

KLEBER PORTELA FORTES

Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae)

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

KLEBER PORTELA FORTES

Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

Aos meus pais e irmã

“Muitas vezes passamos por momentos difíceis, mas temos que permanecer firmes na fé, pois são nestas situações que Deus molda nosso caráter de filho.

O ouro para ser purificado tem que ser exposto ao fogo máximo. Uma vez purificado, é ouro. Se cair na lama, é ouro. Se cair na terra, é ouro.

Independente de onde estiver, tenha fé!

Seja ouro, independente da situação!”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas, por me manter no caminho do bem, por mais esta conquista e por muitas outras que Ele ainda há de me proporcionar.

Aos meus pais, Francisco Fortes Filho e Delzuite Portela Fortes, e minha irmã, Kelyane Portela Fortes, pelo amor e apoio incondicionais, conforto, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Ao meu orientador, Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo, o “Seu Nelder”, pelo exemplo de mestre, disponibilidade, paciência e pelos valores éticos, humanos e científicos.

Ao meu co-orientador, Dr. Vladimir Fazito do Vale, pela amizade e dedicação e por ter contribuído de forma muito agradável no decorrer de todo o trabalho.

Ao Dr. Agenor Vasconcelos pela colaboração durante a realização das análises envolvendo espectrometria de massa.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), César Nonato de Oliveira, pelos insetos e principalmente pela imensa ajuda e preocupação a mim dispensados. Fica aqui registrada a minha sincera admiração à sua pessoa.

Agradeço à “Grande Família” do LFIH, Vaninha, Lú Ceres, Xandoca, Lú-PI, Ana Flávia (LPM), Naylene, Adalberto, Adriana, Kel, Kolivan, Antonio, Fernandinha, Natália, Gabriel, Cássio, Dimitri, Brenda, Daniel, Hemanuela, Danielle, Mariana e os professores Dr. Marcos Horácio Pereira e Dr. Ricardo Nascimento Araújo pelos momentos agradáveis e por tornarem o laboratório um local de ótima convivência, uma condição *sine qua non* que reflete e justifica a realização dos trabalhos de qualidade. Gostaria de agradecer especialmente à Rafaela Paim, uma pessoa que aos poucos foi se tornando uma amiga querida. Rafa obrigado pelos muitos conselhos valiosos e pelo carinho nas horas difíceis.

Ao Leandro César Maia de Freitas, pela grande amizade e por tornar BH uma cidade muito mais agradável através dos amigos que eu conheci através de você: Ricardo Lima, Sônia Maia, Reinaldo Proveti, Everaldo Oliveira, Rejane Dias, Bruna Nunes, Marcos Freitas, Rodrigo Paralelogramo, André Couto e André Sad. Muito obrigado! A meu ver, BH definitivamente não seria a mesma sem vocês!

Aos queridos amigos “pepinos” da turma do mestrado: Thaisa Fonseca, Fabiana Volpato, Bruninha Soares, Lívia Passos, Carina Pacanaro, Frederico Gil, Érica Munhoz, Ana Luiza, Luciana Ventura, Júlia Gatti, Aliani Fonseca, Bruna Silvestre, João Luís, Júnior Fialho, Aytube Coaglio, Thais Almeida e Soraia Silva, gostaria de agradecer a turma como um todo pelos muitos momentos hilários e angustiantes. Momentos estes que nos tornaram mais unidos e que eu vou levar pra sempre na memória. Gostaria de agradecer em especial à Luciana Lima. Lú sou-lhe profundamente grato pelo ombro amigo, preocupação constante, incentivo, pelos vários bons momentos e pela sinceridade que você demonstrou na nossa amizade.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Parasitologia do ICB-UFMG, nas pessoas dos seus coordenadores, Dra. Érika Martins Braga e Dr. Marcos Horácio Pereira, pelo vasto e prazeroso aprendizado. Em especial, agradeço às professoras Dra. Élide Mara Rabelo, “chefa” e Dra. Maria Aparecida Gomes, “Cidinha”, pela forma carinhosa e descontraída como sempre me trataram.

A secretaria do programa de Pós-graduação em Parasitologia, nas pessoas de Sumara Aparecida e Sibebe Abreu, pela eficiência e prestatividade.

Às instituições de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG pela contribuição para realização deste trabalho.

A todos que por ventura eu não tenha citado, mas que de alguma forma tenha contribuído para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

Sumário

	Página
Lista de Abreviaturas e Siglas	10
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	13
Resumo	14
Abstract	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Importância dos flebotomíneos	16
1.2 Biologia dos flebotomíneos	17
1.3 Digestão de proteínas em insetos	20
2. JUSTIFICATIVA	26
3.0 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Origem e manutenção dos insetos	28
4.2 Obtenção dos intestinos e preparo do extrato bruto	28
4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	28
4.4 Purificação da enzima	29
4.5 Quantificação de proteínas	29
4.6 Ensaio enzimáticos	29
4.6.1 Ensaio para atividade de proteases totais	29
4.6.2 Ensaio para atividade de tripsina e quimotripsina	30
4.6.3 Ensaio para atividade da enzima purificada por cromatografia de	30

	afinidade	
4.6.4	Ensaio de determinação da participação da tripsina e quimotripsina na digestão de proteínas totais	31
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma	31
4.8	Determinação da massa molecular da enzima purificada por espectrometria de massa	32
4.9	Determinação do pH ótimo da atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	32
4.10	Determinação da cinética de Michaelis-Menten (K_M)	32
4.11	Efeito dos modificadores químicos na atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	33
4.12	Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	33
5.0	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
6.0	RESULTADOS	35
6.1	Atividades proteolíticas presentes em EBI de larvas (L_4) de <i>L. longipalpis</i>	35
6.2	Determinação da participação da tripsina e quimotripsina na digestão de proteínas totais	38
6.3	Zimograma	39
6.4	Purificação da enzima semelhante à tripsina do intestino de larvas de <i>L. longipalpis</i>	40
6.5	SDS-PAGE do extrato bruto de intestino e da enzima purificada de larvas de <i>L. longipalpis</i>	42
6.6	Determinação da massa molecular aparente da enzima purificada por espectrometria de massa	43
6.7	Determinação do pH ótimo da atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	43
6.8	Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos sobre o L -BAPNA	44
6.9	Efeito dos modificadores químicos na atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	45

6.10	Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e de EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i>	47
7.0	DISCUSSÃO	48
8.0	CONCLUSÕES	54
9.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

Lista de Abreviaturas e Siglas

CaCl₂: cloreto de cálcio

DMSO: dimetilsulfóxido

EBI: extrato bruto de intestino

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HCl: ácido clorídrico

Hepes: ácido etanosulfônico-4-(2-hidroetil)-1-piperazina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

L-BAPNA: *N*- α -benzoil-L-anginil-*p*-nitroanilida

KM: constante de Michaelis-Menten aparente

MES: ácido 4-morfolinoetanofulfônico

MgCl₂: cloreto de magnésio

NS-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA: *N*-Succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida

OMS: Organização Mundial da Saúde

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SBTI: soy bean trypsin inhibitor

TCA: ácido tricloroacético

TPCK: *N*- α -tosil-L-lisina corometil cetona

TLCK: *N*- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

V_{max}: velocidade máxima aparente

3,4-DCI: 3,4 dicloroisocoumarina

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico de flebotomíneos	17
Figura 2: Larva de quarto estágio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	19
Figura 3: Flebotomíneos adultos do gênero <i>Lutzomyia</i> : macho e fêmea ingurgitada após realização de repasto sanguíneo.	19
Figura 4: Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases.	20
Figura 5: Fotografia e representação esquemática do intestino de larvas L ₄ de <i>L. longipalpis</i> evidenciando diversos órgãos e valores de pHs intestinais.	25
Figura 6: Perfil cromatográfico do EBI de larvas (L ₄) de <i>L. longipalpis</i> em coluna de gel filtração.	37
Figura 7: Representação esquemática da contribuição da tripsina e quimotripsina intestinais de larvas (L ₄) de <i>L. longipalpis</i> na digestão de proteínas totais.	38
Figura 8: Efeito do inibidor de protease sobre a atividade proteolítica do extrato bruto de intestino (EBI) de larvas de quarto estágio (L ₄) de <i>L. longipalpis</i> .	39
Figura 9: Purificação de uma enzima digestiva semelhante à tripsina de <i>L. longipalpis</i> .	40
Figura 10: SDS-PAGE do extrato bruto e do produto de eluição da cromatografia de afinidade.	42
Figura 11: Análise por espectrometria de massa em MALDI-TOF da tripsina purificada.	43
Figura 12: Efeito do pH sobre a atividade tripsinolítica de larvas de quarto estágio (L ₄) de <i>L. longipalpis</i> usando L-BApNA como substrato.	44
Figura 13: Cinética de Michaelis-Menten de atividade da tripsina de larvas de <i>L. longipalpis</i> usando o L-BApNA como substrato.	44
Figura 14: Efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre a atividade tripsinolítica de larvas de <i>L. longipalpis</i> utilizando L-BApNA como substrato.	46

Figura 15: Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis* utilizando L-BApNA como substrato. 47

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Tabela de purificação de uma tripsina de <i>L. longipalpis</i> .	41

Resumo

A Leishmaniose Visceral é uma doença de grande impacto à saúde pública. No Novo Mundo é causada por *Leishmania infantum* e transmitida principalmente por *Lutzomyia longipalpis*. Em flebotomíneos adultos, as tripsinas desempenham um importante papel durante o processo de digestão sanguínea, entretanto, pouco se sabe a respeito da ação destas proteases nas formas imaturas. Neste trabalho foi realizado um processo de purificação e caracterização de uma enzima semelhante à tripsina de intestino médio de *L. longipalpis*. Ensaio enzimáticos na presença de benzamidina (inibidor de tripsina) demonstraram que a atividade tripsinolítica é responsável por maior parte da digestão de proteínas totais (58%) quando comparadas com a atividade quimotripsinolítica (42%). O processo de purificação por cromatografia de afinidade (coluna de *p*-aminobenzamidina) permitiu a obtenção de frações com atividade tripsinolítica (substrato: L -BAPNA), que revelou por SDS-PAGE uma única banda de massa molecular de 20,6 kDa. A análise com benzamidina em SDS-PAGE copolimerizado com gelatina, bem como ensaios enzimáticos na presença de diversos inibidores indicou que a enzima é uma protease semelhante à tripsina. Ensaio realizados em diferentes faixas de pH demonstraram que a atividade proteolítica máxima ocorre em pH 9,5. A atividade específica encontrada foi de 2511,5 U.mg⁻¹ e o fator de purificação 46,1 vezes. Na determinação cinética, o valor de Km utilizando L -BAPNA foi de 0,49 mM. Em análise por espectrometria de massa do material purificado, foi detectada a massa de 23311,88 Da (MALDI-TOF). Com relação ao efeito da concentração de íons metálicos (Ca²⁺ e Mg²⁺) e EDTA, verificou-se uma diminuição da atividade tripsinolítica apenas quando EDTA era adicionado aos ensaios em concentrações iguais ou maiores a 18,75 mM, não havendo interferência por parte dos íons metálicos. Este é o primeiro trabalho que relata a purificação e caracterização de uma tripsina digestiva em larvas de *L. longipalpis*.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, digestão de proteínas, tripsina

Abstract

Visceral Leishmaniasis is a disease of major public health impact. In the New World the disease is caused by *Leishmania infantum chagasi* and transmitted mainly by *Lutzomyia longipalpis*. In adult sandflies, trypsins play an important role during of blood digestion. However, little is known about the action of these proteases in immature forms. In this work we purified and characterized a trypsin-like enzyme from the midgut of *L. longipalpis*. Enzyme assays performed with benzamidine (a trypsin inhibitor) demonstrated that trypsin is responsible for most of total protein digestion (58%) compared with chymotrypsins (42%). The process of purification by affinity chromatography (*p*-aminobenzamidine column) produced fractions with tryptic activity (substrate: L-BAPNA), which by SDS-PAGE gel analysis revealed a single band of molecular mass of 20.6 kDa. The benzamidine analysis on SDS-PAGE co-polymerized with gelatin and enzyme assays in the presence of various inhibitors indicated that the enzyme is a trypsin-like protease. Assays performed at different pH showed that the maximum tryptic activity occurs at pH 9.5. The specific activity was 2511.5 U.mg⁻¹ and purification factor of 46.1 times. Kinetic analysis using L-BAPNA gave a Km value using L-BAPNA of 0.49 mM. Mass spectrometry analysis of the purified material detected a mass of 23311.88 Da (MALDI-TOF). Regarding the effects of Ca²⁺, Mg²⁺ and EDTA on the trypsin activity, there was a decrease in tryptic activity only when EDTA was added at concentration ≥ 18.75 mM, with no interference by metal ions. This is the first study that reports the purification and characterization of a digestive trypsin on *L. longipalpis* larvae.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*, protein digestion, trypsin

1.0 INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos flebotomíneos

Flebotomíneos são pequenos insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. A importância dos flebotomíneos deve-se, sobretudo, a seu papel como vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como bactérias do gênero *Bartonella* e inúmeros arbovírus. Entretanto, a maior importância dos flebotomíneos em saúde pública está relacionada com a transmissão dos agentes etiológicos das leishmanioses (Alexander et al., 1995; Sherlock, 2003; Maroli et al., 2012).

As leishmanioses consistem em um complexo de doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. De modo geral, essas enfermidades manifestam-se sob formas clínicas distintas: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutâneo-mucosa, leishmaniose difusa e leishmaniose visceral, estando estas diferentes manifestações clínicas relacionadas com a espécie do parasito, aspectos eco-epidemiológicos e fatores próprios dos hospedeiros (Desjeux, 2001).

Estima-se que a prevalência mundial das leishmanioses esteja próxima de 12 milhões de casos, com uma incidência anual de 1,5-2 milhões de casos (1-1,5 milhão para leishmaniose cutânea e 500.000 para a forma visceral). Atualmente, essas doenças são consideradas endêmicas em 88 países, dos quais, 72 são países em desenvolvimento. A grande maioria (90%) dos casos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (Chappius et al., 2007). Já a forma cutâneo-mucosa ocorre principalmente no Brasil, Bolívia e Peru, que juntos, somam cerca de 90% dos casos da doença. Com relação à leishmaniose cutânea, 90% dos casos notificados concentram-se no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2012).

Estas enfermidades encontram-se em um nítido processo de transição epidemiológica, caracterizada por uma incidência crescente nos últimos anos em áreas onde ocorrem tradicionalmente, associada à notificação de casos em áreas anteriormente não endêmicas.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é de evolução crônica e grave, e se não tratada, a doença pode alcançar taxas de letalidade de até 100%. Estudos recentes sugerem que os parasitos que causam a doença em diferentes focos com transmissão zoonótica, tradicionalmente atribuída a *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo

Mundo, pertencem à mesma espécie, razão pela qual *L. chagasi* tem sido descrita como sinônimo de *L. infantum* (Maurício et al., 2000; Kuhls et al., 2011).

Existem aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos no mundo e 476 espécies do gênero *Lutzomyia* nas Américas. No Brasil, já foram descritas cerca de 220 espécies deste gênero, sendo *L. longipalpis* o principal vetor de *L. infantum* na América do Sul (Galati, 2003; Laison e Rangel, 2005; Bermúdez, 2009). Atualmente sabe-se que *L. evansi* e *L. cruzi*, são vetores secundários de leishmaniose visceral em algumas áreas da Colômbia e do Brasil, havendo também suspeita do papel vetorial de *L. forattinii* (Shaw, 1999; Pita-Pereira et al., 2008).

1.2. Biologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm, possuem o corpo recoberto por inúmeras cerdas, asas lanceoladas semi-eretas e cabeça formando um ângulo de 90° com o tórax. Como todo díptero, são insetos holometábolos (**Figura 1**) e o ciclo de vida caracteriza-se por apresentar uma fase de ovo, uma fase larval que compreende quatro estádios, uma fase de pupa e finalmente a fase adulta (Ward, 1990; Killick-Kendrick, 1999).

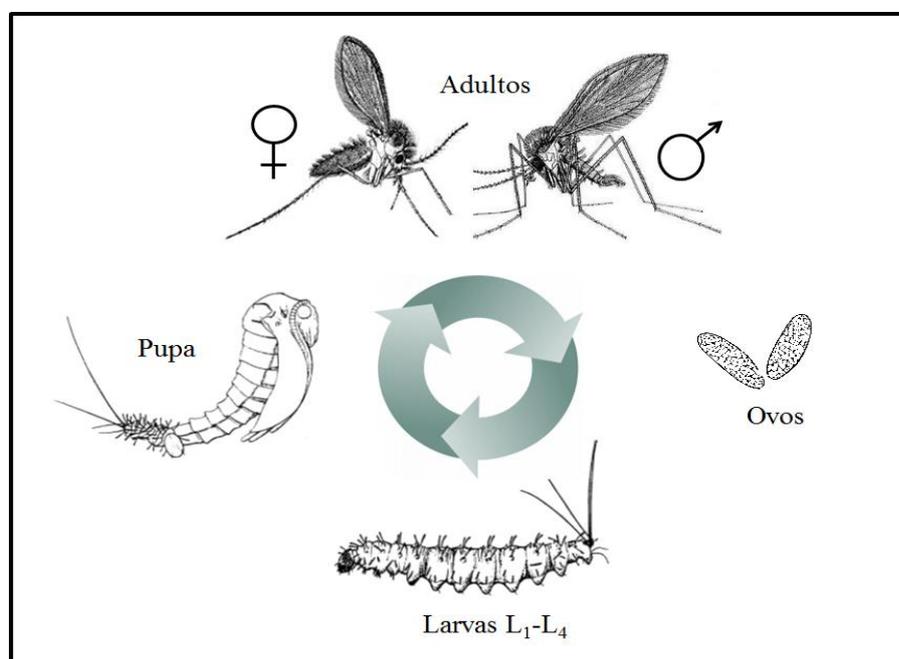


Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico de flebotomíneos.

Em comparação com outras famílias de Nematocera de importância médica, muito pouco se conhece sobre os criadouros naturais de flebotomíneos. Diferentemente dos

mosquitos (Diptera – Culicidae), cujas formas imaturas se desenvolvem em ambientes aquáticos, sabe-se que as larvas de flebotomíneos são exclusivamente terrestres. Estudos realizados com insetos colonizados em laboratório demonstraram que as principais exigências para o desenvolvimento das formas imaturas são umidade, temperatura amena e matéria orgânica em decomposição (Killick-Kendrick, 1987;1999; Volf e Volfova, 2011).

Estudos revelam que fêmeas realizam a oviposição em micro-ambientes estabelecidos através do reconhecimento de um ou mais marcadores que indiquem um local com condições adequadas para o desenvolvimento das larvas (Killick-Kendrick, 1987). Como exemplo de marcadores, substâncias isoladas dos ovos foram apontadas como atrativos de fêmeas para o reconhecimento de possíveis criadouros (Elnaiem e Ward, 1991), assim como compostos químicos presentes em fezes de galinha e coelho também serviram de atrativos para oviposição de fêmeas grávidas de *L. longipalpis* (Dougherty et al., 1995).

Inúmeros autores relatam que na natureza, a postura dos ovos de flebotomíneos é feita em substratos ricos em matéria orgânica tais como: fendas em rochas, tocas de animais, troncos de árvores, solo e demais locais ricos em matéria orgânica animal e vegetal em decomposição, (Deane e Deane, 1957; Mangabeira, 1969; Ferro et al., 1997) e embora esses locais sejam considerados constantes criadouros, o pequeno número de larvas e pupas encontradas não condiz com a alta densidade de adultos nesses locais.

As larvas de flebotomíneos (**Figura 2**) apresentam coloração esbranquiçada, possuem aspecto vermiforme e são constituídas por 12 segmentos, além da cabeça, que é bem desenvolvida, de coloração escura, com presença de um par de antenas e peças bucais fortes do tipo mastigadoras (Leite e Willams, 1996) para auxiliar na alimentação constituída de matéria orgânica em decomposição. Em condições experimentais, várias dietas já foram oferecidas às larvas. Rações à base de pó de fígado e alface cozida (Killick-Kendrick et al., 1977), ração para peixes (Rangel et al. 1986) e fezes de coelho (Peterkova-Koci et al., 2012) mostram-se favoráveis ao desenvolvimento larval e obtenção de formas adultas.



Figura 2: Larva de quarto estágio de *Lutzomyia longipalpis*.

Os flebotomíneos adultos além do dimorfismo sexual acentuado (**Figura 3**), apresentam peculiaridades também no comportamento alimentar. Tanto os machos como as fêmeas necessitam de se alimentar de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções açucaradas de insetos parasitos de plantas como fonte de energia (Chaniotis, 1974; Schlein e Warburg, 1986; Alexander e Usma, 1994), entretanto, somente as fêmeas realizam a hematofagia, hábito alimentar este necessário para a maturação dos ovários e produção dos ovos (Young e Duncan, 1994).



Figura 3: Flebotomíneos adultos do gênero *Lutzomyia*. (A) macho; (B) fêmea ingurgitada após realização de repasto sanguíneo.

1.3 Digestão de proteínas em insetos

De modo geral entende-se por digestão como o processo no qual os alimentos sofrem um conjunto de transformações físico-químicas para se converterem em compostos menores, hidrossolúveis e absorvíveis pelas células do intestino. Este processo é controlado por enzimas digestivas e é dependente da localização destas ao longo do intestino dos insetos (Terra e Ferreira, 2011).

Enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise de proteínas são denominadas de proteases, proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas. Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com a posição da ligação a ser clivada na cadeia peptídica ou de acordo com a natureza química do sítio catalítico (Barrett, 1994).

De acordo com a posição da ligação a ser clivada, as proteases podem ser subdivididas em dois grupos: as endopeptidases, que atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica e as exopeptidases que atuam somente nas extremidades N-terminal ou C-terminal da cadeia polipeptídica, sendo denominadas de aminopeptidases aquelas que atuam na região amino terminal livre liberando um único resíduo de aminoácido, e por sua vez as carboxipeptidases constituem aquelas que atuam na região carboxi terminal livre liberando um único resíduo de aminoácido. Já dipeptidases, são exopeptidases que hidrolisam apenas dipeptídeos, liberando assim dois aminoácidos. (Barrett, 1994). Um esquema simplificado desta classificação das proteases está demonstrado na **Figura 4**.

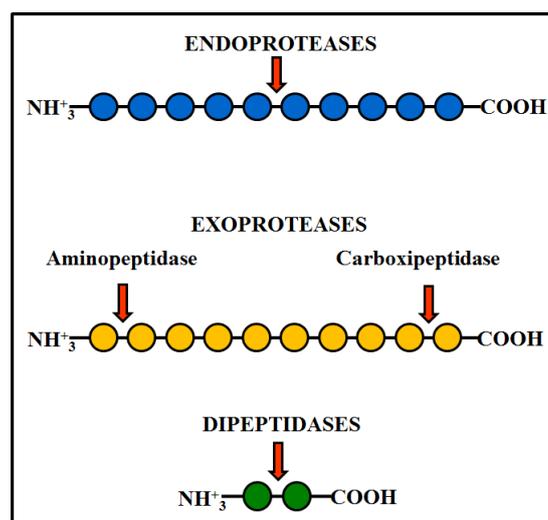


Figura 4: Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases. Adaptado de Barrett, 1994.

Quanto à natureza química do sítio catalítico, as proteases podem ser classificadas principalmente como: serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases e metalo proteases (Terra e Ferreira, 1994).

As serino proteases são as enzimas mais estudadas, sendo encontradas em vírus, bactérias e em eucariotos, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos. Este grupo envolve um conjunto de proteínas com alto grau de homologia de sequências e de similaridade estrutural (Fersht, 2002). A característica mais comum destas enzimas é a tríade catalítica constituída pelos resíduos de serina, histidina e ácido aspártico. Essas proteínas participam de diversas atividades fisiológicas que incluem além da digestão (cujos representantes mais comuns são tripsina, quimotripsina e elastase), a ativação de proteínas específicas, como na cascata de coagulação sanguínea, (Bode et al., 1989; Russo, 2006), no sistema imune de insetos e plantas (Wilson et al., 1997; Gorman et al., 2000a e 2000b) e no desenvolvimento de peptídeos biologicamente ativos (Gill et al., 1996).

Cisteíno proteases são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico do ânion sulfeto, presente no sítio ativo, à ligação peptídica (Kunakbaeva et al., 2003). O sítio ativo de uma cisteíno protease é composto por um resíduo de cisteína, por um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica, sendo o mecanismo de ação destas enzimas muito semelhante ao das serino proteases. Estas enzimas possuem pH ótimo de atuação neutro (Rao et al., 1998), entretanto, enzimas de insetos mostraram atividade máxima quando ensaiadas em pHs ácidos (5-6) com diversos substratos sintéticos (Terra e Ferreira, 2011).

Aspartil proteases são caracterizadas por empregarem uma molécula de água, ativada por dois resíduos de aspartato, como nucleófilo no ataque à ligação peptídica. São todas endopeptidases e são encontradas em organismos tão diversos quanto vertebrados, plantas e vírus (Northrop, 1930). A maioria das aspartil proteases demonstraram atividade máxima em pHs baixos (3-4) e massas moleculares variando de 30-45 kDa (Rao et al., 1998). O primeiro relato de aspartil proteases em insetos foi feito por Greenberg e Paretsky (1955) que observaram uma forte atividade proteolítica no pH 2,5-3 em *Musca domestica*. Em insetos a massa molecular dessas enzimas varia de 60 à 90 kDa (Terra e Ferreira).

As metaloproteases constituem o grupo de maior diversidade de enzimas proteolíticas (Barrett, 1995) e são caracterizadas pela exigência de um íon metálico (usualmente Zn^{2+} ou Mn^{2+}) bivalente em seu sítio catalítico (Rao et al., 1998), tendo sido descritas em diversos

seres vivos, tais como collagenases de organismos superiores (Hibbs et al., 1995) e toxinas hemorrágicas de venenos de serpente (Shannon et al., 1989). Quantidades importantes de metalo proteases solúveis foram encontradas no intestino médio de insetos pertencentes à linhagens mais basais (Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera Adephaga), enquanto que em insetos de linhagens mais derivadas (Coleoptera Polyphaga, Diptera, Lepidoptera) essas enzimas foram encontradas principalmente ligadas às membranas microvilares de células intestinais (Terra e Ferreira, 1994).

Enzimas proteolíticas de invertebrados tem sido alvo de muitos estudos e uma atenção especial tem sido direcionada para o grupo das tripsinas por estas fazerem parte de uma série de processos fisiológicos, desempenhando um papel importante e melhor compreendido na hidrólise de proteínas alimentares (Díaz-Mendoza et al., 2005; Delcroix et al., 2006). Tripsinas clivam preferencialmente cadeias de peptídios no grupamento carboxílico de resíduos de arginina ou lisina. Esta enzima ocorre na maioria dos insetos, com exceção de algumas espécies de hemípteros e coleópteros da família Curculionidae, demonstrando haver semelhança com as tripsinas de vertebrados (Terra et al., 1996; Lam et al., 2000; Muhlia-Almazán et al., 2008).

Em insetos hematófagos, a alimentação sanguínea é um fator que induz a um grande aumento da atividade proteolítica no intestino (Fisk, 1950), sendo a tripsina a principal endoprotease envolvida no processo de digestão das proteínas advindas do sangue (Briegel e Lea, 1975).

Estudos realizados por Billingsley & Hecker (1991), demonstraram que a atividade de tripsina em *Anopheles stephensi* é restrita à porção do intestino médio posterior, e detectável somente após o repasto sanguíneo, apresentando pico de atividade por volta das 30 horas pós repasto e retornando a níveis basais a partir de 60 horas. Em *Anopheles gambiae*, sete genes envolvidos com a produção de tripsinas já foram identificados, dos quais cinco são constitutivos (*Antryp3*, *Antryp4*, *Antryp5*, *Antryp6* e *Antryp7*) e dois são induzidos após repasto sanguíneo (*Antryp1* e *Antryp2*) (Müller et al., 1993; 1995).

Um estudo envolvendo a caracterização da atividade proteolítica presente em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revelou alta atividade de serino proteases no extrato bruto total dos quatro estádios larvais e de pupa. Análises zimográficas dos estádios larvais detectaram 6-8 bandas com massa molecular aparente variando de 20 a 250 kDa e atividade observada em

pHs 5,5 a 10. A forte inibição da atividade proteolítica tanto de larvas como de pupas por PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e TLCK (*N*- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona), indicou que as principais proteases expressas nesses estágios de desenvolvimento são serino proteases semelhantes às tripsinas (Mesquita-Rodrigues et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Borges-Veloso et al., (2012) avaliando ovos, larvas e pupas de *Culex quinquefasciatus*. Diferenças no perfil destas peptidases foram observadas para ambas as espécies durante as diferentes fases de desenvolvimento, sugerindo que estas enzimas exercem funções específicas durante as diferentes fases do ciclo de vida dos insetos. Estudos envolvendo a purificação de tripsinas em mosquitos foram realizados por Graf e Briegel (1985). Os autores descreveram a presença de 5 isoformas de massas moleculares variadas (26,7–32 kDa) no intestino de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue mediante a realização de duas etapas de purificação; uma cromatografia de troca iônica seguida de uma cromatografia de afinidade.

Já é bem estabelecido que no intestino médio de fêmeas de *A. aegypti* são sintetizadas duas formas de tripsina por ocasião do repasto sanguíneo. A primeira forma (*early trypsin*) é produzida em pequenas quantidades e é detectável no intestino médio na primeira hora após o término do repasto sanguíneo, desaparecendo cerca de 6 a 8 horas subsequentes, quando se inicia a síntese da segunda forma (*late trypsin*) que surge por volta de 8 a 10 horas após o repasto, sendo responsável pela maior atividade proteolítica durante a digestão sanguínea (Felix et al., 1991; Noriega e Wells, 1999). Fenômeno semelhante foi descrito por Telleria et al., (2007) em *L. longipalpis*, ao identificarem através de análises de bibliotecas de cDNA, dois genes (*Lltryp1* e *Lltryp2*) que codificam tripsinas com padrões de expressão diferentes. RNA mensageiro de *Lltryp1* (*late trypsin*) é indetectável durante as fases larvais e permanece ausente até o momento do repasto sanguíneo, atingindo um pico cerca de 12 horas pós-repasto e retornando aos níveis basais às 72 horas subsequentes. Em contrapartida, o RNA mensageiro de *Lltryp2* é constitutivamente expresso em altos níveis em fêmeas não alimentadas com sangue, sendo reduzido após o repasto e voltando a níveis elevados após o término da digestão sanguínea. Interessantemente, a expressão do RNA mensageiro de *Lltryp2* foi detectada em machos, em níveis comparáveis aos de fêmeas não alimentadas.

Além da sua importância na digestão sanguínea, tripsinas têm sido implicadas no estabelecimento da infecção de vários patógenos em seus respectivos vetores. Para o sucesso da infecção de *A. aegypti* por *Plasmodium gallinaceum*, uma tripsina do mosquito é essencial

para a ativação de uma quitinase secretada pelo parasito, que auxilia o oocineto no mecanismo de escape da membrana peritrófica (Shahabuddin et al., 2006). Além disso, inibidores de tripsina diminuem a carga do vírus da dengue em *A. aegypti*, indicando uma relação entre infecção, digestão sanguínea e um possível processamento proteolítico de proteínas virais (Molina-Cruz et al., 2005). Em flebotomíneos, alguns mecanismos não esclarecidos sugerem que a infecção espécie-específica por *Leishmania* esteja associada com a expressão de serino proteases no intestino médio dos vetores. Borovsky & Schlein (1987) sugeriram que a atividade de uma enzima semelhante à tripsina presente no intestino de *Phlebotomus papatasi* prevenia o estabelecimento da infecção por *L. donovani*, enquanto que a modulação desta atividade proteolítica por *L. major*, permitia a sobrevivência desta espécie. Atualmente é bem esclarecido que a resistência de *Leishmania* à atividade proteolítica presente no intestino de flebotomíneos é uma etapa crucial durante o desenvolvimento do parasito no inseto (Pimenta et al., 1997; Schlein & Jacobson, 1998).

A digestão de proteínas em flebotomíneos tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos. Gontijo et al., (1998) demonstraram que a atividade tripsinolítica em fêmeas de *L. longipalpis* está presente no conteúdo intestinal e possui atividade ótima em meio alcalino. Ramalho-Ortigão et al., (2003) descreveram os mRNAs de seis serino proteases em *P. papatasi*, quatro tripsinas e duas quimotripsinas. Dentre as enzimas descritas, uma teve o padrão de expressão aumentado e outras duas tripsinas tiveram expressão diminuída após o repasto sanguíneo enquanto que a expressão das quimotripsinas era induzida por ocasião da alimentação sanguínea. Utilizando um modelo de alimentação artificial com sangue bem estabelecido, Sant'Anna et al., (2009) demonstraram que em *L. longipalpis*, a atividade tripsinolítica é reduzida por ocasião da infecção por *L. mexicana* de 24 a 72 horas após realização do repasto sanguíneo, e adicionalmente, o silenciamento da expressão gênica de tripsina por RNAi levou a um aumento do número de parasitos no intestino médio dos insetos. Resultados semelhantes foram obtidos por Telleria et al. (2010), ao constatarem uma diminuição da atividade tripsinolítica em *L. longipalpis* modulada através da infecção por *L. infantum*. Em fêmeas de *L. anthophora*, a presença de serino proteases foi confirmada por Mahmood & Borovsky (1993). Ao estudarem esta espécie, os autores sugeriram que a atividade das quimotripsinas pareceu ser maior que a das tripsinas.

Apesar da importância dos flebotomíneos em saúde pública, pouco se conhece sobre a fisiologia digestiva de suas formas imaturas. Mahmood e Borovsky (1992) descreveram a presença de endoproteases semelhantes às tripsinas e quimotripsinas no intestino de larvas de

L. anthophora. Utilizando uma técnica onde o sítio ativo destas enzimas foi marcado radioisotopicamente com $[1,3-^3\text{H}]$ diisopropilfluorofosfato ($[1,3-^3\text{H}]$ DIP), os autores detectaram 12 bandas referentes às proteases do intestino de larvas e adultos, indicando a presença de isoformas destas proteases no gênero *Lutzomyia*. Adicionalmente, Fazito do Vale et al., (2007), descreveram a anatomia do tubo digestivo, determinaram o pH nas diferentes porções do intestino e investigaram a digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis*. Neste trabalho os autores mostraram que o intestino médio constitui a maior parte do tubo digestivo e que o pH sofre alterações de acordo com as diferentes porções do intestino (**Figura 5**).

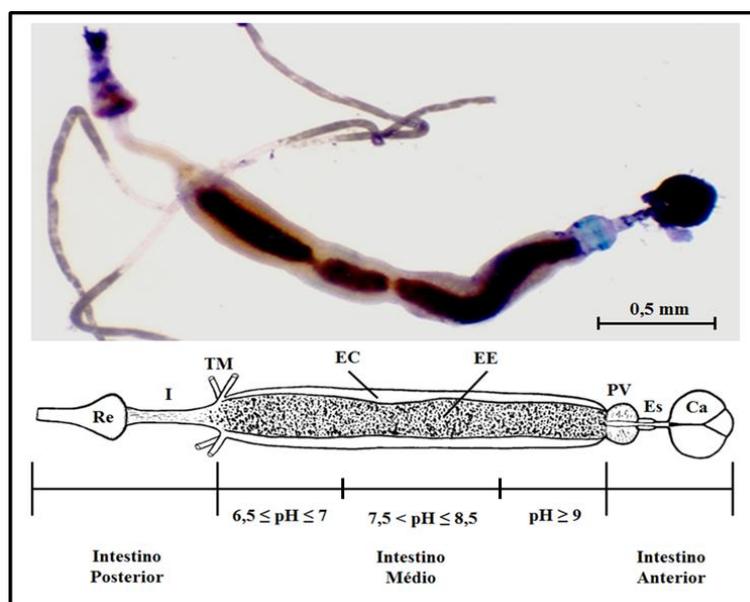


Figura 5: Fotografia e representação esquemática do intestino de larvas L_4 de *L. longipalpis* evidenciando diversos órgãos e valores de pHs intestinais. Ca: cabeça, Es: esôfago, PV: pró-ventrículo, EE: espaço endoperitrítico, EC: espaço ectoperitrítico, TM: túbulos de Malpighi, I: íleo, Re: reto. Adaptado de Fazito do Vale et al., (2007).

Além disso, os autores descreveram a presença de endoproteases solúveis secretadas no intestino médio anterior e a capacidade destas de digerir o substrato azocaseína em várias faixas de pH, especialmente no pH 11. Utilizando vários inibidores, os autores concluíram que as enzimas responsáveis pela atividade proteolítica são proteínas semelhantes às tripsinas e quimotripsinas, resultados estes confirmados pela utilização de substratos sintéticos específicos para estas enzimas. Aminopeptidases também foram investigadas através da utilização de substratos sintéticos, e os autores concluíram que estas enzimas estão localizadas no intestino médio posterior, ligadas ao epitélio intestinal e possuindo atividade máxima em pHs que variam de 6,5-8 (Fazito do Vale et al. 2007).

2.0 JUSTIFICATIVA

Estudos bioquímicos envolvendo a digestão em insetos tiveram início nas primeiras décadas do século passado. Entretanto com o desenvolvimento de inseticidas químicos sintéticos na década de 40, estudos nesta área tornaram-se escassos. Mais tarde com o surgimento de problemas ambientais devido à utilização destes produtos em larga escala, novas abordagens para o controle de insetos começaram a ser investigadas. Tendo em vista que o intestino é a maior interface entre um inseto e o meio ambiente, torna-se essencial o entendimento do processo digestivo destes seres para o desenvolvimento de novos métodos de controle. Dado que tripsinas desempenham um papel essencial em diversos processos fisiológicos de insetos, a caracterização bioquímica destas enzimas pode fornecer dados importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de controle, quer seja por inibição ou interferência na produção destas. Considerando a importância dos flebotomíneos em saúde pública, pouco se conhece a respeito destas enzimas nos estágios imaturos desses insetos. Diante do exposto, nos propusemos purificar e caracterizar bioquimicamente uma enzima semelhante à tripsina presente em larvas de *Lutzomyia longipalpis*.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar as serino proteases intestinais de larvas L₄ de *Lutzomyia longipalpis* com enfoque na purificação e caracterização bioquímica de enzimas semelhantes às tripsinas.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Purificar a tripsina solúvel presente no conteúdo intestinal das larvas.
- ii. Determinar o efeito do pH sobre a atividade enzimática da tripsina purificada.
- iii. Determinar a massa molecular aparente da tripsina purificada por eletroforese em poliacrilamida e espectrometria de massa.
- iv. Medir o K_M da tripsina purificada utilizando o substrato sintético L-BApNA.
- v. Avaliar a influência de inibidores de proteases, dos íons cálcio e magnésio e EDTA sobre a atividade da tripsina purificada.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e manutenção dos insetos

Foram utilizadas larvas oriundas de uma colônia de *Lutzomyia longipalpis* já estabelecida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG. Esta colônia é mantida em um insetário climatizado, sob condições semi-controladas (temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, $60\pm 15\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase) conforme a metodologia proposta por Modi e Tesh (1983) com pequenas modificações. Esta colônia foi estabelecida a partir de espécimes coletados na cidade de Teresina-PI, área endêmica para leishmaniose visceral.

4.2 Obtenção dos intestinos e preparo do extrato bruto

Para a obtenção dos intestinos, larvas de 4º estágio (L_4) ativas e com presença de conteúdo intestinal foram dissecadas em solução salina 0,9% com o auxílio de estiletos entomológicos sob um microscópio estereoscópico. Após a dissecação, 100 intestinos com seus conteúdos foram lavados em solução salina 0,9% e transferidos para um tubo de microcentrífuga mantido em gelo contendo 50 μL de tampão Tris (hidroximetil) aminometano Tris-HCl 0,1 M/ NaCl 0,5 M pH 8,0. Em seguida, todo o material foi macerado com o auxílio de um microhomogeneizador manual de vidro abrasivo e após homogeneização adicionou-se 500 μL do mesmo tampão anteriormente citado. A amostra foi então centrifugada a $14.000\times g$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e mantido em freezer a -80°C até o momento de sua utilização.

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Uma amostra de extrato bruto de intestino (EBI) contendo o equivalente a 100 intestinos foi filtrada em uma membrana de 22 μm e em seguida cromatografada em uma coluna de filtração molecular Discovery BIO GFC 150 (Supelco) utilizando um aparelho Shimadzu LC-20AT. A coluna de filtração molecular foi equilibrada com solução salina 0,9% em um fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. 50 μL da amostra foram aplicados no aparelho e após 10 minutos de corrida, frações de 65 μL foram coletadas de 20 em 20 segundos em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL pelo coletor Pharmacia LKB – Frac – 200.

Após a coleta de 90 frações, cada uma delas foi testada para as atividades de proteases totais, tripsina e quimotripsina conforme está descrito nas seções 4.6.1 e 4.6.2 respectivamente.

4.4 Purificação da enzima

Para a obtenção da enzima purificada, 500 μ L do EBI foram aplicados em uma coluna de *p*-aminobenzamidina-agarose (Sigma Aldrich Química Brasil) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M/NaCl 0,5 M pH 8,0. Utilizou-se como eluente uma solução de HCl 10 mM/NaCl 0,5 M pH 2,0. Frações de 400 μ L foram coletadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 100 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M/ NaCl 0,5 M pH 8,0.

Após a coleta das frações, a coluna foi regenerada mediante a aplicação de 15 mL de solução de borato 0,1 M/NaCl 0,5 M pH 9,8, seguida de 15 mL de solução de borato 0,1 M pH 9,8 e por fim 15 mL de água destilada. Terminada a etapa de regeneração da coluna, a mesma foi estocada na presença de solução de azida sódica (NaN_3) 0,2% em NaCl 0,5 M.

4.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro UV-1650 PC Shimadzu a 280 nm de absorvância segundo metodologia proposta por Kirschenbaum (1976).

4.6 Ensaio enzimáticos

4.6.1 Ensaio para atividade de proteases totais

Para o ensaio da atividade de endopeptidases totais a azocaseína foi utilizada como substrato de acordo com o método de Sarath et al., (1989). Vinte e cinco μ L de uma solução estoque de azocaseína (4%) preparada em salina 0,9% foram incubados durante 2 horas a 30°C em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 50 μ L de tampão glicina/NaOH 0,1 M pH 9,5, 12,5 μ L de solução aquosa de β -mercaptoetanol 5mM e 12,5 μ L de cada fração coletada na cromatografia líquida de alta eficiência descrita na seção 4.3.

Terminada a incubação, 150 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram adicionados em cada tubo para parar a reação e precipitar a azocaseína não digerida. Após 15 minutos de espera, os tubos foram centrifugados a 10.000 \times g por 5 minutos e 150 μ L do sobrenadante foram transferidos para outros tubos contendo 175 μ L de NaOH 1M. Após homogeneização, coletou-se 200 μ L de cada amostra e transferiu-se para uma microplaca de

96 poços. A absorvância de cada mostra foi lida a 440 nm em um leitor de ELISA (VersaMax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices). Os controles foram preparados substituindo-se as amostras das frações por um volume equivalente de salina 0,9%.

4.6.2 Ensaio para atividade de tripsina e quimotripsina

Os ensaios de atividade tripsinolítica e quimotripsinolítica foram realizados utilizando como substratos sintéticos respectivamente: *N*- α -benzoil-L-anginil-*p*-nitroanilida (L-BApNA) e *N*-Succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida (NS-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração final de 0,5 mM (Sarath et al., 1989). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μ L de tampão glicina/NaOH 0,1 M pH 9,5, 50 μ L de solução salina 0,9%, 20 μ L de H₂O destilada, 20 μ L de cada fração e 10 μ L de cada substrato a 10 mM. Os controles foram preparados substituindo-se as amostras das frações por um volume equivalente de salina 0,9%. A atividade enzimática foi avaliada a partir da variação da cor das amostras, mediante leituras consecutivas realizadas em um leitor de ELISA (VersaMax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices). As leituras foram realizadas a cada 30 segundos, a 410 nm, com agitação de 3 segundos no intervalo de cada leitura, durante 20 minutos a uma temperatura constante de 30°C. Os valores de velocidade inicial ($\text{mDO}\cdot\text{min}^{-1}$) foram convertidos em unidade de atividade enzimática com base na determinação do coeficiente de extinção molar da *p*-nitroanilida (8.800) a 410 nm. Uma unidade (1 U) de atividade específica corresponde à quantidade de enzima ativa que catalisa a formação de um μmol de *p*-nitroanilida por minuto. Os resultados foram expressos como as médias das unidades de enzima obtidas em três experimentos independentes.

4.6.3 Ensaio para atividade da enzima purificada por cromatografia de afinidade

O mesmo protocolo descrito na seção anterior foi utilizado para verificar a atividade enzimática presente nas frações purificadas obtidas pela cromatografia de afinidade descrita na seção 4.4. Neste ensaio foram utilizados 20 μ L de cada fração e L-BApNA 10 mM como substrato sintético. Os controles foram preparados substituindo-se a enzima purificada por um volume equivalente de solução de Tris/HCl 0,1 M/NaCl 0,5 M pH 8,0 contendo HCl 10 mM/NaCl 0,5 M pH 2,0 na proporção de 4:1.

4.6.4 Ensaio de determinação da participação da tripsina e quimotripsina na digestão de proteínas totais

Com o intuito de determinar a contribuição da tripsina e quimotripsina na digestão de proteínas, utilizou-se o mesmo protocolo para o ensaio descrito na seção 4.6.1. Para tanto amostras de EBI de larvas L₄ de *L. longipalpis* utilizadas neste ensaio foram incubadas na presença e na ausência de benzamidina (um inibidor específico de tripsinas) numa concentração final de 5 mM. Deste modo, a atividade restante obtida nos ensaios realizados na presença de benzamidina corresponde à atividade exercida pelas quimotripsinas e outras endoproteases que possam estar presentes. Os resultados destes ensaios foram expressos como as médias das unidades de enzima obtidas em três experimentos independentes.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma

Para a visualização do perfil eletroforético do EBI e da enzima purificada, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com a metodologia de Laemmli (1970) utilizando gel de acrilamida/bisacrilamida 10% na presença de dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS). Amostras de 30 µL de EBI e da enzima purificada foram adicionadas ao tampão da amostra contendo β-mercaptoetanol, as amostras foram então submetidas à fervura por 5 minutos e em seguida aplicadas no gel. Para visualização das proteínas presentes, o gel foi corado com nitrato de prata.

O zimograma foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Heussen e Dowdle (1980) utilizando SDS-PAGE contendo 0,1% de gelatina copolimerizada. Foram aplicadas no gel, amostras de 30 µL de EBI de larvas L₄ homogeneizadas em tampão da amostra sem β-mercaptoetanol, não aquecidas com quantidades equivalentes a 1/4, 1/8 e 1/16 intestino.

As corridas eletroforéticas foram realizadas no aparelho Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) a 120 V até que o marcador azul de bromofenol atingisse a base do gel.

Após a corrida, o gel foi lavado em uma solução aquosa de Triton X-100 2,5% durante 1 hora para retirada do SDS. O gel foi então incubado por 12 horas em tampão borato/NaOH 0,1 M pH 10,0, para que as enzimas pudessem agir sobre o substrato (gelatina). Posteriormente o gel foi lavado em H₂O destilada e em seguida corado por Comassie Blue (solução de Azul de Comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%). Finalizada esta etapa, o gel foi descorado em uma solução de metanol 10% e ácido acético 5% para

visualização das bandas de gelatina digerida como regiões não coradas em meio a um fundo azul.

4.8 Determinação da massa molecular da enzima purificada por espectrometria de massa

Amostras da enzima purificada foram analisadas por espectrometria de massa utilizando o sistema MALDI-TOF AltoFlex III controlado pelo FlexControl™ software, do Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas – ICB/UFMG, de acordo com o protocolo usual deste núcleo.

4.9 Determinação do pH ótimo da atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

Para determinar as melhores condições de pH para atividade enzimática foram realizados ensaios enzimáticos utilizando o mesmo protocolo descrito na sessão 4.6.2. Estes ensaios foram realizados com a enzima purificada por cromatografia de afinidade utilizando os seguintes tampões numa concentração final de 50 mM: ácido cítrico/NaOH (pH 4,0 a 5,0), ácido 4-morfolinoetanofulfônico (MES)/NaOH (pH 5,5 a 6,5), ácido etanosulfônico-4-(2-hidroetil)-1-piperazina (Hepes)/NaOH (pH 7,0 e 7,5), Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)/HCl (pH 8,0 e 8,5), glicina/NaOH (pH 9,0 e 9,5) e carbonato de sódio/HCl (pH 10,0 a 11,0). Uma série de triplicatas sempre foi realizada para a quantificação da atividade enzimática.

4.10 Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten

Os ensaios para obtenção da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max}) foram realizados com a enzima purificada utilizando o mesmo protocolo descrito na sessão 4.6.2. Os ensaios foram realizados em tampão glicina/NaOH 0,1 M pH 9,5 com concentrações de L-BApNA variando de 0,01 a 6 mM. As velocidades iniciais para cada concentração foram determinadas a 410 nm para L-BApNA, em função do tempo, utilizando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar específico de 8.800 M^{-1} . Os resultados obtidos foram expressos como μmoles de produto gerado por minuto. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por meio de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 for Windows. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

4.11 Efeito dos modificadores químicos na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

Diferentes inibidores de proteases foram testados quanto ao seu efeito sobre a atividade proteolítica presente nas frações purificadas. Os ensaios de inibição foram realizados utilizando os seguintes inibidores: benzamidina (1 a 5000 μM), 3,4 dicloroisocoumarina inibidor de serino protease (3,4-DCI) (1 a 1000 μM), inibidor de tripsina de soja (*Glycine max*) (SBTI) (1 a 1000 nM), *N*- α -tosyl-L-lisine chloromethyl ketone (TLCK) (1 a 1000 μM) e *N*- α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) (1 a 1000 μM). A mistura dos reagentes foi previamente incubada por 5 minutos na presença dos diferentes inibidores de proteases e o L-BApNA foi adicionado subsequentemente, conforme foi descrito anteriormente na seção 4.6.2.

4.12 Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

Para observar o efeito destes íons sobre a atividade enzimática, soluções de cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de magnésio (MgCl_2) foram adicionadas ao ensaio realizado na seção 4.6.2 , numa concentração final variando de 1 a 1000 μM . Ensaios realizados com adição de EDTA, as concentrações finais variaram de 0,75 a 75 mM.

5.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 for Windows.

Variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo Teste T (no caso de 2 grupos) ou ANOVA (no caso de mais de 2 grupos) seguida pelo teste de Tukey para identificar diferença entre os grupos. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

6.0 RESULTADOS

6.1 Atividades proteolíticas presentes em EBI de larvas (L₄) de *L. longipalpis*

A cromatografia de filtração molecular em HPLC do EBI contendo o equivalente a 100 intestinos de larvas (L₄) de *L. longipalpis* revelou um perfil cromatográfico complexo, indicando a existência de diversas proteínas de massas moleculares variadas (**Figura 6**).

Cada fração obtida na cromatografia foi utilizada para a realização de diferentes ensaios de atividade proteolítica com o objetivo de se obter um pico de atividade máxima e relacionar este pico com o tempo de eluição. Após a realização dos ensaios com as frações, os gráficos resultantes revelaram a ocorrência de pelo menos dois picos bem definidos para cada atividade testada. O gráfico referente ao ensaio de atividade de proteases totais (**Figura 6.A**) revelou dois picos de alta atividade e um pico de baixa atividade apresentando tempos de retenção de 10,32, 16,92 e 21,21 minutos e massas moleculares de 133,90 kDa, 8,32 kDa e 2,07 kDa respectivamente. A presença de três picos de atividade indica a presença de pelo menos três proteases de massas moleculares distintas atuando sobre o substrato.

Considerando o gráfico referente ao ensaio de atividade de quimotripsina (**Figura 6.B**), pôde-se observar a ocorrência de três picos de atividade com tempos de retenção de 10,65, 16,59 e 21,12 minutos respectivamente, coincidindo com os tempos de retenção dos picos do gráfico anterior, o que nos leva a crer que a quimotripsina presente no EBI de larvas de *L. longipalpis* é de fato responsável por parte da proteólise da azocaseína. O aparecimento de três picos de atividade em tempos relativamente distantes sugere a ocorrência pelo menos duas isoformas de quimotripsinas de massas moleculares consideravelmente distintas, sendo 118,01 kDa, 12,15 kDa e 2,07 kDa.

O gráfico ilustrado na **Figura 6.C** representa o ensaio de atividade tripsinolítica sobre o substrato L-BApNA. Neste gráfico, dois picos de atividade tripsinolítica foram revelados. Entretanto, o primeiro pico que apresentou tempo de retenção por volta de 10,65 minutos e massa molecular de 133,90 kDa, demonstrou uma atividade relativamente baixa quando comparada com a atividade observada no segundo pico que apresentou tempo de retenção de 17,91 minutos e massa molecular de 7,33 kDa, o que nos leva a crer que uma provável interação indevida com a coluna ou a formação de complexos proteínas da dieta-tripsina permitiu que uma pequena parte da tripsina fossem eluída precocemente. Esse pico de

atividade corresponde a uma massa molecular de 7,33 kDa. Deste modo, deduz-se que existam uma ou mais tripsinas atuando no intestino de larvas de *L. longipalpis*.

A massa molecular das enzimas foi calculada tendo como base o tempo de retenção destas moléculas na coluna, entretanto, as análises envolvendo o uso de padrões de massa molecular conhecido (albumina, anidrase carbônica e citocromo C) forneceram valores que não condizem com valores já estimados por outras metodologias previamente realizadas. Uma explicação para esses valores de massas moleculares incomuns pode ser devido à interações indevidas das moléculas com a coluna de cromatografia ou mesmo interações com demais proteínas presentes no extrato de intestino das larvas.

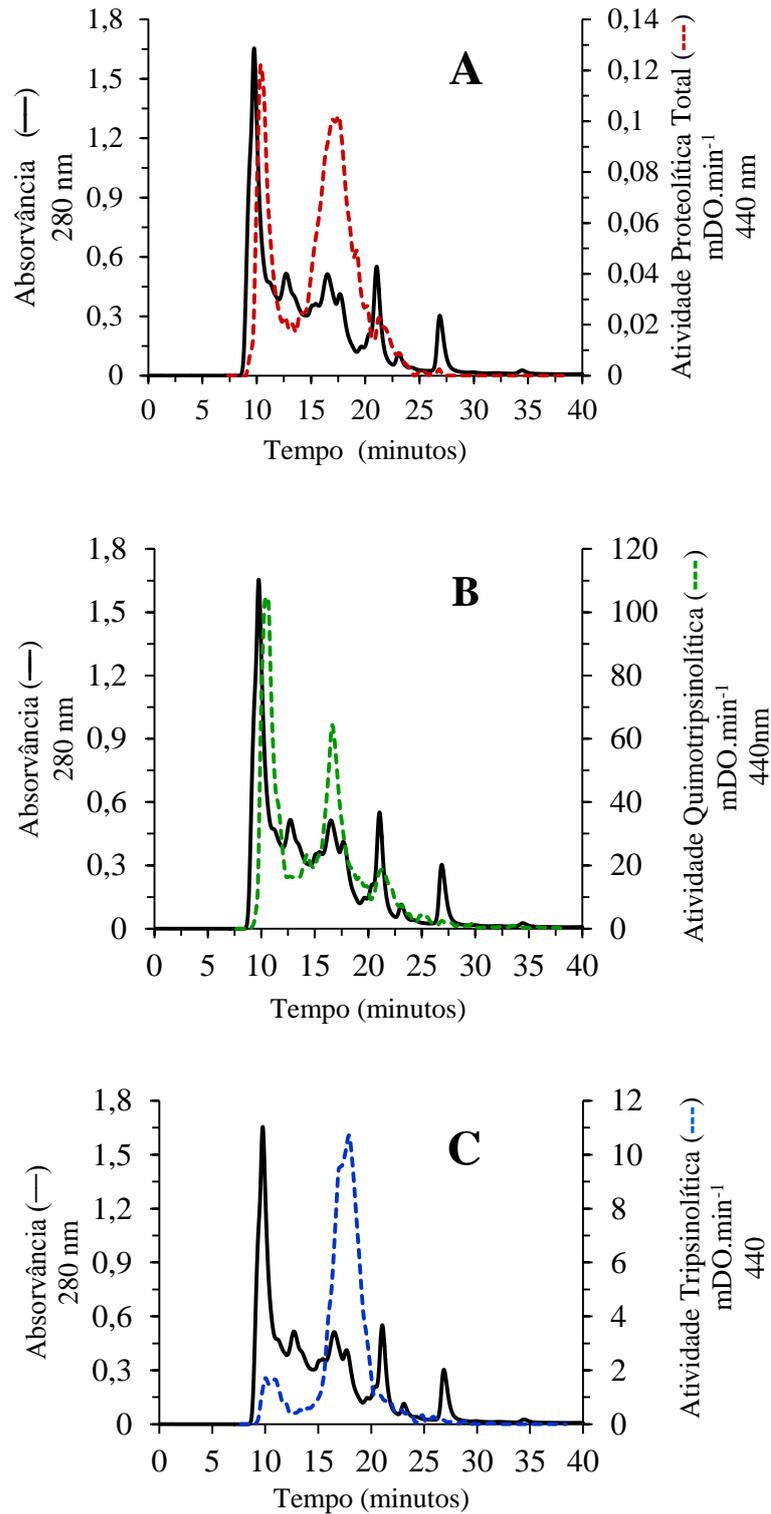


Figura 6: Perfil cromatográfico do EBI de larvas (L₄) de *L. longipalpis* em coluna de gel filtração. O EBI foi submetido a uma coluna de filtração molecular equilibrada com salina 0,9% em um fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Frações de 65 μL foram coletadas de 20 em 20 segundos e utilizadas em ensaios enzimáticos. (A) Ensaio de atividade de proteases totais utilizando azocaseína como substrato. (B) Ensaio de atividade quimotripsinolítica utilizando NS-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA como substrato. (C) Ensaio de atividade tripsinolítica utilizando L-BAPNA como substrato. (—) absorvância das proteínas a 280 nm, (---) atividade enzimática.

6.2 Determinação da participação da tripsina e quimotripsina na digestão de proteínas totais

Com o intuito de quantificar a parcela de contribuição da tripsina e de outras proteases (principalmente quimotripsina) na digestão de proteínas totais, a atividade tripsinolítica foi inibida totalmente pela adição de benzamidina. O primeiro gráfico (**Figura 7.A**) exibe as atividades de proteólise total (em cinza) e atividades de outras proteases (em preto) obtidas em três tempos diferentes. Observa-se de um modo geral que a atividade quimotripsinolítica e de possíveis outras proteases foi responsável por menos da metade da digestão do substrato, quando esta é comparada ao grupo controle, o qual a atividade de tripsina também está presente.

A quantificação da atividade de cada enzima foi então calculada através da diferença das médias dos valores encontrados para a atividade proteolítica total e da atividade quimotripsinolítica, que foram expressos em porcentagem conforme o gráfico representado na **Figura 7.B**. Deste modo, as atividades tripsinolítica e quimotripsinolítica foram responsáveis por 58% e 42% da digestão do substrato respectivamente.

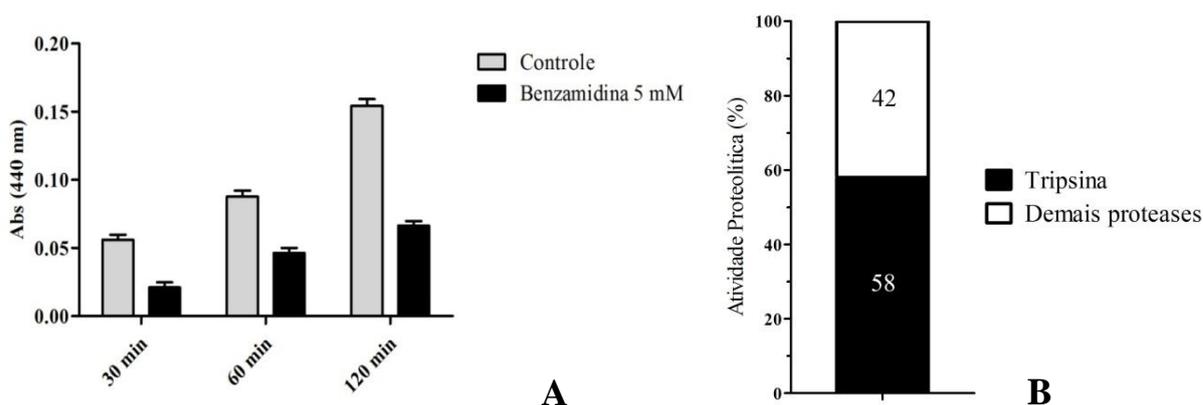


Figura 7: Representação esquemática da contribuição da tripsina e quimotripsina intestinais de larvas (L₄) de *L. longipalpis* na digestão de proteínas totais. A: Gráfico que expressa a atividade de proteínas totais em cinza e a atividade quimotripsinolítica em preto. Cada barra representa a média de três repetições ($n=3$). Linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão da média. B: Gráfico que expressa em porcentagem a participação de cada protease.

6.3 Zimograma

A análise do zimograma (**Figura 8**) de amostras de extrato bruto de intestino apresentou após descoloração, uma grande quantidade de bandas referentes às enzimas capazes de digerir a gelatina presente no gel. Pôde-se constatar uma grande variação no que se refere à massa molecular dessas enzimas, uma vez que são observadas bandas com massa molecular um pouco acima de 35 kDa bem como bandas com massa molecular superiores à 120 kDa. A análise do gel em que a benzamidina (inibidor de tripsinas) foi adicionada às amostras de EBI, assim como o tampão de incubação, permite-nos observar o desaparecimento das bandas de menor massa molecular ($\cong 35$ kDa). Estes resultados indicam que as tripsinas de larvas de *L. longipalpis* são as proteases digestivas de menor massa molecular presentes no EBI.

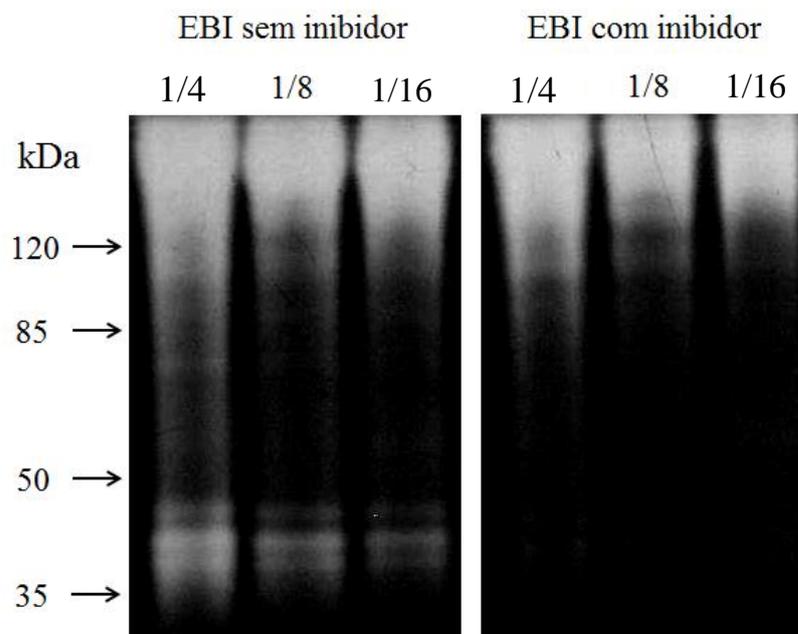


Figura 8: Efeito do inibidor de protease sobre a atividade proteolítica do extrato bruto de intestino (EBI) de larvas de quarto estágio (L₄) de *L. longipalpis*. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 10% copolimerizados com gelatina 0,1%. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 12 horas a 25°C em tampão borato/NaOH 0,1 M pH 10,0. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 1/4, 1/8 e 1/16 de intestino na ausência (controle) e presença de benzamidina 5mM. Os números à esquerda indicam a massa molecular aparente das bandas ativas expressas em kiloDantons (kDa).

6.4 Purificação da enzima semelhante à tripsina do intestino de larvas de *L. longipalpis*

O sobrenadante do extrato de intestino das larvas de *L. longipalpis*, obtido por centrifugação foi aplicado diretamente em uma coluna de afinidade de *p*-aminobenzamidina-agarose. O perfil cromatográfico na **Figura 9** mostra que a coluna utilizada foi eficiente durante a etapa de purificação de tripsinas intestinais de larvas. A mudança do pH de 8,0 para 2,0 foi capaz de eluir as enzimas ligadas à resina da coluna e uma alta atividade tripsinolítica foi observada nas frações coletadas logo após a eluição. Pela análise do cromatograma é possível observar a presença de dois picos com atividade tripsinolítica, detectada usando L-BApNA como substrato. O primeiro pico (frações 1-6) está associado à proteólise não específica do substrato L-BApNA por outras enzimas com atividades semelhantes às de tripsinas, e que estão presentes no extrato de intestino de insetos (Terra e Ferreira, 1994). É possível também que a resina estivesse saturada com tripsina. As frações que apresentaram alta atividade proteolítica (29 e 30) foram homogeneizadas e utilizadas posteriormente para outros ensaios. Verificou-se que o perfil de proteína (Abs 280 nm) é coincidente com o perfil de atividade (Abs 410 nm).

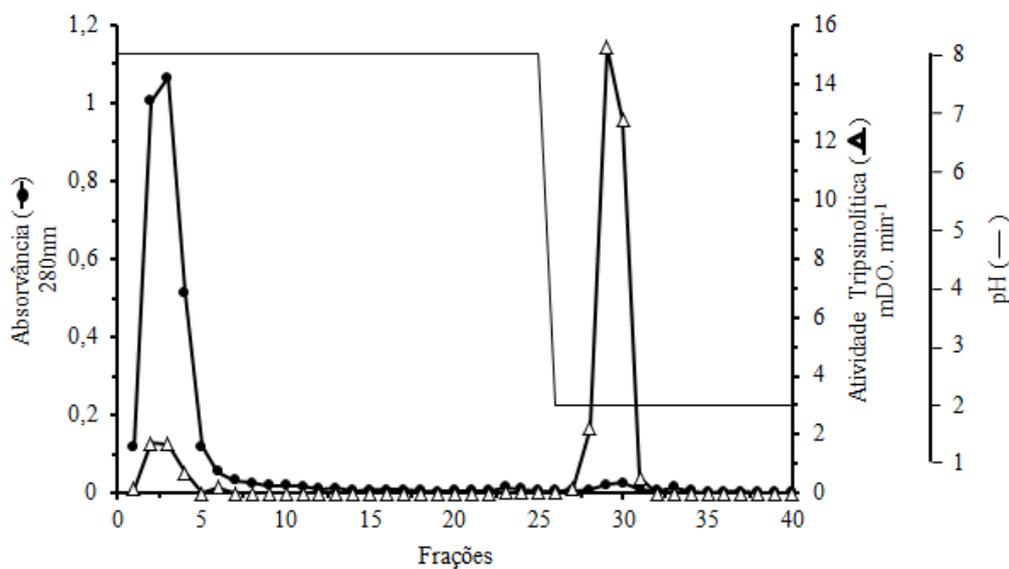


Figura 9: Purificação de uma enzima digestiva semelhante à tripsina de *L. longipalpis*. Cromatografia do extrato de intestino de larvas em uma coluna de *p*-aminobenzamidina-agarose equilibrada com tampão TRIS 0.1 M e 0.5 M de NaCl pH 8,0 e eluída com HCl 10 mM e 0.5 M de NaCl pH 2,0. O substrato usado foi L-BApNA. (●) absorvância das proteínas a 280 nm, (▲) atividade enzimática.

Como se pode observar na **Tabela 1**, a metodologia empregada para purificação de tripsinas de larvas L₄ de *L. longipalpis* foi altamente eficiente. Em apenas uma etapa de purificação, a atividade específica de tripsina saltou de 54,4 U.µg⁻¹ para 2.511,5 U.µg⁻¹, o que revelou um fator de purificação de 46,1. Além disso, a perda de atividade total pôde ser considerada pequena, uma vez que esta sofreu uma redução de 84,4 U no EBI para 65,3 U nas frações purificadas, gerando um rendimento de 77,3%.

Tabela 1: Tabela de purificação de uma tripsina de *L. longipalpis*.

	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U.mg⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	1,55	84,4	54,4	100	1
Coluna de afinidade	0,026	65,3	2.511,5	77,3	46,1

A atividade enzimática foi estabelecida a 410 nm, utilizando o substrato L-BApNA a 0,5 mM e pH 9,5.

6.5 SDS-PAGE do extrato bruto de intestino e da enzima purificada de larvas de *L. longipalpis*

A pureza das amostras obtidas após a cromatografia de afinidade foi avaliada por SDS-PAGE. Uma análise comparativa entre as amostras do extrato bruto de intestino e da amostra purificada revelou após coloração pela prata diversas bandas de massas moleculares variadas presentes no EBI, ao passo que a amostra que continha a enzima purificada revelou uma banda única de massa molecular de 20,6 kDa, demonstrando que a purificação foi bem sucedida (**Figura 10**). Adicionalmente, a presença de uma forte banda correspondente à banda da enzima purificada, quando comparada às demais bandas presentes no EBI, sugere que tripsinas estão presentes em grande quantidade no intestino de larvas de *L. longipalpis*.

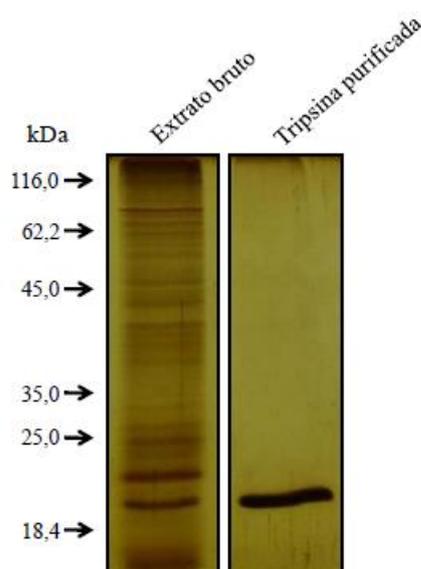


Figura 10: SDS-PAGE do extrato bruto e do produto de eluição da cromatografia de afinidade. A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida/bisacrilamida 10% e ao final da corrida o gel foi corado com solução de nitrato de prata. Os valores dos padrões de massa molecular estão indicados por números e setas ao lado esquerdo da figura.

6.6 Determinação da massa molecular aparente da enzima purificada por espectrometria de massa

A análise de espectrometria de massa (**Figura 11**) do material purificado por cromatografia de afinidade detectou uma massa molecular de 23.311,88 Da, resultado este condizente com a faixa esperada para tripsinas de insetos (20 a 35 kDa).

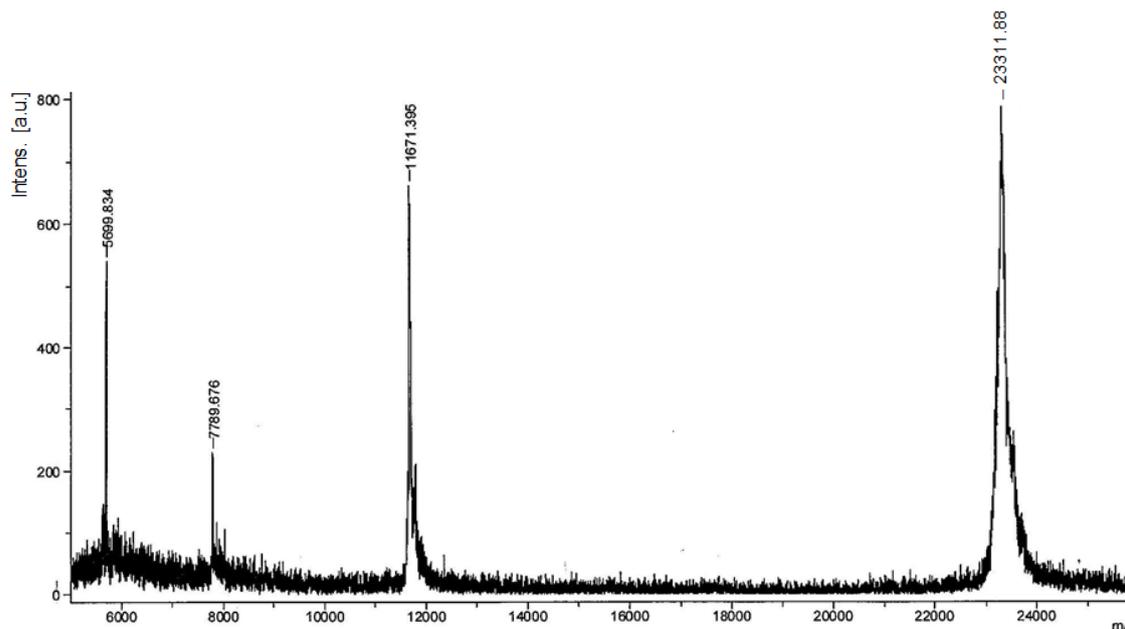


Figura 11: Análise por espectrometria de massa em MALDI-TOF da tripsina purificada.

6.7 Determinação do pH ótimo da atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

O efeito do pH sobre a atividade tripsinolítica da enzima purificada foi determinado (**Figura 12**). A existência de um único pico sugere a presença de uma única protease nas frações obtidas pela cromatografia de afinidade. A atividade encontrada nos ensaios realizados em pH 6,5 – 7 é baixa, e à medida que ocorre a alcalinização do meio, verifica-se um aumento na taxa de digestão do substrato com atividade proteolítica máxima compreendida entes os pHs 8,5 e 11. A atividade relativa de 100% refere-se à maior atividade obtida, neste caso, 100% equivale a $95,2 \pm 8,1 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.

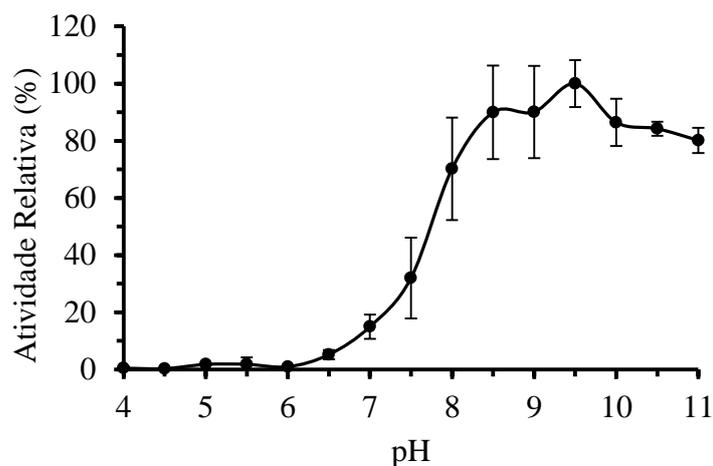


Figura 12: Efeito do pH sobre a atividade tripsinolítica de larvas de quarto estágio (L_4) de *L. longipalpis* usando L-BApNA como substrato. Cada ponto representa a média de três repetições ($n=3$). Linhas verticais sobre os pontos representam o desvio padrão da média.

6.8 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos sobre o L-BApNA

Os valores de K_M de 0,49 e erro padrão de $\pm 0,043$ mM e V_{max} de 1,092 e erro padrão de $\pm 0,067$ $\mu\text{moles}/\text{min}^{-1}$ (**Figura 13**) foram obtidos através de regressão não-linear, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten.

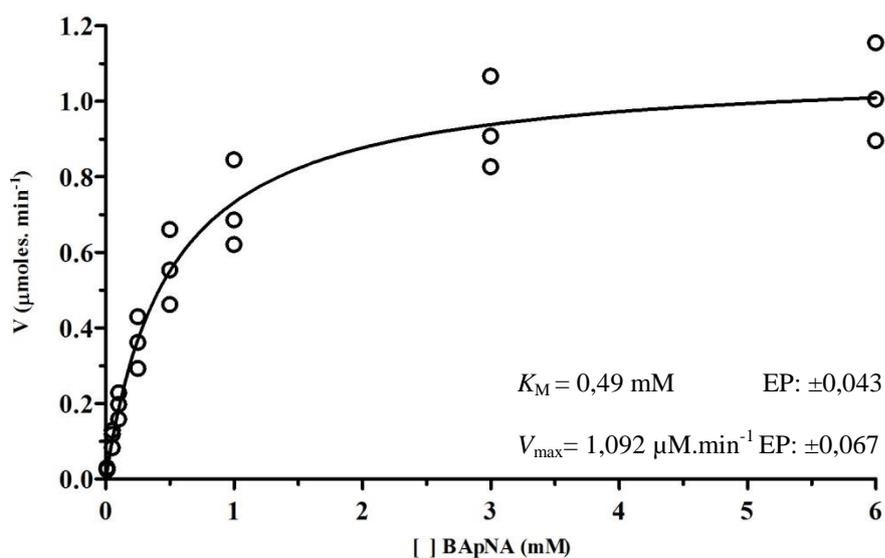


Figura 13: Cinética de Michaelis-Menten de atividade da tripsina do intestino de larvas de *L. longipalpis* usando o L-BApNA como substrato. A determinação dos parâmetros

cinéticos foi realizada em pH 9,5 a 30°C utilizando diferentes concentrações de L-BApNA (0,1-6 mM) e mantendo-se constante a quantidade de enzima (0,2 µg).

6.9 Efeito dos modificadores químicos na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

A enzima purificada de *L. longipalpis* foi também caracterizada mediante utilização de inibidores específicos (**Figura 14**). 3,4-DCI é um inibidor de serino proteases em geral, capaz de inativar uma grande variedade de tripsinas, elastases, quimotripsinas (Harper et al., 1985). O seu mecanismo de ação envolve a acilação de um sítio ativo de serina, com a concomitante abertura do anel de cumarina (Powers et al., 1989). Este inibidor não apresentou boa capacidade inibitória, mesmo quando este foi utilizado em concentrações elevadas.

A benzamidina consiste em uma amidina aromática sintética que inibe tripsinas por competitividade (Mares-Guia, 1968). Este inibidor inibiu fortemente a atividade proteolítica quando utilizado em concentrações a partir de 100 µM.

O TLCK é uma cetona que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina, exercendo assim um efeito de inibição irreversível sobre a enzima (Shaw et al., 1965). Este inibidor causou uma redução significativa da atividade proteolítica específica de tripsina em concentrações a partir de 10 µM.

A utilização de SBTI, um inibidor competitivo reversível de tripsinas, revelou uma forte inibição da atividade proteolítica da enzima, mesmo quando utilizado em concentrações a partir de 10 nM.

O TPCK, um inibidor irreversível de quimotripsinas e algumas cisteíno proteases, não demonstrou nenhum efeito inibitório sobre a atividade proteolítica em nenhuma das concentrações testadas. Estes resultados demonstram de fato que a enzima purificada trata-se de uma tripsina e não de uma quimotripsina.

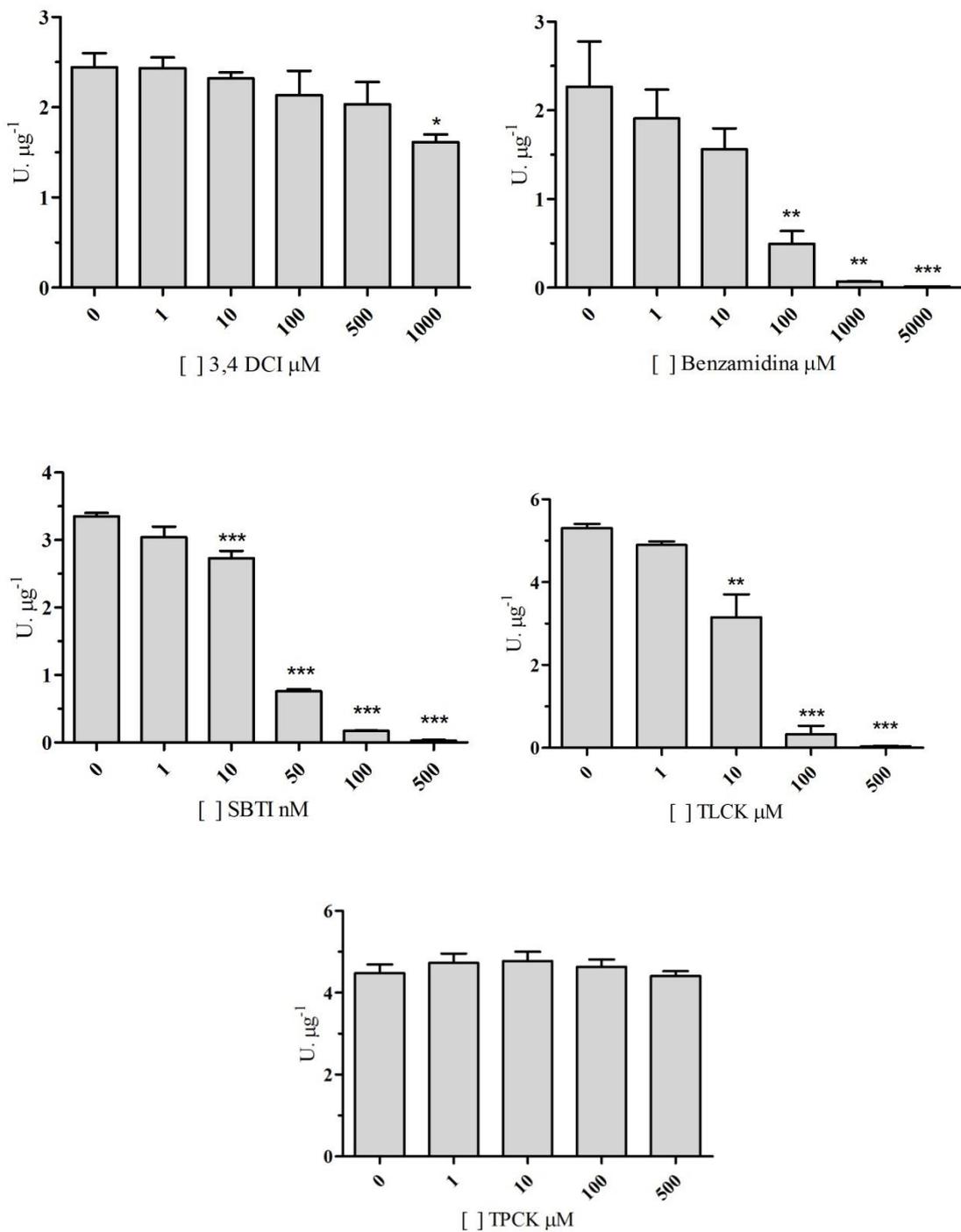


Figura 14: Efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre a tripsina purificada de larvas de *L. longipalpis* utilizando L-BApNA como substrato. Cada barra representa a média de três repetições ($n=3$). Linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão da média e * indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

6.10 Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis*

O aumento da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} não demonstrou nenhuma alteração na atividade proteolítica da enzima purificada. Ensaios realizados com a enzima purificada previamente incubada com EDTA demonstraram um decréscimo estatisticamente significativo da atividade proteolítica quando submetidos a uma concentração mínima de 18,75 mM de EDTA (**Figura 15**).

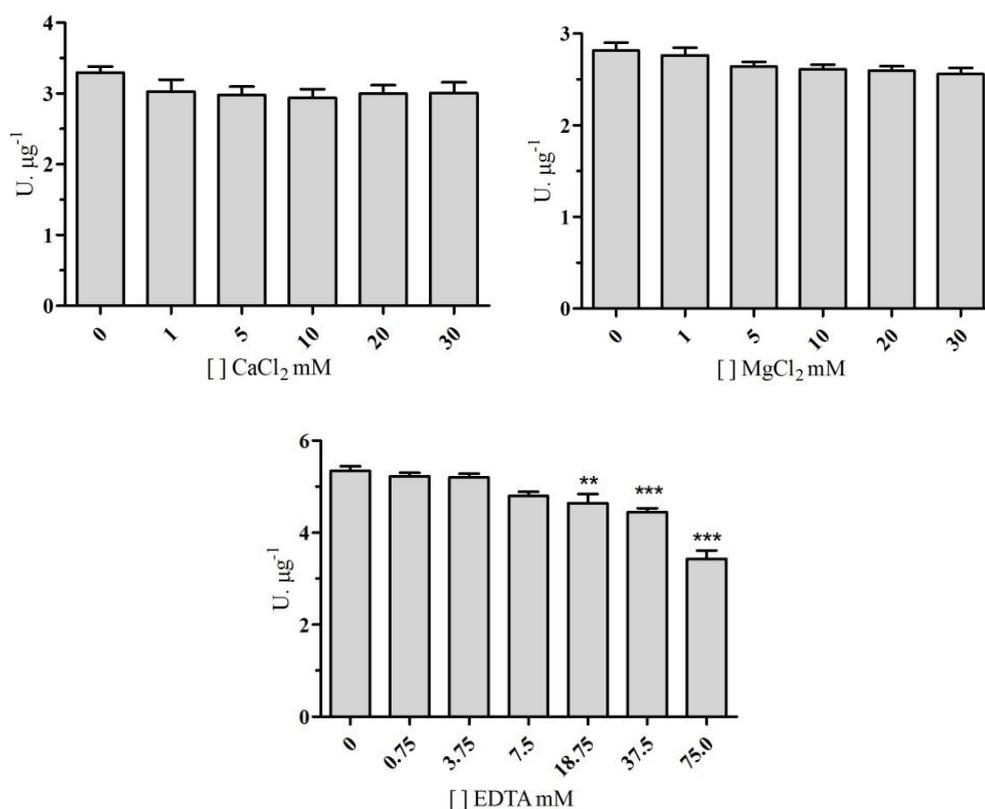


Figura 15: Efeito da concentração dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} e de EDTA na atividade tripsinolítica de larvas de *L. longipalpis* utilizando L-BApNA como substrato.

Cada barra representa a média de três repetições ($n=3$). Linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão da média e * indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

7.0 DISCUSSÃO

Nas três últimas décadas, a leishmaniose visceral ressurgiu no mundo de forma preocupante. No Brasil, a expansão da endemia tem sido constatada em várias cidades, incluindo grandes centros urbanos ocasionando um aumento expressivo no número de óbitos. Considerando-se a inexistência de vacinas eficientes e os sérios efeitos colaterais das terapias tradicionais, novas abordagens para o controle da leishmaniose visceral são de grande necessidade.

As limitações de métodos tradicionais de controle de vetores como resistência a inseticidas, custos elevados, grande impacto ecológico devido aos resíduos tóxicos e agressão a outras espécies indicam a necessidade de elaboração de novas técnicas mais eficientes. Com o surgimento da transgenia, o estudo da fisiologia digestiva de flebotomíneos tornou-se mais fácil. Atualmente não existe nenhuma forma de controle eficiente das formas imaturas de flebotomíneos, logo, o entendimento da digestão em espécies de interesse associada à manipulação genética das mesmas representam uma abordagem alternativa de controle. Além disso, o desenvolvimento de técnicas capazes de interferir em alvos moleculares, órgãos ou tecidos onde ocorrem as interações parasito-vetor poderiam alterar significativamente sua capacidade vetorial, conforme já foi descrito na literatura para algumas espécies de culicídeos.

Proteínas são de longe os nutrientes mais abundantes em uma refeição sanguínea, estando presentes também em grande quantidade na matéria orgânica em decomposição que serve de alimento para as formas imaturas. Logo, é de se esperar que as principais enzimas digestivas de insetos hematófagos sejam proteases. Neste contexto as tripsinas são consideradas as principais enzimas responsáveis pela digestão de proteínas nestes insetos (Lehane, 1994), salvo raras exceções tais como os barbeiros (Hemiptera), que possuem cisteíno e aspartil-proteases atuando em pH ácido no intestino médio posterior (Terra e Ferreira, 1994).

Outras serino proteases tais como as quimotripsinas parecem possuir uma distribuição semelhante às das tripsinas entre os insetos (Applebaum, 1985). Os resultados obtidos nos ensaios de proteases totais, e os que utilizaram substratos sintéticos específicos (**Figura 6**) mostram que as proteases digestivas presentes em larvas de *L. longipalpis* são serino proteases semelhantes às tripsinas e quimotripsinas. Embora outras endoproteases possam também estar presentes, o uso de diferentes inibidores de proteases como os utilizados por Fazito do Vale et al., (2007) indicam que estas duas enzimas constituem as principais

endoproteases digestivas de larvas de *L. longipalpis*. Utilizando EBI de larvas L₄, os autores descreveram a presença de tripsinas e quimotripsinas secretadas no intestino anterior e a capacidade destas de digerir o substrato azocaseína em várias faixas de pH, especialmente em pH alcalino (pH 11). Adicionalmente, estas enzimas foram descritas em larvas e adultos de *L. anthophora* (Mahmood e Borovysky, 1992; 1993), em adultos de *L. longipalpis* (Gontijo et al., 1998; Telleria et al., 2007; 2010) e também em adultos de outras espécies de flebotomíneos tais como *P. papatasi* (Borovsky e Schlein, 1987; Valenzuela, 2003) e *P. langeroni* (Dillon e Lane, 1993).

A quantificação comparativa da atividade tripsinolítica e quimotripsinolítica do EBI de larvas de *L. longipalpis* revelou que tripsinas são mais atuantes na digestão de proteínas totais quando comparadas com as quimotripsinas nas condições dos ensaios testados (**Figura 7**). Curiosamente, efeito contrário foi observado por Mahmood e Borovysky (1992), ao quantificarem por meio de ensaios de proteases totais a atividade enzimática destas enzimas em larvas de *L. anthophora*. Os autores concluíram que a atividade quimotripsinolítica é consideravelmente maior comparada com a atividade tripsinolítica. Entretanto, ao avaliarem a digestão em adultos, os autores constataram haver um predomínio de atividade tripsinolítica (Mahmood e Borovysky, 1993).

A análise do zimograma revelou várias bandas de endoproteases que correspondem a diferentes isoformas de tripsinas e quimotripsinas presentes em EBI de larvas L₄ de *L. longipalpis* (**Figura 8**). Resultados semelhantes foram observados por Fazito do Vale et al., (2007) ao descreverem 11 bandas de endoproteases reveladas mediante a utilização da mesma técnica. Mahmood e Borovysky (1992), utilizando uma técnica onde o sítio ativo das enzimas foi marcado radioisotopicamente com [1,3-³H] diisopropilfluorofosfato ([1,3-³H] DIP), um inibidor irreversível de serino proteases, descreveram 12 bandas, entretanto, os autores deste estudo não determinaram a massa molecular destas isoformas.

Segundo Terra e Ferreira (1994), as massas moleculares de tripsinas e quimotripsinas de insetos costumam ser baixas, variando de 20 a 35 kDa. Embora nossos zimograma tenham revelado bandas acima de 35 kDa para tripsinas e acima de 120 kDa para quimotripsinas, nossos resultados de eletroforese com a proteína purificada e a espectrometria de massa desmentem esta interpretação. O grande número de bandas presentes no zimograma se deve provavelmente a algum artefato. Alguns estudos utilizando larvas de outros insetos indicaram que endoproteases de massas moleculares elevadas podem estar presentes no intestino. Oliveira et al., (2005) descreveram tripsinas de 66-91 kDa no intestino de larvas de *Anticarsia*

gemmatalis (Lepidoptera). Endoproteases semelhantes às tripsinas e quimotripsinas de massas moleculares incomuns também foram descritas para *L. longipalpis* (33-102 kDa) por Fazito do Vale et al., (2007), *A. aegypti* (20-250 kDa) por Mesquita-Rodrigues et al., (2011) e *C. quinquefasciatus* (11-130 kDa) por Borges-Veloso et al., (2012).

Devido ao fato da técnica de SDS-PAGE co-polimerizada com gelatina detectar a atividade de proteases, estas proteínas não são completamente desnaturadas. Portanto, a massa molecular calculada para as bandas que indicam a atividade proteolítica devem ser consideradas apenas como uma estimativa muito grosseira. O fato das amostras de proteínas não serem fervidas na presença de SDS e β -mercaptoetanol, pode predispor a formação de agregados proteicos resultando em bandas de alto peso molecular. Além disso, é possível que a ligação das proteases às moléculas de SDS esteja acontecendo em um grau sub-ótimo. Isso daria aos complexos uma relação carga/massa alterada e conseqüentemente uma migração alterada no gel. Assim estes fatores em conjunto podem atrasar a migração das proteases, causando a falsa impressão de uma elevada massa molecular (Nauen et al., 2001; Mesquita-Rodrigues et al., 2011).

Contudo, uma análise em SDS-PAGE em que uma amostra da enzima purificada foi desnaturada pelo calor na presença de SDS e β -mercaptoetanol (**Figura 10**), permitiu-nos avaliar mais precisamente a massa molecular desta tripsina. Deste modo obteve-se o valor de 20,6 kDa, valor este muito semelhante ao valor encontrado pela análise de espectrometria de massa (**Figura 11**) que nos forneceu o valor de 23311,88 Da, demonstrando haver uma certa congruência entre as duas técnicas. Estes resultados estão de acordo com os dados citados na literatura, uma vez que em insetos enzimas intestinais semelhante às tripsinas tem sido reportadas com massas moleculares compreendidas numa faixa entre 20 e 35 kDa por Terra e Ferreira (1994) e 18 e 25 kDa por Novillo et al., (1999).

O fato de tripsinas possuírem massa molecular reduzida consiste em um aspecto interessante, considerando o fato de que em larvas de *L. longipalpis* estas enzimas são produzidas na porção anterior do intestino médio e posteriormente secretadas no espaço ectoperitrófico. Deste modo, as enzimas precisam ultrapassar os poros da membrana peritrófica para atuarem na digestão inicial de proteínas dentro do espaço endoperitrófico por um processo conhecido como mecanismo de contracorrente, descrito por Dow (1981) e responsável pela reciclagem de enzimas digestivas solúveis (Terra, 1998, 1990).

Segundo Terra e Ferreira (1994), os complexos formados por endopeptidases e proteínas dietéticas têm seus tamanhos reduzidos pela ação proteolítica, sendo assim capazes de ultrapassar a membrana peritrófica e ganhar o espaço ectoperitrófico por intermédio deste mecanismo de contra corrente. Uma vez presentes no espaço ectoperitrófico, os nutrientes já digeridos são absorvidos pelas microvilosidades do epitélio intestinal e as endopeptidases podem se difundir de volta ao espaço endoperitrófico para serem posteriormente reutilizadas (Fazito do Vale et al., 2007). Entretanto, a ideia de que estas enzimas necessitam de possuir massa molecular reduzida não é tão restrita, tendo em vista que Edwards e Jacobs-Lorena (2000) observaram que a membrana peritrófica de larvas de *A. aegypti* e *A. gambiae* são permeáveis a moléculas de até 148 kDa.

Apesar da ocorrência de dois picos de atividade tripsinolítica no cromatograma (**Figura 9**), o segundo pico eluído é o que corresponde às frações purificadas pela cromatografia de afinidade em coluna de *p*-aminobenzamidina-agarose, exibindo um fator de purificação de 46,1 vezes. Um pico de menor atividade sobre o substrato L-BApNA foi observado juntamente com as proteínas intestinais que não se ligaram à coluna de afinidade (frações 1–6). Uma possível explicação para isso seria hidrólise não específica do substrato L-BApNa, exercida provavelmente por enzimas intracelulares tendo em vista que outras enzimas são capazes de agir sobre este substrato (Terra e Ferreira, 1994). É possível também que, durante a cromatografia, algumas moléculas de proteínas, presentes no EBI estivessem competindo com a coluna pela ligação às moléculas de tripsina.

O pH do conteúdo intestinal é um fator interno importante que afeta diretamente a atividade das enzimas digestivas. Tem sido descrita em várias espécies de insetos a determinação dos valores de pH luminal juntamente com o pH ótimo de suas enzimas digestivas. (Terra e Ferreira, 1994). Estes estudos afirmam que há uma correlação entre pH ótimo das enzimas e o pH no lúmen intestinal de insetos (Applebaum, 1985).

Estudos realizados com larvas de *A. aegypti* (Mesquita-Rodrigues et al., 2011) e *C. quinquefasciatus* (Borges-Veloso et al., 2012) relatam a ocorrência de atividade de serino proteases em diversas faixas de pHs (3,5-10). Entretanto, a intensidade do perfil proteolítico foi drasticamente reduzida nos pHs 3,5 e 5,5 quando comparados àqueles obtidos nos pHs 7,5 e 10. Esses valores de pH ótimo para atividade de serino proteases estão de acordo com o ambiente alcalino presente no interior do intestino médio tanto de larvas como em mosquitos adultos (Boudko et al., 2001a, Boudko et al., 2001b; del Pilar Corena et al. 2004; del Pilar Corena et al. 2005).

Nossos resultados indicam que, como nos demais insetos, tripsinas em *L. longipalpis* também possuem atividade máxima em pH bastante alcalino. Conforme ilustrado na **Figura 12**, a determinação do pH ótimo da enzima purificada exibiu um pico de atividade compreendido entre os pH 8,5 e pH 10.

Experimentos semelhantes realizados por Fazito do Vale et al., (2007), descreveram a ocorrência de dois picos de atividade tripsinolítica (pH 8,5 e pH 10) ao utilizarem EBI de larvas de *L. longipalpis*. Segundo os autores, a presença de mais de um pico de atividade na curva de pH indicaria a existência de isoenzimas de tripsinas atuando na digestão de proteínas. Tendo em vista nossos resultados, é possível que estes dois picos de atividade sejam uma decorrência dos tampões utilizados no estudo.

Mediante a utilização de corantes vitais, os autores estimaram os valores de pHs no lúmen intestinal das larvas. Os valores de pH encontrados ao longo do intestino médio foram de ≥ 9 para a porção anterior, entre 7,5 e 8,5 para a porção mediana e entre 6,5 e 7 para porção posterior. Adicionalmente estas diferentes porções foram testadas para atividade de endoproteases totais e aminopeptidases, onde foi observada uma maior atividade de endoproteases na porção anterior, enquanto que na porção posterior foi observada uma maior atividade de aminopeptidases atuando melhor em pHs próximos da neutralidade.

Telleria et al., (2010) avaliando o perfil proteolítico do EBI de fêmeas de *L. longipalpis* em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina, concluiu que em flebotomíneos adultos a atividade proteolítica máxima ocorre em pH 8, confirmando os resultados prévios em que Gontijo et al., (1998) obtiveram dados semelhantes ao ensaiar a atividade enzimática utilizando um substrato sintético específico para tripsina (L-BApNA) em diferentes faixas de pH (5-8,5). Estes achados, aliados aos de Fazito do Vale et al., (2007) reforçam a ideia de Applebaum (1985) na qual o autor sugere que há uma correlação direta entre pH ótimo de enzimas e pH do lúmen intestinal.

Os parâmetros cinéticos (**figura 13**) encontrados para a enzima purificada de *L. longipalpis* assemelham-se aos de tripsinas de outros insetos. O valor de K_M obtido neste trabalho para L-BApNA ($K_M = 0,49$ mM) encontra-se na faixa de valores encontrados para tripsinas de outros insetos tais como o de *Musca domestica* ($K_M = 0,12$ mM) (Lemos e Terra, 1992), *Locusta migratoria* ($K_M = 0,47$ e $0,26$ mM) (Lam et al., 2000), *Periplaneta americana* ($K_M = 0,12$ mM) (Lopes e Terra, 2003), *A. gemmatalis* ($K_M = 0,32$ mM) (Oliveira et al., 2005) e *Sitophilus zeamais* ($K_M = 0,34$ mM) (Silva et al., 2010).

A atividade proteolítica da enzima purificada do EBI de *L. longipalpis* foi fortemente inibida por inibidores clássicos de serino proteases benzamidina, SBTI e TLCK e nenhum efeito inibitório foi observado na presença de TPCK que é um inibidor específico de quimotripsinas (**Figura 14**). Estes dados estão de acordo com os de vários autores que realizaram a purificação parcial de tripsinas de intestinos de outras espécies de insetos. A título de exemplo temos *Lymantria dispar* (Valaitis, 1995), *Ostrinia nubilalis* (Bernardi et al., 1996), *L. migratoria* (Lam et al., 2000), *A. gemmatalis* (Oliveira et al., 2005), e *S. zeamais* (Silva et al., 2010). É interessante ressaltar que dentre todos os inibidores utilizados, o SBTI foi o que mostrou maior inibição da atividade tripsinolítica, discordando das proposições de Oliveira et al., (2005), ao sugerir que este inibidor não deve alterar a atividade de proteases de insetos exercendo efeito apenas em tripsinas de mamíferos.

O inibidor de metaloproteases EDTA diminuiu a atividade proteolítica da enzima purificada de *L. longipalpis* quando utilizado em concentrações iguais ou superiores a 18,75 mM. Deste modo, o efeito inibitório da atividade enzimática causado pelo EDTA deve ter sido ocasionado pelas altas concentrações do inibidor e não pelo sequestro de íons metálicos associados à enzima, uma vez que os ensaios realizados com diferentes concentrações dos íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} não mostraram diferenças para os diferentes grupos testados (**Figura 15**). Estes resultados estão de acordo com diversos estudos presentes na literatura que afirmam que algumas propriedades das tripsinas de insetos são diferentes das de vertebrados, uma vez que tripsinas de insetos não são ativadas ou estabilizadas por íons Ca^{2+} (Levinsk et al., 1977; Jonhston et al., 1991; Lemos e Terra, 1992). Contrastando estas evidências, Oliveira et al., (2005) sugeriram que uma enzima digestiva semelhante à tripsina de *A. gemmatalis* parece ser estabilizada por íons Ca^{2+} à semelhança do que ocorre com tripsinas de vertebrados (Dias e Rogana, 1986).

Este trabalho relata pela primeira vez a purificação e caracterização de uma enzima semelhante à tripsina presente no intestino de larvas de *L. longipalpis*. Trabalhos recentes que abordam a participação de algumas enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (Fazito do Vale et al., 2012; Moraes et al., 2012), aliados aos resultados aqui presentes, vem a acrescentar mais informações ao conhecimento da biologia digestiva das larvas desta espécie.

8.0 CONCLUSÕES

A digestão de proteínas em larvas de *Lutzomyia longipalpis* é realizada principalmente por serino proteases semelhante às tripsinas e quimotripsinas.

A atividade tripsinolítica é responsável pela maior parte da proteólise no intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* quando comparada com a atividade quimotripsinolítica.

As análises em SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-TOF) demonstraram que a proteína purificada por cromatografia de afinidade em coluna de *p*-aminobenzamidina-agarose possui massa molecular de 23 kDa.

A enzima purificada possui atividade máxima em pH alcalino.

O valor de K_M obtido para enzima purificada utilizando L-BApNA foi de 0,49 mM EP \pm 0,043, no pH 9,5 a 30°C.

O uso de inibidores específicos mostrou que a enzima purificada é uma serino protease semelhante à tripsina.

A enzima purificada não é ativada pelos íons metálicos testados.

A atividade enzimática da enzima semelhante à tripsina não é inibida por EDTA.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B. Usma, MC. 1994. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Ann Trop Med Parasitol.* v. 88, n.5, p. 543-549.
- Alexander, B. Cadena, H. Usma, MC. Rojas, CA. 1995. Laboratory and field evaluations of a repellent soap containing diethyl toluamide (DEET) and permethrin against phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Valle del Cauca, Colombia. *Am J Med Trop Hyg.* 52(2):p.169-173.
- Applebaum, SW. 1985. Biochemistry of digestion. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* (Edited by Kerkut GA and Gilbert, LI). Pergamon Press, New York. 4: p.473-500.
- Barrett, A. 1994. Classification of peptidases: Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. In: *Methods in Enzymology.* (ed. Barrett AJ). Academic Press, San Diego. 244: p.1-15.
- Barrett, A. 1995. Classification of peptidases: Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. In: *Methods in Enzymology.* (ed. Barrett AJ). Academic Press, San Diego. 248: p.183.
- Bermúdez, EGC. 2009. *Lutzomyia sand flies in the Brazilian Amazon basin (Diptera: Psychodidae).* Manaus: INPA, 202p.
- Bernardi, R. Tedeschi, G. Ronchi, S. Palmieri, S. 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 25. p.883-889.
- Billingsley, PF. Hecker, H. 1991. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and α -glucosidase in the midgut. *J Med Entomol.* 28: p.865-871.

Bode, W. Bauman, M. Huber, R. Stone, S. Hofsteenge. J. 1989. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *The EMBO J.* 8ed. (11): p.3467-3475.

Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Pires RC, Britto C, Fernandes N, d'Avila-Levy CM, De Jesus JB. 2012. Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. *Parasites and Vectors.* 20;5:p.123.

Borovsky, D. Schlein, Y. 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol.* 1: p.235-242.

Boudko, DY. Moroz, LL. Harvey, WR. Linser, PJ. 2001a. Alkalinization by chloride/bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26, 15354-15359.

Boudko, DY. Moroz, LL. Linser, PJ. Trimarchi, JR. Smith, PJS. Harvey, WR. 2001b. *In situ* analysis of pH gradients in mosquito larvae using noninvasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *J Exp Biol* 204, p.691-699.

Brazil, RP. Brazil, BG. 2003. Biologia de Flebotomíneos Tropicais. In: Rangel, EF & Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p.257-274.

Briegleb, H. Lea, A. 1975. Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology.* 21, p.1597-1604.

Chappuis, F. Sundar, S. Hailu, A. Ghalib, H. Rijal, S. Peeling, R. Alvar, R. Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiol.* 5. p.873-882.

Deane, LM. Deane, MP. 1957. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos do noroeste de Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.* 9: p.225-246.

- del Pilar Corena, M. Fiedler, MM. VanEkeris, L. Tu, C. Silverman, DN. Linser, PJ. 2004. Alkalization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol* 137, p.207-225.
- del Pilar Corena, M. VanEkeris, L. Salazar, M. I. Bowers, D. Fiedler, MM. Silverman, D. Tu, C. Linser, PJ. 2005. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J Exp Biol.* 208, p.3263-3273.
- Delcroix, M. Sajid, M. Caffrey, C. Lim, K-C. Dvorak, J. Hsieh, I. Bahgat, M. Dissous, C, McKerrow, J. 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem.* 284: p.39316-39329.
- Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95, p.239-243.
- Dias, CLF. Rogana, E. 1986. Autolysis of b-trypsin at pH 3.0. *Braz J Med Biol Res.* 19. p.11-18.
- Díaz-Mendoza, M. Ortego, F. García de Lacoba, M. Magaña, C. de la Poza, M. Farinós, G. Castañera, P. Hernández-Crespo, P. 2005. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochem Mol Biol.* 35: p.1005-1020.
- Dillon, RJ. Lane. RP. 1993. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatazi* and *Phlebotomus langeroni*. *Parasitol Res.* 79: p.492-496.
- Dougherty, MJ. Guerin, PM. Ward, RD. 1995. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiol Ent.* 29: p.5-12.
- Dow, JAT. 1981. Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *J Insect Physiol.* 27, p.579-585.

- Elnaiem, DA. Ward, RD. 1991. Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. *Med Vet Ent.* 5: p.87-91.
- Edwards, MJ. Jacobs-Lorena, M. 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J Insect Physiol.* 46. p.1313-1320.
- Fazito do Vale, V. Pereira, MH. Gontijo, NF. 2007. Midgut pH profile and digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol.* 53. p.1151-1159.
- Felix, CR. Betschart, B. Billingsley, BF. Freyvogel, TA. 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is separable into two cellular phases. *Insect Biochem.* 21: p.197-203.
- Fersht, A. 1998. *Structure and Mechanism in Protein Science : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman, New York. 4ed. p. 650.
- Fisk, W. 1950. Studies on proteolytic digestion in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America.* 43, p.555-572.
- Galati, EAB. 2003. Morfologia e Taxonomia: Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, EF & Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p.177-206.
- Gill, I. López-Fandiño, R. Jorba, X. Vulfson, E. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology.* 18: p.162-183.
- Gontijo, NF. Almeida-Silva, S. Costa, FF. Mares-Guia, ML. Willams, P. Melo, MN. 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some especulations upon *Leishmania* development. *Exp Parasitol.* 90: p.212-219.
- Gorman, M. Andreeva, O. Paskewitz, S. 2000a. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 30: p.35-46.
- Gorman, M. Andreeva, O. Paskewitz, S. 2000b. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene.* 251: p.9-17.

Graf, R. Briegel, H. 1985. Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L). *Insect Biochem.* 15. p.611-618.

Greenberg, B. Paretsky, D. 1955. Proteolytic enzymes in the house fly *Musca domestica* (L.) *Annals of the Entomological Society of America.* 48, p.46-50.

Harper, J.W., Hemmi, K. Powers, J.C. (1985) *Biochemistry.* 24, 1831-1841.

Heussen, C. Dowdle, EB.1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry.* 102, p.196-202.

Hibbs, M. Hasty, K. Seyer, J. Kang, A. Mainardi, C. 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260: p.2493–2500.

Jonhston, KA. Gatehouse, JA. Anstee, JH. 1991. The partial purification and characterization of serine proteases activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem.* 21. p.389-397.

Killick-Kendrick, R. Leaney, AJ. Ready, PD. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 13: p.429-440.

Killick-Kendrick, R. 1987. The breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cévennes focus of leishmaniasis in the south of France. *Parassitologia.* 29: p.181-191.

Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 17: p.279-289.

Kirschenbaum, MD. 1976. Quantification of protein. In: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (Fasman, GD.) 3rd Ed. Vol. 2. p.383. CRC Press, Cleveland, Ohio.

- Kuhls, K. Alam, MZ. Cupolillo, E. Ferreira, GEM. Maurício, IL. et al. 2011. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *Plos Negl Trop Dis* 5: e1155.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, p.680-685.
- Lainson, R. Rangel, EF. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Mem Int Oswaldo Cruz*. 100: p.811-827.
- Lam, W. Coast, G. Rayne, R. 2000. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem Mol Biol*. 30, p.85-94.
- Lehane, MJ. 1994. Digestive enzymes, haemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood-sucking insects. *Int J Parasitol*. 24: p.27-32.
- Leite, ACR. Willams, P. 1996. Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. *Mem Int Oswaldo Cruz*. 91: p.571-578.
- Lemos, . Terra, . 1992. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem Mol Biol*. 22. p.613-619.
- Lewinski, H. Birk, Y. Applebaum, SW. 1977. Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Int J Pept Protein Res*. 10. p.252-264.
- Lopes, AR. Terra, WR. 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochem Mol Biol*. 33. p.407-415.
- Mahmood, F. Borovsky, D. 1992. Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 29: p.489-495.
- Mahmood, F. Borovsky, D. 1993. Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 30: p.683-688.

Mangabeira, O. 1969. Sobre a sistemática e biologia dos phlebotomus do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 21: p.3-25.

Mares-Guia, M. 1968. Hydrofobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hydrophobic binding site to side chain modifications in competitive inhibitors of the amidinium type. *Arch Biochem Biophys*. 127. p.317-322.

Maroli, M. Feliciangeli, MD. Bichaud, L. Charrel, RN. Gradoni, L. 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

Maurício, IL. Stothard, JR. Miles, MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 16: p.188–189.

Mesquita-Rodrigues, C. Saboia-Vahia, L. Cuervo, P. Levy, CM. Honório, NA. Domont, GB. Jesus, JB. 2011. Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. 76, 4: p.223-235.

Modi, GB. Tesh, RB. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol*. 20: p.568-569.

Molina-Cruz, A. Gupta, L. Richardson, J. Bennet, K. Black, W 4th. Barrlias-Mury, C. 2005. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 72: p.631-637.

Muhlia-Almazán, A. Sánchez-Paz, A. García-Carreño, F. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J Comp Physiol B*. 178: p.655–672.

Müller, H. Crampton, J. della-Torre, A. Crisanti, A. 1993. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by a blood meal. *EMBO J*. 12: p.2891-2900.

Müller, H. Catteruccia, F. Fizioli, J. della-Torre, A. Crisanti, A. 1993. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol*. 81: p.371-385.

- Nauen, R. Sorge, D. Sterner, A. Borovsky, D. 2001. TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 47: p.169-180.
- Noriega, F. Wells, M. 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology.* 45. p.613-620.
- Northrop, J. 1930. Crystalline Pepsin: Isolation and Tests of Purity. *The Journal of General Physiology.* 13(6): p.739-766.
- Novillo, C. Castañera, P. Ortego, F. 1999. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia monagrioides*. *Insect Biochem Mol Biol.* 27.p.177-184.
- Peterkova-Koci, K. Robles-Murguia, M. Ramalho-Ortigao, M. Zurek, L. 2012. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors.* 5: p.145-153.
- Pimenta, PF. Modi, GB. Pereira, ST. Shahabunddin, M. Sacks, DL. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolitic activities of the sand fly midgut. *Parasitology.* 115: p.359-369.
- Pita-Pereira, D. Cardoso, MA. Alves, CR. Brazil, RP. Britto, C. 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Tropica,* 107(1): p.66-9.
- Powers, J.C., Kam, C.-M., Narasimhan, L., Oletsysz, J., Hernandez, M.A. Ueda, T. (1989). Mechanism-based isocoumarin inhibitors for serine proteases: use of active site structure and substrate specificity in inhibitor design. *J Cell Biochem.* 39, 33-46.
- Rao, M. Aparna, M. Ghatge, M. Deshpande, V. 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: p.597-635.

- Ramalho-Ortigão, JM. Kamhawi, S. Rowton, ED. Ribeiro, JM. Valenzuela, JG. 2003. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochem Mol Biol.* 33: p.163-171.
- Rangel, EF. Souza, NA. Wermelinger, ED. Barbosa, AF. Andrade, CA. 1986. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912, *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae), under experimental conditions. *Mem Int Oswaldo Cruz.* 81: p.432-438.
- Russo, C. 2006. Modelagem de serino proteases e inibidores com emprego de ferramentas de bioinformática estrutural. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. p.79.
- Sant'Anna, MR. Diaz-Albiter, H. Mubarak, M. Dillon, RJ. Bates, PA. 2009. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of Leishmania. *Parasit Vectors.* p.62.
- Sarath, G. De La Monte, R. Wagner, F. 1989. Protease assay methods. *Proteolytic enzymes: a practical approach.* Press at Oxford, University Press, cap.3, p.25-55.
- Schlein, Y. Warburg, A. 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Ent.* 23 (1): p.11-5.
- Schlein, Y. Jacobson, RL. 1998. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology.* 117: p.467-473.
- Shahabuddin, M. Lemos, F. Kaslow, D. Jacobs-Lorena, M. 2006. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immun.* 64: p.739-743.
- Shannon, J. Baramova, E. Bjarnason, J. Fox, J. 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. *J. Biol. Chem.* 264:11575-11583.
- Shaw, E. Mares-Guia, M. Cohen, W. 1965. Evidence of an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanona, the chloromethyl ketone derived from *N*- α -tosyl-L-lysine. *Biochemistry.* 4, p.2219-2224.

Shaw, JJ. 1997. The relationship of sand fly ecology to the transmission of the leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. *Contributions to the Knowledge of Diptera*. (ed. J.F.Burger) p.503-507. Gainesville, Associated Publishers.

Sherlock, IA. 2003. A importância médico-veterinária dos flebotomíneos. In: Rangel, EF & Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 368p.

Silva, LB. Reis, AP. Pereira, EJG. Oliveira, MGA. Guedes, RNC. 2010. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Comp Biochem Physiol*. 155. p.12-19.

Telleria, EL. Pitaluga, AN. Ortigão-Farias, JR. Araújo, AP. Ramalho-Ortigão, JM. Traub-Cseko, YM. 2007. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 66: p.53-63.

Telleria, EL. Araújo, APO. Secundino, NF. d'Ávila-Levy. CM. Traub-Cseko, YM. 2010. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *Plos One*. 5 (5) p.1-8.

Terra, WR.1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 21, p.657–734.

Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*. 35, p.181–200.

Terra, W. Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. n.109b, p.1-62.

Terra, W. Ferreira, C. Jordão, B. Dillon, R. 1996. Digestive enzymes. In: Lehane, M. Billingsley, P. (Eds.) *Biology of Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge, p.153-186.

Terra, W. Ferreira, C. 2011 . Biochemistry and molecular biology of digestion. In: L.I. Gilbert. (Org.). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2011, v.1 p.365-418.

Valaitis, AP. 1995. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem Mol Biol*. 25. p.139-149.

Valenzuela, JG. 2003. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochem Mol Biol*. 33. p.163-171.

Volf, P. Volfova, V. 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol*. doi: 10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x.

Ward, RD. 1990. Some aspects of the biology of phlebotomine sand fly vectors. In: Harris KF (Ed.). *Adv Dis Vector Res*, New York: Springer-Verlag, p.91-126.

Wilson, I. Vogel, J. Somerville, S. 1997. Signalling pathways: a common theme in plants and animals? *Current Opinion in Biology*. 7 (3): p.175-178.

Young, DG. Duncan, MA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Entomological Institute*. n.54, p.871-881.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em: 12/09/2012