTGATGAGTCGAGGTTG
DSA2  GTTGGCAATGACGGGCGCGCGATTATTAATGTCGGTGCCCTTGACTACGATATGATGCTGGCCATACACATTGGAAGTGAAGTCTGTCTT
      ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * *
DSA1  TAACATCAGAATTTGAGGAATCAAGACAACACTTCACAATAAATGCACTCAAAAATCG-----
DSA3  TAACTTTCATCAGTGTTTTGAAGAAACAAGACTACAAACATATTCAGAATAAAATGTATTCGCATATCGAAAAAAA-----
DSA2  TGATCCTGTTCAAATTGGCTGAAAAATATCTAACTTTGATGCAACGTATAATGGAAATAAAATTTATTGATCAATACTTAAACCTCGTGC
      * *                * * * * * *

```

Figura 7- Alinhamento da porção 5' das sequências das α -amilases parcialmente clonadas. Em vermelho está a região não codificante. Negrito indica o stop códon. Regiões grifadas foram usadas para desenho de iniciadores específicos.

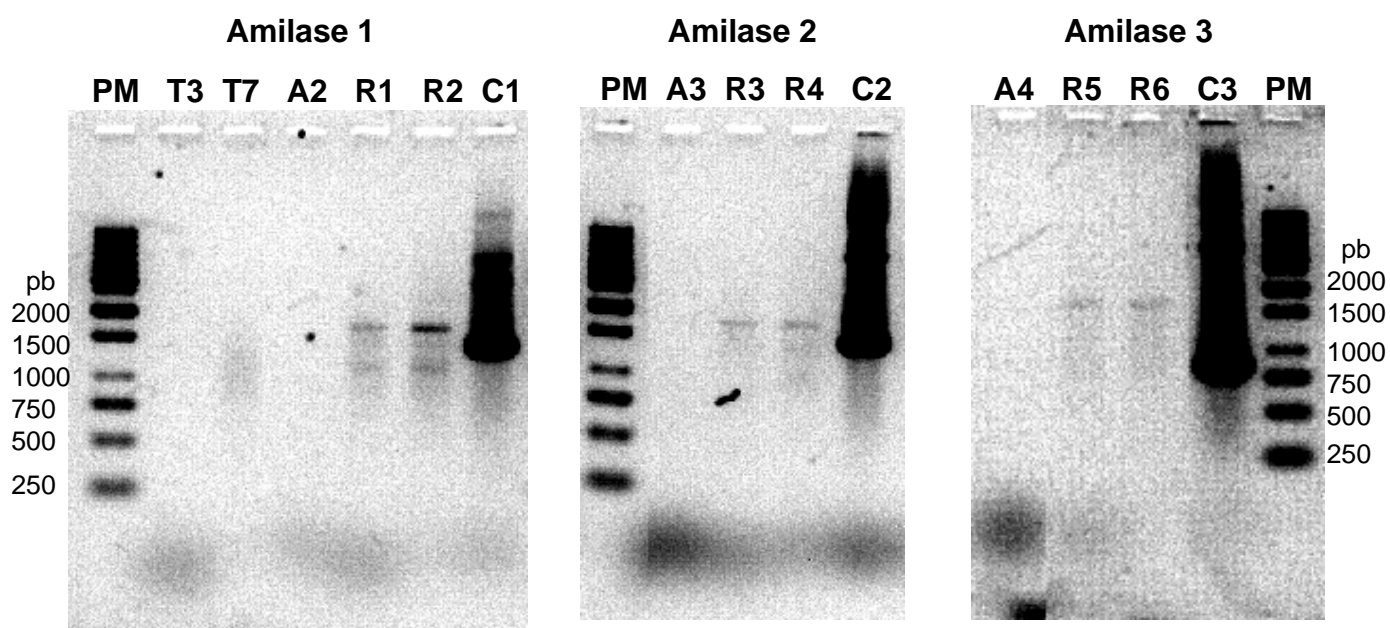


Figura 8- Eletroforese dos produtos de PCR realizados com iniciadores específicos para cada sequência de α -amilase. T3, T7, A2, A3 e A4, controles usando somente iniciador indicado. C1, C2, C3: controles usando como molde o respectivo fragmento de cDNA e como iniciadores C1, C2 ou C3 mais SP6. R1 a R6, amplificação usando como molde a biblioteca de *D. saccharalis*. R1 R3 e R5, iniciador T3 mais respectivamente os iniciadores A2, A3 e A4. R2, R4 e R6, iniciador T7 mais, respectivamente, os iniciadores A2, A3 e A4. PM, marcador de massa molecular.

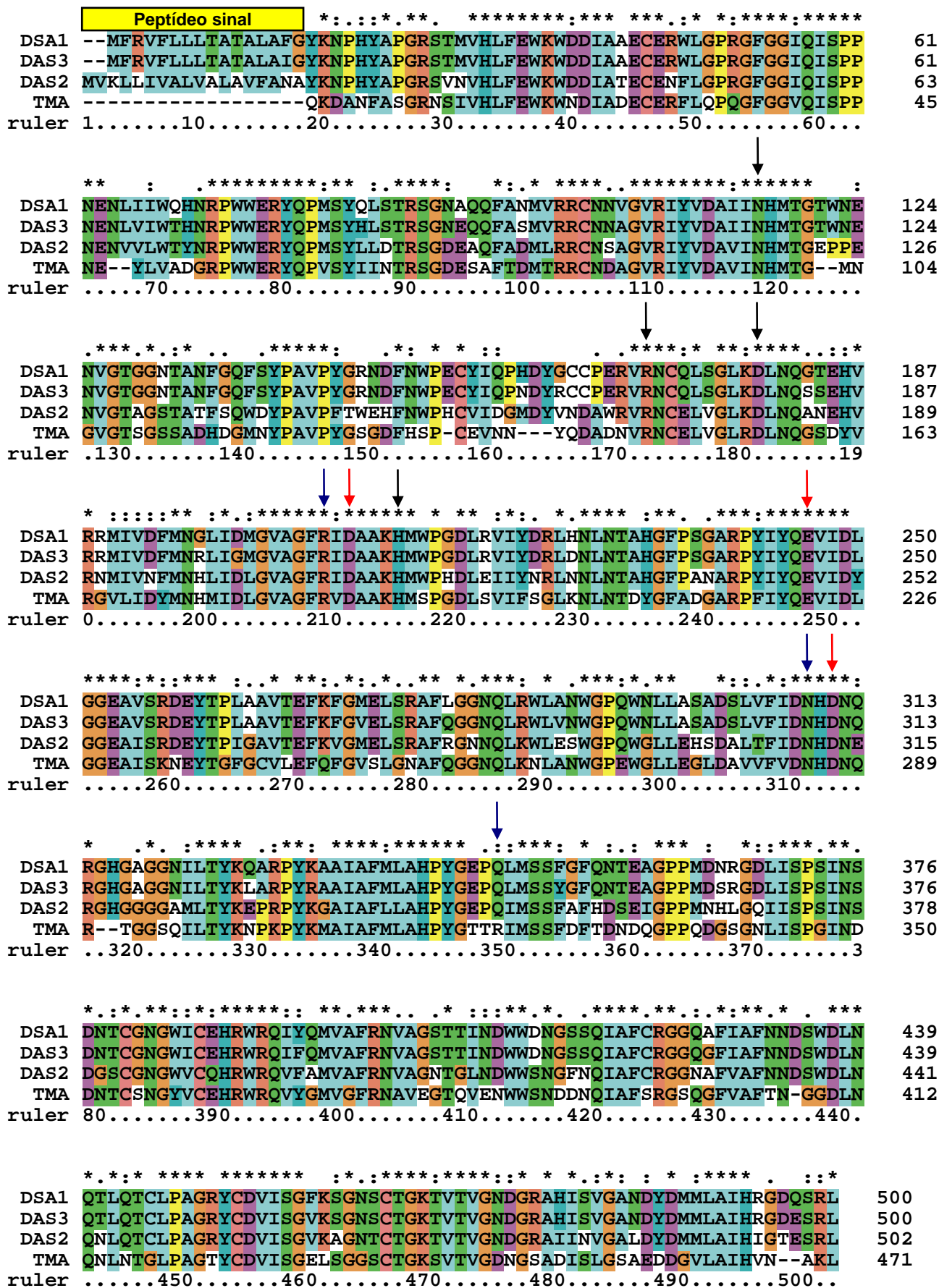


Figura 9- Alinhamento das seqüências de aminoácidos das α -amilases de *D. saccharalis* (DSA) e *T. molitor* (TMA, proteína madura). Setas vermelhas indicam os resíduos catalíticos; setas pretas os resíduos ligantes de Ca^{++} e as setas azuis os resíduos ligantes de Cl^- . Caixa amarela indica região do peptídeo sinal.

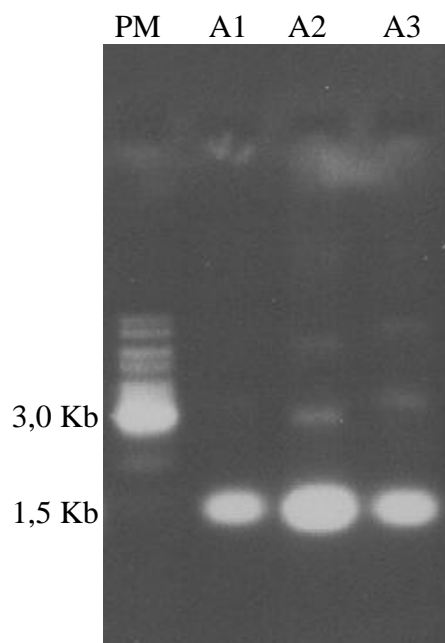


Figura 10- Eletroforese em agarose 1% de produtos de PCR. MW-marcadores de peso molecular. A1, A2 e A3 – produtos de PCR usando iniciadores de expressão e moldes específicos para DSA1, DSA2 e DSA3, respectivamente.

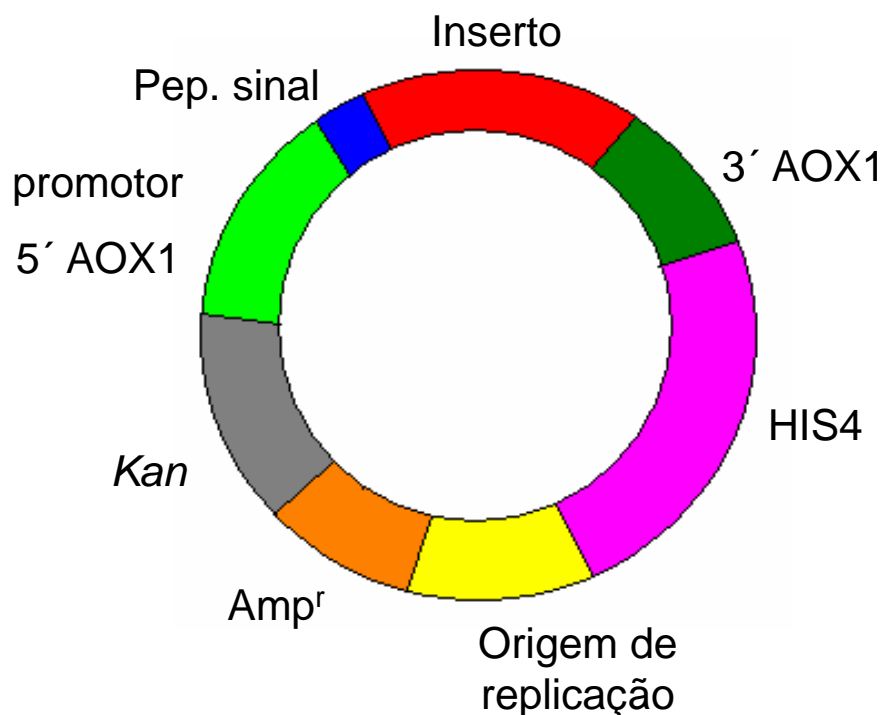


Figura 11 – Representação esquemática dos plasmídeos de expressão construídos. AOX1, gene codificante da Álcool oxidase. HIS4, gene para síntese do aminoácido histidina. Amp^r, gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Kan gene de resistência ao antibiótico kanamicina (gene modificado que congere resistência a geneticina para leveduras). Pep. Sinal, peptídeo sinalizador para expressão da proteína recombinante expressa.

	DSA1						DSA2
	dia 1		dia 3		dia 5		dia 5
nº clone	MM	MR	MM	MR	MM	MR	MR
1	6	8	212	344	645	507	3
2	13	28	353	560	1072	561	0
3	11	5	208	417	564	458	3
4	4	6	319	366	581	391	0
5	6	11	257	382	565	567	8
6	8	12	306	508	748	549	29
7	9	31	305	461	724	1127	8
8	9	32	284	798	518	1112	0
9	9	6	451	293	541	349	9
10	0	6	195	253	137	100	0
11	0	5	106	305	111	152	0
12	0	7	125	351	135	236	1
13	0	2	131	249	198	128	36
14	0	11	99	392	124	150	14
15	0	13	165	461	201	277	0
16	0	21	191	830	154	169	3
17	0	1	113	231	60	0	0
18	0	9	36	385	42	2	0
19	0	0	80	152	47	19	0
20	3	6	243	351	47	60	0

Tabela 3- Amilase (mU/mL) presente no meio de cultura mínimo (MM) ou rico (MR), aonde cresciam células de *P. pastoris* transformadas com cDNA codificante de DSA1 ou DSA2 após indução. Os clones transformados com cDNA codificante de DSA2 só apresentaram atividade significativa após 5 dias de indução em meio rico. Em vermelho estão indicados os clones selecionados para maxi-indução.

Atividade Específica (mU/mg)			
	DSA1 MM	DSA1 MR	DSA2 MR
dia 1	6,69	3,55	0,37
dia 2	5,70	4,01	0,21
dia 3	8,23	3,88	0,15
dia 4	8,27	3,91	0,14
Atividade Enzimática (mU/mL)			
dia 1	161	312	27
dia 2	215	457	19
dia 3	471	540	17
dia 4	559	646	16

Tabela 4- Atividade e atividade específica de amilases expressas em células de *P. pastoris* crescidas em meio mínimo (MM) ou em meio rico (MR). DSA2 em meio mínimo não aparece na tabela pois não é observada atividade alfa-amilásica.

		MM			MR		
	pH \ dia	1	2	3	1	2	3
DSA1	6,0	0	45	162	23	95	297
	7,0	27	90	333	45	189	594
	8,0	0	0	27	0	0	27
DSA2	6,0	0	0	23	0	23	59
	7,0	9	32	99	14	68	185
	8,0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5- Atividade amilásica (mU/mL) determinado no meio mínimo (MM) e no meio rico (MR) após expressão da enzima. Os meios foram feitos em pHs 6, 7 ou 8 e a atividade foi determinada a cada 24h. Observa-se a maior atividade em pH 7,0 e uma expressão irrisória em pH 8,0. Em vermelho está destacada a condição escolhida para se obter a enzima.



Figura 12- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% do meio de cultura (BMMY) aonde cresciam células de *P. pastoris* transformadas com cDNA que codifica IC1. MW- padrão de peso molecular. 1-9- diferentes clones induzidos por 72h.

A

```

DSA3 CTGAATGTTACATCCAACCTAACGATTACAGGTGCTGCCCTGAACGGGTCCGCAACTGTC
DSA1 CTGAATGTTACATCCAACCTCACGATTATGGATGCTGCCCTGAGCGGGTACGTAACCTGTC
*****
DSA3 AACTCTCCGGTCTAAAAGATTTAAACCAAAGCTCTGAACATGTCCGTCTGAATGATCGTTG
DSA1 AACTCTCCGGTCTAAAAGATTTAAACCAAAGGCACTGAACATGTCCGTCTGAATGATCGTTG
*****
DSA3 ACTTTATGAACCGTCTCATCGGCATGGGCGTTGCTGGATTTAGGATTGACGCGGCAAAGC
DSA1 ACTTTATGAACCGTCTCATTGATATGGGCGTTGCTGGATTCAGGATTGACGCAGCCAAGC
*****

```

B

```

DSA3 AGACTTTACAGACCTGTTTACCTGCCGGTAGATATTGTGATGTGATCTCCGGTGTCAAGA
DSA1 AGACTCTTCAGACTTGTTTACCTGCCGGTAGATATTGTGATGTGATCTCCGGTTTTAAGA
DSA2 AGAATTTACAGACATGTCTCCCAGCAGGCAGATACTGTGACGTCATATCCGGAGTAAAAG
*** * * * *
DSA3 GTGGCAACAGCTGCACAGGCAAGACAGTTACAGTTGGTAACGACGGTCGTGCTCACATCT
DSA1 GTGGCAACAGCTGCACAGGCAAGACAGTGACGGTTGGTAATGATGGTCGTGCTCACATAT
DSA2 CTGGCAACACTTGCACCGGCAAGACGGTGACGGTTGGCAATGACGGGCGCGCGATTATTA
*****
DSA3 CCGTTGGAGCTAATGACTACGATATGATGCTTGCCATTACAGGGGTGATGAGTCGAGGT
DSA1 CCGTTGGAGCCAATGACTACGATATGATGCTTGCTATTATAGGGGTGATCAGTCAAGAC
DSA2 ATGTCGGTGCCCTTGACTACGATATGATGCTGGCCATACACATTGGAAGTGAAGTCGTC
* * * * *
DSA3 TGTAACCTTTCATCAGTGT--TTGAAGAAA--CAAGACTACAAACATATT-CAGAATAAAT
DSA1 TGTAACCTTTCATCAGTGT--TTGAAGAAA--CAAGACTACAAACATATT-CACAATAAAT
DSA2 TTTGATCCTGTTCAAATTGGCTGAAAAATATCTAAGTTGATGCAACGTATAATGGAAAT
* * * * *
DSA3 GTATTTCGCATATCGAAAAA-----
DSA1 GCACTCAAAAATCG-----
DSA2 AAATTTATTGATCAATACTTAAACCTCGTGC
* * * * *

```

Figura 13- Alinhamento parcial das seqüências de nucleotídeos das α -amilases *D. saccharalis*. **A-** parte do alinhamento das duas amilases mais similares (DSA1 e DSA3). Destacadas em azul: regiões onde possíveis iniciadores se anelariam. **B-** porção 3' do alinhamento das três seqüências. Estão destacadas as regiões onde se anelariam os iniciadores para realização de PCR em tempo real. As regiões usadas na construção dos iniciadores utilizados nos experimentos de clonagem estão grifadas.

Gene	organismo	código
DNA polimerase γ	<i>Apis mellifera</i>	XM_393171
DNA polimerase γ	<i>Drosophila melanogaster</i>	NM_079738
DNA polimerase γ	<i>Anopheles gambiae</i>	XM_315205
DNA polimerase γ	<i>Tribolium castaneum</i>	XM_964107
DNA polimerase Δ	<i>Tribolium castaneum</i>	XM_962197
DNA polimerase Δ	<i>Drosophila melanogaster</i>	NM_079375
DNA polimerase Δ	<i>Anopheles gambiae</i>	XM_320778
DNA polimerase Δ	<i>Apis mellifera</i>	XM_623792
DNA polimerase α	<i>Trachemys scripta</i>	AB178526
DNA polimerase α	<i>Drosophila melanogaster</i>	BAA14340
DNA polimerase α	<i>Danio rerio</i>	XP_687096
DNA polimerase α	<i>Gallus gallus</i>	XM_416792
DNA polimerase α	<i>Anopheles gambiae</i>	EAA00974
RPS6	<i>Spodoptera frugiperda</i>	AF429980
RPS6	<i>Manduca sexta</i>	U64795
RPS6	<i>Bombyx mori</i>	AY769320
RPS6	<i>Lysiphlebus testaceipes</i>	AY961549
RPS6	<i>Tribolium castaneum</i>	XM_963302

Tabela 6- Genes dos diferentes organismos escolhidos para alinhamento e posterior desenho de iniciador degenerado para clonagem. São descritos os nomes das proteínas que eles codificam, o nome dos organismos e os respectivos códigos de acesso no banco de dados do NCBI.

Iniciador	Seqüência	Produto	Tm
DNApol_ α	5' ATA GT(G/A/C) CG(G/T/A) (C/A)G(C/A) GA(C/T) TGG T 3'	1550 pb	58-70°C
DNApol_ Δ	5' GA(C/T) AA(A/G) ATG GA(T/C) TGC AA(A/G) GG 3'	850 pb	59-64°C
DNApol_ γ	5' T(A/G)C T(T/A/C)T A(C/T)G ATC C(T/G)G CTT T 3'	1300 pb	53-61°C
RPS6	5' G(C/A)C ACT C(T/A/C)T G(C/T)T ACA GAC C 3'	600 pb	49-61°C

Tabela 7- Iniciadores desenhados para clonar genes constitutivamente expressos de *D. saccharalis*. Estão descritas as seqüências dos iniciadores estando entre parênteses as diferentes bases nas posições degeneradas, o tamanho do produto previsto para uma amplificação por PCR e as faixas de temperatura de anelamento, levando em consideração as possíveis combinações de base (degenerações) de cada iniciador.

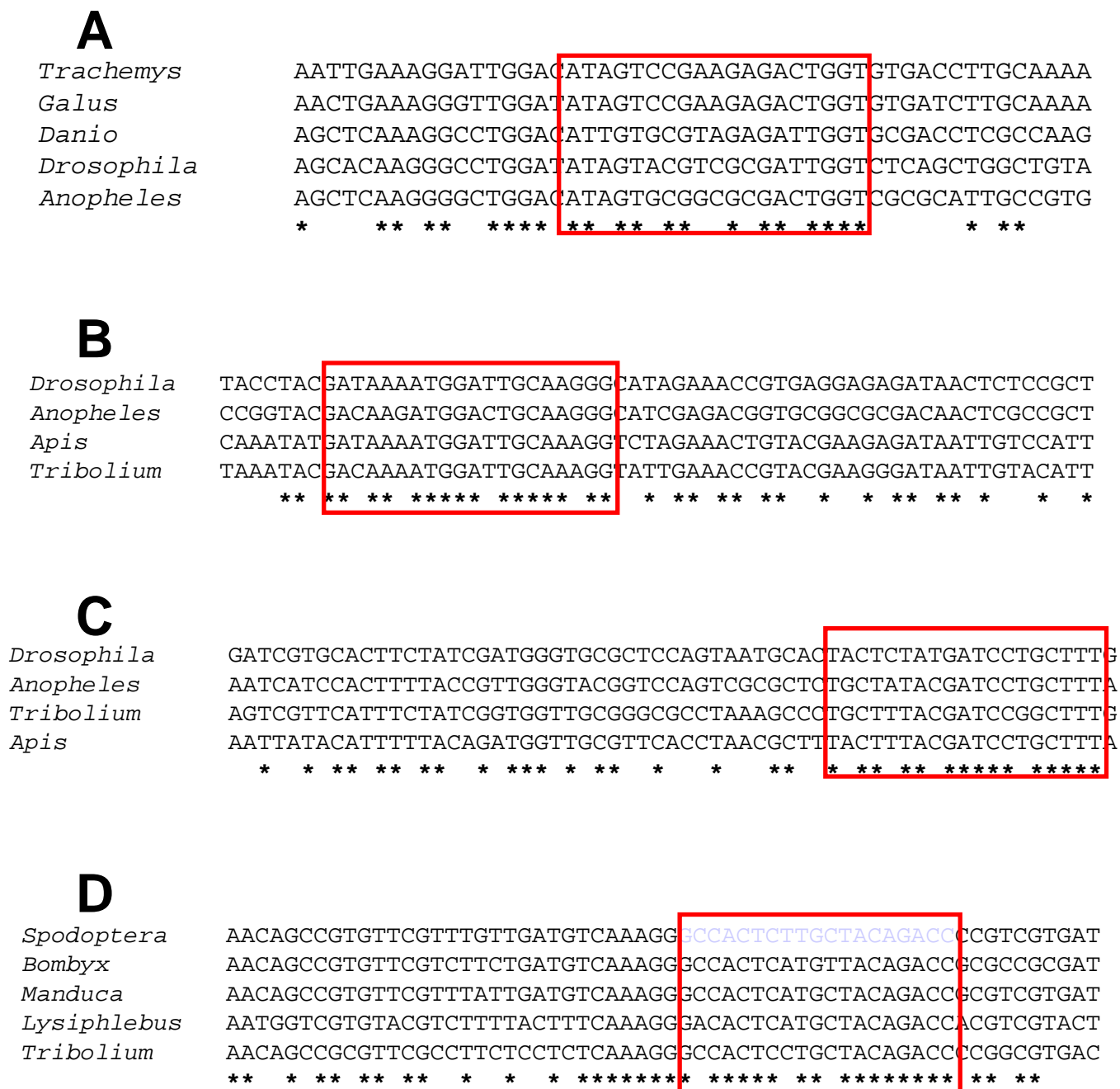


Figura 14- Parte dos alinhamentos das seqüências codificantes dos diferentes genes constitutivos, descritas na tabela 8. Asteriscos indicam os nucleotídeos conservados. A caixa vermelha indica a região escolhida para desenhar o iniciador de clonagem para cada gene, descritos na tabela 9. **A-** Alinhamento das seqüências codificantes da subunidade catalítica da DNA polimerase α . **B-** Alinhamento das seqüências codificantes da subunidade catalítica da DNA polimerase Δ . **C-** Alinhamento das seqüências codificantes da subunidade catalítica da DNA polimerase γ . **D-** Alinhamento das seqüências codificantes da proteína ribossomal S6 (RPS6).

<i>Bombyx_mori</i>	MKLNVSYFATGCQKLFVVDEHKLRIFYEKRMGAEEVADQLGDEWKGYVL
<i>Manduca sexta</i>	MKLNVSFATGCQKLFVVDEHKLRIFYEKRMGAEEVADLLGDEWKGYVL
<i>Spodoptera frugiperda</i>	MKLNVSFATGCQKLFVVDEHKLRIFYEKRMGAEEVADQLGDEWKGYVL
<i>Diatraea saccharalis</i>	-----
<i>Bombyx_mori</i>	RVAGGNDKQGFPMKQGVLTNSRVRLMSKGHSCYRPRRDGERKRKSVRGC
<i>Manduca sexta</i>	RVAGGNDKQGFPMKQGVLTNSRVRLMSKGHSCYRPRRDGERKRKSVRGC
<i>Spodoptera frugiperda</i>	RIAGGNDKQGFPMKQGVLTNSRVRLMSKGHSCYRPRRDGERKRKSVRGC
<i>Diatraea saccharalis</i>	-----CHSCYRPRRDGERKRKSVRGC *****
<i>Bombyx_mori</i>	IVDANLSVLALVIVRKGAQEIPGLTDGNVPRRLGPKRASKIRKLFNLSKE
<i>Manduca sexta</i>	IVDANLSVLALVIVRKGEQEIPGLTDGNVPRRLGPKRASKIRKLFNLSKE
<i>Spodoptera frugiperda</i>	IVDANLSVLALVIVRKGEQEIPGLTDGNVPRRLGPKRASKIRKLFNLSKE
<i>Diatraea saccharalis</i>	IVDANLSVLALVIVRKGTQEIAGLTDGNVPRRLGPKRASKIRKLFNLSKE ***** . *** . ***** . **
<i>Bombyx_mori</i>	DDVRRYVVKRVLPAGEGKENAKPRHKAPKIQRLVTPVVLQRRRHRLALKK
<i>Manduca sexta</i>	DDVRRYVVKALLPAKEGKENAKPRYKAPKIQRLVTPVVLQRRRHRLALKK
<i>Spodoptera frugiperda</i>	DDVRRYVVKRLLPAKEGKENAKPRYKAPKIQRLVTPVVLQRRRHRLALKK
<i>Diatraea saccharalis</i>	DDVRRYVVKRLLPAKEGKENAKPRYKAPKIQRLVTPAVLQRRRHRLALKK ***** : ***** : ***** . *****
<i>Bombyx_mori</i>	KRLAKRKSSEAEYAKLLAQKKESKVRQEEIKRRRSASMRDSKSSSQSA
<i>Manduca sexta</i>	KRLAKRKSSEAEYAKLLAQKKESKVRQEEIKRRRSASMRDSKSSNQSA
<i>Spodoptera frugiperda</i>	KRLAKRKSSEAEYAKLLAQKKESKVRQEEIKRRRSASMRDSKSSDKSA
<i>Diatraea saccharalis</i>	KRLAKRKSSEAEYAKLLAQKKESKVRQEEIKRRRSASMRDSKSSDKSA ***** . : * : ***** : : ***** . : **
<i>Bombyx_mori</i>	PQK
<i>Manduca sexta</i>	PQK
<i>Spodoptera frugiperda</i>	PQK
<i>Diatraea saccharalis</i>	PQK ***

Figura 15- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína ribossomal S6 de diferentes Lepidoptera incluindo a deduzida a partir do cDNA clonado de *D. saccharalis*. Observa-se uma alta similaridade entre as seqüências indicando que o cDNA clonado codifique a proteína de interesse.

nº de congelamentos	pH 7,0	pH 9,5
1	449	275
2	389	224
3	459	378
4	402	299
5	375	225
6	398	325

Tabela 8- Atividade de DSA1 (mU/mL), ensaiada em pH 9,5; após congelamentos seqüenciais em pHs 7,0 e 9,5.

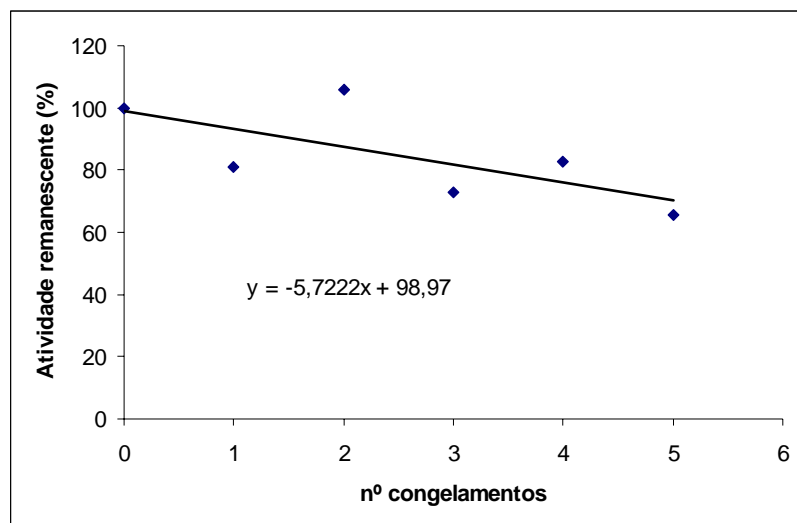


Figura 16 – Estabilidade de DSA2 ao congelamento em pH 8,0. O gráfico mostra a porcentagem da atividade remanescente após cada congelamento. É observada uma tendência de perda de atividade, de 5,7% a cada congelamento.

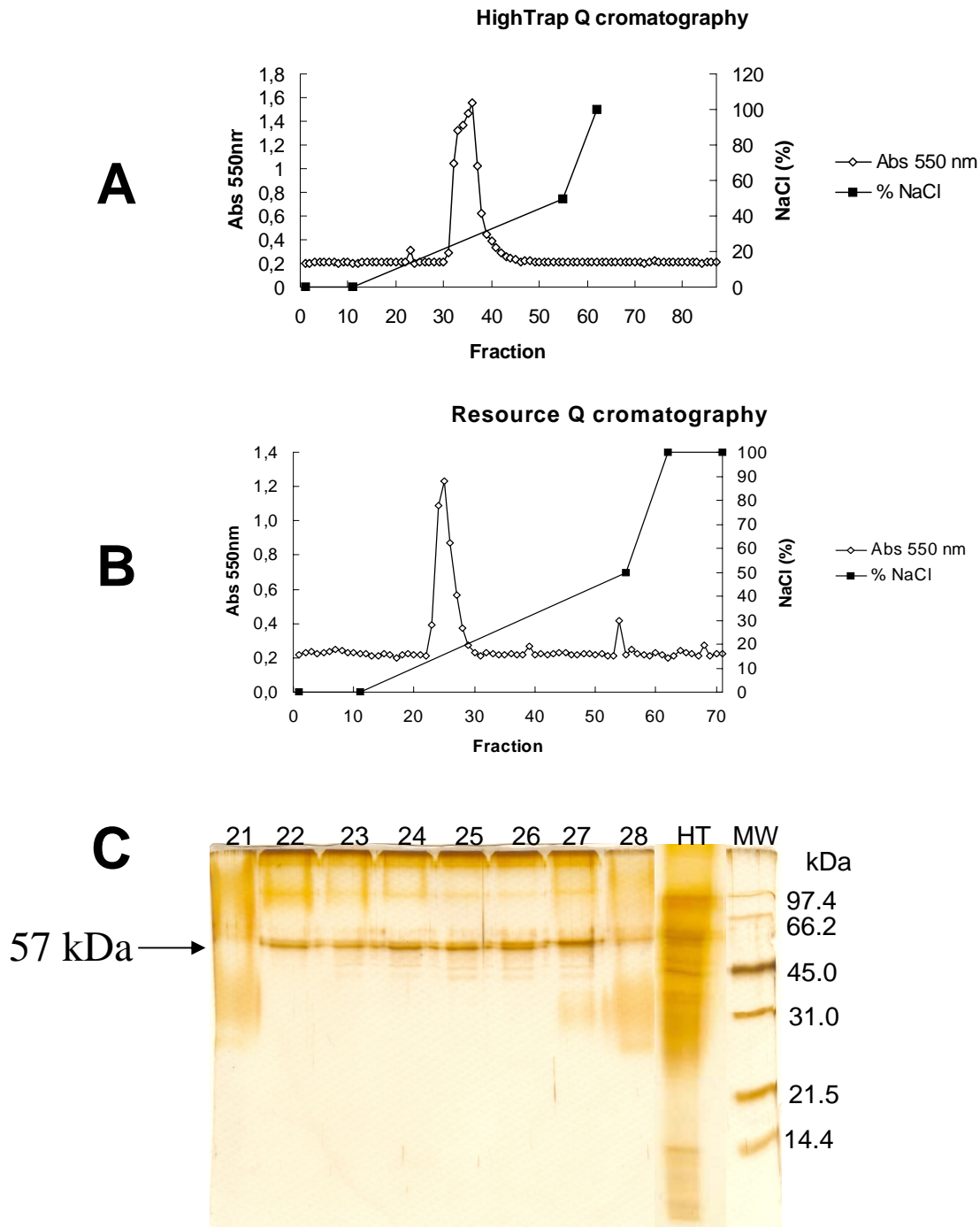


Figura 17- Semi-purificação de DSA1. O meio de cultura de *P. pastoris* após indução da expressão de DSA1 foi submetido a uma cromatografia em HighTraoQ (A). As frações mais ativas dessa cromatografia foram reunidas e aplicadas em uma cromatografia em ResouseQ (B). As frações com atividade amilásica dessa cromatografia foram aplicadas em SDS-PAGE (mesma quantidade de proteína por raia) para evidenciar o grau de pureza da proteína de interesse (C). As raia (21 – 28) estão numeradas com o número da fração correspondente em B. A banda majoritária tem massa molecular semelhante ao previsto para DSA1.

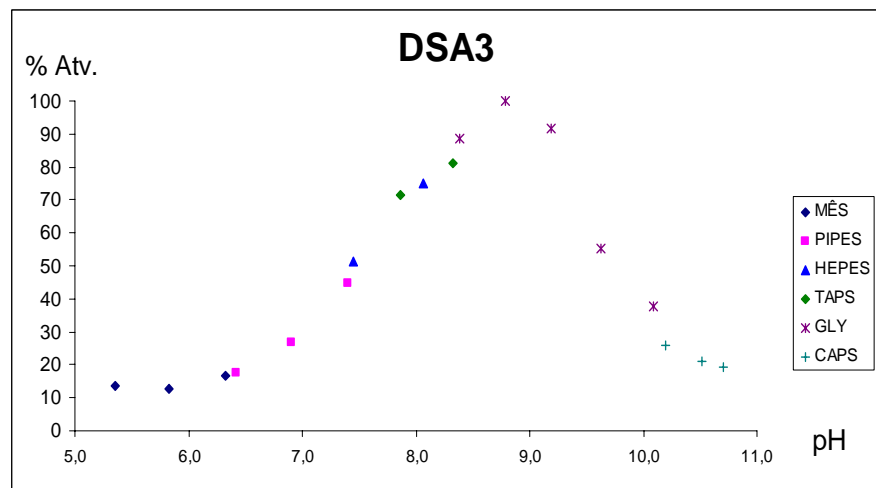
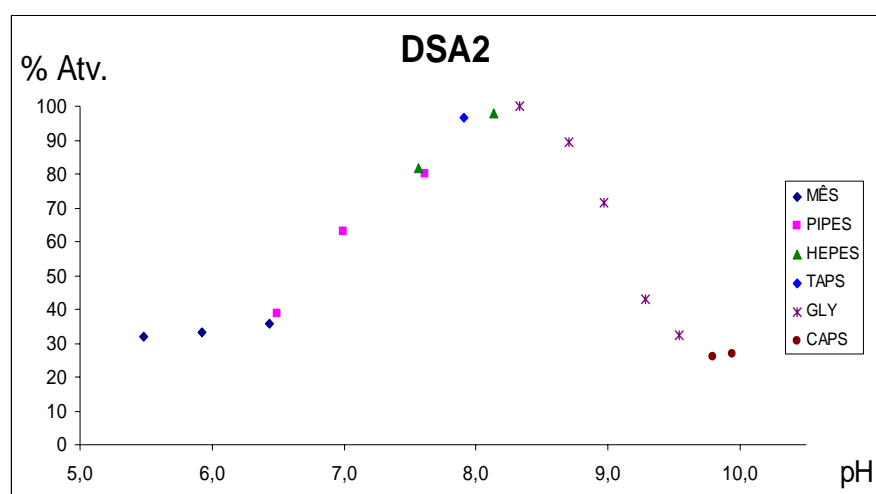
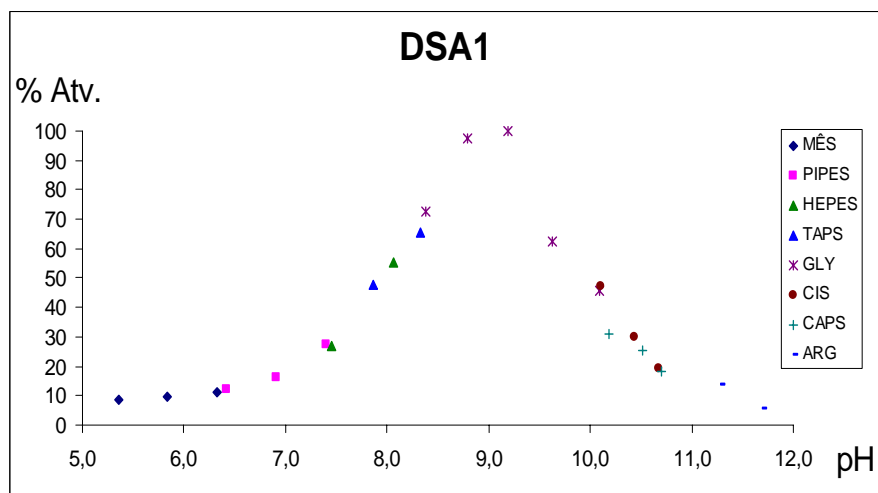


Figura 18- Efeito do pH na atividade enzimática. O gráfico mostra a porcentagem da atividade remanescente das enzimas recombinantes DSA1, DSA2 e DSA3 em função do pH.

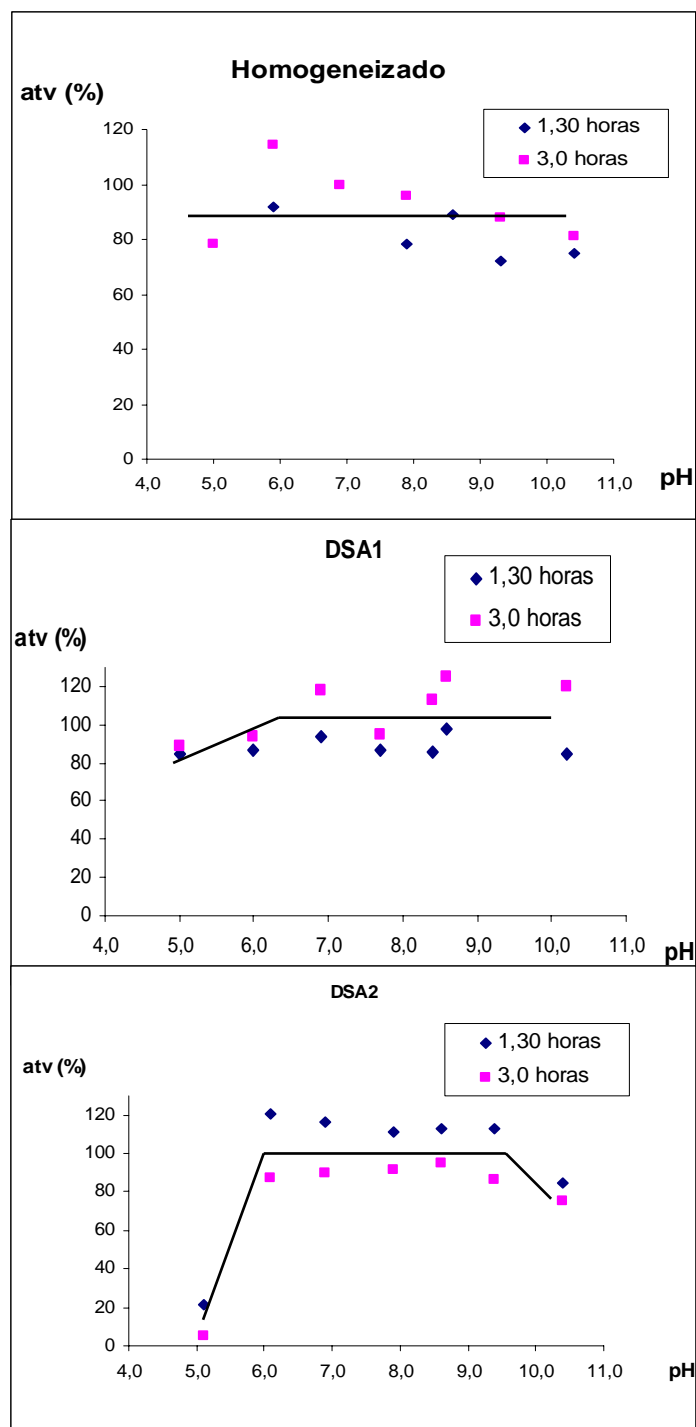


Figura 19- Estabilidade de DSA1, DSA2 e da atividade amilásica presente no homogeneizado do conteúdo intestinal de *D. saccharalis* em diferentes pHs. Os gráficos mostram a atividade remanescente em cada um dos materiais após incubações de 1,30 e 3 horas a 30°C , na ausência de substrato. As linhas indicam a faixa de pH onde a atividade é estável (patamares) e as tendências de perda de atividade.

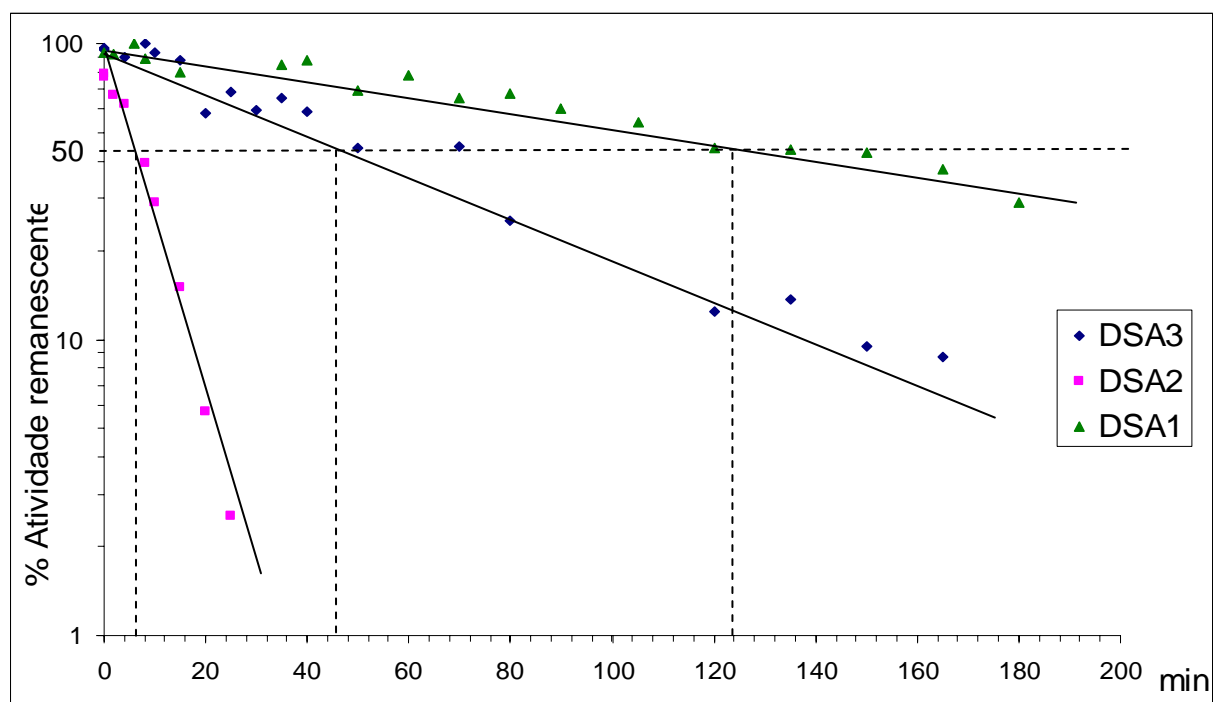


Figura 20- Inativação térmica das amilases recombinantes à 50 °C. O gráfico mostra o log da porcentagem da atividade remanescente pelo tempo em que os materiais permaneceram incubados. Foram ensaiadas as três enzimas recombinantes DSA1, DSA2 e DSA3. Observa-se diferentes $t_{1/2}$: 125 min para DSA1, 6 min para DSA2 e 45 min para DSA3.

Inibidor Enzima	α -AI1	α -AI2	IT-1	IT-3
HSA	ÑI	ÑI	13	9
PPA	15	ÑI	61	ÑI
DSA1	ÑI	ÑI	31	ÑI
DSA2	ÑI	ÑI	36	34
DSA3	ÑI	ÑI	10	10

Tabela 9 – Sensibilidade das α -amilases recombinantes de *D. saccharalis*, DSA1, DSA2 e DSA3, e das comerciais, salivar humana (HSA) e pancreática de porco (PPA), a diferentes inibidores. Foram utilizados os α -Ai1 e 2 de feijão na concentração 0,5 mg/mL, e os inibidores comerciais de trigo tipo 1 e 3 na concentração 12,5 mg/mL. Os valores da tabela são as atividades remanescentes (%) em relação a um ensaio sem inibidor. ÑI indica a ausência de inibição.

Enzima Substrato	DSA1	DSA2	DSA3
Amido	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
Amido em DMSO	0,12 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
Amilose em DMSO	0,17 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Glicogênio	0,08 \pm 0,005	0,10 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02

Tabela 10- Afinidade das amilases recombinantes por diferentes substratos. Os valores estão expressos em % (p/v).

Figura 21- Cromatografia em camada delgada dos produtos da ação de DSA1 e DSA2 após ensaio de atividade com amido como substrato. **PD-** padrão de oligosacarídeos. G1 a G6: glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose, respectivamente. **DSA1-** produtos de hidrólise de DSA1. **DSA2-** produtos de hidrólise de DSA2.



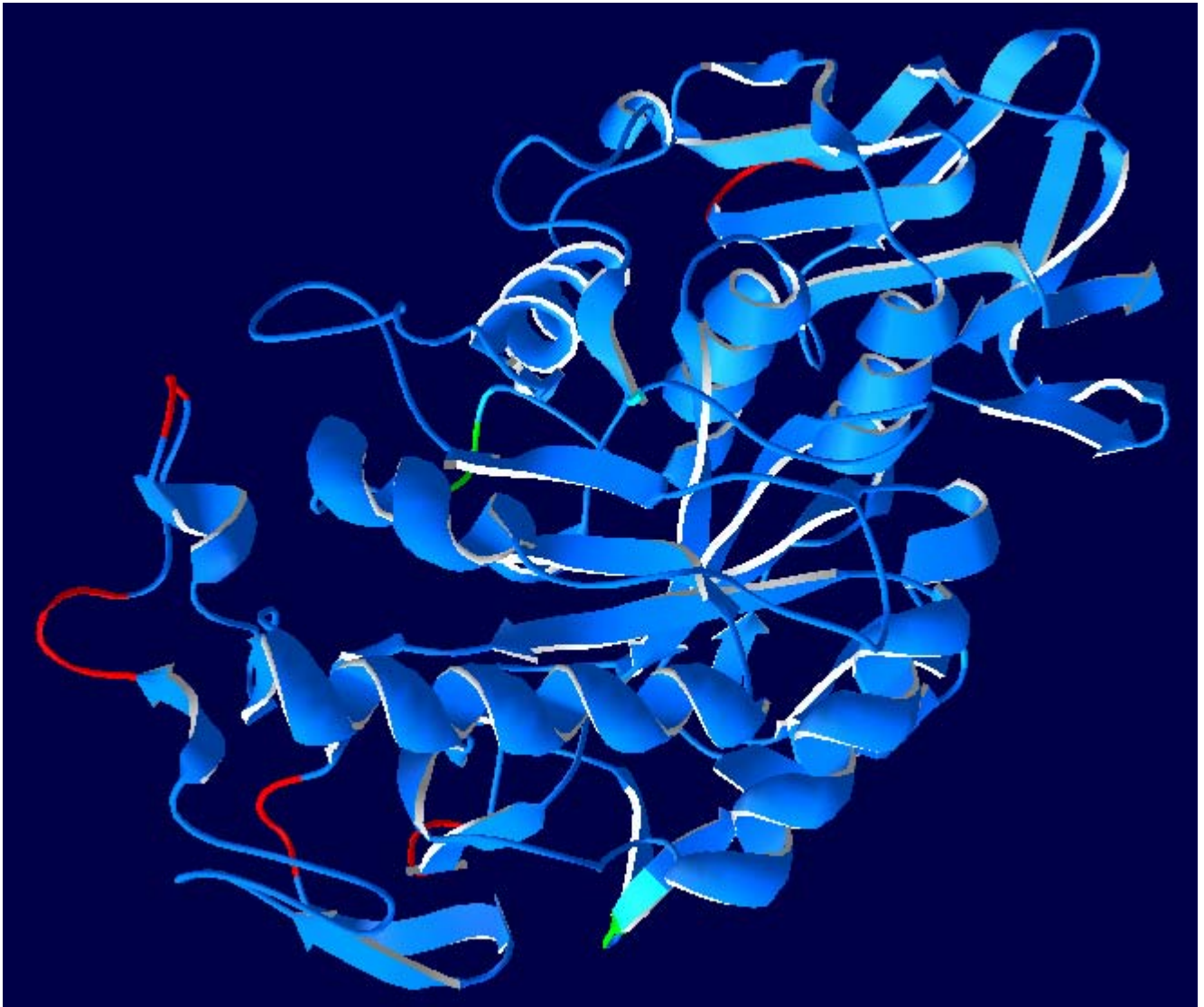


Figura 22- Modelo da estrutura de DSA1 gerado a partir do SWISS-MODEL e visualizada com o programa Swiss-PdbViewer. Regiões em azul indicam alta similaridade entre a sequência de DSA1 amilase de *T. molitor* e amilase pancreática de porco, que foram usadas como modelo para a modelagem estrutural. Regiões em vermelho e verde são regiões de baixa similaridade.

Figura 23- Cladograma de seqüências de α -amilases de insetos depositadas no GenBank. *Euroguyphus maynei* (ácaro, AAD38943.1), *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro, AAD38942.1), *Aedes aegypti* (Diptera, AAA29343.1 e AAB60934.1), *Anthonomus grandis* (Coleoptera, AAN77139.1 e AAN77138.1), *Anopheles merus* (Diptera, AAA03323.1), *Apis mellifera mellifera* (Hymenoptera, AAM20738.1), *Biblio marci* (Diptera, AAL92553.1 e AAA29343.1), *Blaps macronata* (Coleoptera, AAO14612.1), *Blatella germanica* (Dictyoptera, ABC68516.1), *Bombyx mori* (Lepidoptera, AAA17751.1), *Callifora vomitoria* (Diptera, AAY88831.1 e AAY88830.1), *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera, BAB72257.1), *Ceratitis capitata* (Diptera, AAO13691.1), *Culex tarsalis* (Diptera, AAO03350.1), *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera, AAF20998.1), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, DSA1 AAP92665.1, DSA2 AAP97393.1 e DSA3 AAP97394.1), *Drosophila bocki* (Diptera, BAA95436.1, BAA95435.1, BAA95434.1 e BAA95433.1), *Lutzomia longipalpis* (Diptera, AAD032192.1), *Ochlerotatus atropalpus* (Diptera, AAA03322.1), *Phaedon cochleariae* (Coleoptera, CAA76926.1), *Sarcophaga carnaria* (Diptera, AAY88849.1), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, AAO13754.1), *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Swissprot PS6634), *Thaumatomyia notata* (Diptera, AAY88858.1), *Tribolium castaneum* (Coleoptera, AAA03708.1, AAA03709.1 e CAA300009.1), *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, AAF3435.1). O cladograma foi obtido com o programa Mega 4 (Takamura et al, 2007).