

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOQUÍMICA)**

**NATHÁLIA RAMALHO MOREIRA**

**$\alpha$ -MANOSIDASES INTESTINAIS DA LARVA DE *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA)**

**São Paulo**

**12/08/2008**

NATHÁLIA RAMALHO MOREIRA

**$\alpha$ -MANOSIDASES INTESTINAIS DA LARVA DE *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA)**

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

*Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra*

São Paulo

12/08/2008

NATHÁLIA RAMALHO MOREIRA

$\alpha$ -MANOSIDASES INTESTINAIS DA LARVA DE *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA)

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para obtenção do*

*Título de Mestre em  
Ciências na Área de Bioquímica*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.**

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Orientador:** \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

Dedico este trabalho aos meus pais José Jorge da Silva Moreira e Rosa Maria Ramalho Moreira e aos meus irmãos Mireile, Edmar e Edmairy.  
A vocês com todo meu amor e carinho, minha gratidão eterna.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador Walter Ribeiro Terra, por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação e por ter permitido a realização deste trabalho.

À profa. Dra. Clélia Ferreira também pelo acolhimento e discussões.

A Maria Cícera Pereira da Silva e Thaís Duarte Bifano pelo apoio durante a realização deste trabalho.

As amigas Érica Oliveira, Thaís Bifano e Patrícia Pessoa que me abriram as portas e o coração.

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica de insetos, Thaís, Érica, Dra. Maria Cícera, Bruno, Alexandra, Lucas, Fábio, Ivan, Flávia, Daniela, Marcelo, André, Walciane, Binho e Pedro, pela ajuda, carinho e amizade.

À Ana Laura pelo companheirismo, paciência e enorme ajuda emocional e profissional, sempre me fazendo lutar pelos meus objetivos.

Ao amigo Everton pela sua atenção, carinho e amizade.

À amiga Helena pelo apoio constante a cada novo desafio e pela sua amizade, carinho e compreensão.

Aos amigos do departamento de Bioquímica, Fernando Shoenmaker, Fernanda, Fabiana Cançado, Layla, Diogo, Gianluca Karina, Luci, pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos amigos antigos que continuam presentes na minha vida como Simone e Patrícia que sempre terão um lugar no meu coração.

Às técnicas e amigas Luiza Nakabayashi, Maria Ivanilde Marcelino e Cristiane Cardoso por todo o auxílio durante os anos de mestrado.

Agradeço a Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais José Jorge e Rosa Maria, aos meus irmãos, aos meus cunhados e em especial a minha cunhada Valéria que sempre me deu muito apoio e incentivo na hora certa e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Durante a realização deste trabalho, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pelo CNPq e FAPESP.

## RESUMO

Moreira, N.R.,  $\alpha$  Manosidases intestinais da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera). Ano: 2008. 80 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os estudos da função intestinal foram particularmente estimulados após a conscientização de que o tubo digestivo é uma enorme interface relativamente pouco protegida entre o inseto e o meio ambiente e pode ser usado como alvo para controle de pragas. Neste contexto, nosso trabalho envolve a purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -manosidase solúvel e a detecção de uma  $\alpha$ -manosidase de membrana. As  $\alpha$ -manosidases pertencem a uma família de exoglicosidases as quais hidrolisam resíduos de  $\alpha$ -D-manosil a partir de terminais não redutores de oligossacarídeos. Estas enzimas são implicadas no catabolismo de carboidratos e na via de N-glicosilação protéica em insetos, mas pouco se sabe sobre a bioquímica destas glicosidases. O *Tenebrio molitor* é um Coleoptera bastante estudado pelo nosso laboratório devido a sua relevância como praga agrícola e o seu posicionamento em um ponto estratégico da árvore filogenética de insetos. O estudo de distribuição desta enzima mostrou que a  $\alpha$ -manosidase encontra-se, principalmente, como uma enzima solúvel no conteúdo anterior e médio do intestino médio, mas também existe uma atividade significativa na fração de membrana. Para confirmar a existência desta enzima de membrana, microvilosidades foram purificadas por precipitação diferencial com cálcio. A enzima aminopeptidase foi utilizada como marcadora, uma vez que sabe-se que esta enzima é uma típica de membrana microvilar. Como a  $\alpha$ -manosidase solúvel é majoritária demos início a sua purificação e posterior caracterização. A sua purificação foi realizada utilizando uma combinação de quatro passos de cromatografia: Uma de troca iônica em Hitrap Q XL (Amersham/Bioscience), duas filtrações em gel, uma em Superdex 75 e outra em Superdex 200 (Amersham/Bioscience) usando o sistema AKTA, e o último passo é uma hidrofóbica em Phenyl Superose. Nós observamos a presença de dois picos de atividade nomeados de Man 1 e Man 2, sugerindo a existência de duas  $\alpha$ -manosidases solúveis, que se diferem quanto a hidrofobicidade. O pH ótimo das  $\alpha$ -manosidases é de 5,6 e sua massa molecular, determinada por cromatografia de

filtração em gel, é de 123 kDa, e no SDS-PAGE observamos uma única banda de 70 kDa, indicando a existência de duas subunidades. Em um gel nativo revelado com o substrato fluorescente (metilumbelliferil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo) nota-se somente uma banda de atividade. A Man 2 possui pI de 3,38.  $\alpha$ -manosídeses de *T. molitor* seguem a cinética de Michaelis-Menten com Km para o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo de 0,84 mM para Man 1 e 0,62 mM para Man 2. Também foram feitos ensaios de inibição com dois inibidores que sabidamente inibem carboidrases, um é o deoximanojirimicina e o outro é a swainsonina. O Ki encontrado para o primeiro inibidor foi de 0,12 mM para Man 1 e 0,15 mM para Man 2 e o Ki para o segundo inibidor foi de 67,8 nM para Man 1 e 63 nM para Man 2, sendo ambos inibidores competitivos. O fato destas enzimas serem inibidas apenas por Swainsonina em concentrações razoáveis, permite a sua classificação como tipo II. Isso sugere que elas são derivadas da forma lisossômica, embora apresente pH ótimo alterado.

**Palavras-chave:** *Tenebrio molitor*,  $\alpha$ -manosídeses, caracterização cinética, digestão, Microvilosidades



## ABSTRACT

Moreira, N.R., Alpha-Mannosidases intestinal from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. Ano: 2008. 80 páginas. Master Thesis. Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Studies of intestinal function were prompted after noticing that the gut is a huge and relatively unprotected interface between the insect and the environment and can thus be used as a target for pest control. In this context, our work involves the purification and characterization of an soluble alpha-mannosidase and detection of a membrane  $\alpha$ -mannosidase.  $\alpha$ -Mannosidases are a family of exoglycosidases which hydrolyse  $\alpha$ -D-mannosyl residues from terminal non-reducing end of oligosaccharides. These enzymes are implicated in the catabolism of carbohydrates and N-linked protein glycosylations in insects, but little is known on this biochemistry. *T.molitor* is a Coleoptera studied in our laboratory because of its relevance as agricultural pest and its position at a strategic point in the phylogenetic tree of insects.  $\alpha$ - Mannosidase is more active in the anterior and middle midgut content of *T.molitor* larvae, although there is a significant activity in the membrane fraction. To confirm the existence of this membrane enzyme, microvilli were purified by differential precipitation with calcium. Aminopeptidase was used as a marker, since it is known that it is a typical microvillar membrane enzyme.

Most  $\alpha$ -mannosidase activity is soluble. This led us to purify this enzyme for further characterization. The purification of *T. molitor*  $\alpha$ -mannosidase was attained by using a combination of four chromatographic steps: an anion-exchange chromatography in Hitrap Q XL (Amersham/Bioscience), two gel filtration chromatographies, one in Superdex 200 and another in Superdex 75 (Amersham/Bioscience) using an AKTA system, and the last step is a Hydrophobic chromatography in Phenyl Superose. Two peaks of activity were resolved: Man 1 and Man 2, suggesting the existence of two soluble  $\alpha$ -mannosidases, differing only in hydrophobicity. The optimum pH of the  $\alpha$ -mannosidases is 5.6 and the molecular mass is 123 KDa determined by gel filtration and 70 KDa in the case of SDS PAGE. This suggests that the holoenzyme has two subunits. In a native gel revealed with the fluorescent substrate (methylumbelliferyl- $\alpha$ -

D-mannopyranoside) only one band of activity is seen. Man 2 has pI 3.38. *T. molitor*  $\alpha$ -mannosidases followed Michaelis-Menten kinetics with a  $K_m$  value of 0.84 mM for Man 1 and 0.62 mM for Man 2 using p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside as substrate. Inhibition tests were made with typical inhibitors of  $\alpha$ -mannosidases: one is the 1-deoxymannojirimycin and the other is the Swainsonine. The  $K_i$  for the first was of 0.12 mM for Man 1 and 0.15 mM for Man 2 and for the second was 67.8 nM for Man 1 and 63 nM for Man 2. Both were competitive inhibitors. The fact that the enzymes are inhibited only by swainsonine in reasonable concentrations, allows us to classify them as type II. This suggests that they are derived from the lysosomal form, although they have an altered optimum pH.

**Keywords:** *Tenebrio molitor*, kinetic characterization,  $\alpha$ -mannosidase, digestion, microvilli

## ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
Blast	``Basic Local Aligment Search``
BSA	Albumina Sérica Bovina
C1	Sedimento resultante da centrifugação a 2.800g, 15 minutos;
C2	Sedimento resultante da centrifugação a 15.500g, 15 minutos;
C3	Sobrenadante resultante da centrifugação a 15.000g, 15 minutos.
cDNA	DNA sintetizado a partir de mRNA
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato
DMJ	Deoximanojirimicina
DO <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	Etiqueta de sequência expressa
FPLC	``Fast Protein Liquid Chromatography``
IPTG	Isopropiltiol beta D galactopiranosídeo
KDa	kilodaltons
Ki	Constante de Inibição
Km	Constante de Michaelis
LB	Meio de cultura de Luria-Bertani
Man 1	Manosidase eluída no pico 1 da cromatografia hidrofóbica
Man 2	Manosidase eluída no pico 1 da cromatografia hidrofóbica
mRNA	RNA mensageiro
mU	miliunidades
PCR	reação em cadeia da polimerase
pfu	unidades formadoras de placas
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PM	peso molecular
RNA	ácido ribonucléico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SW	swainsonina
TAE	tampão Tris acetato EDTA
Tris	tris (hidroximetil) amino metano
U	Unidade enzimática dada em µmol/minuto
Vc	Volume da coluna
V <sub>máx</sub>	velocidade máxima
V <sub>o</sub>	Volume morto
V <sub>r</sub>	Volume de eluição da proteína
UV	Ultravioleta
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indoil beta D galactopiranosídeo

## Índice

<b>1 – Introdução</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1 – Considerações gerais</b> -----	<b>1</b>
<b>1.2 – O pH do tubo digestivo e sua importância na digestão do alimento pelos insetos</b> -----	<b>3</b>
<b>1.3 – As microvilosidades intestinais</b> -----	<b>4</b>
<b>1.4 – Proteínas microvilares intestinais de T. molitor</b> -----	<b>8</b>
<b>1.4.1 – Considerações gerais</b> -----	<b>8</b>
<b>1.4.2 – <math>\alpha</math>-Manosidades</b> -----	<b>8</b>
<b>1.4.3 – Inibidores de <math>\alpha</math>-Manosidades</b> -----	<b>11</b>
<b>2 – Objetivos</b> -----	<b>12</b>
<b>3 – Materiais e Métodos</b> -----	<b>14</b>
<b>3.1 – Animais</b> -----	<b>14</b>
<b>3.2 – Preparação dos animais dissecados</b> -----	<b>14</b>
<b>3.3 – Determinação de proteína</b> -----	<b>15</b>
<b>3.4 – Determinação das atividades enzimáticas</b> -----	<b>15</b>
<b>3.5 – Preparação do material solúvel de farelo de trigo</b> -----	<b>16</b>
<b>3.6 – Preparação de microvilosidades intestinais</b> -----	<b>16</b>
<b>3.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições: desnaturantes (SDS-PAGE) e em condições não desnaturantes (PAGE).</b> -----	<b>17</b>
<b>3.8 – Cromatografias</b> -----	<b>18</b>
<b>3.8.1 – Cromatografia de troca iônica</b> -----	<b>18</b>
<b>3.8.2 – Cromatografia de filtração em gel</b> -----	<b>19</b>

3.8.3 – Cromatografia de interação hidrofóbica-----	19
3.9 – Purificação da $\alpha$ -manosidase solúvel-----	20
3.10 – Diálise-----	20
3.11 – Determinação do efeito do pH sobre a atividade da $\alpha$ -manosidase-----	21
3.12 – Determinação do peso molecular por filtração em gel em coluna Superdex 200 em sistema AKTA-----	21
3.13 – Focalização isoeétrica em géis de poliacrilamida-----	22
3.14 – Determinação de $K_m$ e da $V_{m\acute{a}x}$ da $\alpha$ -manosidase-----	23
3.15 – Estudos de inibição-----	23
3.16 - SEQÜENCIAMENTO AO ACASO DA BIBLIOTECA DE CDNA-----	24
3.16.1 – EXCISÃO <i>IN VIVO</i> DO PLASMÍDEO BLUESCRIPT-----	24
3.16.2 – AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE AMOSTRAS DE DNA CONTIDAS EM COLÔNIAS BACTERIANAS ÍNTEGRAS -----	25
3.16.3 – SEQÜENCIAMENTO DOS CDNAS-----	26
3.16.4 – ANÁLISE E MONTAGEM DOS ESTs-----	27
4 – Resultados-----	28
4.1 – Distribuição da atividade da $\alpha$ -manosidase no tubo digestivo de <i>T.</i> <i>molitor</i> .-----	28
4.2 – Purificação de microvilosidade intestinais-----	28
4.3 – Purificação da $\alpha$ -manosidase presente no conteúdo luminal do intestino médio das larvas de <i>T. molitor</i> .-----	32
4.4 – Efeito do pH-----	41
4.5 – Determinação do ponto isoeétrico (pI) da $\alpha$ -manosidase purificada Man 2-----	42

4.6 – Propriedades cinéticas das $\alpha$ -manosidases purificadas-----	42
4.7 – Transcriptoma parcial do intestino médio de <i>T.molitor</i> -----	45
5 – Discussão-----	50
5.1 – Distribuição da atividade de $\alpha$ -manosidase nas diferentes regiões do intestino médio de <i>T. Molitor</i> e purificação de microvilosidades intestinais-----	50
5.2 – Purificação da $\alpha$ -manosidase presente no intestino médio de <i>T. Molitor</i> -----	52
5.3 – Caracterização cinética da $\alpha$ -manosidase presente no intestino médio de <i>T. Molitor</i> -----	54
5.4 – Seqüências das $\alpha$ -manosidases intestinais de <i>T. Molitor</i> ----	55
6 – Conclusões-----	57
7 – Bibliografia-----	59

## ÍNDICE DE E TABELAS FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Contigs de seqüências de cDNA codificadoras de proteínas microvilares intestinais de <i>Tenebrio molitor</i> *.(Ferreira, A.H.P., et al., 2007). -----	7
<b>Tabela 2-</b> Classificação das $\alpha$ -manosidasases-----	11
<b>Tabela 3</b> - Distribuição da atividade de $\alpha$ -manosidase nas diferentes regiões do intestino médio de <i>T. molitor</i> -----	30
<b>Tabela 4</b> – Atividade da $\alpha$ -mannosidase obtida em frações durante a preparação de microvilosidade das células-----	31
<b>Tabela 5</b> – Inibição das $\alpha$ -manosidasases purificadas de <i>T.molitor</i> do intestino médio da larva de <i>T. molitor</i> -----	44
<b>Figura 1</b> – Estrutura química dos inibidores utilizados neste trabalho-----	12
<b>Figura 2</b> – Perfil cromatográfico para $\alpha$ -manosidase em coluna Hitrao Q-----	34
<b>Figura 3</b> – Perfil cromatográfico para $\alpha$ -manosidase em coluna de filtração em gel Superdex 75.-----	35
<b>Figura 4</b> – Perfil cromatográfico para $\alpha$ -manosidase em coluna de filtração em gel Superdex 200.-----	36
<b>Figura 5</b> – Perfil cromatográfico para $\alpha$ -manosidase em coluna de interação hidrofóbica.-----	37
<b>Figura 6</b> – SDS-PAGE 7,5% das frações reunidas durante a marcha de purificação da $\alpha$ -manosidase solúvel de <i>T.molitor</i> .-----	38
<b>Figura 7</b> – Curva padrão para definir o peso molecular da $\alpha$ -manosidase por cromatografia de filtração em gel.-----	39
<b>Figura 8</b> – Eletroforese em condições nativas em gel de poliacrilamida 7,5 % da $\alpha$ -manosidase.-----	40

<b>Figura 9</b> – O efeito do pH na taxa de hidrólise do p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo-----	41
<b>Figura 10</b> – Focalização isoelétrica da $\alpha$ -manosidase purificada Man 2 de <i>T.molitor</i> -----	42
<b>Figura 11</b> – Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da $\alpha$ -manosidase de <i>T.molitor</i> .-----	43
<b>Figura 12</b> – Determinação do $K_i$ para a $\alpha$ -manosidase purificada Man 2 de <i>T.molitor</i> na presença de 1-deoximanojirimicina.-----	45
<b>Figure 13</b> – Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de uma possível $\alpha$ -manosidase solúvel (Tenebrio 1) de <i>T.molitor</i> com outras sequências de $\alpha$ -manosidases.-----	47
<b>Figure 14</b> – Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de uma possível $\alpha$ -manosidase microvilar (Tenebrio 2) de <i>T.molitor</i> com outras sequências de $\alpha$ -manosidases.-----	48
<b>Figure 15</b> – Relação filogenética entre $\alpha$ -manosidases de diferentes organismos.-----	49



## **1 – Introdução**

### **1.1 – Considerações gerais**

O crescimento do conhecimento em bioquímica da digestão de insetos teve um brilhante início nas primeiras décadas do século passado, mas decaiu após o desenvolvimento dos inseticidas químicos sintéticos na década de 40. Mais tarde, com os problemas ambientais causados pelos inseticidas químicos, novos métodos de controle de insetos foram investigados. Os estudos da função intestinal foram particularmente estimulados após a conscientização de que o tubo digestivo é uma enorme interface relativamente pouco protegida entre o inseto e o meio ambiente. Um maior conhecimento sobre as propriedades das enzimas digestivas (que diferem entre os vários grupos de insetos) e sobre a sua distribuição no canal alimentar, pode auxiliar no planejamento da produção de novas plantas transgênicas para o controle de pragas (para revisão ver Schuler *et al.*, 1998). Outros métodos de controle podem ser visualizados usando o conhecimento crescente sobre digestão em insetos e tendo como alvo o intestino destes.

Applebaum (1985) em sua revisão da bioquímica da digestão reconheceu o início desse renovado crescimento do campo. Ele discutiu a pesquisa contemporânea que mostrava que as enzimas digestivas de insetos são similares às correspondentes dos mamíferos, mas que dietas exóticas de insetos empregavam enzimas específicas.

Um pouco antes da revisão de Applebaum (1985), o nosso laboratório escolheu a estratégia de estudar detalhadamente insetos-modelo dispostos em pontos relevantes da árvore filogenética de insetos. Esses estudos, revistos várias vezes à medida que avançavam (Terra, 1988; Terra, 1990; Terra & Ferreira, 1994;

Terra & Ferreira 2005), avaliavam a organização do processo digestivo através do estudo da distribuição de enzimas nas diferentes partes do intestino e dos fluxos de fluidos intestinais, associados a análises morfológicas macro e ultraestruturais dos tecidos intestinais e do isolamento e caracterização de enzimas representativas. Esses estudos mostraram que o processo digestivo nos insetos organiza-se em padrões filogeneticamente determinados (e não em função da dieta, como se pensava) e permitiam o levantamento de hipóteses sobre o papel da membrana peritrófica (estrutura anatômica que separa o alimento da superfície intestinal no interior do intestino dos insetos) (Terra, 2001) e das membranas perimicrovilares (membrana lipoprotéica que recobre as microvilosidades intestinais como dedo de luva e que terminam em fundo cego) dos Hemíptera (percevejos, cigarras e pulgões) (Terra *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do setor passa pela ampliação do conhecimento dos eventos moleculares subjacentes aos fenômenos fisiológicos intestinais, o que requer conhecimento das enzimas digestivas em detalhe estrutural, assim como de proteínas associadas a outras funções intestinais tais como: transportadores, receptores, bombas, proteínas relacionadas aos mecanismos de secreção, etc. Esse estudo molecular dos fenômenos fisiológicos é o que denominamos fisiologia molecular. Este trabalho foi parte desse programa de pesquisa em fisiologia molecular e usou como modelo o intestino do besouro *Tenebrio molitor* e teve como ponto de partida o aprofundamento do conhecimento das proteínas associadas às microvilosidades intestinais de *T. molitor*.

## 1.2 – O pH do intestino e sua importância na digestão do alimento pelos insetos

Dando uma visão geral da estrutura do intestino, temos que larvas desenvolvidas de *Tenebrio molitor* (0,12 g de peso fresco) possuem um intestino medindo por volta de  $27 \pm 3$  mm, sendo este dividido em intestino anterior ( $0,8 \pm 0,2$  mm), intestino médio ( $18 \pm 2$  mm) e o intestino posterior ( $8 \pm 2$  mm). Como revisado por Terra & Ferreira (1994) o pH luminal das diferentes regiões do intestino dos insetos em geral corresponde ao pH ótimo das enzimas encontradas nas respectivas regiões. O pH do conteúdo do intestino é também o mais importante parâmetro afetando a atividade das enzimas digestivas. A manutenção de certo valor de pH no tubo digestivo dos insetos é de muita importância na digestão do alimento por esses animais.

O intestino anterior em Dictyoptera, Orthoptera e Coleoptera é um importante sítio para a digestão do alimento, região essa que é abastecida com enzimas vindas do intestino médio (Terra, 1990). Como na maioria dos coleópteros, *Tenebrio molitor* apresenta um pH ácido na região anterior do intestino médio (pH=5,6) e a região posterior tem pH levemente alcalino (pH=7,9) (Terra *et al.*, 1985). Associado com esses gradientes de pH está a ocorrência de uma alta atividade de carboidrases na região anterior e uma alta atividade de proteases na região posterior do intestino médio. Essa regionalização da presença dessas enzimas provavelmente se deve a instabilidade das carboidrases na presença de enzimas proteolíticas (Terra, 1990).

Diversos exemplos têm mostrado que o processo digestivo em insetos deve ser estudado levando em conta não só a dieta do inseto de interesse, mas também considerando a história evolutiva do grupo ao qual ele pertence. Isso pode ser dito uma vez que os dados de distribuição de enzimas, padrão geral da digestão e da

ultraestrutura do intestino médio correlacionam-se melhor com a posição filogenética do inseto do que com sua dieta (Terra *et al.*, 1998; Terra, 1990; Terra & Ferreira 1994).

### **1.3 – As microvilosidades intestinais**

A microvilosidade intestinal dos insetos é homóloga àquela descrita para vertebrados e revista por Bement & Mooseker (1996). Assim, um feixe paralelo de filamentos de actina interligados por proteínas como fimbrina e vilina forma o núcleo da microvilosidade. Braços laterais (compostos de miosina I e calmodulina) conectam os lados do feixe de actina com a membrana plasmática circundante.

As microvilosidades intestinais de insetos foram isoladas pela primeira vez por Ferreira & Terra (1980) de um inseto com um intestino possuindo um único tipo celular (os cecos gástricos de um Díptera inferior), usando uma técnica de precipitação diferencial com cálcio (ou magnésio) desenvolvido para mamíferos. Poucos meses mais tarde, Hanozet *et al.* (1980) usou a mesma técnica para isolar as microvilosidades das células colunares (principais) do intestino de uma larva de Lepidoptera. Contudo, a falta de monitoração microscópica não pode descartar a possibilidade de a preparação estar contaminada com membranas das células caliciformes, o outro tipo celular presente nos intestinos de Lepidoptera. Santos *et al.* (1986) compararam vários procedimentos para preparar microvilosidades de células intestinais com monitoramento por microscopia eletrônica. Após esse trabalho e os dados complementares de Eisen *et al.* (1989), a precipitação diferencial tornou-se o método de escolha para preparar microvilosidades das células colunares de intestinos de Lepidoptera. Em adição aos Díptera inferiores e Lepidoptera, a

precipitação diferencial tem sido usada para isolar microvilosidades de células intestinais de outros táxons de insetos (revisão: Terra *et al.*, 2006).

As preparações de microvilosidades foram usadas para mostrar que as enzimas digestivas que são integrantes das membranas microvilares variam nos diferentes táxons de insetos. Mais freqüentemente essas enzimas são: aminopeptidase, fosfatase alcalina, carboxipeptidase, dipeptidase e  $\alpha$ -glucosidase (Terra and Ferreira, 1994). As preparações de microvilosidades foram usadas também para revelar simportadores de aminoácidos (Terra *et al.*, 2006). Transportadores de íons (Pullikuth *et al.*, 2003) e aquaporinas (Le Caherec *et al.*, 1997) foram encontrados nas membranas celulares apicais e supõe-se que sejam proteínas microvilares. Em adição a esses estudos, exceto por poucas enzimas digestivas, nenhuma outra proteína foi associada a proteínas microvilares específicas.

Avanços posteriores na pesquisa de microvilosidades intestinais incluíram a remoção do citoesqueleto de microvilosidades, resultando em membranas microvilares purificadas com quantidades negligenciáveis de citoesqueleto e com pequena contaminação por membranas basolaterais (Jordão *et al.*, 1995; Capella *et al.*, 1997).

A fisiologia da membrana microvilar pode mudar ao longo do intestino e entre os táxons de insetos, incluindo diferenças na digestão terminal (mencionado acima), defesas químicas, homeostasia iônica, sinalização e mecanismos secretores. As proteínas microvilares devem refletir essa complexidade e a sua quantidade pode ser avaliada pelas densidades das membranas microvilares. Como esperado, as densidades das membranas microvilares intestinais varia amplamente entre os insetos, com os mais evoluídos apresentando membranas mais densas que os

menos evoluídos (Terra *et al.*, 2006). Isso apóia a hipótese que a superfície celular desempenha papéis mais sofisticados nos insetos superiores que nos inferiores. A identificação das proteínas é, assim, um passo adiante na compreensão da função microvilar.

O objetivo deste trabalho era contribuir nesse tema, usando como modelo a larva de *T. molitor*.

**Tabela 1 – Contigs de seqüências de cDNA codificadoras de proteínas microvilares intestinais de *Tenebrio molitor*\*.**

Nº contig	Nº Seqüências no Contig	Proteína predita	Função hipotética
1	50	Alérgeno de barata	Desconhecida
2	48	Alérgeno de barata	Desconhecida
3	27	Alérgeno de barata	Desconhecida
6	6	Alérgeno de barata	Desconhecida
4	17	Peritrofina	Membrana peritrófica
5	7	Peritrofina	Membrana peritrófica
7	6	Peritrofina	Membrana peritrófica
10	3	Peritrofina	Membrana peritrófica
8	4	$\alpha$ -Manosidase	Digestão
11	2	Aminopectidase	Digestão
12	2	Desconhecida	Desconhecida
9	3	Sem homologia reconhecida	Desconhecida
13	2	Sem homologia reconhecida	Desconhecida

\* Uma biblioteca de cDNA de expressão do intestino de *T. molitor* foi varrida com anticorpos gerados contra microvilosidades intestinais purificadas de *T. molitor* e os clones cujas proteínas expressas foram reconhecidas pelos anticorpos foram seqüenciados. Foi realizado um blastx gerando a tabela acima (Ferreira, A.H.P., et al., 2007).

## **1.4 – Proteínas microvilares intestinais de *T. molitor***

### **1.4.1 – Considerações gerais**

As proteínas cuja ocorrência nas microvilosidades intestinais de *T. molitor* é predita estão listadas na Tabela 1. O alérgeno de barata foi estudado por outros membros de nosso grupo e será de objeto de publicação separada. A aminopeptidase foi purificada, caracterizada cineticamente e teve alguns de seus resíduos importantes em catálise identificados por modificação química (Cristofolletti and Terra, 1999; 2000). Presentemente o cDNA codificante dessa enzima foi clonado, seqüenciado e junto com outros dados será objeto de publicação futura. O estudo da  $\alpha$ -manosidase foi o objeto de estudo deste trabalho.

### **1.4.2 – $\alpha$ -Manosidades**

As alpha-manosidases pertencem à classe das glicosídeo hidrolases onde se encontram todas as enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas. As glicosídeo hidrolases são enzimas extremamente específicas para uma determinada configuração da ligação glicosídica. Enzimas que clivam ligações na configuração  $\beta$  não são capazes de clivar ligações  $\alpha$  e vice-versa, exceto em alguns casos especiais. Desta forma é necessário indicar na nomenclatura sob qual tipo de ligação glicosídica a enzima é ativa, exemplo:  $\alpha$ -manosidase, para manosidases que clivam ligações glicosídicas na configuração  $\alpha$  e  $\beta$ -manosidase, que clivam ligações na configuração  $\beta$ . (Henrissat, 1991).



As glicosidases são enzimas que atuam sobre di- ou oligossacarídeos retirando resíduos de monossacarídeos da extremidade não redutora do substrato.

As  $\alpha$ -manosidases são uma família de exoglicosidases as quais hidrolisam resíduos de  $\alpha$ -D-manosil do terminal não redutor de oligossacarídeos. Estudos com tecidos de mamíferos tem estabelecido a ocorrência de muitas  $\alpha$ -manosidases neutras capazes de processar oligossacarídeos N-ligados de glicoproteínas (para revisar ver Moremen *et al.*, 1994) e formas lisossomais ácidas responsáveis pela degradação de glicanos de oligomanosídeos (Michalski *et al.*, 1990). Em contraste, pouco é conhecido das  $\alpha$ -manosidases que ocorrem em tecidos de insetos. Enzimas solúveis e ligadas à membrana tem sido identificadas no sistema digestivo (Terra *et al.*, 1988) e na hemolinfa (Kimura., 1983).

$\alpha$ -Manosidades correspondem a uma classe de glicosídeo hidrolases envolvidas na maturação e degradação de oligossacarídeos ligados a glicoproteínas. As vias de maturação e degradação de glicoproteínas são muito conservadas, e atividades de  $\alpha$ -manosidases tem sido detectadas em todos os eucariotos onde esta enzima foi ensaiada. Existem 3 clados monofiléticos que representam famílias distintas de  $\alpha$ -manosidades (Gonzalez and Jordan, 2000). Estas classes são baseadas em ambas características funcionais e homologia de seqüência (Moremen, K.W., Trimble, and Herscovics, 1994; Henrissat, 1998). O compartimento subcelular onde elas catalisam a hidrólise de manose (Ex: Retículo endoplasmático, Golgi ou Lisossomos) pode distinguir  $\alpha$ -manosidases (Gonzalez and Jordan, 2000). A classe I corresponde às enzimas que estão envolvidas na maturação de oligossacarídeos ligados a Asn, hidrolisam apenas ligações  $\alpha$ -1,2 manose, localizam-se no retículo endoplasmático ou complexo de Golgi e pertencem à família 47 das glicosídeo hidrolases (Henrissat, 1995; Henrissat and Bairoch, 1993). A classe II compreende as  $\alpha$ -

manosidades que catalisam a degradação de oligossacarídeos ligados a Asn (a maioria), embora existam também aquelas envolvidas em processamento de N-glicanas. As  $\alpha$ -manosidases da classe II tem menos especificidade pelo substrato, hidrolisando ligações  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,2. Finalmente, enzimas dessa classe pertencem à família 38 das glicosídeos hidrolases (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993) e podem ocorrer no citossol, lisossomos e complexo de Golgi (Gonzales and Jordan, 2000). A classe III é menos conhecida e é muito variada, incluindo as  $\alpha$ -manosidases considerada ancestrais (Gonzalez and Jordan, 2000).

As  $\alpha$ -manosidases de insetos melhor conhecidas são da classe II e ocorrem no complexo de Golgi, onde estão envolvidas na manuturção de cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas (Gonzalez and Jordan, 2000; Kwart *et al.*, 2001).

As  $\alpha$ -manosidases intestinais de insetos são pouco conhecidas (nenhuma havia sido purificada completamente antes deste trabalho) para assegurar uma classificação adequada. A maioria delas é solúvel, embora ocorram também ligadas às membranas microvilares, possuem um pH ótimo entre 4,5 e 5,0, Km para p-nitrofenil  $\alpha$ -manosídeos de 0,5 – 1,8 mM e massa molecular de 100-200 kDa (Terra and Ferreira, 1994). As  $\alpha$ -manosidases solúveis, pelo menos em *Rhodnius prolixus* (Terra *et al.*, 1988) e *Dysdercus peruvianus* (Silva and Terra, 1994), são secretadas para o lúmen intestinal.

### 1.4.3 – Inibidores de $\alpha$ -Manosidades

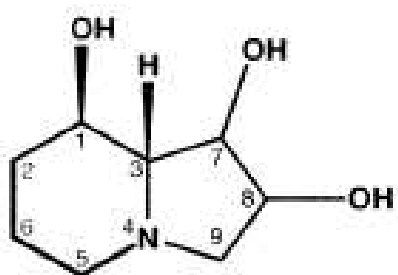
Manosidases são enzimas chaves nas vias de N-glicosilação em eucariotos. Estas enzimas estão distribuídas em duas classes (I e II) E são caracteristicamente diferentes em mecanismos catalíticos, sequência, e estrutura.

1-Deoximanojirimicina (DMJ) é um análogo de manose com um nitrogênio no lugar típico de um oxigênio no anel. DMJ é capaz de inibir  $\alpha$ -manosidases de ambas as classes mas é um inibidor típico da classe I (Ex:  $\alpha$ -manosidases do retículo).

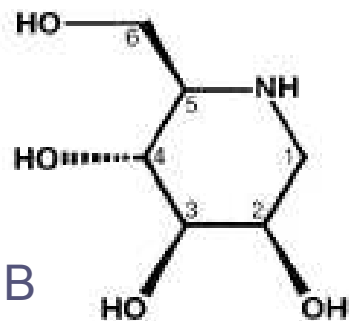
Swainsonina (SW) [(1S,2R,8R,8aR)-trihidroxi-indolizidina] é um alcalóide que ocorre naturalmente em plantas na Austrália e América do norte e é utilizado como droga terapêutica anti-câncer. É um inibidor típico da classe II (Inclui  $\alpha$ -manosidases de Golgi e também as lisossomais) (Shah., et al 2003).

**Tabela 2 – Classificação das  $\alpha$ -manosidases**

	<b>Classe I</b>	<b>Classe II</b>
<b>Classificação das Glicosil Hidrolases</b>	Família 47	Família 38
<b>Ligações de manose hidrolisadas</b>	$\alpha$ -1,2	$\alpha$ -1,2; $\alpha$ -1,3; $\alpha$ -1,6
<b>Inibidores ótimos</b>	Análogos de piranose	Análogos de furanose
<b>Localização</b>	Retículo endoplasmático e Aparato de Golgi	Citossol, Lisossomos e Aparato de Golgi



A



B

**Figura 1** – Estrutura química dos inibidores utilizados neste trabalho. (A) Swainsonina (análogo de furanose), (B) 1-deoximanojirimicina (Análogo de piranose).

## 2 – Objetivos

Isolar, purificar e caracterizar as  $\alpha$ -manosidases intestinais de *T. molitor*, incluindo a sua distribuição ao longo do tubo digestivo e nas células colunares. Microssequenciar as  $\alpha$ -manosidases favoráveis.

### **3 – Materiais e Métodos**

#### **3.1 – Animais**

Culturas estoque de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) foram mantidas em farelo de trigo à temperatura de 24-26°C e uma umidade relativa de 70-75%. Larvas completamente desenvolvidas (cada uma pesando cerca de 0,12g) de ambos os sexos foram utilizadas nas preparações.

#### **3.2 – Preparação dos animais dissecados**

As larvas de *T. molitor* foram imobilizadas no gelo sendo em seguida dissecadas em solução de NaCl 342 mM. O tubo digestivo foi removido e o intestino médio isolado separando-se o epitélio ventricular do conteúdo luminal delimitado pela membrana peritrófica. Para os estudos de distribuição das atividades enzimáticas, os intestinos médios foram divididos em porção anterior e média, e posterior. Este material era, então, congelado a -20°C até o uso. As amostras eram descongeladas e homogeneizadas em água bidestilada, com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Em seguida, os epitélios foram centrifugados a 20.000 g por 30 minutos a 4°C obtendo-se frações solúveis e de membrana correspondentes. O conteúdo luminal do intestino médio foi separado em anterior + médio e posterior. Estas amostras foram utilizadas em ensaios de distribuição da atividade ao longo do tubo digestivo deste inseto.

Para o isolamento das enzimas por cromatografia, o tubo digestivo das larvas de *T. molitor* era retirado, o intestino médio separado e dividido em conteúdo luminal e epitélio, sendo que a membrana peritrófica e o conteúdo luminal foram utilizados

como fonte de atividade enzimática. A membrana peritrófica e seu conteúdo foram homogeneizados em água bidestilada gelada com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Em seguida, este material foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4°C, o sedimento foi descartado e o sobrenadante recolhido. Esse material foi usado como fonte de enzimas para purificação da  $\alpha$ -manosidase.

### **3.3 – Determinação de proteína**

A determinação da quantidade de proteína na amostra foi realizada utilizando o método descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton e Evans (1992), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina.

### **3.4 – Determinação das atividades enzimáticas**

Nos ensaios para detecção de todas as atividades enzimáticas a mistura de reação foi incubada em banho-maria termostaticado (30°C) por quatro diferentes períodos de tempo. Foram utilizados brancos de enzima e brancos de substrato como controle. A atividade da  $\alpha$ -manosidase foi determinada utilizando-se como substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo 2,5 mM em tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,0 (Erlanger, 1961). A atividade sobre substratos p-nitrofenil-derivados (NP) foi determinada pela quantificação da liberação de p-nitrofenolato a 420 nm como previamente descrito (Terra *et al* 1979).

Todos os ensaios foram realizados nas condições em que a atividade era proporcional à concentração de proteína e ao tempo. 1 U de enzima é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mol de substrato (ou ligação) por minuto.

### 3.5 – Preparação do material solúvel de farelo de trigo

Foram pesados 3g de farelo de trigo, seguido do acréscimo de um volume de tampão citrato/fosfato, pH 6,0, 20 mM, o suficiente para submergir o material. Essa mistura foi sonicada em um sonicador Branson 250, com a potência acertada em 3, através de três pulsos de 30 s com intervalos de 30 s. Em seguida esse material foi homogeneizado em Omni-Mixer (Sorvall) a uma velocidade de 6.000 rpm, em três pulsos de 30 s com intervalos de 30 s. O homogeneizado foi centrifugado (3.000 x g; 5 min; 4<sup>o</sup>C), sendo o sobrenadante retirado. Esse foi novamente submetido a uma centrifugação (25.000x g; 15 min; 4<sup>o</sup>C) e o sobrenadante resultante foi usado como fonte de enzima. Todos os passos foram realizados sobre refrigeração (Terra *et al.*, 1985).

### 3.6 – Preparação de microvilosidades intestinais

As microvilosidades dos epitélios intestinais de *T. molitor* foram purificadas por precipitação diferencial por Ca<sup>2+</sup> de acordo com Jordão *et al.* (1995). Os epitélios provenientes de 100 larvas de *T. molitor* foram homogeneizadas em um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (aproximadamente 10 movimentos de pistilo) em um meio hipotônico contendo manitol 50 mM em tampão Tris-HCl 2 mM, pH 7,1. Os homogeneizados foram passados por uma malha de nylon de poros de 45 µM. CaCl<sub>2</sub> dissolvido no tampão de homogeneização foi adicionado aos filtrados, de modo a se obter uma concentração de 30 epitélios/ mL e 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. Os filtrados foram deixados 10 minutos no gelo, com agitações periódicas e em seguida foram centrifugados. As seguintes frações são obtidas: C1, sedimento resultante da centrifugação a 2.800g, 15 minutos; C2, sedimento resultante da centrifugação a



15.500g, 15 minutos; C3, sobrenadante resultante da centrifugação a 15.000g, 15 minutos. As frações C1 e C3 são dispensadas, sendo somente utilizada como fração enriquecida em microvilosidades o sedimento C2. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL do tampão Tris-HCl 2 mM, pH 7,1, contendo 50 mM de manitol, para então ser utilizado nos ensaios.

### **3.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições: desnaturantes (SDS-PAGE) e em condições não desnaturantes (PAGE).**

As amostras a serem submetidas à eletroforese tiveram o sal retirado através de diálise e, posteriormente, aquecidas durante 5 minutos a 95 °C em tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, contendo SDS 2% (p/v), glicerol 10%, β-mercaptoetanol 0,36 mM e azul de bromofenol 0,0025%) e em seguida submetidas a uma separação eletroforética utilizando um equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) em gel de poliacrilamida 7,5% com 1,0 mm de espessura (Laemmli, 1970). As eletroforeses foram realizadas a 200 V e temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol (utilizado como indicador da mobilidade eletroforética) estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa. O gel foi corado para visualização de proteínas com prata (Blum *et al.*, 1987). O marcador de massa molecular utilizado foi o High Range Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) contendo as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), β-galactosidase (116,25 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), e ovoalbumina (45 kDa).

Amostras a serem aplicadas em eletroforese nativa foram dialisadas contra água Milli Q e concentradas com o auxílio do concentrador de amostras Amicon Ultra (Millipore). Foi utilizado um tampão de amostra contendo glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v) e aplicadas em um gel de poliacrilamida 7,5%.O

tampão de corrida também não contém SDS, portanto é utilizado o Tris-Glicina. As placas de eletroforese foram submetidas a 200V a temperatura de 4°C, sendo então lavadas 3 vezes com tampão citrato-fosfato 20 mM pH 6,0 sob agitação. Após a lavagem, para o ensaio de  $\alpha$ -manosidase, um papel Whatman n°41 umidecido, com uma solução de 0,25 mM de metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo em tampão citrato-fosfato 20 mM pH 6,0, foi colocado sobre o gel de eletroforese para a incubação em câmara úmida. Após a incubação, o papel foi retirado e o gel colocado em um transiluminador de luz ultravioleta, para a visualização de bandas fluorescentes correspondentes ao substrato hidrolisado (Manchenko 1994).

### **3.8 – Cromatografias**

#### **3.8.1 – Cromatografia de troca iônica**

Foi usada a coluna Hitrap Q XL (5,0 mL), Amersham Biosciences. A coluna foi acoplada ao sistema AKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech), sendo a cromatografia realizada a temperatura ambiente. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna com tampão Tris HCl 20 mM pH 7,0. A amostra foi eluída no mesmo tampão com um gradiente de NaCl de 0 a 1M com fluxo de 2,0 mL/min e as frações coletadas de 2 mL. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo.

### **3.8.2 – Cromatografia de filtração em gel**

Foi usada a coluna Superdex 75 HR 10/30 e subsequentemente a coluna Superdex 200 ambas da Pharmacia. As colunas foram acopladas ao sistema AKTA, sendo as cromatografias realizadas a temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo.

A cromatografia foi realizada em tampão Tris-HCl, pH 7,0, sendo o fluxo utilizado de 0,5 mL/min e as frações coletadas de 0,3 mL. A coluna foi previamente equilibrada com dois volumes de tampão antes das cromatografias.

As frações ativas após a eluição da coluna Superdex 75 foram reunidas e aplicadas em uma nova filtração em gel a Superdex 200. A coluna foi acoplada ao sistema AKTA.

### **3.8.3 – Cromatografia de interação hidrofóbica**

Foi usada a coluna Phenyl Superose HR 5/5 (Pharmacia, Suécia) acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (AKTA) e equilibrada com tampão fosfato 50 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M; pH 7,0. Antes de a amostra ser aplicada nesta coluna ela deve ser combinada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de maneira a obter uma concentração do sal de 2,0M. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5mL do tampão descrito. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20mL) de 2,0 a 0M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no mesmo tampão e uma lavagem com 5 mL de tampão sem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Usou-se um fluxo de 0,5 mL/min e coletaram-se frações de 0,3 mL cada.

### 3.9 – Purificação da $\alpha$ -manosidase solúvel

O sobrenadante da centrifugação do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (vide item 3.2) foi aplicado na coluna HiTrap Q XL (Pharmacia). As frações eluídas com maior atividade sobre o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo foram reunidas. Esse material foi concentrado de um volume de 12 mL para aproximadamente 400  $\mu$ L com auxílio do concentrador de amostras Amicon Ultra (Millipore). Esta amostra concentrada foi então aplicada na coluna para filtração em gel Superdex 75 (Pharmacia). As frações do pico eluído, correspondente a  $\alpha$ -manosidase e contendo atividade sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo foram reunidas. O reunido foi concentrado com auxílio do concentrador Amicon Ultra (Millipore) e então aplicado na coluna de filtração em gel Superdex 200 (Pharmacia). As frações do pico eluído com atividade sobre p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo foram reunidas e foi adicionado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para concentração final de 2M. Esta amostra foi aplicada na coluna Phenyl Superose e ambos os picos foram usados separadamente como fonte de  $\alpha$ -manosidase.

### 3.10 – Diálise

A diálise foi feita para eliminar o sal presente nas amostras antes de submetê-las a eletroforese. Essa foi feita contra 100 volumes de água milli-Q<sup>®</sup>, sendo realizadas três trocas. A membrana utilizada tinha o limite de exclusão de 12.000 Da.

### **3.11 – Determinação do efeito do pH sobre a atividade da $\alpha$ -manosidase**

Essa determinação foi realizada usando preparações purificadas de  $\alpha$ -manosidase, obtidas após último passo da marcha de purificação, a cromatografia de interação hidrofóbica. Esta cromatografia separou a amostra aplicada em dois picos de atividades e ambas as  $\alpha$ -manosidases (Man 1 e Man 2) tiveram seu pH ótimo determinado. Foi utilizada uma série de tampões: tampão citrato-fosfato 0,2 M (pH 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,4; 7,0), tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 7,0; 8,0). P-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo 2,5 mM feito em água milli-Q<sup>®</sup> foi utilizado como substrato para  $\alpha$ -manosidase. Tanto os ensaios quanto a determinação de pH das misturas de substrato e tampão foram realizadas a 30 °C.

### **3.12 – Determinação do peso molecular por filtração em gel em coluna**

#### **Superdex 200 em sistema AKTA**

Amostra de 200  $\mu$ L de preparação purificada de  $\alpha$ -manosidase foi aplicada em coluna Superdex 200 (Pharmacia) em sistema AKTA (FPLC) e eluída com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min. O material eluído foi coletado em frações de 0,3 mL. Essas frações serviram como fonte de material para os ensaios enzimáticos. O perfil de proteínas ao longo da cromatografia foi monitorado pela absorção espectrofotométrica das frações a 280 nm. Pelo volume de eluição das frações com atividade, pode-se obter um valor de  $M_r$  através do plote desse valor numa curva de calibração, obtida através de cromatografias de amostras contendo proteínas de peso molecular conhecido que foram aplicadas nas coluna Superdex 200. Utilizou-se como marcadores: Citocromo

C (12.400 Da), Ovalbumina (43.000 Da), Soro albumina bovina (BSA) (67.000 Da), Beta amilase (200.000 Da).

### **3.13 – Focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida**

A focalização isoelétrica foi realizada como previamente descrito por Terra, *et al* 1978, em colunas de gel de poliacrilamida 7% contendo 1% de anfolitos pH 2-11 (Pharmalite). O reservatório superior ao gel contém 200mM de NaOH e o reservatório inferior contém 150 mM de ácido fosfórico. Amostras foram aplicadas juntamente com o gel tornando-se distribuída ao longo deste ao invés de ser aplicada no topo do lado alcalino após o gel estar polimerizado. A eletrofocalização foi realizada a 4°C por 2h e 30 min com voltagem de 31 V/cm. Não foi necessário uma pré-focalização uma vez que a amostra foi aplicada juntamente com o gel. Os géis foram fracionados usando o fracionador (Autogeldivider Savant Instruments, EUA) no mesmo tampão usado nos ensaios (citrato-fosfato pH 6,0). As frações coletadas foram ensaiadas segundo item 3.4. Os pHs ao longo do gel foram determinados fracionando um gel controle, sem amostra, com água bidestilada, e medindo-se o pH em pHmetro. O gel controle foi fracionado com o mesmo fracionador utilizando água para que o pH das frações pudesse ser medido. A recuperação da atividade aplicada no gel foi de aproximadamente 10%.

### 3.14 – Determinação de $K_m$ e da $V_{m\acute{a}x}$ da $\alpha$ -manosidase

Esses experimentos foram realizados usando preparações purificadas de  $\alpha$ -manosidases (Man 1 e Man 2) de *Tenebrio molitor*. O substrato utilizado foi P-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (0,25 a 23 mM). O efeito da concentração de substrato sobre a atividade de  $\alpha$ -manosidase foi determinado em tampão citrato-fosfato 20 mM pH 6,0 a 30°C usando 15 concentrações diferentes de substrato. As velocidades de hidrólise do substrato foram determinadas e os dados obtidos aplicados ao programa Enzfitter (Elsevier Biosoft) para obtenção dos valores da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima.

### 3.15 – Estudos de inibição

Constante de inibição,  $K_i$ , foi determinada como descrito por (Dixon e Webb, 1979), com P-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo como substrato variando sua concentração de 0,125 a 2 mM (de 0,2 a 2  $K_m$ ). Foram utilizados dois inibidores: 1-deoximanojirimicina e Swaisonina. Foram utilizadas as concentrações 0,2; 0,5; 0,75 e 1 mM para o primeiro inibidor e as concentrações 10, 20, 50 e 100 nM para o segundo inibidor. O valor de  $K_i$  e/ou os mecanismos de inibição foram determinados por replots de inclinações e interceptos dos plotes de Lineweaver-Burk contra concentração de inibidor (Segel, 1975). Todos os experimentos de inibição foram realizados em triplicata. As constantes foram calculadas juntamente com desvios padrões.

### **3.16 – Seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA**

#### **3.16.1 – Excisão *in vivo* do plasmídeo Bluescript**

Células XL1-Blue MRF' e SOLR foram crescidas em LB líquido suplementado com maltose 0,2% (p/v) e MgSO<sub>4</sub> 10 mM durante 16 h a 30°C sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as células foram precipitadas por centrifugação (2.000 g por 5 minutos a 8°C) e ressuspensas em uma solução de MgSO<sub>4</sub> 10 mM até obter uma DO<sub>600</sub> de 1.0 (8 x 10<sup>8</sup> células/mL).

Em seguida, foram combinados 10<sup>7</sup> pfu da biblioteca em fago λ Zap II (1μL) com 10<sup>8</sup> de XL1-Blue MRF' e 10<sup>9</sup> pfu de fago “helper EX Assist”. Nesse passo, proteínas codificadas pelo fago “helper” reconhecem especificamente regiões do DNA do fago λ Zap II e promovem a excisão e circularização de uma fita simples de DNA que contém as seqüências do plasmídeo Bluescript e o inserto de cDNA contido no clone de interesse. Essa mistura foi então incubada a 37°C por 15 minutos e logo em seguida foi acrescentado LB líquido para incubação por 3 horas a 37°C com agitação para que o plasmídeo fosse então encapsulado pelas proteínas do fago “helper” e eliminado pelas células XL1-Blue MRF'. Para purificar os fagos, a cultura foi incubada a 70°C por 20 minutos, período suficiente para matar células XL1-Blue MRF' presentes no meio. Finalmente, esse material foi centrifugado (2.000 g por 10 minutos a 8°C) e o sobrenadante, contendo os fagos carregando o plasmídeo pBluescript e fagos λ Zap II, recuperados.

Para finalizar, as células SOLR foram transformadas com o plasmídeo pBluescript. Para isso 200 μL de suspensão de células SOLR foram incubadas com 1 μL da preparação de fagos obtida no passo anterior. Após 15 minutos de



incubação a 37 °C, essas células foram plaqueadas em meio LB agar contendo carbenicilina (50 µg/mL), Xgal (50 mg/mL) e IPTG 100 mM. As placas foram incubadas por 16 h a 37°C.

Durante esse procedimento, os fagos “helper EX Assist” infectam as célula SOLR, mas não são capazes de crescer. Essas células são selecionadas negativamente em meios contendo carbenicilina e XGal. Os fagos λ Zap II não são capazes de infectar as células SOLR. Células infectadas pelos fagos “helper ExAssist”, contendo como material genético o plasmídeo pBluescript, são selecionadas positivamente em meios contendo carbenicilina e XGal.

### **3.16.2 – Amplificação por PCR de amostras de DNA contidas em colônias bacterianas íntegras**

As colônias isoladas obtidas no meio LB agar contendo carbenicilina, XGal e IPTG foram crescidas em placas de 96 poços durante 16 h a 37 °C sem agitação em meio LB líquido também contendo carbenicilina (50 µg/mL).

Posteriormente, com auxílio de um carimbo de replicação parte das bactérias que cresceram no meio líquido foram transferidas para uma placa de PCR para realização do PCR de colônia e ao restante foi acrescido glicerol 30% e então armazenadas a -80 °C. A reação de PCR de colônia foi realizada em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,4, contendo KCl 50 mM; gelatina 0,01 % (p/v); Triton X-100 0,1 % (p/v); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; 0,5 mM de cada iniciador utilizado; 5 U de taq DNA Polimerase. Esta reação foi incubada a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos como descrito a seguir: 30 segundos a 94°C, para a desnaturação da dupla

fita do DNA; 30 segundos a 55°C para o pareamento dos iniciadores e finalmente 3 minutos a 68°C, para o alongamento da fita complementar de DNA.

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação por PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose escolhendo aleatoriamente algumas amostras. 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 foram resolvidas com uma diferença de potencial de 80-100V. O tampão de amostra (2:5 volumes de amostra) contendo azul de bromofenol, utilizado na eletroforese, foi usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese.

Após a eletroforese, o DNA foi evidenciado utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

### **3.16.3 – Seqüenciamento dos cDNAs**

Os produtos do PCR de colônia, após terem sido verificados aleatoriamente através de gel de agarose foram utilizados na reação de seqüenciamento. Com auxílio do carimbo de replicação, o produto do PCR de colônia foi carimbado em uma placa de PCR contendo a mistura para reação de seqüenciamento, usando o iniciador T7. A reação de seqüenciamento foi realizada usando o produto do PCR de colônia; 3 µL de iniciador na concentração de 3,3 pmol/µL; 2 µL de “Terminator Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer); 3 µL de tampão Tris-HCl 200mM, pH 9 contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, para um volume final de 15 µL. A reação foi realizada na máquina da Perkin-Elmer com 35 ciclos que consistiam de: 96°C por 45 segundos; 50°C por 30 segundos; 60°C por 4 minutos. As amostras foram seqüenciadas pelo

serviço de sequenciamento de cDNA, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, utilizando um seqüenciador automático ABI373A (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

#### **3.16.4 – Análise e montagem dos ESTs**

As seqüências foram processadas em um computador Pentium IV 2,26 GHz rodando sobre o sistema operacional Linux (Debian Testing com kernel 2.6) com os programas Phred, Phrap e Consed Linux 2.6 (Ewing e Green 1998a e 1998b; Gordon *et al.*, 1998) compilados, cujas licenças de uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Eletroferogramas gerados no seqüenciador foram convertidos em seqüências, as quais foram aparadas, extirpando-se extremidades de baixa qualidade, e as regiões seqüenciadas de vetor foram mascaradas. Em seguida ao processamento, as seqüências foram alinhadas, separando as que se sobrepõe em contíguos e as isoladas (singletos).

Através da ferramenta de biologia molecular Blast Client 3, softwares distribuídos pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi possível comparar as seqüências obtidas com as seqüências do banco de dados internacionais de forma automatizada (Altschul *et al.*, 1990; Benson *et al.*, 2000).

## **4 – Resultados**

### **4.1 – Distribuição da atividade da $\alpha$ -manosidase no tubo digestivo de *T. molitor*.**

Com o intuito de se verificar o papel fisiológico da  $\alpha$ -manosidase envolvida na digestão de cadeias de carboidratos, o epitélio ventricular e o conteúdo luminal foram divididos em duas porções, nas quais foram determinadas a atividade da  $\alpha$ -manosidase (Tabela 3). Os resultados mostram que a  $\alpha$ -manosidase encontra-se, principalmente, como uma enzima solúvel no conteúdo ventricular (81,5% da atividade total) e 18,5% da atividade total encontram-se no epitélio ventricular. A maior atividade da  $\alpha$ -manosidase está no conteúdo luminal na porção anterior mais média do intestino médio (60,3% da atividade total), com uma atividade significativa na fração de membrana do epitélio anterior e médio (11,8% da atividade total) (tabela 3).

### **4.2 – Purificação de microvilosidade intestinais**

Na tentativa de purificar as microvilosidades das células do intestino médio da larva de *T. molitor* foi utilizada a técnica de precipitação diferencial com cálcio descrita com detalhes no item 3.12 e a aminopeptidase foi utilizada como uma enzima marcadora, uma vez que sabe-se que ela está presente em maior quantidade na porção posterior do intestino médio e é uma enzima típica de membrana microvilar. A atividade da  $\alpha$ -manosidase microvilar foi enriquecida 11 vezes na porção anterior e 5 vezes na porção posterior do intestino médio (tabela 4).

Estes resultados são compatíveis com uma localização microvilar, já que a aminopeptidase marcadora foi enriquecida 18 e 3,5 vezes nas mesmas frações anteriores.

**Tabela 3 – Distribuição da atividade de  $\alpha$ -manosidase nas diferentes regiões do intestino médio de *T. molitor***

Enzima	Intestino médio inteiro			Epitélio			Conteúdo Luminal		
	Solúvel	Membrana	Anterior + Médio	Anterior + Médio	Posterior	Posterior	Anterior +Médio	Posterior	Posterior
Atividade Total (mU/An)	220±10	50±3	27±3	29±3	7±1	15±2	149±9	20±1	
%	81,5	18,5	10,9	11,7	2,8	6,1	60,3	8,2	
Proteína ( $\mu$ g)	1100±100	160±10	120±20	130±20	57±7	46±3	560±40	145±9	
Atividade Específica (mU/ $\mu$ g)	0,28±0,03	0,36±0,03	0,23±0,02	0,24±0,01	0,14±0,02	0,38±0,05	0,28±0,01	0,144±0,003	
Soma das atividades absolutas	270±20			250±20					

Os valores são média e SEM calculados de ensaios realizados com 4 preparações obtidas de 7 animais cada. O substrato utilizado foi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade que cataliza a clivagem de 1  $\mu$ mol de substrato/min.

**Tabela 4 – Atividade da  $\alpha$ -manosidase obtida em frações durante a preparação de microvilosidade das células do intestino médio da larva de *T. molitor***

<b>Fonte</b>	<b>Proteína (mg/animal)</b>	<b>Atividade Total (mU/animal)</b>	<b>Atividade específica (mU/mg)</b>	<b>Fator de Purificação</b>
<u>Epitélio Anterior</u>				
<b>Homogeneizado</b>	120 $\pm$ 10	39 $\pm$ 10	0,3 $\pm$ 0,1	1
<b>Sobrenadante 1</b>	70 $\pm$ 1	30 $\pm$ 8	0,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2
<b>Microvilosidade</b>	31 $\pm$ 9	100 $\pm$ 10	3,8 $\pm$ 0,7	11 $\pm$ 3
<u>Epitélio Posterior</u>				
<b>Homogeneizado</b>	40 $\pm$ 5	4,5 $\pm$ 0	0,113 $\pm$ 0,00	1
<b>Sobrenadante 1</b>	22,40 $\pm$ 5	2,6 $\pm$ 0	0,12 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,1
<b>Microvilosidade</b>	12 $\pm$ 2	6,7 $\pm$ 0	0,6 $\pm$ 0,10	6 $\pm$ 1

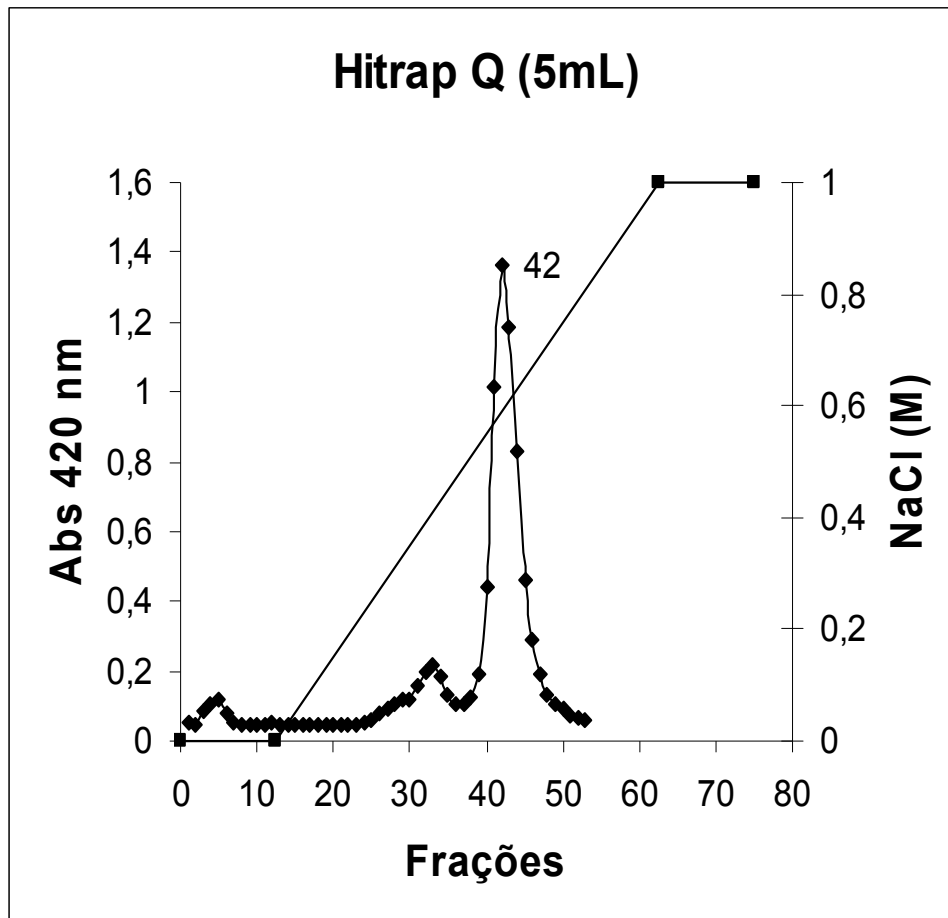
Os valores são média e SEM calculados de 4 ensaios realizados em 3 diferentes preparações obtidas de 100 animais cada. O substrato utilizado foi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo para  $\alpha$ -manosidase. Detalhes da preparação de microvilosidades estão descritos no item 3.6. O fator de purificação para o marcador de membrana microvilar aminopeptidase foi de 18 para o anterior e 3,5 para o epitélio posterior.

### **4.3 – Purificação da $\alpha$ -manosidase presente no conteúdo luminal do intestino médio das larvas de *T. molitor*.**

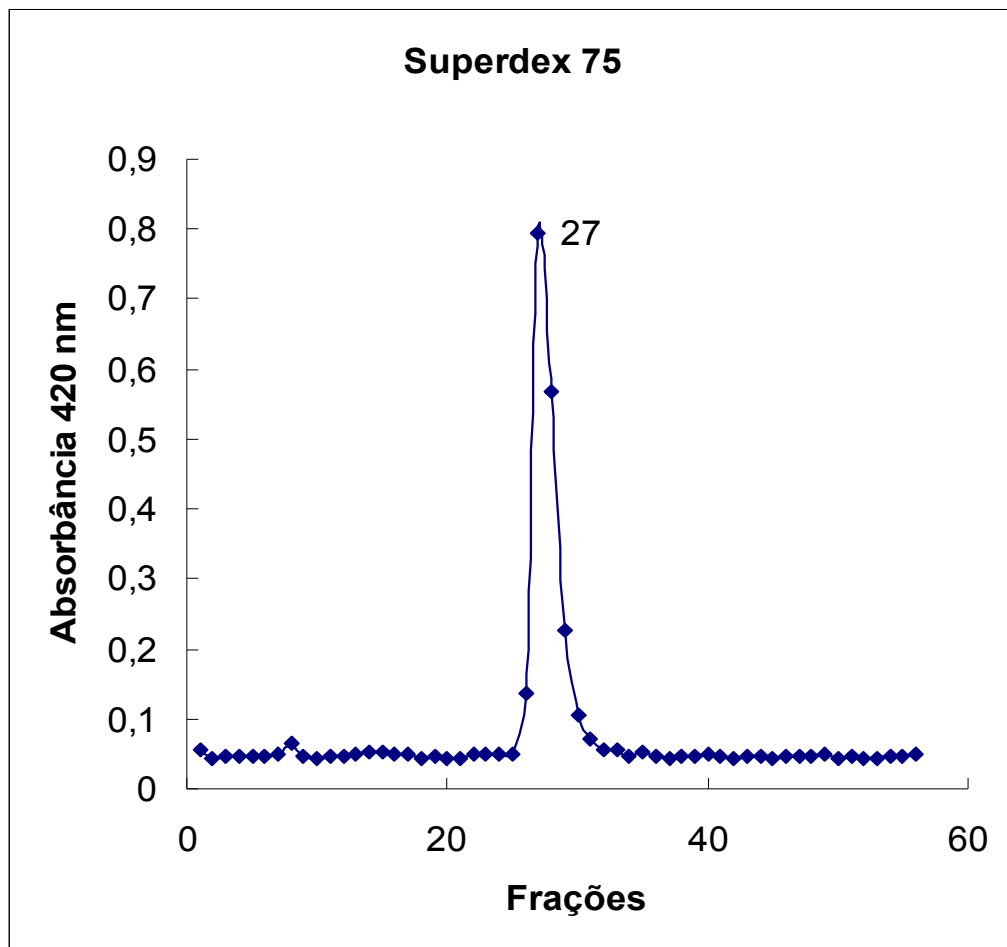
Com o objetivo de purificar a  $\alpha$ -manosidase solúvel do intestino médio das larvas de *T. molitor* (já que pelo resultado de distribuição, observamos que esta enzima encontra-se majoritariamente no conteúdo), optamos começar por uma cromatografia de troca iônica, onde a coluna utilizada foi uma Hitrap Q e as proteínas foram eluídas em gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M, utilizando o tampão Tris HCl 20 mM pH 7,0. Uma preparação de homogeneizado de conteúdo luminal contendo 100 animais foi aplicada a esta coluna e a atividade da  $\alpha$ -manosidase foi medida nas frações desta cromatografia (figura 2), utilizando um método colorimétrico de identificação. Observamos que a enzima foi eluída em concentração de NaCl por volta de 0,5 M. A recuperação de atividade enzimática foi de 34,4 % em relação ao material inicial. Como o próximo passo envolve uma coluna de filtração em gel (Superdex 75) e esta possui um limite de volume permitido a ser aplicado, optou-se por concentrar a amostra eluída da troca aniônica. A recuperação da atividade enzimática após a concentração é quase total. Após a concentração, a amostra foi cromatografada em uma coluna Superdex 75 onde observamos apenas um pico de atividade de  $\alpha$ -manosidase (figura 3). A recuperação da atividade enzimática neste passo foi de 37,2% em relação ao material vindo do reunido da Hitrap Q. O reunido da Superdex 75 foi aplicado numa nova filtração em gel, agora a Superdex 200 (figura 4). A recuperação da atividade enzimática após o passo da Superdex 200 foi de 17,8% em relação ao material inicial. As frações correspondentes ao pico de atividade foram cromatografadas numa coluna de



interação hidrofóbica, a Phenyl Superose. Esta coluna foi acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (AKTA). O perfil encontrado após o ensaio das frações eluídas com o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo está ilustrado na figura 5 e podemos observar a presença de dois picos de atividade. Amostras dos dois picos foram submetidas a um SDS-PAGE (figura 6). Neste gel podemos observar que a união das frações do pico 1 incluem várias bandas de proteínas que não correspondem a da  $\alpha$ -manosidase (dado não mostrado), já aquelas correspondentes ao pico 2 resultam em apenas uma banda, que corresponde a  $\alpha$ -manosidase com aproximadamente 70 KDa. Na cromatografia de filtração em gel podemos deduzir o peso molecular da  $\alpha$ -manosidase observando o volume de eluição da  $\alpha$ -manosidase (ver item 3.12) (figura 7). O valor encontrado foi de 123 KDa. Por outro lado, quando fizemos uma SDS-PAGE, que é desnaturante, podemos ter bandas correspondentes as subunidades de proteínas oligoméricas observadas na SDS-PAGE (figura 6). As duas bandas somadas geram uma proteína de peso molecular de aproximadamente 140 KDa. O valor de massa molecular encontrado por filtração em gel é de aproximadamente 123 KDa. Ambos os picos eluídos da cromatografia de interação hidrofóbica foram concentrados separadamente no concentrador microcon YM-10 e aplicado num gel nativo, o qual foi revelado com o substrato fluorescente como descrito em 3.7. Ao revelar-mos este gel, podemos observar apenas uma banda de atividade sobre o substrato em ambos os picos e com a mesma migração no gel (figura 8).

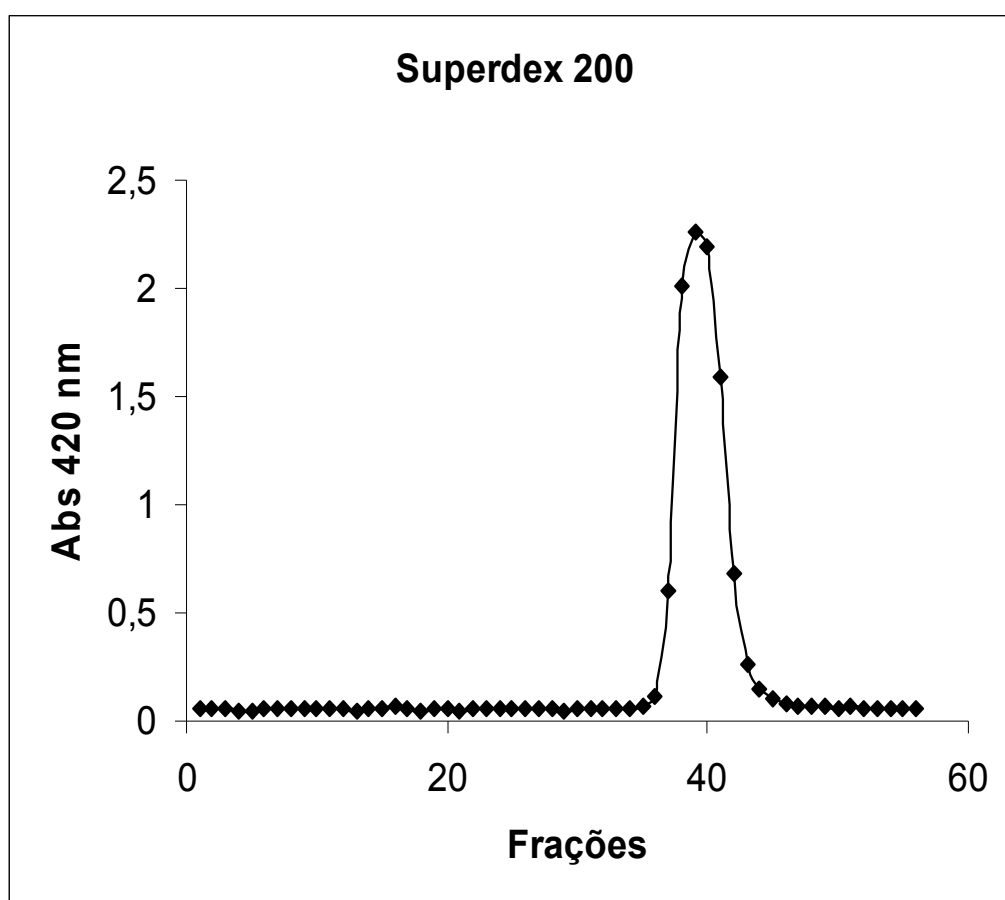


**Figura 2 – Perfil cromatográfico para  $\alpha$ -manosidase em coluna Hitrap Q.** A fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *T. molitor* foi aplicada em uma cromatografia em Hitrap Q com o gradiente de NaCl entre 0 e 1,0 M em tampão Tris HCl 20 mM pH 7,0. A atividade enzimática foi determinada para o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo. A atividade para  $\alpha$ -manosidase foi detectada em 420nm.

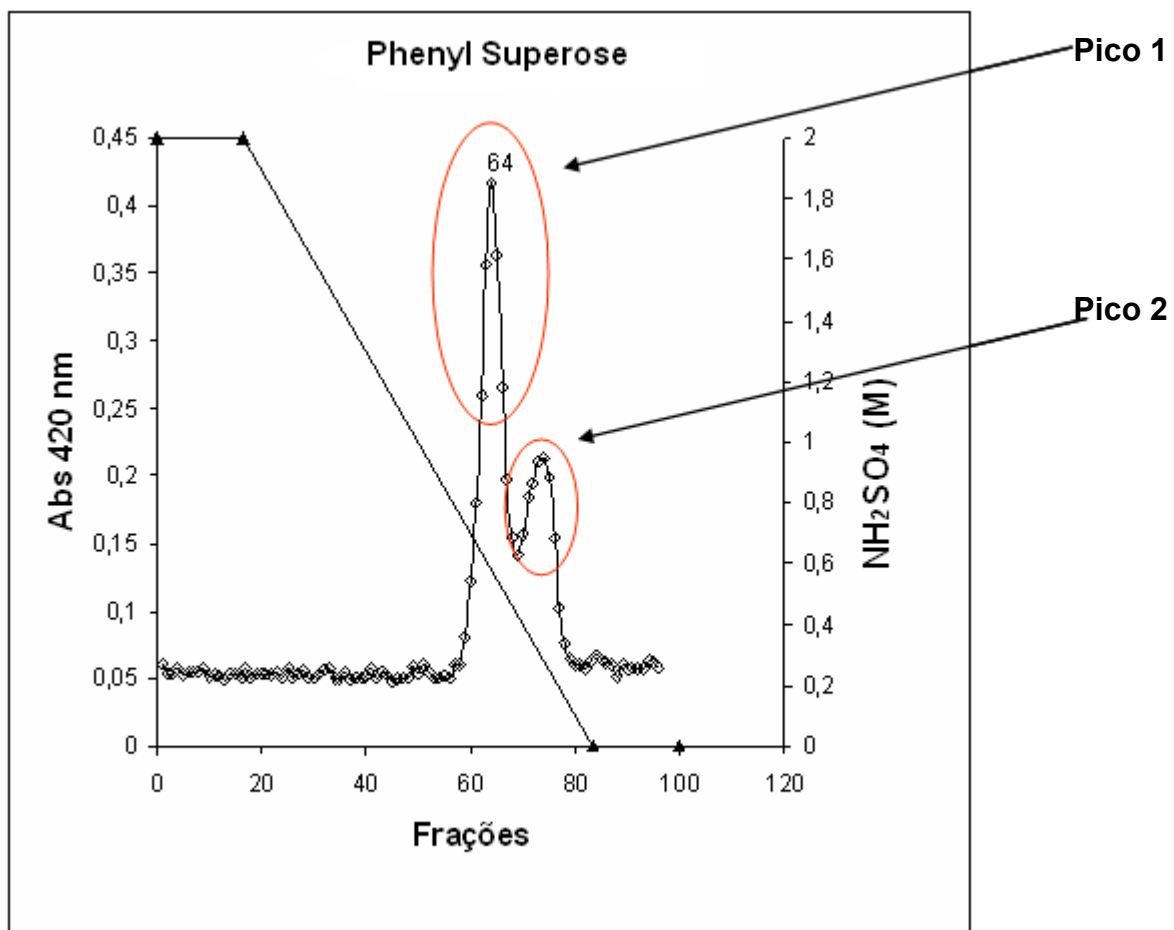


**Figura 3 – Perfil cromatográfico para  $\alpha$ -manosidase em coluna de filtração em gel Superdex 75.**

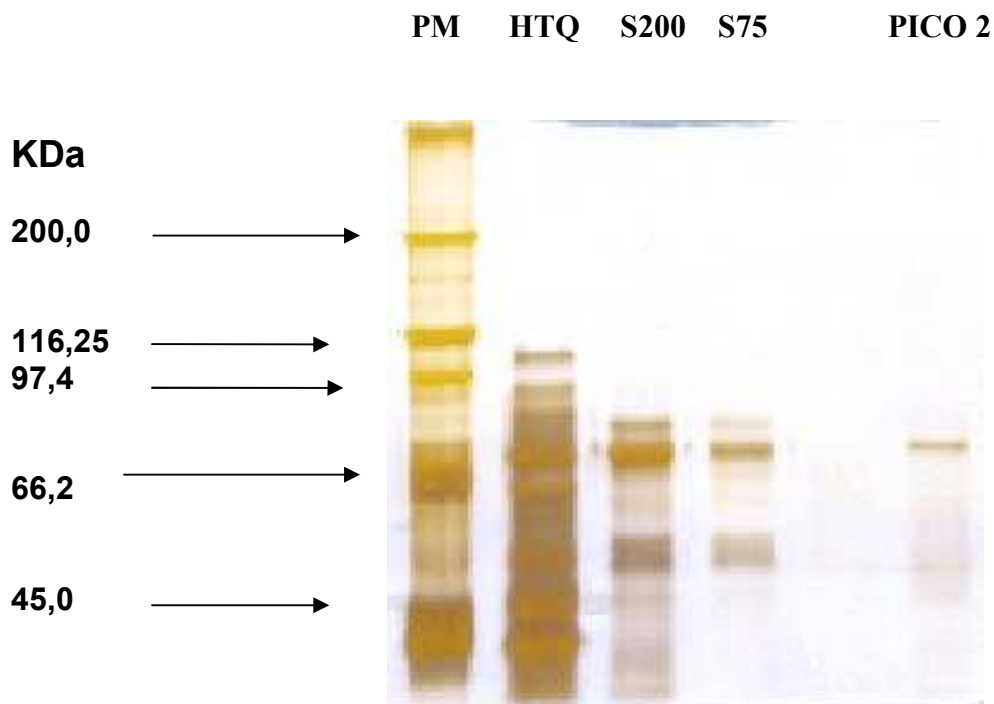
As frações (40 a 45) recolhidas da cromatografia de troca iônica (figura 2) foram cromatografadas nesta coluna S75. Outros detalhes na figura 2.



**Figura 4 – Perfil cromatográfico para  $\alpha$ -manosidase em coluna de filtração em gel Superdex 200.** As frações (25 a 29) recolhidas da cromatografia de filtração em gel Superdex 75 (figura 3) foram cromatografadas nesta coluna S200. Outros detalhes na figura 2.

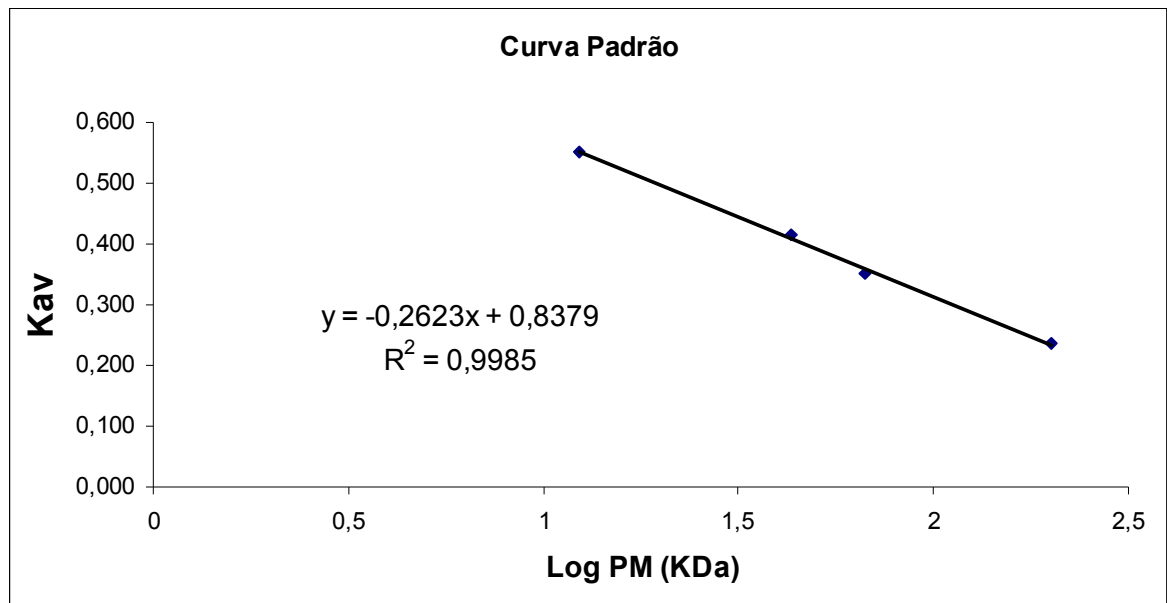


**Figura 5 – Perfil cromatográfico para  $\alpha$ -manosidase em coluna de interação hidrofóbica.** As frações (40 a 45) recolhidas da cromatografia de filtração em gel S200 foram cromatografadas nesta coluna Phenyl Superose. Foi utilizado um gradiente de sulfato de amônio de 0 a 2M. Outros detalhes na legenda da figura 2.



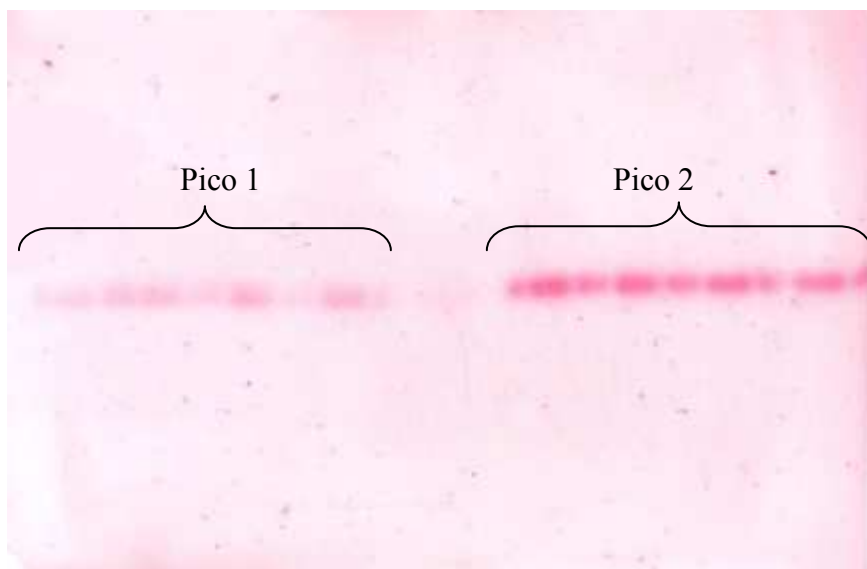
**Figura 6- SDS-PAGE 7,5% das frações reunidas durante a marcha de purificação da  $\alpha$ -manosidase solúvel de *T.molitor*.**

Todas as amostras foram dialisadas e submetidas à fervura antes de serem aplicadas no gel. O gel foi corado com prata segundo Blum *et al.*(1987), para evidenciar proteínas. PM- padrões de peso molecular; HTQ- Frações reunidas após eluição da cromatografia troca aniônica Hitrap Q, S200- Frações reunidas após eluição da cromatografia de filtração em gel Superdex 200, S75- Frações reunidas após eluição da cromatografia de filtração em gel Superdex 75, Pico 2- Frações reunidas após eluição da cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Superose correspondentes ao segundo pico (Man 2).



**Figura 7 – Curva padrão para definir o peso molecular da  $\alpha$ -manosidase por cromatografia de filtração em gel**

Foram utilizadas como padrões as seguintes proteínas: beta-amilase (200KDa); BSA (67KDa); ovalbumina (43KDa) e citocromo C (12,4 KDa). As amostras foram aplicadas separadamente na coluna Superdex 200 e os volumes de eluição foram monitorados através da detecção a 280 nm. Os cálculos foram realizados com o auxílio da seguinte fórmula:  $K_{av} = (V_r - V_o) / (V_c - V_o)$ , sendo  $V_r$  igual ao volume de eluição da proteína; para o cálculo de  $V_o$  (igual ao volume morto) utilizou-se blue dextran (2.000 KDa) e  $V_c$  que corresponde ao volume da coluna em mL. O  $K_{av}$  encontrado para  $\alpha$ -manosidase foi de 0,281.

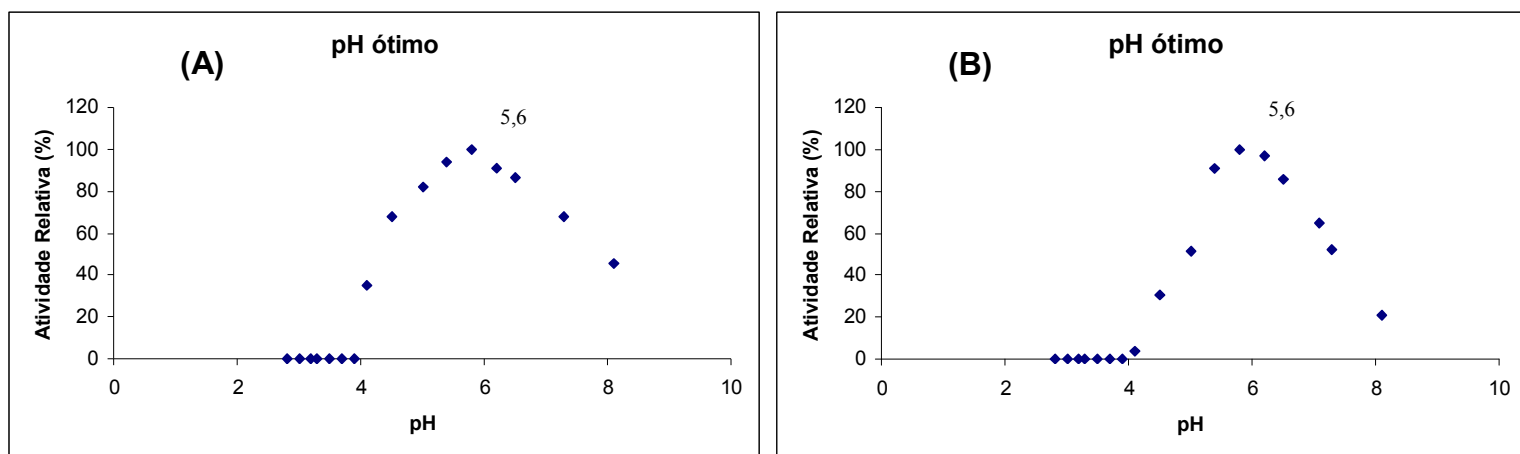


**Figura 8 – Eletroforese em condições nativas em gel de poliacrilamida 7,5 % da  $\alpha$ -manosidase.**  
A amostra utilizada para fazer este gel foi obtida do pico 1 e 2 eluídos da coluna Phenyl Superose (interação hidrofóbica).



#### 4.4 – Efeito do pH

Ensaio enzimáticos para a verificação do efeito do pH sobre a atividade da  $\alpha$ -manosidase de *Tenebrio molitor* foram realizados com a  $\alpha$ -manosidase 1 e 2 (Man 1 e Man 2) presentes nos picos de atividade eluídos da coluna de interação hidrofóbica. As enzimas mostraram-se estáveis entre os pHs 4 e 7. O pH ótimo observado para ambas (Man 1 e Man 2) foi de aproximadamente 5,6 (figura 9).



**Figura 9 – O efeito do pH na taxa de hidrólise do p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo.** (A) e (B) correspondem respectivamente a Man 1 e Man 2, as quais foram recolhidas dos picos 1 e 2 da cromatografia de interação hidrofóbica. Os pontos vieram de ensaios em triplicata. Os tampões usados foram: citrato-fosfato de sódio 0,2 M (pH de 2,6 – 7,0) e Tris-HCl 0,2 M (pH de 7,0 – 8,0). O substrato utilizado estava em uma concentração final de 2,5 mM. Os resultados estão expressos em função da maior atividade.

#### 4.5- Determinação do ponto isoelétrico (pI) da $\alpha$ -manosidase purificada Man 2

A  $\alpha$ -manosidase purificada Man 2 foi submetida a uma focalização isoelétrica para determinar seu pI. O resultado apresentado na figura 10 mostra que esta enzima purificada apresenta pI em 3,38.

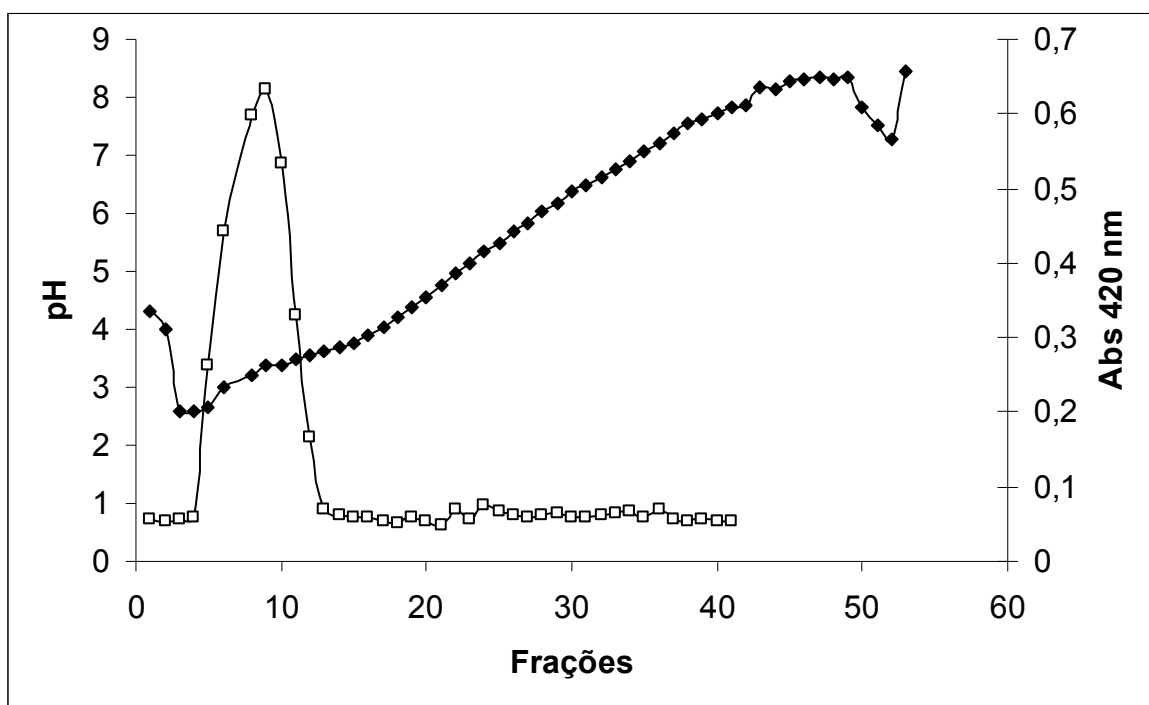


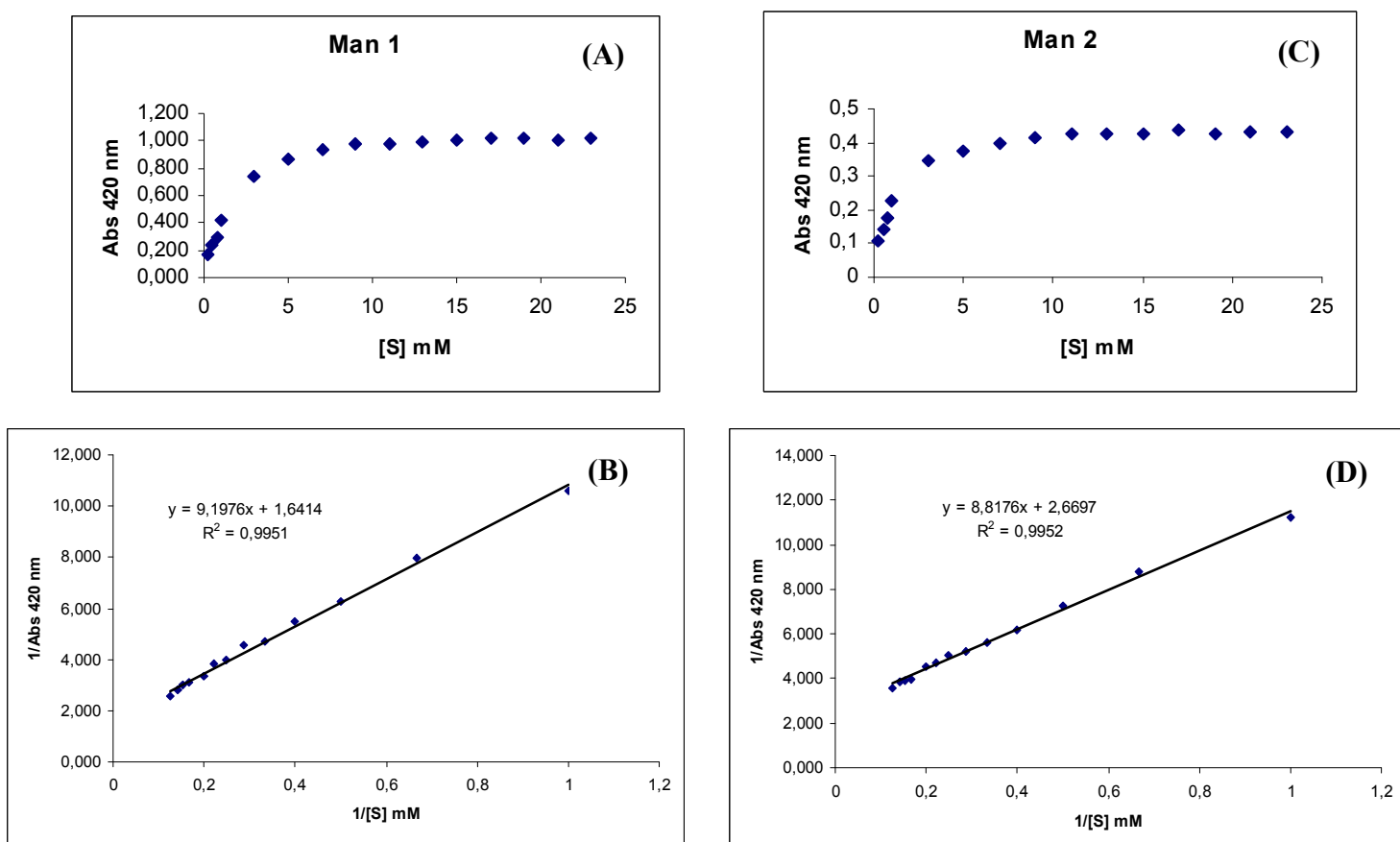
Figura 10 – Focalização isoelétrica da  $\alpha$ -manosidase Man 2 purificada de *T.molitor*

O pI foi calculado como sendo igual a 3,38 com uma recuperação menor que 10%.

#### 4.6- Propriedades cinéticas das $\alpha$ -manosidasas purificadas

As  $\alpha$ -manosidasas digestivas, purificada a partir de larvas de *T.molitor* tiveram suas atividades testadas sobre o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo para determinação dos parâmetros cinéticos. As medidas de Km e Vmáx foram feitas

medindo a formação de produto em diferentes concentrações de substrato utilizando os plotes de Lineweaver-Burk. Tanto Man 1 e Man 2 seguem a cinética de Michaelis-Menten. Os valores de  $K_m$  para Man 1 e Man 2 foi de 0,84 e 0,62 mM respectivamente, e  $V_{m\acute{a}x}$  com valores de 1,12 e 0,21 para Man 1 e Man 2 respectivamente, com erros calculados pelo programa Enzfitter ficando abaixo de 5 % (figura 11).



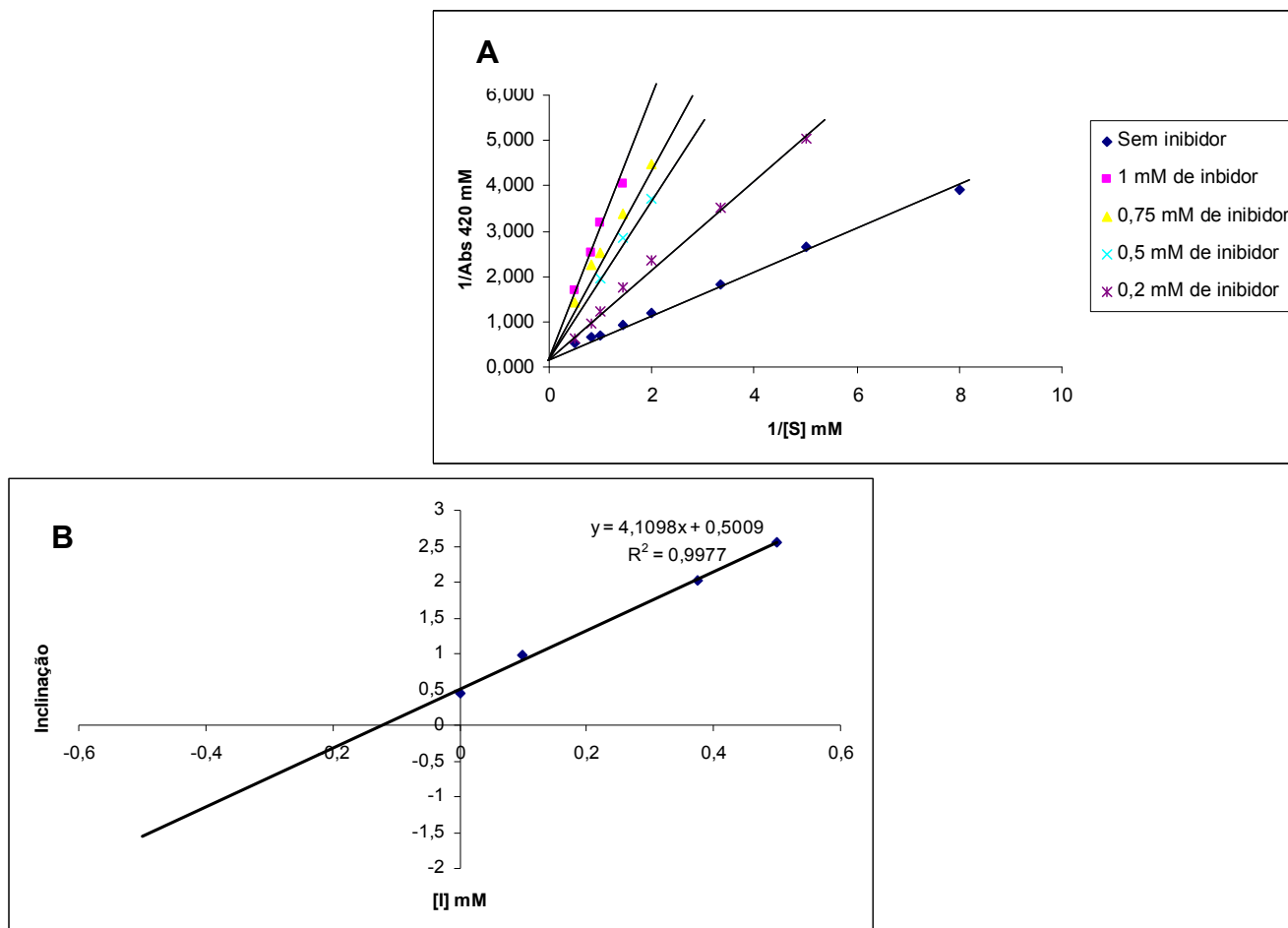
**Figura 11 – Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da  $\alpha$ -manosidase de *T.molitor*.** As enzimas foram incubadas com várias concentrações de substrato em tampão citrato-fosfato 20 mM pH=6,0. As atividades foram determinadas segundo item 3.4. Valores de  $k_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram obtidos através de ajustes dos pontos experimentais (média e desvio padrão da média) feitos no programa Enzfitter (Elsevier Biosoft). Man 1:(A) e (B) correspondem aos plotes de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk respectivamente; Man 2: (C) e (D) correspondem aos plotes de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, respectivamente.

Também foram feitos ensaios de inibição com dois inibidores que sabidamente inibem  $\alpha$ -manosidases: 1-Deoximanojirimicina e Swainsonina. Os Kis encontrados para Man 1 e Man 2 estão resumidos na tabela 5 e foram determinados como apresentado na figura 12. O padrão de inibição obtido em todos os casos é do tipo competitivo linear simples. Swainsonina foi o mais efetivo inibidor, sendo ativo na ordem de nanomolar, enquanto o outro inibidor, 1-deoximanojirimicina foi efetivo apenas em concentrações milimolares.

**Tabela 5 – Inibição das  $\alpha$ -manosidases purificadas de *T.molitor***

<b>Inibidor</b>	<b>Man 1</b>	<b>Man 2</b>
<b>Ki (1-deoximanojirimicina)</b>	0,12 mM	0,15 mM
<b>Ki ( Swainsonina)</b>	67,8 nM	63 nM

A atividade foi determinada pela hidrólise de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, em tampão citrato-fosfato 20 mM, pH 6,0. Os Kis foram determinados incubando-se 8 diferentes concentrações de substrato com 4 diferentes concentrações de inibidor. Os valores apresentados foram calculados a partir do replote de inclinação de plotes de Lineweaver-Burk contra concentração de inibidor ( figura 11).



**Figura 12 – Determinação do  $K_i$  para a  $\alpha$ -manosidase purificada Man 2 de *T.molitor* na presença de 1-deoximanojirimicina.** O substrato usado foi p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo. As curvas apresentadas em A correspondem aos plotes de Lineweaver-Burk na presença de concentrações crescentes de inibidor (0,2; 0,5; 0,75; 1 mM). B, corresponde ao replote das inclinações do plote em A contra as concentrações de inibidor correspondentes. Os valores de  $K_i$  estão apresentados na tabela 5.

#### 4.7 – Transcriptoma parcial do intestino médio de *T.molitor*

Um sequenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA preparada a partir de intestinos médios de *T molitor* foi realizado a procura de sequências de interesse representada, nesse trabalho, por sequências de  $\alpha$ -manosidases. Após o processamento dos sequenciamentos, onde as sequências de vetor foram aparadas

e as de baixa qualidade foram descartadas, surgiu um EST útil para este projeto. Uma sequência era considerada útil quando apresentava um mínimo de 150 bases contíguas com qualidade inferida pelo Phred  $\geq 20$  (Ewing, *et al.*, 1998 a,b).

A montagem de contíguos consiste na junção ordenada dos nucleotídeos, com base na similaridade entre as sequências das diferentes ESTs sequenciadas, levando em conta os critérios de qualidade de sequenciamento e sua interpretação. Assim é possível estabelecer uma sequência comum (consenso) a partir da montagem de várias sequências. As sequências que não formam contíguos foram denominadas singletos. O EST útil encontrado na varredura da biblioteca de cDNA de *T. molitor* foi um singleto. A tradução da sequência deste singleto quando comparada com às sequências depositadas no Genbank (Blastx – banco de dados não redundante – nr), revelou que tinha similaridade com algumas  $\alpha$ -manosidases de outros organismos. Com a ajuda do programa CLUSTAL, o alinhamento de sequência foi feito gerando a figura 13. Quando foi encontrado este singleto homólogo a  $\alpha$ -manosidases foi feito um alinhamento entre esta e a possível  $\alpha$ -manosidase de membrana descrita por Ferreira, *et al* (2007) (tabela 1) para ver se formavam um contíguo, pois um dos objetivos é completar a seqüência desta proteína. O resultado foi que estas duas seqüências não se alinhavam. Devido às diferenças entre estas duas seqüências obtidas, elas foram alinhadas separadamente com as seqüências do banco de dados gerando figuras separadas (ver figura 13 e 14). Ambas as seqüências foram mais similares a uma seqüência de  $\alpha$ -manosidase de *Aedes aegypti*.

A figura 15 foi gerada para verificar quão próximas filogeneticamente eram as duas seqüências de  $\alpha$ -manosidase de *T. molitor* em relação as outras seqüências de

banco de dados. Foram feitos dendogramas separados para cada  $\alpha$ -manosidase, pois elas correspondem a regiões distintas da molécula de  $\alpha$ -manosidase.

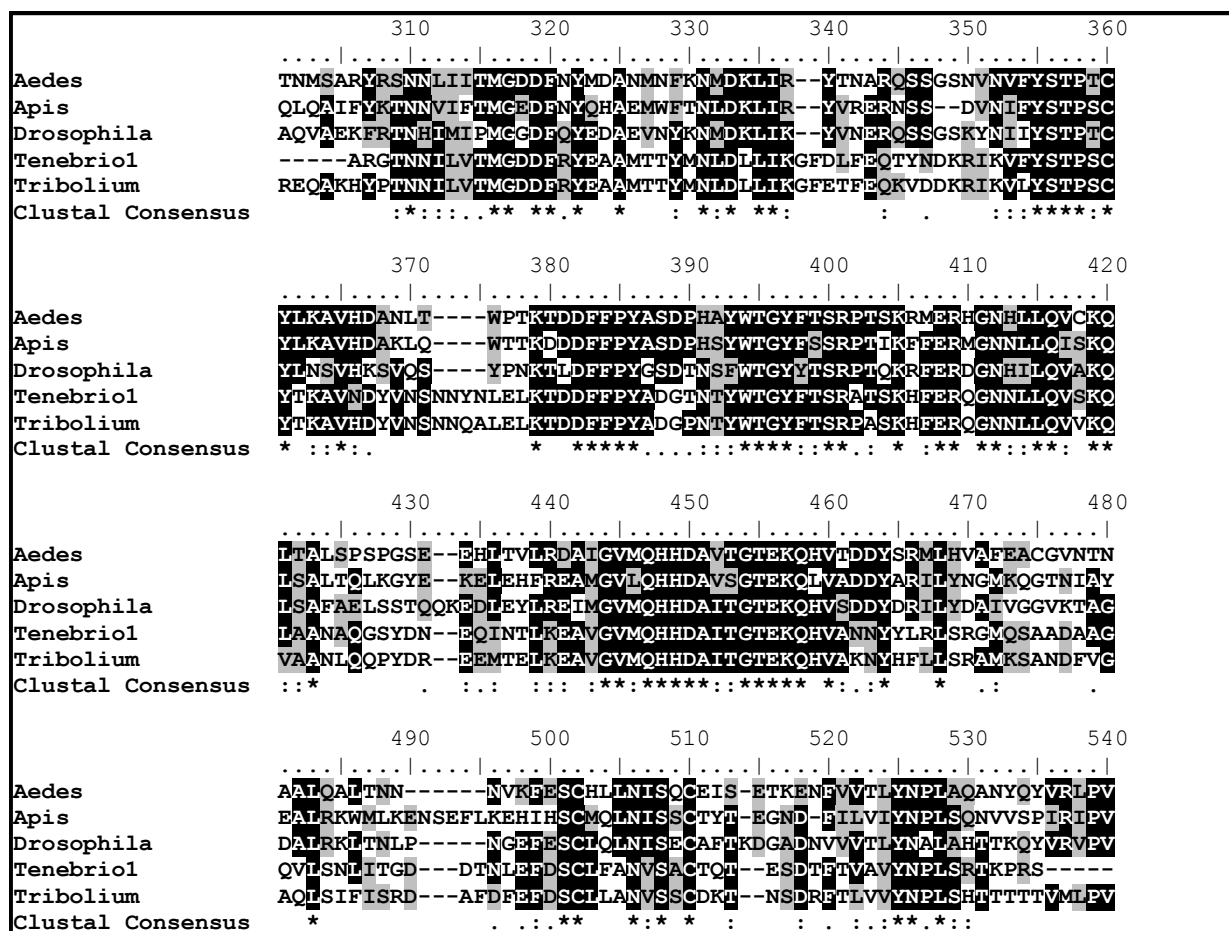
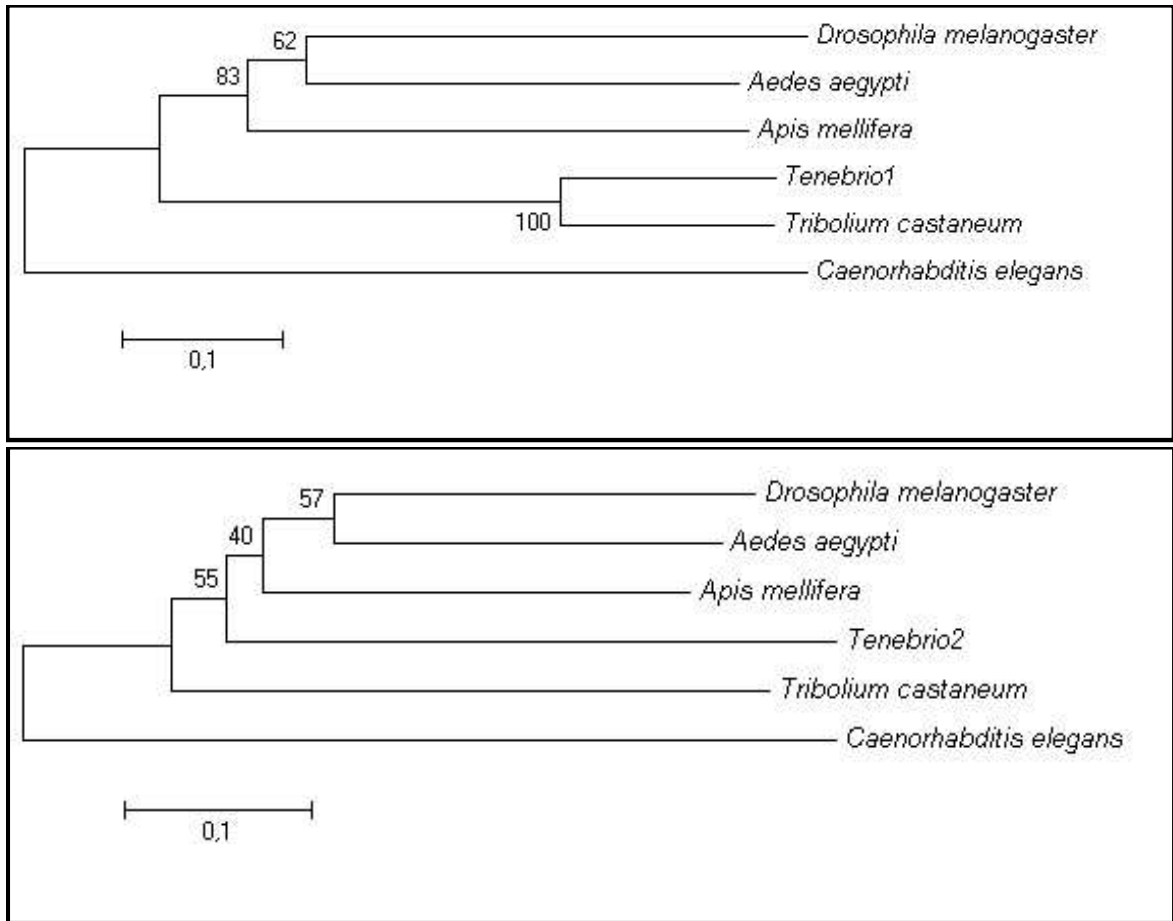


Figura 13 – Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos de uma possível  $\alpha$ -manosidase solúvel (*Tenebrio 1*) de *T. molitor* com outras seqüências de  $\alpha$ -manosidas. Aminoácidos marcados com (\*) são resíduos totalmente conservados, (:) corresponde a resíduos fortemente conservados, (.) indica conservação fraca e ausência de sinal corresponde a uma região ou resíduo não conservado. Os alinhamentos foram feitos com o programa CLUSTALW.







**Figura 15 – Relação filogenética entre  $\alpha$ -manosidases de diferentes organismos.** O dendograma da  $\alpha$ -manosidase foi gerado por comparação dois a dois de seqüências de aminoácidos de  $\alpha$ -manosidases. Tenebrio 1 corresponde a seqüência da  $\alpha$ -manosidase solúvel e Tenebrio 2 corresponde a  $\alpha$ -manosidase de membrana. Os valores dos “bootstraps” são mostrados na raiz dos ramos. A filogenia do “neighbor-joining” foi construída com a versão 3.1 do programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis”.

## 5 – Discussão

### 5.1 – Distribuição da atividade de $\alpha$ -manosidase nas diferentes regiões do intestino médio de *T. Molitor* e purificação de microvilosidades intestinais

Diversos trabalhos têm mostrado que enzimas presentes no tubo digestivo de insetos podem ser provenientes do alimento por eles ingeridos. Schumaker *et al.* (1993) verificaram a existência de uma cisteína proteinase no tubo digestivo de *Scaptotrigona bipunctata* que era proveniente do pólen ingerido na dieta. Terra *et al.* (1985) mostraram que a atividade de aminopeptidase e celulase encontrado no farelo de trigo usado na alimentação de larvas de *T. molitor* contribuía significativamente para a atividade encontrada na forma solúvel do intestino médio desse animal. Dessa forma, para assegurar que uma determinada enzima é realmente produzida pelo inseto é necessário primeiro verificar se as enzimas encontradas no tubo digestivo não seriam originárias do alimento por eles ingeridos. A fração solúvel de tubos digestivos inteiros das larvas de *T. molitor* possui considerável atividade hidrolítica sobre o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo. A possibilidade da atividade da  $\alpha$ -manosidase luminal ter vindo do alimento fornecido aos animais foi descontada porque a atividade de 20 mg de farelo de trigo (correspondente ao peso fresco no tubo digestivo do *T. molitor*) é de 0,18 mU/Animal de  $\alpha$ -manosidase. Como esse número corresponde a apenas 0,07% da atividade recuperada do tubo digestivo de *T. molitor* (tabela 3), a atividade encontrada foi considerada como originada do próprio inseto (para detalhes ver item 3.5).

Os resultados da distribuição mostraram que a  $\alpha$ -manosidase encontra-se, principalmente, como uma enzima solúvel no conteúdo intestinal (82% da atividade total) e 18% encontra-se no epitélio intestinal como uma enzima de membrana. A

maior atividade da  $\alpha$ -manosidase está no conteúdo luminal na porção anterior mais média do intestino médio (60,3% da atividade total), com uma atividade significativa na fração de membrana do epitélio anterior e médio (11,8% da atividade total) (tabela 3). Este resultado confirma os indícios da existência de uma  $\alpha$ -manosidase de membrana, que deu início a este projeto após a varredura da biblioteca de cDNA de *T. molitor* com anticorpos gerados contra microvilosidades intestinais purificadas de *T. molitor* (ver tabela 1) (Ferreira *et al.*, 2007). Na tentativa de purificar as microvilosidades das células do intestino médio da larva de *T. molitor* foi utilizada a técnica de precipitação diferencial com cálcio descrita com detalhes no item 3.12 e a aminopeptidase foi utilizada como uma enzima marcadora, uma vez que sabe-se que ela está presente em maior quantidade na porção posterior do intestino médio e é uma enzima típica de membrana microvilar. Enriquecimentos de marcadores microvillares em uma preparação é inversamente relacionado á concentração de proteínas microvillares em relação a concentração de proteínas total. O pequeno enriquecimento observado em preparações de Diptera (3-7,5) (Houk *et al.*, 1986), comparado com preparações de Lepidoptera (4,5-10) (Santos *et al.*, 1986) pode resultar do fato de todas as células do intestino médio de Diptera terem microvilosidades (Ferreira *et al.*, 1981) enquanto somente células colunares possuem microvilosidades verdadeiras em tecidos do intestino médio de larvas de Lepidoptera. Enriquecimentos elevados observados em preparações de Coleoptera (10-13) (Jordão *et al.*, 1995) podem ter sido gerados devido ao conteúdo de proteína das micovilosidades do intestino médio de Coleoptera ser menor do que o de Diptera e provavelmente do que o de Lepidoptera (Jordão *et al.*, 1995). O aumento observado na atividade específica da  $\alpha$ -manosidase e o enriquecimento próximo ao da enzima marcadora aminopeptidase confirma a existência de uma  $\alpha$ -manosidase

microvilar, embora exista também em menor quantidade uma forma solúvel no epitélio posterior. A atividade da  $\alpha$ -manosidase microvilar foi enriquecida 11 vezes na porção anterior e 5 vezes na porção posterior do intestino médio (tabela 4). Como a  $\alpha$ -manosidase solúvel é majoritária, deu-se início a purificação desta enzima para uma posterior caracterização.

## **5.2 – Purificação da $\alpha$ -manosidase presente no intestino médio de *T. Molitor***

Com o objetivo de purificar a atividade majoritária da  $\alpha$ -manosidase presente no conteúdo luminal do intestino média das larvas de *T. molitor* (já que pelo resultado de distribuição, observamos que estas enzimas encontram-se majoritariamente no conteúdo), optamos começar por uma cromatografia de troca iônica, onde a coluna utilizada foi uma HiTrap Q e as proteínas foram eluídas em gradiente de NaCl de 0 a 1 M, utilizando o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0. Uma preparação de homogeneizado de conteúdo luminal foi aplicada a esta coluna e a atividade de  $\alpha$ -manosidase foi medida nas frações desta cromatografia (figura 2), utilizando um método colorimétrico de identificação. Os próximos passos de purificação foram: duas filtrações em gel (Superdex 75 e Superdex 200), onde observamos apenas um pico de atividade de  $\alpha$ -manosidase (figura 3 e 4), e uma coluna de interação hidrofóbica (Phenyl Superose). Foram utilizadas duas filtrações em gel, porque quando elas foram testadas, observamos perfis distintos de eluição, indicando que se as filtrações fossem combinadas geraria uma purificação melhor. Estas duas colunas (Superdex 75 e Superdex 200) possuem os poros da resina de tamanhos diferentes e assim conseguimos eliminar proteínas contaminantes de tamanhos diferentes. O perfil encontrado, após o ensaio das frações eluídas da Phenyl

Superose, com o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo está ilustrado na figura 5 e podemos observar a presença de dois picos de atividade, sugerindo a existência de duas  $\alpha$ -manosidases solúveis e que só se diferem quanto à hidrofobicidade. Amostras dos dois picos foram submetidas a um SDS-PAGE (figura 6). Neste gel podemos observar que a união das frações do pico 1 incluem várias bandas de proteínas que não correspondem a da  $\alpha$ -manosidase (dado não mostrado), portanto não está pura, já aquelas correspondentes ao pico 2 resultam em apenas uma banda, que corresponde a  $\alpha$ -manosidase com aproximadamente 70 KDa. Na cromatografia de filtração em gel podemos deduzir o peso molecular da  $\alpha$ -manosidase observando o volume de eluição da  $\alpha$ -manosidase (ver item 3.12). O valor encontrado foi de 123 KDa. Por outro lado, quando fizemos uma SDS-PAGE, que é desnaturante, podemos ter bandas correspondentes às subunidades de proteínas oligoméricas observadas na SDS-PAGE (figura 5). As duas bandas somadas geram uma proteína de peso molecular de aproximadamente 140 KDa. O valor de massa molecular encontrado por filtração em gel é de aproximadamente 123 KDa (ver figura 7), o que aliado ao resultado de SDS-PAGE indica que a  $\alpha$ -manosidase deve ser formada por duas subunidades de mesmo tamanho, uma vez que esta eletroforese foi realizada em condições desnaturantes. Ambos os picos eluídos da cromatografia de interação hidrofóbica foram concentrados separadamente e aplicados num gel nativo, o qual foi revelado com o substrato fluorescente como descrito em 3.7. Ao revelar-mos este gel, podemos observar apenas uma banda de atividade sobre o substrato em ambos os picos e com a mesma migração no gel (figura 8), o que significa que somente uma enzima naquele meio é capaz de hidrolisar aquele substrato e que é possível utilizar as frações

correspondentes a estes picos como fonte de enzima para caracterização enzimática.

### **5.3 – Caracterização cinética da $\alpha$ -manosidase presente no intestino médio de *T. Molitor***

Existem pelo menos quatro tipos de  $\alpha$ -manosidases encontradas em diferentes organismos com pH ótimo diferentes. Estas enzimas encontram-se em locais diferentes nestes organismos, assim podemos citar a  $\alpha$ -D-manosidase do lisossomo, da membrana do golgi e a do citossol. Estas enzimas tem pH ótimo de 4,6; 5,6 e 6,0 (ou 6,5 se for extrato sem tratamento) respectivamente (Opheim and Touster, 1977). O pH ótimo observado para ambas: Man 1 e Man 2 foi de aproximadamente 5,6 (figura 9), aproximando-se dos pHs observados nas enzimas do Golgi.

$\alpha$ -manosidases são encontradas com os mais variados pontos isoelétricos. Os valores encontrados na literatura variam desde pls 3,2 até pls 6,7 passando por valores 4,6; 5,8 e 6,0 (Takegava, K. *et al*, 1989; Athanasopoulos VI *et al*, 2005; Tulsiani, D.R.P, *et al*,1977; Teruo Miyagawa, M.D., Fukuko Dói, M.D, 1979; Phillips, N. C. *et al*, 1976). O pl encontrado para a  $\alpha$ -manosidase Man 2 solúvel de *T.molitor* foi de 3,38. Este dado pode ser utilizado em métodos de separação desta enzima.

As enzimas purificadas tem uma elevada afinidade pelo substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, com valor de Km encontrado para Man 1 e Man 2 iguais a 0,84 e 0,62 mM respectivamente, similar aos dados encontrados para a  $\alpha$ -manosidase citosólica de fígado de rato (Opheim and Touster, 1978) e também se assemelha aos dados da  $\alpha$ -manosidase de membrana do retículo endoplasmático (Bischoff and Kornfeld, 1983). Enzimas citossólicas tem Km baixo e pH ótimo

próximo da neutralidade, já as  $\alpha$ -manosidases lisossomais e as de Golgi tem valores de Km elevados e pH ótimo mais ácidos. Estes dados indicam que a enzima citossólica é claramente diferente das enzimas do Golgi e lisossomais. As enzimas do Golgi e lisossomais embora sejam similares, também são diferentes. O Km da lisossomal é significativamente menor do que a  $\alpha$ -manosidase do Golgi (Opheim and Touster, 1978).

Os resultados dos estudos de inibição estão apresentados na tabela 5. Foram utilizados dois inibidores, 1-deoximanojirimicina e swainsonina, que sabidamente inibem  $\alpha$ -manosidases. Tanto Man 1 como Man 2 foram inibidas por ambos os inibidores, mas o inibidor mais eficiente foi swainsonina, o qual apresentou um valor de Ki bem menor quando comparado com 1-deoximanojirimicina. A inibição por swainsonina foi mais efetiva, sendo ativa na ordem de nanomolar, enquanto o outro inibidor foi ativo na ordem de milimolar. A  $\alpha$ -manosidase lisossomal e a  $\alpha$ -manosidase II do Golgi são inibidas por swainsonina, já a  $\alpha$ -manosidase I do Golgi é inibida por 1-deoximanojirimicina. A citossólica não é inibida por 1-deoximanojirimicina (Bischoff and Kornfeld, 1986). A swainsonina é um potente inibidor de manosidases lisossomais de mamíferos (Tulsiani et al., 1985). O fato desta enzima ser inibida apenas por Swainsonina em concentrações razoáveis, permite a sua classificação como tipo II. Isso sugere que ela é derivada da forma lisossômica, embora apresente pH ótimo alterado.

#### **5.4 – Sequências das $\alpha$ -manosidases intestinais de *T. Molitor***

O alinhamento entre a possível  $\alpha$ -manosidase microvilar obtido anteriormente (Ferreira *et al*, 2007), e o singleto encontrado na varredura da biblioteca de cDNA

intestinal de *T. molitor* mostrou que eles não se alinhavam. Para isso podemos dar duas explicações: eles corresponderiam a porções diferentes da seqüência codificante da mesma proteína e não se sobreporiam por serem pequenos ou a primeira seqüência seria uma  $\alpha$ -manosidase microvilar e a segunda uma  $\alpha$ -manosidase solúvel. Ambas as seqüências foram mais similares a uma seqüência correspondente a uma  $\alpha$ -manosidase de *Aedes aegypti* depositada em bancos de dados.

Foram feitos dendogramas separados das duas  $\alpha$ -manosidases (figura 15), uma vez que as duas seqüências se alinham em porções diferentes das outras seqüências utilizadas para o alinhamento (estas foram retiradas do banco de dados do NCBI). Chamamos de Tenebrio 1 a seqüência correspondente a uma possível  $\alpha$ -manosidase solúvel e esta teve um bootstrap de 100% com uma seqüência de *Tribolium castaneum*, já a seqüência tenebrio 2 (possivelmente a de membrana microvilar) ficou próxima de alguns insetos, mas com bootstraps diferentes da seqüência do tenebrio 1. Podemos observar padrões diferentes da distribuição das duas seqüências, sugerindo que são  $\alpha$ -manosidases diferentes, embora não se possa descartar a possibilidade que são porções diferentes da mesma seqüência codificante.



## 6 – Conclusões

- Os resultados mostraram que as  $\alpha$ -manosidases encontra-se, principalmente, como uma enzima solúvel no conteúdo intestinal (82% da atividade total) e 18% encontra-se no epitélio intestinal como uma enzima de membrana. Dos 85% da atividade total, 60% está no conteúdo na porção anterior e média do intestino médio e temos também uma atividade significativa na fração de membrana do epitélio anterior e médio (12% da atividade total).
- Microvilosidades foram purificadas, o aumento observado na atividade específica da  $\alpha$ -manosidase nas microvilosidades purificadas, aliado ao enriquecimento próximo ao da enzima marcadora aminopeptidase, confirmou que existe uma  $\alpha$ -manosidase microvilar.
- A  $\alpha$ -manosidase solúvel de *T. molitor* foi purificada e caracterizada depois de passar por 4 passos de cromatografia.
- Esta enzima possui pH ótimo de 5,6 sendo estável entre os pHs 4,0 e 7,0
- Possui massa molecular de 123 kDa determinada por filtração em gel em coluna Superdex 200 (condição nativa) e por SDS-PAGE (condições desnaturantes) observamos uma banda de aproximadamente 70 Kda. Isso nos levou a concluir que essa enzima possui duas subunidades de mesma massa molecular que juntas somam a massa molecular encontrada pela filtração em gel.
- Pelo Gel nativo observamos apenas uma banda de atividade o que nos levou a concluir que esta enzima estava pura quanto enzima naquela preparação e assim podemos caracterizá-la cineticamente.

- Man 1 e Man 2 correspondem as  $\alpha$ -manosidases encontradas durante a purificação, as quais só se diferem (levando em consideração os parâmetros verificados) quanto a hidrofobicidade.
- A enzima purificada tem uma elevada afinidade pelo substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo com valor de Km encontrado para Man 1 e Man 2 iguais a 0,84 e 0,62 mM.
- Tanto Man 1 como Man 2 foram inibidas por ambos os inibidores, mas o inibidor mais eficiente foi swainsonina, o qual apresentou um valor de Ki bem menor quando comparado com 1-deoximanojirimicina. A inibição por swainsonina foi mais efetiva, sendo ativa na ordem de nanomolar, enquanto o outro inibidor foi ativo na ordem de milimolar.
- O fato desta enzima ser inibida apenas por Swainsonina em concentrações razoáveis, permite a sua classificação como tipo II. Isso sugere que ela é derivada da forma lisossômica, embora apresente pH ótimo alterado.

## 7 – Bibliografia

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.L.(1990). Basic local alignment serrate tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Applebaum, S. W. (1985) Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Vol. 4, pp. 279-311. Pergamon Press, New York.
- Athanasopoulos, V.I, Niranjana, K., Rastall, R.A. (2005). The production, purification and characterisation of two novel alpha-D-mannosidases from *Aspergillus phoenicis*. *Carbohydr Res.* Mar 21;340(4):609-17.
- Bement, W.M. and Mooseker M.S. (1996). The cytoskeleton of the intestinal epithelium: components, assembly and dynamic rearrangements: In: Hesketh J.E. and Pryme J.F. (eds.), *The cytoskeleton: a multi-volume treatise. Greenwich: JAI Press* 3: 359-404.
- Benson,D.A., Karsch-Mizrachi,I., Lipman,D.J., Ostell,J., Rapp,B.A. and Wheeler,D.L. (2000) *Nucleic Acids Res.*, 28, 15–18
- Bischoff, J., Kornfeld, R. (1983). Evidence for an alpha-mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol Chem.* Jul 10;258(13):7907-10.
- Bischoff, J., Liscum, L., Kornfeld, R. (1986). The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various alpha-mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells. *J Biol Chem.* Apr 5;261(10):4766-74.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). improved silver staining of plant proteins, Proteolytic enzymes. *Academic Press, London.*
- Capella A. N., Terra W.R., Ribeiro A.F. and Ferreira C. (1997) Cytoskeleton removal and characterization of the microvillar membranes isolated from two midgut regions of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27: 793-801.
- Cristofolletti P.T., Terra, W.R. (2000). The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 15;1479(1-2):185-95.

- Cristofolletti P.T., Terra, W. R. (1999). Specificity, anchoring and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, p. 807-819.
- Eisen N.S., Fernandes V.F., Harvey W.R., Spaeth, D.D. and Wolfersberger M.G. (1989). Comparison of brush border membrane vesicles prepared by three methods from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochem.* 19: 337-342.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N. E Cohen, W., (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Ewing, B., Green, P., (1998a). Base-calling of automated Sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L.D., Wendi, M.C., Green, P., 1998b. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy Assessment *Genome Res.* 1998 8: 175-185.
- Ferreira C. and Terra W.R. (1980) Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B: 467-473.
- Ferreira, C., Ribeiro, A. F., Terra, W. R. (1981). Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara americana* and its physiological implications. *Journal Of Insect Physiology*, v. 27, p. 559-570,
- 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 fugiperda* by cDNA library screenings with antibodies. *Insect Physiol.*, 53: 1112-1124.
- Gonzalez D.S. and Jordan I.K. (2000). The  $\alpha$ -mannosidases: phylogeny and adaptive diversification. *Mol. Biol. Evol.* 17: 292-300.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P.,(1998). Consed: A Graphical tool for sequence Finishing. *Genome Res.* 1998 8: 195-202.
- Hanozet G.M., Giordana B. and Sacchi J.F. (1980) K<sup>+</sup>-Dependent phenylalanine uptake in membrane vesicles isolated from the midgut of *Philosamia cynthia* larvae. *Biochim. Biophys. Acta.* 596: 481-486.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.

- Henrissat, B. & Romeu, A. (1995) Families, superfamilies and subfamilies of glucosyl hydrolases. *Biochem, J.* 311, 350-351.
- Henrissat, B. (1998). Glycosidase families. *Biochem Soc Trans.* May;26(2):153-6. Review.
- Houk, E.J, Kramer, L.D, Hardy, J.L, Presser, S.B. (1986). An interspecific mosquito model for the mesenteronal infection barrier to western equine encephalomyelitis virus (*Culex tarsalis* and *Culex pipiens*). *Am J Trop Med Hyg.* May;35(3):632-41.
- Houk, E.J, Hardy, J.L, Chiles, R.E. (1986). Mesenteronal epithelial cell surface charge of the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett. Binding of colloidal iron hydroxide, native ferritin and cationized ferritin. *J Submicrosc Cytol.* Apr;18(2):385-96.
- Jordão B.P., Terra W.R. and Ferreira C. (1995) Chemical determinations in microvillar membranes purified from brush-borders isolated from the larval midgut of one Coleoptera and two Diptera species. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 417-426.
- Kawart Z., Karaveg K., Moremen K.W and Jarvis D.L. (2001) Insect cells encode a class II  $\alpha$ -mannosidase with unique properties. *J. Biol. Chem.* 276: 16335-16340.
- Kimura, S. (1983). Genetics of insect hemolymph alpha-mannosidase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Genet.* Aug;21(7-8):713-24.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le Cahérec F., Guillam M.T., Beuron F., Cavalier A., Thomas D., Gouranton J. and Hubert J.F. (1997) Aquaporin-related proteins in the filter chamber of homopteran insects. *Cell Tissue Res.* 290: 143-151.
- Manchenko, G. P. (1994) *Handbook of detection of enzymes on eletrophoretic gels.* Boca raton: CRC Press, p. 226.
- Michalski, J.C, Haeuw, J.F, Wieruszeski, J.M, Montreuil, J, Strecker, G. (1990). In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal alpha-D-mannosidases. *Eur J Biochem.* Apr 30;189(2):369-79.
- Moremen, K.W., Lal, A, Schutzbach, J.S, Forsee, W.T, Neame, P.J, (1994). Isolation and expression of murine and rabbit cDNAs encoding an alpha 1,2-mannosidase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* Apr 1;269(13):9872-81.

- Moremen, K.W, Trimble, R.B, Herscovics, A. (1994). Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*. Apr;4(2):113-25.
- Morton, R.E., Evans, T.A., (1992). Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical biochemistry* 204, 332-334.
- Opheim, D.J; Touster, O (1978). Purification and Comparison with the Golgi and Cytosolic  $\alpha$ -D-mannosidases. *The Journal of Biological Chemistry*; Vol.253, no 4, Issue of February 25, pp. 1017-1023.
- Opheim, D.J., Touster, O. (1978). Lysosomal alpha-D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the golgi and cytosolic alpha-D-mannosidases. *J Biol Chem*. Feb 25;253(4):1017-23
- Phillips, N. C., Robinson, D. & Winchester, B. G. Characterization of human liver alpha-D-mannosidase purified by affinity chromatography. *Biochem J*. (1976). March 1; 153(3): 579–587.
- Pullikuth A.K., Filipov V. and Gill S.S. (2003) Phylogeny and cloning of ion transporters in mosquitoes. *J. Exp. Biol*. 206: 3857-3868.
- Santos C.D., Ribeiro A.F. and Terra W.R. (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool*. 64, 490-500.
- Schuler, T. H., poppy, G.M. Kerry R.B. & Denholm, I. (1998) *Insect-resistant transgenic plants*. TIBTECH 6, 168-175.
- Schumaker, T.T.S.Cristofolletti, P.T.; Terra,W.R. (1993). Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae [Cellobiase, Maltase] *Animal physiology – Nutrition*. v. 24(1) p. 3-17
- Shah, N., Kuntz, D.A., Rose, D.R. (2003) Comparison of kifunensine and 1-deoxymanojirimycin binding to class I and II  $\alpha$ -mannosidases Demonstrates Different Saccharide Distortions in Inverting and Retaining Catalytic Mechanisms. *Biochemistry*, 42, 13812-13816.
- Silva C.P. and Terra W.R. (1994) Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Molec. Biol*. 24: 493-505.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76-85.
- Takegawa, K., Miki, S., Osaka, F., Jikibara, T and Iwahara, S, (1989). Action of J-Mannosidases on O-J-D-Mannopyranosyl-(1 -> 2)-D-mannose. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (4), 1179-1180.
- Teruo Miyagawa, M.D., Fukuko Dóji, M.D, (1979). Multiple forms and glycoprotein nature of acid phosphatase,  $\alpha$ -fucosidase and  $\alpha$ -mannosidase of psoriatic scales. *The journal of investigative dermatology*, 73: 554- 557.
- Terra, W.R., Ferreira, C. & Bastos, F. (1985) Phylogenetic considerations of insect digestion: Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect biochem.* 15, 443-449.
- Terra, W. R. (1988). Physiology and Biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 21, p. 675-734
- Terra W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
- Terra W.R. and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62.
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F & Ferreira, C. (1998). The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *J Insect Physiol.* 34, 463-472.
- Terra W.R. (1998) Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med.Biol. Res.* 21: 675-734.
- Terra W.R. (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47-61.
- Terra W.R. ; Ferreira C. . Biochemistry of Digestion. In: Gilbert L., I. Iatrov K., Gill S.. (Org.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier, 2005, v. 4, p. 171-224
- Terra W.R., Costa, R.H. and Ferreira C. (2006). Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78: 255-269.
- Terra, W. R.; Costa, R. H., Ferreira, C. (2006). Plasma membrane, from insect midgut cells.. *An. Acad. Bras. Cien.*, v. 78, p. 255-269,

- Tulsiani, D.R.P, Opheim, D.J, Touster, O. (1977). Purification and characterization of  $\alpha$ -D-mannosidase from Rat liver Golgi membranes. The journal of biological chemistry. Vol 252, No 10, Issue of May 25, pp. 3227- 3233.
- Tulsiani, D.R.P, Broquist, H.P, Touster, O. (1985). Marked differences in the swainsonine inhibition of rat liver lysosomal alpha-D-mannosidase, rat liver Golgi mannosidase II, and jack bean alpha-D-mannosidase. Arch Biochem Biophys. Jan;236(1):427-34.



## Súmula curricular

### Dados Pessoais

Nome: Nathália Ramalho Moreira

Local e data de nascimento: Muriaé/MG dia 16 de dezembro de 1982

### Educação

Universidade,Local,Ano: Universidade Federal de viçosa (UFV), Viçosa-MG, 2006

Graduação (modalidade): Graduação em Bioquímica

Universidade, local, ano: Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, 2008.

Mestrado em Bioquímica.

### OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado/Doutorado, Agência, vigência da bolsa: Bolsista de Mestrado, CNPq, 2006-2008

### PUBLICAÇÕES (ARTIGOS COMPLETOS E RESUMOS EM CONGRESSOS)

#### ARTIGOS:

1.1

PILON, A.M., GUEDES, R.N.C., ALMEIDA, F.T., OLIVEIRA, J.A., MARINHO, J.S., MOREIRA, N.R., OLIVEIRA, M.G.A. Biochemical answer of the soy caterpillar to the inhibitor of protease benzamidine and its effects in the post-embrionic development. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia – SP. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, D-53, 2005.

1.2

J.S. MARINHO, M.G.A OLIVEIRA,. N.R. MOREIRA, K.V. LOPES, , A. Pallini, R.N.C. Guedes., Resposta Bioquímica de Lagartas de Eucalipto *Thyrntaina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) Submetidas a Inibidores de Protease. In: IV Encontro Brasileiro de Ecologia Química. Piracicaba, SP, 2005. v.1. p.128 – 128

1.3

SILVA, Fernanda Miquelitto Figueira da (Estudante); MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Estudante); MARTINS, Ana Carolina Calçado Lopes (Estudante); MOREIRA, Nathália Ramalho (Estudante); LOPES JR, Carlos de Oliveira (Estudante); MOREIRA, Cláudia Barbosa Saraiva (Estudante); QUEIROZ, José Humberto de

(Orientador); REZENDE, Sebastião Tavares de (Professor). CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

#### 1.4

MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Bolsista); OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida (Orientador); LOPES, Kênia Viçoso Gomes (Estudante); RIBEIRO, Fabrício Rainha (Estudante); FAZOLLO, Anderson (Estudante); MOREIRA, Nathália Ramalho (Estudante); PILON, Franciny Martins (Estudante); SANT'ANA, Rita de Cássia Oliveira (Estudante); AQUINO, Roney Anderson Nascimento de (Estudante). CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE GLÂNDULAS SALIVARES DO PREDADOR *Podisus nigrispinus*. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

#### 1.5

MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Bolsista); OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida (Orientador); SANT'ANA, Rita de Cássia Oliveira (Estudante); PIRES, Christiano Vieira; LOPES, Kênia Viçoso Gomes (Estudante); RIBEIRO, Fabrício Rainha (Estudante); FAZOLLO, Anderson (Estudante); MOREIRA, Nathália Ramalho (Estudante); PILON, Franciny Martins (Estudante); MENDES, Fabrícia Queiroz (Estudante). ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS EM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNAS. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

#### 1.6

SANT ANA, Rita de Cássia Oliveira (Estudante); PIRES, Christiano Vieira (Outro); MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Estudante); PILON, Franciny Martins (Estudante); LOPES, Kênia Viçoso Gomes (Estudante); RIBEIRO, Fabrício Rainha (Estudante); FAZOLLO, Anderson (Estudante); MOREIRA, Nathália Ramalho (Estudante); REIS, Denise Queiroz C (Estudante); OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida (Orientador). GANHO DE PESO EM RATOS SUBMETIDOS A DIETAS PREPARADAS COM DIFERENTES FONTES PROTÉICAS. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

#### 1.7

PILON, Franciny Martins (Bolsista); FAZOLLO, Anderson (Estudante); MOREIRA, Nathalia Ramalho (Estudante); PILON, Anderson Martins (Estudante); MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Estudante); SANTANA, Rita de Cassia Oliveira (Estudante); LOPES, Kenia Viçoso Gomes (Estudante); RIBEIRO, Fabricio Rainha (Estudante); ALMEIDA, Fabricio Tadeu de Almeida (Estudante); OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida (Orientador). RESPOSTA BIOQUÍMICA DA LEPIDOPTERA *Anticarsia gemmatalis* AO INIBIDOR DE SERINO PROTEASE BENZAMIDINA. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

## 1.8

FAZOLLO, Anderson (Bolsista-IC); PILON, Franciny Martins (Estudante); LOPES, Kenia Viçoso Gomes (Estudante); RIBEIRO, Fabricio Rainha (Estudante); MOREIRA, Nathalia Ramalho (Estudante); SANTANA, Rita de Cassia Oliveira (Estudante); MOREIRA, Lilian Fernandes (Estudante); MENDONÇA, Eduardo Gomes de (Estudante); XAVIER, Luciana Pereira (Estudante); OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida (Orientador). ATIVIDADE DE PROTEASES TRIPSINA-LIKE LIGADAS À MEMBRANA DO INTESTINO DA LAGARTA DA SOJA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006

## 1.9

Mendonça, E.G.; Visôto, L.E.; Motta, C.C.; Moreira, L.F.; Veloso, R.V.S.; Moreira, N.R.; Ribon, A.O.B.; Oliveira, M.G.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, J.A. Hydrolytic Enzymes of the Gut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae): Compared Enzymatic Activity between Two Distinct Diets. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006

## 1.10

Moreira, N. R.; Lemos, F.; Sarmiento, R. A.; Oliveira, M. G. A.; Pallini, A.; Janssen, A.; Guedes, R. N. C.; Lopes, K. V. G. Quantification of Proteinases Inhibitors in Tomato Plants in Response to the Attack of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006

## 1.11

Mendonça, E.G.; Visôto, L.E.; Pilon, F.M.; Moreira, N.R.; Ribeiro, F.R.; Oliveira, J.A.; Ribon, A.O.B.; Guedes, R.N.; Oliveira, M.G.A. A Study of the Gut Microbiota Associated with *Anticarsia gemmatalis*(Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006

## 1.12

R.A. Sarmiento, F. Lemos, A. Janssen, A. Pallini, N. R. Moreira, M. A.G. Oliveira. Herbivores Using Odours to Determine The Level Of Plant Defense. In: I Simpósio Brasileiro de Acarologia (I SIBAC) - Universidade Federal de Viçosa-2006

## 1.13

Moreira, N.R. ; BIFANO, T. D. ; TERRA, W. R. . Distribution and partial characterization of two  $\alpha$ -mannosidases of *Tenebrio molitor* (Coleoptera). In: XXXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts, 2007, Salvador - BA. XXXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference, 2007.

## 1.14

Moreira, N.R, Terra, W.R

Purification and characterization of an alpha-mannosidase from *Tenebrio molitor* larvae. In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008

