



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PPGBIOTEC**

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TREALOSE-6-FOSFATO  
FOSFATASE DE *Anopheles gambiae* PRODUZIDA EM *Pichia  
pastoris***

**MARCOS CÉZAR FERNANDES PESSOA**

**MANAUS/AM  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PPGBIOTEC**

**MARCOS CÉZAR FERNANDES PESSOA**

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TREALOSE-6-FOSFATO  
FOSFATASE DE *Anopheles gambiae* PRODUZIDA EM *Pichia  
pastoris***

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM)**

**MANAUS/AM  
2014**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P475e Pessoa, Marcos Cézar Fernandes  
Expressão e caracterização de trealose-6-fosfato fosfatase de Anopheles gambiae produzida em Pichia pastoris / Marcos Cézar Fernandes Pessoa. 2014  
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Trealose. 2. Trealose-6-fosfato fosfatase. 3. Expressão. 4. Caracterização enzimática. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



### 163ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 06 de junho de 2014 às 08:30 h. no Auditório do Bloco M - Setor Sul – UFAM, **Marcos César Fernandes Pessoa** defendeu sua Tese de Doutorado “**Expressão e caracterização de trealose-6-fosfato fosfatase de *Anopheles gambiae* produzida em *Pichia pastoris*”.**

#### Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Spartaco Astolfi Filho - (Presidente)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dr. Eduardo Rezende Honda - (CEPEM/RO)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Sandra Patricia Zanotto - (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dr. Wanderli Pedro Tadei - (INPA)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dr. Luis André Morais Mariuba - (FIOCRUZ/AM)	Aprovado (X) Reprovado ( )	

Manaus, 06 de junho de 2014.

**Resultado Final:**    Aprovado (X)  
                               Reprovado ( )

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
 Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia  
  
 Prof. Dr. Eymar Vitor Andrade  
 Coordenador

\_\_\_\_\_  
 Coordenador do PPGBIOTEC

**Aos meus pais e irmãos que muito me ajudaram e aos mestres e amigos que sempre acreditaram em meu potencial, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sua infinita sapiência e amor por ter dado a mim forças e perseverança de continuar e, assim, concluir este trabalho;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**, grande amigo e companheiro, pelos seus ensinamentos, conselhos, lições no fazer Ciência e por ter acreditado em meu potencial desde o início do Doutorado, por seus conselhos nos experimentos de caracterização enzimática, principalmente quando estes insistiam em não dar certo;

Aos meus pais, **Esperidião Batista Pessoa** e **Maria Célia Fernandes Pessoa**, que sempre estiveram e estão presentes em minha vida. Agradeço por toda a zelosa educação moral e cristã que dedicaram a mim, e que fizeram construir o ser humano que hoje sou;

Aos meus irmãos, em especial à **Regina** e **Eldenora** por terem dado todo o apoio necessário nesta caminhada;

À **Érika Izumi** por sua grande colaboração e companheirismo durante todo o processo de construção do gene sintético e por ter me auxiliado no início dos meus experimentos em laboratório. Obrigado por tudo!

A **Elson Sadalla** e **Edson Carmo** por seus auxílios durante os experimentos de clonagem e expressão em *Pichia pastoris*. Valeu pelo ensinamento de vocês dois em uma área completamente nova para mim;

A **André Mariúba**, e sua equipe de laboratório, por ter tido a disposição em me ajudar e ensinar durante os testes de *colony blot* e *Western blotting*;

À **Anita Souza** por ter me auxiliado durante os procedimentos de purificação da enzima;

À Bruna Protti, Andréa Listik, André, Rogério, Júlio Nino, Maurício Leite, Dina, Elza Lima, Pamella, Lorena, Márcia Neiva, Idacleia e tantos outros que passaram pelo laboratório de DNA pela companhia que vocês me deram durante todo esse tempo. O que tenho a dizer é simplesmente um “Muito obrigado” como forma de carinho e respeito para com todos vocês! Aos mais “antigos” valeu pela companhia ao longo desses sete anos que já tenho no laboratório.

À **FAPEAM** pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual não poderia levar adiante o Doutorado;

À **Universidade Federal do Amazonas** pela oportunidade em oferecer o curso de Doutorado e por dispor o Laboratório de Tecnologias de DNA, no qual eu desenvolvi minha pesquisa.

*"Somos o que repetidamente  
fazemos. A excelência,  
portanto, não é um efeito, mas  
um hábito."*

*(Aristóteles)*



## RESUMO

A malária humana por ser uma doença tropical e parasitária de relevância médica, social e econômica, representa um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. Em vista à resistência do inseto-vetor aos inseticidas, a pesquisa de novas ferramentas para o controle do vetor tem sido proposta. Uma das alternativas mais fascinantes baseia-se no uso de inibidores de enzimas que desempenham papel importante e fundamental no metabolismo e fisiologia do inseto. Uma destas enzimas é a trealose-6-fosfato fosfatase atuante na rota metabólica da trealose que desfosforila a molécula de trealose-6-fosfato, formando como produtos o dissacarídeo trealose e fosfato inorgânico. A trealose é um dímero de glicose encontrado em plantas, insetos e micro-organismos. Nestes organismos acredita-se ser importante para diversos papéis, um dos quais é servir como sítio de armazenamento de glicose para energia e/ou para a síntese de componentes celulares, outro papel é proteger as células contra pressões ambientais, tais como dessecação e congelamento, e para estabilização de proteínas contra a desnaturação. Por esse motivo, este trabalho teve como objetivo clonar e expressar o gene da trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) de *Anopheles gambiae* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e analisar a enzima recombinante expressa na levedura. De acordo com os resultados obtidos, foi possível demonstrar que a enzima TPP de *A. gambiae* foi expressa eficazmente na levedura *P. pastoris* e secretada no sobrenadante da cultura celular, conforme análise por *Western blotting*. Pelo perfil eletroforético em gel SDS-PAGE, após procedimento de purificação, foi revelado que a enzima TPP recombinante do clone TPP 61 tem massa molecular de ~36 kDa. A caracterização da enzima apresentou pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 38 °C. As constantes cinéticas da enzima indicaram um  $K_M$  de  $3,19 \pm 0,10$  mM e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $290,0 \pm 3,78$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ . A análise de variância (ANOVA) com dois fatores revelou inibição significativa da TPP recombinante para EDTA ( $p < 0,0001$ ), NaF ( $p < 0,0001$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0,001$ ) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $p < 0,0001$ ) na concentração de 25 mM, enquanto que na concentração de 5 mM os compostos  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0,001$ ) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $p < 0,05$ ) foram significativos na inibição da enzima.

**Palavras-chave:** trealose, trealose-6-fosfato fosfatase, expressão, caracterização enzimática, parâmetros cinéticos; inibição.

## ABSTRACT

Human malaria being a tropical and parasitic disease of medical, social and economic relevance represents one of the most important public health problems in the world. Given of resistance of the insect vector to insecticides, research of new tools for vector control has been proposed. The most fascinating alternative is based on the use of enzyme inhibitors that play an important and fundamental role in the metabolism and physiology of the insect. One of this enzyme is trehalose-6-phosphate phosphatase that dephosphorylates trehalose-6-phosphate substrate, forming trehalose disaccharide and inorganic phosphate. Trehalose is a dimer of glucose found in plants, insects and microorganisms. In that organisms trehalose is important to different roles, of which is to serve as a site of glucose storage for energy and/or synthesis of cellular components, another role is to protect the cells against environmental stresses such as desiccation and freezing, and to stabilize proteins against denaturation. Therefore, this study aimed to clone and express trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) gene from *Anopheles gambiae* mosquito in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and to analyze recombinant enzyme expressed in this yeast. According to results, was demonstrated that TPP enzyme from *A. gambiae* has been efficiently expressed in *P. pastoris* and secreted into the cell culture supernatant as analyzed by Western blotting. By the electrophoretic profile in SDS-PAGE gel, after the purification procedure, has been revealed that recombinant TPP enzyme of TPP 61 clone has a molecular weight of ~ 36 kDa. The characterization of enzyme presented an optimum pH of 8.0 and optimum temperature of 38 °C. The kinetic constants of enzyme indicated a  $K_M$  of  $3.19 \pm 0.10$  mM and  $V_{max}$  of  $290.0 \pm 3.78 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ . The two-way ANOVA test revealed significant inhibition of recombinant TPP for EDTA ( $p < 0.0001$ ), NaF ( $p < 0.0001$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0.001$ ) and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $p < 0.0001$ ) at 25 mM concentration, while  $\text{CaCl}_2$  ( $p < 0.001$ ) and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $p < 0.05$ ) compounds were significant for inhibition enzyme at 5 mM concentration.

**Keywords:** trehalose, trehalose-6-phosphate phosphatase, expression, enzymatic characterization, kinetic parameters, inhibition.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação tridimensional da estrutura da TPP (domínio hidrolase, em azul, e domínio do capuz, em vermelho). O íon  $Mg^{2+}$  (MG) seus resíduos coordenantes (amarelo) e o glicerol (verde) são mostrados no modelo bola-bastão. N, porção amino-terminal; C, porção carbóxi-terminal..... 29
- Figura 2:** Via metabólica para a síntese de trealose e sua conexão com a glicólise e gliconeogênese, evidenciando as enzimas trealose-6-P sintase e trealose-6-P fosfatase..... 30
- Figura 3:** Via de biossíntese da trealose, demonstrando o papel da enzima trealose-fosfatase na síntese do dissacarídeo..... 31
- Figura 4:** Modelagem por cristalografia do substrato T6P na interface dos domínios central e do capuz. A cavidade é formada primariamente pela alça de especificidade ao substrato (em vermelho) e outra alça de especificidade (em azul). A bola em azul refere-se ao íon  $Mg^{2+}$  ..... 32
- Figura 5:** Sítio ativo da TPP, evidenciando o sítio de ligação do íon  $Mg^{2+}$  ..... 32
- Figura 6:** Mecanismo de reação no sítio catalítico das fosfatases pertencentes à superfamília HAD. A carboxila de um resíduo de aspartato no sítio catalítico da enzima (em vermelho) atua como nucleófilo na reação de desfosforilação do substrato (em azul)..... 34
- Figura 7:** Esquema geral do ciclo catalítico de PSP. (A) Conformação aberta da enzima. (B) O substrato liga-se ao sítio ativo apresentando o grupo fosfato ao Asp20. (C) Estado de transição com ataque nucleofílico do Asp20. (D) Intermediário covalente fosfoaspartil-enzima; estado de transição com ataque nucleofílico de uma molécula de água, causando a desfosforilação do Asp20. (E) Fosfato ligado não covalentemente no sítio ativo. (F) Enz-H indica o ácido geral Asp22, o qual após a protonação do grupo de saída serve como base catalítica Enz-B..... 35
- Figura 8:** Estrutura da  $\alpha,\alpha$ -trealose com modelagem molecular comparada com seus isômeros  $\alpha,\beta$ - e  $\beta,\beta$ -trealose..... 37
- Figura 9:** Via de biossíntese da trealose e a interconexão com os compostos precursores de trealose. Enzimas/vias metabólicas: (a) cinases e outras enzimas; (b) glicogênio fosforilase; (c) fosfoglicomutase; (d) glicose-1-fosfato uridil transferase; (e) trealose-6-fosfato sintase; (f) trealose-6-fosfato fosfatase; (g) fosfoglicose isomerase; (h) fosfofrutocinase-1; (i) frutose-1,6-bifosfatase; (j) glicólise; (k) gliconeogênese; +/- ativador/inibidor alostérico..... 38
- Figura 10:** Interconversões de glicogênio, glicose e trealose. Glicogênio é a forma de armazenamento de carboidrato e é convertido a glicose e trealose quando a energia é requerida..... 40
- Figura 11:** Esquema mostrando o possível modo de ação dos hormônios hipertrealossêmicos sobre a glicogenólise no corpo gorduroso da barata (*P. americana*)..... 42

- Figura 12:** Ativação da TAG lipase pelo AKH. A TAG lipase hidrolisa os triglicerídeos em diacilgliceróis, que são transportados até os tecidos-alvo por meio das lipoforinas..... 44
- Figura 13:** Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*: 1- Álcool oxidase; 2- Catalase; 3- Formaldeído desidrogenase; 4- Formato desidrogenase; 5- Diidroxiacetona sintase; 6- Diidroxiacetona cinase; 7- Frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8- Frutose 1,6-bisfosfatase..... 47
- Figura 14:** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região HIS4 do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*. O gene *HIS4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região HIS4 não mutada do vetor..... 49
- Figura 15:** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3'AOX1 do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*..... 49
- Figura 16:** Integração por substituição gênica do vetor com o genoma de *Pichia pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as duas regiões 5'AOX1 (promotor) e 3'AOX1 com as respectivas regiões homólogas no genoma de *P. pastoris*. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut<sup>s</sup>..... 50
- Figura 17:** Fluxograma das atividades desenvolvidas durante a tese..... 56
- Figura 18:** Mapa físico do vetor pBlueScript K com o gene de trealose-6-fosfato fosfatase inserido entre os promotores da RNA polimerase T3 e T7. O mapa físico foi construído com auxílio do programa SnapGene<sup>®</sup> Viewer versão 2.4.2 (2014)..... 58
- Figura 19:** Mapa físico do vetor de expressão/ secreção pPIC9 e suas principais regiões. PS – peptídeo sinal fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*..... 59
- Figura 20:** Múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9. O quadrado em vermelho evidencia os sítios de *EcoRI* e *NotI* que foram usados para subclonagem do inserto *TPP* ao vetor. A sequência em amarelo, indica o sítio de *EcoRI*; o sítio de *NotI* é mostrado em azul claro; a cauda de histidina é mostrada em rosa. TAA – códon de término da tradução. ACGCGT – sítio de *MluI*..... 61
- Figura 21:** Sequência nucleotídica e de aminoácidos da enzima *TPP* de *A. gambiae*. Em (A) é mostrada a sequência nucleotídica do gene *TPP* que está situado a montante da sequência do fator  $\alpha$ , bem como os sítios de enzimas de restrição e os códons da cauda de histidina. Em (B) é mostrada a tradução em fase, gerando um polipeptídio de 269 resíduos de aminoácidos incluindo os seis resíduos da cauda de histidina na região C-terminal. Também é mostrada a existência de dois sítios sinais para N-glicosilação (em laranja) e um sítio sinal para O-glicosilação (em azul-claro) na sequência polipeptídica da *TPP*..... 74
- Figura 22:** Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose do resultado da dupla digestão do plasmídeo pBSK-trealose com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. 1- Marcador GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas); 2- pBSK-trealose digerido com *EcoRI/NotI*; 3- pPIC9 digerido com *EcoRI*; 4- pPIC9 digerido com *NotI*..... 75
- Figura 23:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % do resultado da digestão dupla

- com as enzimas *EcoRI* e *NotI* após purificação do gene *TPP*. 1- gene da trealose fosfatase; 2- pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI*; 3- pPIC9 não digerido; 4- Marcador GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas)..... 76
- Figura 24:** Mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-TPP mostrando a inserção do gene *TPP* (indicado em azul) no vetor pPIC9, sendo flanqueado pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e situado após a região codificadora do peptídeo sinal de secreção fator  $\alpha$ . O mapa físico foi construído com auxílio do programa SnapGene® Viewer versão 2.4.2 (2014)..... 77
- Figura 25:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % dos plasmídeos recombinantes extraídos dos clones de *E. coli*, transformados geneticamente. (1) pPIC9 sem inserto; (2) clone 1 da trealose fosfatase; (3) clone 2 da trealose fosfatase; (4) clone 3 da trealose fosfatase..... 78
- Figura 26:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando o produto da digestão dupla do plasmídeo recombinante pPIC-TPP com *EcoRI* e *NotI*. (1) Marcador GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas); (2) gene da trealose fosfatase; (3) pPIC9 sem inserto digerido com *EcoRI* e *NotI*; (4) pPIC9 não digerido..... 78
- Figura 27:** *Western blotting* dos clones induzidos por 72 h em meio BMMY após o teste de *colony blot* em placa. O marcador de proteína utilizado foi *Color Plus Prestained Protein Ladder Broad Range* 10-230 kDa (Biolabs). Massas moleculares em kDa são indicadas no lado direito da figura..... 80
- Figura 28:** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 15 % de diferentes quantidades de clones TPP 59 e TPP 61. **A-** TPP 59 dil. 1:25; **B-** TPP 59 dil. 1:10; **C-** TPP 59 concentrado; **D-** Marcador *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); **E-** TPP 61 dil. 1:25; **F-** TPP 61 dil. 1:10; **G-** TPP 61 concentrado. Os números indicam os tamanhos aproximados do marcador mostrado no lado direito da figura..... 82
- Figura 29:** Perfil cromatográfico de afinidade em  $Ni^{2+}$  (HisTrap HP) para purificação de trealose fosfatase. A seta maior indica o pico da proteína ao ser eluída com aproximadamente 300 mM de imidazol. O número 1 indica o pico formado por proteínas contaminantes. No eixo y, absorbância em UV da proteína eluída no tampão B. No eixo x, volume de eluição em mL. Gradiente da concentração do Imidazol é mostrado pela linha ascendente verde. Em vermelho, as frações coletadas..... 85
- Figura 30:** Perfil eletroforético da análise em gel SDS-PAGE 15 % da enzima TPP purificada por cromatografia de afinidade do clone TPP 61. **1-** Fração 7; **2-** Fração 6; **3-** Fração 5; **4-** TPP 61 não purificada; **5-** Eluato do tampão de lavagem; **6-** Fração 10; **7-** Fração 9; **8-** Fração 8; **9-** Marcador *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); kDa- massas moleculares aproximadas do marcador variando de 10 a 260 kDa..... 86
- Figura 31:** Efeito do pH sobre a atividade da TPP recombinante da fração 10 purificada..... 89
- Figura 32:** Efeito da temperatura na atividade de fosfatase da TPP purificada..... 91
- Figura 33:** Determinação da temperatura ótima da enzima TPP recombinante a partir de uma faixa de temperatura restrita entre 30 °C – 40 °C..... 92

<b>Figura 34:</b> Curva de Michaelis-Menten onde é expressa a velocidade inicial da reação em função da concentração do substrato.....	95
<b>Figura 35:</b> Gráfico Lineweaver-Burk obtido pela cinética enzimática da TPP eluída na fração 10.....	96
<b>Figura 36:</b> Resultado do teste de inibidores químicos para TPP recombinante.....	98

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Montagem do sistema de diluição de TPP após concentração em Amicon.....	67
<b>Tabela 2:</b> Detalhamento da análise de variância com dois fatores entre a amostra controle e os inibidores químicos.....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Å - Angström

AKH I – hormônio adipocinético I

AKH II – hormônio adipocinético II

ANOVA – *Analysis of variance*

AOX 1 – álcool oxidase 1

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BMGY-U – *Buffered Glycerol Complex Medium*

BMMY-U – *Buffered Methanol Complex Medium*

BSA – albumina de soro bovino

°C – grau Celsius

cDNA – DNA complementar

dil. – diluição

dH<sub>2</sub>O – água deionizada

DNA – ácido desóxirribonucleico

EC – *Enzyme Commission*

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

et al – e outros autores

GRAS – *Generally Recognized As Safe*

h – hora

HAD – dehalogenase haloácida

HIS4 – histidinol desidrogenase

HrTH – hormônio hipertrealossêmico

ITN – *insecticide-treated mosquito net*

IRS – *indoor residual spraying*

Kb – quilobase

kDa – quilodalton

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

$K_M$  – constante de Michaelis-Menten

L – litro

LB – Luria-Bertani



LLIN – *long-lasting insecticidal net*

M – molar

mA – miliampere

MD – *minimal dextrose medium*

MES – ácido morfolinoetanossulfônico

mg – miligrama

mg/mL – miligrama por mililitro

min - minuto

mL – mililitro

mL/min – mililitro por minuto

mm - milímetro

mM - milimolar

Mut<sup>+</sup> - *methanol utilization plus*

Mut<sup>s</sup> – *methanol utilization slow*

NaF – fluoreto de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ng/μL – nanograma por microlitro

nm – nanômetro

O.D. – densidade óptica

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – pares de base

PGK – fosfoglicerato cinase-1

pI – ponto isoelétrico

Pi – fosfato inorgânico

PSP – fosfoserina fosfatase

p/v – peso por volume

rpm – rotação por minuto

sp. – espécie

spp. – espécies

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio de eletroforese em gel de poliacrilamida

SCP – *single cell protein*

T6P – trealose-6-fosfato

TPP – trealose-fosfato fosfatase

TPS – trealose-fosfato sintase

U – unidade

UV – ultra violeta

$V_0$  – velocidade inicial

VF – volume final

$V_{m\acute{a}x}$  – velocidade máxima

v/v – volume por volume

W – Watts

X – vezes

$\mu\text{g/mL}$  – micrograma por mililitro

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrometro

$\mu\text{M}$  - micromolar

[S] – concentração de substrato

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	iv
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	v
<b>EPÍGRAFE.....</b>	vii
<b>RESUMO.....</b>	viii
<b>ABSTRACT.....</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	21
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	24
2.1 Histórico da malária no Brasil.....	24
2.2 Mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> como espécie vetora.....	26
2.3 A enzima Trealose-6-fosfato fosfatase.....	28
2.3.1 Mecanismo catalítico das fosfatases da superfamília HAD.....	34
2.4 O dissacarídeo trealose.....	36
2.5 Metabolismo de carboidratos nos insetos.....	40
2.6 Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i> .....	44
2.6.1 Metabolismo do metanol (CH <sub>3</sub> OH).....	46
2.6.2 Transformação e Integração.....	48
2.6.3 Produção de proteínas heterólogas em <i>P. pastoris</i> .....	51
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	53
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	55
4.1 Objetivo Geral.....	55
4.2 Objetivos Específicos.....	55
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	56
5.1 Estratégia Utilizada.....	56
5.2 Linhagens hospedeiras.....	57
5.3 Vetores Utilizados.....	57
5.4 Síntese química do gene codificador da trealose-6-fosfato fosfatase ( <i>TPP</i> ) de <i>A. gambiae</i> .....	59
5.5 Construção do vetor recombinante pPIC-TPP.....	60
5.6 Transformação de células <i>Escherichia coli</i> DH10B com o vetor recombinante pPIC-TPP.....	62
5.7 Extração de DNA plasmidial.....	62

5.8	Análise de restrição para confirmação do vetor recombinante pPIC-TPP.....	62
5.9	Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 com o cassete de expressão do vetor recombinante pPIC-TPP.....	63
5.10	Indução em placa dos clones pPIC-TPP.....	63
5.11	Seleção por <i>colony blot</i> dos clones pPIC-TPP.....	64
5.12	Indução dos clones pPIC-TPP em frascos agitados.....	65
5.13	Análise por <i>Western blotting</i> do sobrenadante da cultura para confirmação da expressão da proteína heteróloga.....	66
5.14	Concentração e análise eletroforética da enzima produzida pelos clones recombinantes TPP 59 e TPP 61.....	66
5.15	Purificação da trealose fosfatase por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap™ HP.....	67
5.16	Análise da purificação.....	68
5.17	Ensaio para quantificação de proteína total.....	69
5.18	Caracterização enzimática da trealose-6-fosfato fosfatase recombinante.....	69
5.18.1	Determinação do pH ótimo.....	69
5.18.2	Determinação da temperatura ótima.....	70
5.18.3	Cinética enzimática.....	70
5.18.4	Teste com inibidores químicos.....	71
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
6.1	<i>Design</i> do gene sintético <i>TPP</i> .....	72
6.2	Construção do plasmídeo recombinante pPIC-TPP.....	75
6.3	Análise por <i>colony blot</i> e <i>Western blotting</i> da proteína recombinante no sobrenadante da cultura.....	79
6.4	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes concentrados dos clones recombinantes TPP 59 e TPP 61.....	81
6.5	Purificação da trealose fosfatase recombinante a partir do sobrenadante do clone TPP 61.....	84
6.6	Caracterização bioquímica da enzima TPP recombinante.....	88
6.6.1	Atividade enzimática em diferentes pHs.....	88
6.6.2	Atividade enzimática em diferentes temperaturas.....	90
6.6.3	Constantes Cinéticas.....	94
6.6.4	Teste de inibição para TPP recombinante.....	98
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>
<b>10.</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>121</b>
10.A:	Meios de cultivo.....	122

10.A.1: Meios de cultivo bacteriano.....	122
10.A.2: Meios de cultivo de leveduras <i>P. pastoris</i> .....	122
10.A.3: Soluções estoques para preparo de meio de cultivo para <i>P. pastoris</i> .....	124

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, potencialmente grave, causada por protozoários unicelulares do gênero *Plasmodium* spp. transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados através da picada das fêmeas de *Anopheles* spp. (FORATTINI, 2002; WHO, 2012). Atualmente, seis espécies de *Plasmodium* são parasitos do homem: *Plasmodium falciparum* Welch, *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, *Plasmodium ovale* Stephens (GARNHAM, 1966), *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan (SABBATANI et al., 2010; YAKOB et al., 2010) e *Plasmodium cynomolgi* Mayer (TA et al., 2014).

Todos os transmissores da malária humana são insetos do gênero *Anopheles*, dos quais apenas reduzido número têm importância para a epidemiologia da malária. Os adultos (fêmeas) são hematófagos e as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (GUIMARÃES, 2007).

O principal vetor da malária humana no Brasil é o *Anopheles darlingi* (RACHOU, 1958; DEANE, 1986; TADEI et al., 1998; TADEI e DUTARY-THATCHER, 2000). É um anofelino que tem alta capacidade de adaptação ao ambiente amazônico, hábito de realizar a endofagia e exofagia, elevada antropofilia e se beneficia das alterações que o homem produz no ambiente, tais como aquelas que provocam alterações nos padrões do regime de chuvas e de temperaturas. Como consequência, as temporadas de mais calor e muita chuva são propícias aos mosquitos *Anopheles* para completar seu ciclo de vida, o que é notado pelo surgimento de criadouros naturais (TADEI et al., 1988; SHUMAN, 2010).

A resistência do mosquito a pelo menos um dos inseticidas usados para o controle do paludismo foi identificada em 64 países. Em Maio de 2012, a OMS e o Programa “Fazer Recuar o Paludismo” publicaram o Plano Mundial de Gestão das Resistências dos Vetores aos Inseticidas no Paludismo, uma estratégia em cinco pontos para a gestão do risco da resistência aos inseticidas, sendo: (i) necessidade de controle do vetor; (ii) implementação e distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticida (ITN) e mosquiteiros com inseticidas de longa duração (LLIN); (iii)

política de adoção e implementação da pulverização intradomiciliar (IRS); (iv) estratégias no manejo dos criadouros naturais de mosquitos; e (v) plano global para o manejo da resistência aos inseticidas dos vetores de malária (WHO, 2012).

Um dos pontos de grande relevância é o conhecimento acerca do metabolismo e fisiologia do mosquito vetor. Tendo, como exemplo, o metabolismo energético da grande maioria dos mosquitos adultos, machos e fêmeas, que depende inicialmente da ingestão de carboidratos, provenientes de seivas, néctar de flores e frutos. Os açúcares são ingeridos pelos mosquitos adultos através da probóscide, sugando-os sem retrair o lábio (FOSTER, 1995; DANTAS-OLIVEIRA, 2011). A ingestão de açúcar possibilita o desempenho de algumas funções primordiais a sua existência como o voo, a dispersão e as múltiplas atividades biológicas (CLEMENTS, 1992).

O mais importante açúcar da hemolinfa é a trealose, um dissacarídeo não-redutor, sintetizado pela ação combinada de duas enzimas, trealose-6-fosfato sintase e trealose-6-fosfato fosfatase, que catalisam a síntese de trealose em muitos organismos (CANDY e KILBY, 1961; WYATT, 1967; THOMPSON, 2003; KARTHIK, 2011). Além disso, este composto é formado no corpo gorduroso pela combinação de dois intermediários da glicólise: glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato. Ela serve como uma fonte energética circulante, tal como a glicose o faz no sangue dos vertebrados (KLOWDEN, 2013).

A trealose foi isolada em 1832 de cravagem do centeio. O açúcar foi primeiramente conhecido como micose. Subsequentemente descrito e renomeado como trealose por Berthelot (1858) a partir de gorgulhos do gênero *Larinus*. O nome refere-se às células da pupa de besouro ou casulos – “treala” – formadas em volta de sementes de plantas hospedeiras coletadas por pessoas em toda a Ásia Menor (PIERCE, 1915; RICHARDS et al., 2002). A trealose foi descrita em diversas fontes, incluindo bactérias, fungos, líquens, algas, poucas plantas vasculares e vários animais invertebrados (THOMPSON, 2003).

O papel deste dissacarídeo além de atuar como componente de armazenamento, estrutural e de transporte, serve para a proteção de membranas e proteínas contra efeitos adversos de estresse, tais como calor, frio, dessecação, anóxia e, em alguns casos, parece ser importante na eclosão de ovos.

Uma estratégia para o controle do vetor da malária seria a inibição ou silenciamento das enzimas responsáveis pela síntese de trealose. Uma elucidação

para a implementação desta estratégia foi a identificação de inibidores enzimáticos, pela técnica de *high throughput screening*, da enzima trealose sintase (TPS) da mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, e do ectoparasita de gatos, *Ctenocephalides felis*. Os compostos que obtiveram resultados positivos nos ensaios de concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) pertencem à classe dos tiopiranos. Estes compostos podem ser úteis para o desenvolvimento de inseticidas com um novo modo de ação, tornando a enzima TPS um potencial alvo molecular inseticida (KERN et al., 2012).

Portanto, a ausência destas enzimas, em particular a trealose fosfatase, objeto de estudo deste trabalho, em humanos e seu papel crucial no metabolismo da trealose faz da enzima em discussão um alvo atrativo na formulação futura de um inseticida para o controle de mosquitos vetores.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico da malária no Brasil**

No Brasil, registros da ocorrência da doença podem ser encontrados em literaturas que datam dos séculos XVII e XVIII. No final do século XIX (1898), Adolfo Lutz, baseado em observações empíricas, registrou a participação do vetor *Anopheles cruzi* na cadeia de transmissão da malária, durante uma epidemia ocorrida entre os trabalhadores da estrada São Paulo - Santos, naquela época em construção, passando a recomendar a instalação dos alojamentos dos trabalhadores longe da floresta (SILVEIRA e REZENDE, 2001).

No final do século XIX e início do século XX, foi registrada importante epidemia de malária no país, durante a construção da Estrada de Ferro Madeira Mamoré, no período de 1896 a 1912, no Estado de Rondônia, conseqüente a um grande fluxo migratório para a região, constituído por trabalhadores brasileiros e estrangeiros. A presença desses trabalhadores em plena Floresta Amazônica foi seguida de grande número de casos e óbitos por malária, cuja real magnitude nunca foi possível precisar, dada a fragilidade dos registros disponíveis, existindo estimativas quanto a ocorrência de mais de 10.000 óbitos entre trabalhadores (MATIAS e LIMA, 2005).

Os estudos sobre malária passaram a ter maior sistematização e melhores registros a partir de 1922, quando a Fundação Rockefeller passou a desenvolver trabalhos na Baixada Fluminense no Rio de Janeiro, atividades que foram, aos poucos, ampliando-se para outras regiões do país (FRANCO-AGUDELO, 1981; FARIA, 1995).

Até meados da década de 40, a malária difundia-se por todo o país, estimando-se, na época, a existência de seis milhões de casos da doença, equivalendo a cerca de 15% da população (DEANE et al., 1985; BRASIL, 1995; 1995a). A área de transmissão atingia total ou parcialmente todos os estados,

excluindo-se apenas o Rio Grande do Sul (DEANE et al., 1985; SILVEIRA e REZENDE, 2001).

Em 1965 foi criada a Campanha de Erradicação da Malária - CEM, cujos trabalhos, baseados nos pressupostos da erradicação (1. a transmissão é intradomiciliar; 2. o homem é o único reservatório animal e, por conseguinte, o tratamento adequado eliminaria as fontes de infecção; 3. disponibilidade de um inseticida eficaz), conseguiram eliminar ou reduzir drasticamente a malária de extensas áreas do território brasileiro (regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul). Em 1970 foi registrado o menor número de casos de malária do país (52.469 casos) (BARATA, 1995; SILVEIRA e REZENDE, 2001; LOIOLA et al., 2002).

A estratégia da erradicação, entretanto, não deu bons resultados na Amazônia, em decorrência das características próprias da região: grande dispersão populacional; presença, hábitos e comportamento de grupos humanos especialmente expostos ao contato com o vetor (garimpeiros, madeireiros, agricultores); habitações precárias, algumas com ausência de superfícies borrifáveis (paredes ausentes ou incompletas); significativa transmissão peri e extra-domiciliar (pela mudança de comportamento do vetor *A. darlingi*, anteriormente com maior atuação no intra-domicílio); ocorrência de cepas de *P. falciparum* resistentes aos antimaláricos; deficiente infra-estrutura social (saneamento, educação, organização social) e de serviços de saúde na grande maioria dos municípios (BRASIL, 1995; DUARTE et al., 2002).

A ocorrência de epidemia de malária em 1999, que atingiu praticamente todos os estados da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Acre, Roraima, Amapá, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso), com registro de 637 mil casos (99,5% ocorridos nessa região), levou o governo brasileiro a propor a redução da incidência da malária em 50% até dezembro de 2001, em relação a 1999, e a redução da mortalidade em 50% até dezembro de 2002, em relação a 1997. Essas metas faziam parte de uma ação de impacto emergencial, denominada Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal – PIACM (BALDEZ, 2005).

Nas Américas, aproximadamente 2/3 das infecções por malária ocorrem na Bacia Amazônica. O número elevado de casos está associado aos seguintes fatores: (1) a capacidade das espécies de *Anopheles* em detectar os hospedeiros vertebrados; (2) densidade populacional das espécies vetoras; (3) o ciclo de

reprodução na natureza; (4) as inter-relações dessas espécies com o homem; (5) a presença de pacientes infectados com malária e os assintomáticos; (6) as condições ambientais favoráveis à proliferação dos mosquitos; e (7) os diferentes tipos de ecossistemas presentes na Amazônia (RODRIGUES, 2006).

## 2.2 Mosquitos do gênero *Anopheles* como espécie vetora

Os mosquitos transmissores da malária humana são da ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Anophelinae, à qual pertence o gênero *Anopheles*, compreendendo este seis subgêneros: *Anopheles* Meigen, *Cellia* Theobald, *Kerteszia* Theobald, *Lophopodhomyia* Antunes, *Nyssorhynchus* Blanchard e *Stethomyia* Theobald (FERREIRA e ALVARADO, 1991).

O subgênero *Cellia* é composto pelos principais vetores da malária humana nos continentes africano e asiático (DEANE, 1986; CONSOLI e LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). Na África, o mosquito *Anopheles gambiae* Giles, é o principal vetor da malária humana, atuando na transmissão do *P. falciparum* que causa a forma mais grave da doença. Este vetor é altamente antropófilo, sendo atraído por meio do CO<sub>2</sub>, ácido láctico e outras substâncias emitidas pela respiração dos humanos, além das características das glândulas sudoríparas e da microbiota da pele humana que emitem compostos orgânicos de odor, notadamente ácidos carboxílicos, que são fatores primários determinantes na preferência de hospedeiros dos mosquitos antropófilos (SMALLEGANGE et al., 2011).

Na Ásia e no Oriente Médio o mosquito *Anopheles stephensi* Liston, 1901 é um importante vetor de malária humana. Esta espécie com distribuição subtropical tem sido descrita como zoófila, embora tenha sido documentada atividade antropófila em algumas regiões geográficas do Iraque e Índia (HATI, 1997). Em laboratório, o *A. stephensi* é utilizado, em países da Europa e nos Estados Unidos, como um excelente modelo de malária em roedores para elucidar as interações entre o parasito e o hospedeiro (ANDERSON et al., 2004; BALDACCI e MENARD, 2004; ISHINO et al., 2004; LEVASHINA, 2004).

Na América do Sul os principais vetores pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (DEANE, 1986; CONSOLI e LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). No Brasil, mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* são os mais importantes vetores do parasita da malária, sendo representados por *Anopheles darlingi* Root,

1926, *Anopheles aquasalis* Curry, 1932, *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 dentre outros (GUIMARÃES, 2007). O *A. darlingi* é o principal vetor da malária apresentando comportamento altamente antropófilo (DEANE, 1989; ROSA-FREITAS et al., 1998; TADEI et al., 1998; SOUZA-SANTOS, 2002), embora já tenha sido capturado picando animais (DEANE, 1989; CHARLWOOD, 1996). Sua colonização em laboratório não foi possível ainda, pois essa espécie necessita de grandes espaços para realizar o voo nupcial ou cópula. Este anofelino está presente em todo o interior do país, exceto nos locais mais secos do Nordeste, no extremo Sul e em locais de maior altitude, sendo mais frequente ao longo de grandes rios e próximos às florestas (CONSOLI e LOURENÇO-OLIVEIRA, 1998; NEVES et al., 2005).

O *A. aquasalis* é encontrado em locais onde existem águas salobras. A presença desses mosquitos em áreas distantes do litoral se deve à presença de cloretos no solo ou à invasão do terreno pelas marés, como ocorre na área de Belém, Pará (CONSOLI e LOURENÇO-OLIVEIRA, 1998). Seus criadouros são coleções de águas paradas e salobras ensolaradas ou parcialmente sombreadas. É uma espécie cuja densidade populacional é diretamente influenciada pela presença das chuvas: menor com o avançar da época mais seca; maior quando se iniciam ou finalizam os períodos chuvosos (GUIMARÃES, 2007).

*A. albitarsis* Lynch-Arribalzaga, que também possui um importante papel na transmissão da malária, é um complexo de várias espécies crípticas que não podem ser distinguidas morfológicamente na fase adulta. Fazem parte deste complexo: *A. albitarsis*, *Anopheles oryzalimnetes*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles deanorum*, *Anopheles janconnae*, *Anopheles albitarsis* G e *Anopheles albitarsis* F, sendo que algumas destas já foram encontradas infectadas com *P. falciparum* ou *P. vivax* (LEHR et al., 2005; LI e WILKERSON, 2005; MOTOKI et al., 2009).

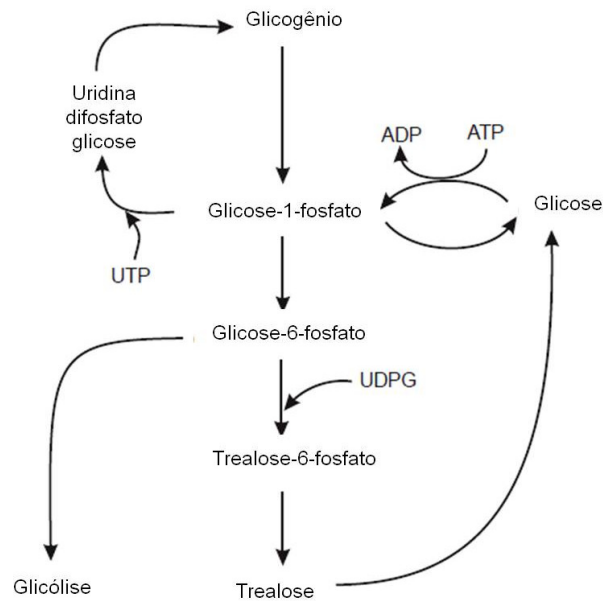
As espécies de *Nyssorhynchus* são peridomiciliares entrando nas casas para se alimentar de sangue. De imediato, retiram-se e pousam-se novamente na vegetação próxima. *Anopheles nuneztovari*, por exemplo, é zoófilo, crepuscular e peridomiciliar. Entretanto, esses hábitos podem mudar dependendo de uma série de fatores externos, especialmente aqueles relacionados com as atividades humanas. No entanto, os registros mostram que os surtos são desencadeados somente quando os casos de malária são provocados pelo *A. darlingi* (TADEI e DUTARY-THATCHER, 2000).

As mudanças no comportamento dos mosquitos frente aos inseticidas, a resistência às drogas pelos parasitos, o custo elevado de novas drogas, as limitações no desenvolvimento de vacinas e os danos causados ao meio ambiente pela aplicação de pesticidas, são fatores que levam à busca de novas alternativas no controle da malária.

O conhecimento sobre o metabolismo do inseto vetor, assim como as principais enzimas envolvidas nas diferentes rotas metabólicas, reúne dados importantes sobre a fisiologia do inseto, abrindo espaço para a pesquisa e implementação de estratégias que visam proporcionar meios de controle entomológico e gerenciamento dos mecanismos de resistência do inseto vetor frente aos inseticidas conhecidos e largamente utilizados.

### **2.3 Metabolismo de carboidratos nos insetos**

As mais importantes reservas de carboidrato nos insetos são o glicogênio e trealose, sintetizados quando a entrada de carboidrato é maior do que é imediatamente requerido. Ambos podem facilmente ser convertidos à glicose quando as reservas necessitam ser mobilizadas (figura 1). Glicogênio estocado no corpo gorduroso pode ser imediatamente convertido à trealose para ser liberada na hemolinfa (KLOWDEN, 2013).



**Figura 1:** Interconversões de glicogênio, glicose e trealose. Glicogênio é a forma de armazenamento de carboidrato e é convertido a glicose e trealose quando a energia é requerida.

Fonte: Klowden (2013) com adaptações.

A mobilização das reservas de glicogênio para formar glicose e trealose na hemolinfa é hormonalmente controlada pelo hormônio hipertrealossêmico (HrTH), liberado do corpo cardíaco. A liberação do hormônio é desencadeada pelas reduções das concentrações de açúcares na hemolinfa quando eles são consumidos durante o metabolismo ou durante a fome. A fosforilase cinase, um segundo mensageiro do sistema, ativa a glicogênio fosforilase que forma glicogênio-1-fosfato a ser liberado do glicogênio com formação final de trealose (KLOWDEN, 2013).

Como um dissacarídeo, a trealose pode ser mantida em uma alta concentração na hemolinfa antes de se difundir através da membrana para dentro das células. A alta concentração de trealose na hemolinfa facilita sua distribuição por difusão para todas as células do inseto (KLOWDEN, 2013).

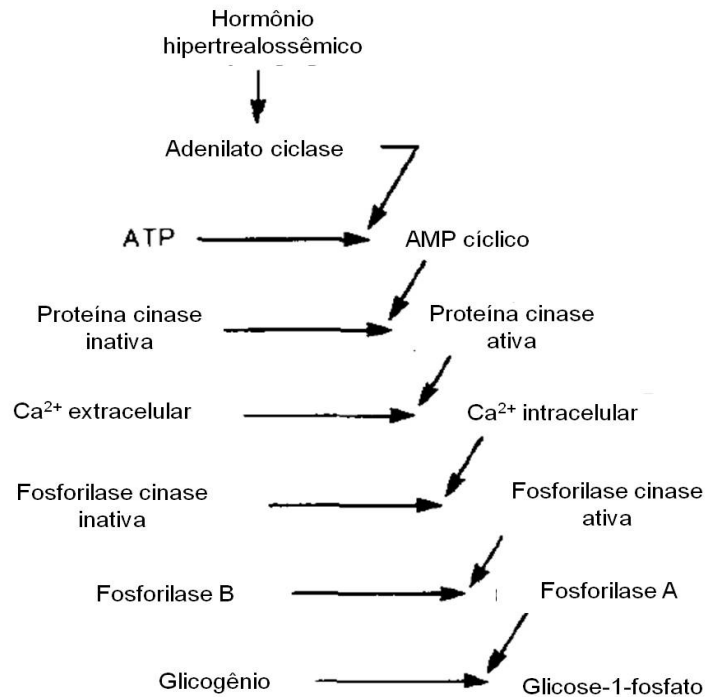
A concentração de trealose na hemolinfa, entretanto, não está homeostaticamente regulada. Preferivelmente, a trealose ocorre em níveis altamente variáveis, tipicamente entre 5 e 10 mM, dependendo de condições ambientais, estado fisiológico e nutricional. Esta concentração variável é essencial para cumprir os papéis da trealose: (1) como estoque de energia, o papel tradicional atribuído à trealose; (2) como crioprotetor, reduzindo o super-resfriamento de alguns insetos sensíveis à baixa temperatura; (3) como molécula estabilizadora de proteínas de membrana durante os estresses térmico e osmótico, uma função apenas

recentemente investigada em insetos; e (4) como componente de um mecanismo de resposta, regulando o comportamento alimentar e nutricional, onde os níveis de metabólitos da hemolinfa, incluindo a trealose, agem por meio da modulação de respostas dos receptores do paladar através do sistema nervoso central, influenciando a seleção de alimentos (THOMPSON, 2003).

Para a manutenção do voo prolongado de insetos, os carboidratos de outras fontes podem ser mobilizados. Estes carboidratos são fornecidos para o músculo do voo via hemolinfa, principalmente na forma de trealose (WYATT, 1967; BAILEY, 1975). A trealose da hemolinfa é reabastecida dos estoques de glicogênio no corpo gorduroso (BEENAKKERS et al., 1984).

A glicose é removida da hemolinfa durante o voo principalmente por sua conversão direta em trealose no corpo gorduroso (CLEGG e EVANS, 1961). Em *Phormia regina*, por exemplo, a trealose da hemolinfa é reabastecida a partir do glicogênio localizado no corpo gorduroso, assim como de açúcares do intestino, embora o corpo gorduroso pareça ser o local exclusivo para a síntese de trealose (BERNAKKERS et al., 1984).

O controle por hormônios metabólicos constitui um outro nível de regulação da mobilização de trealose. Hormônios hipertrealossêmicos que causam uma elevação dos níveis de trealose na hemolinfa, pela estimulação da conversão do glicogênio do corpo gorduroso em trealose, foram demonstrados em várias espécies de insetos (CANDY, 1981; BEENAKKERS et al., 1984), como é visto na figura 2. Conforme mostra a figura, os hormônios hipertrealossêmicos ativam uma cascata de eventos celulares onde, finalmente, será formado glicose-1-fosfato a partir da degradação do glicogênio pela glicogênio fosforilase. Com a glicose-1-fosfato formada, tem-se início uma série de reações enzimáticas que darão origem ao dissacarídeo trealose.



**Figura 2:** Esquema mostrando o possível modo de ação dos hormônios hipertrealossêmicos sobre a glicogenólise no corpo gorduroso da barata (*P. americana*).

Fonte: Adaptado de Steele (1982).

O papel fisiológico dos hormônios hipertrealossêmicos durante o voo foi demonstrado em *Calliphora erythrocephala*. Moscas varejeiras são capazes de manter o nível constante de trealose na sua hemolinfa durante um voo de 45 minutos. Se o corpo cardíaco é removido ou desnervado a concentração de trealose cai marcadamente durante o voo e as moscas perdem sua habilidade de voo (VEJBJERG e NORMANN, 1974).

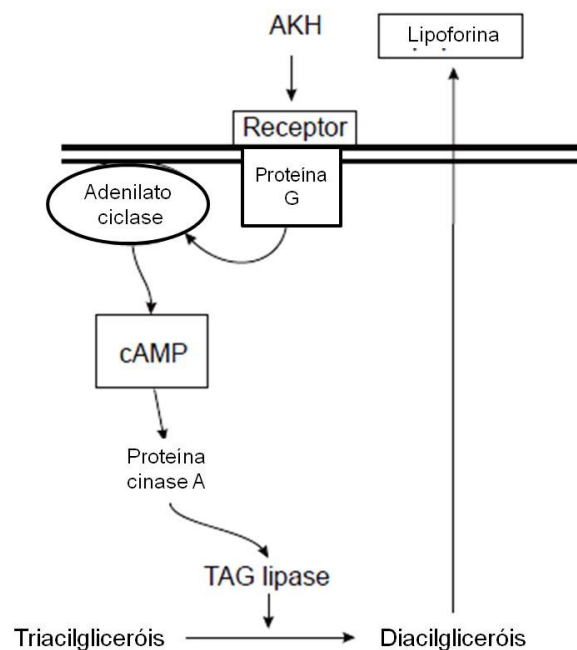
Os hormônios hipertrealossêmicos estimulam a degradação do glicogênio no corpo gorduroso por meio da ativação da glicogênio fosforilase (STEELE, 1982). Tanto a degradação do glicogênio quanto a de trealose levam à formação de glicose-6-fosfato, e o catabolismo deste até piruvato nos músculos de voo é, em essência, idêntico à glicólise dos vertebrados (BEENAKKERS et al., 1984).

Nos gafanhotos existem dois fatores hipertrealossêmicos, um no lobo de armazenamento e outro no lobo glandular do corpo cardíaco (MORDUE e GOLDSWORTHY, 1969) O corpo cardíaco também contém peptídeos conhecidos como peptídeos adipocinéticos: o principal fator, AKH I (hormônio adipocinético I), está presente no lobo glandular e o fator secundário, AKH II (hormônio adipocinético II), está localizado no lobo de armazenamento e, principalmente, no lobo glandular



(GOLDSWORTHY et al., 1972; CARLSEN et al., 1979; KLOWDEN, 2013). Tanto AKH I quanto AKH II aumentam os níveis de carboidratos na hemolinfa de gafanhotos.

Quando liberado na hemolinfa durante o voo, o AKH ativa a TAG (triacilglicerol) lipase no corpo gorduroso, a qual hidrolisa os triglicerídeos armazenados em diacilgliceróis que, então, são transportados aos tecidos-alvo pelas lipoforinas (figura 3). A liberação de AKH é inibida pela trealose presente na hemolinfa e estimulada pela octopamina (KLOWDEN, 2013).



**Figura 3:** Ativação da TAG lipase pelo AKH. A TAG lipase hidrolisa os triglicerídeos em diacilgliceróis, que são transportados até os tecidos-alvo por meio das lipoforinas.

Fonte: Klowden (2013) com adaptações.

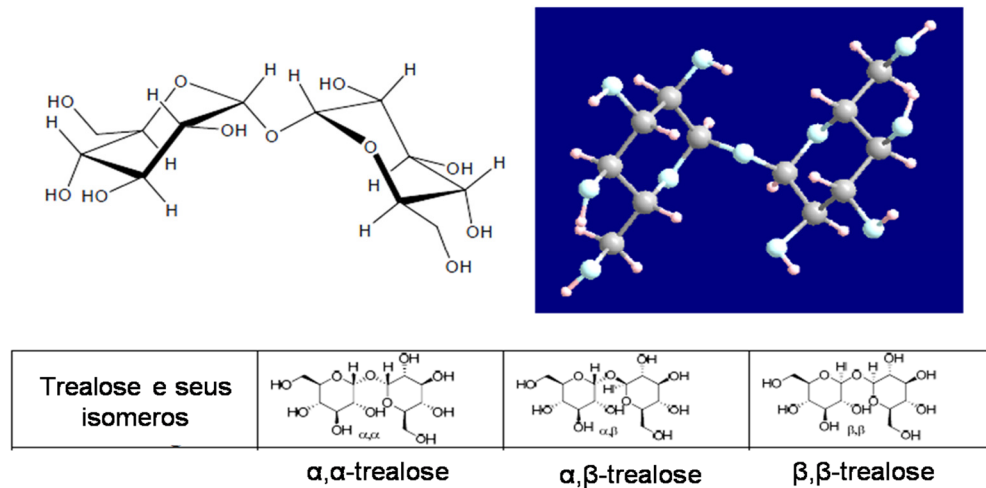
Por volta de quarenta isoformas de AKH foram identificadas em uma variedade de ordens de insetos com algumas delas contendo múltiplas formas do hormônio, de modo que cada uma pode realizar diferentes papéis. Estes hormônios consistem de oito a dez aminoácidos com ao menos dois aminoácidos aromáticos (KLOWDEN, 2013).

## 2.4 O dissacarídeo Trealose

Trealose ( $\alpha,\alpha$ -trealose) é um dissacarídeo formado por uma ligação  $\alpha$ -1, $\alpha$ -1 de duas moléculas de D-glicose (BIRCH, 1963). Ela é um açúcar não redutor que não é facilmente hidrolisada por ácido e a ponte glicosídica não é clivada pela  $\alpha$ -glicosidase. Sua fórmula molecular é  $C_{12}H_{22}O_{11}$  e peso molecular de 343,31 (RICHARDS et al., 2002). Resistência à hidrólise ácida e uma ausência de ligação direta de hidrogênio intramolecular faz da trealose quimicamente única quando comparada com outros dissacarídeos, particularmente sacarose, o dissacarídeo não-redutor de origem vegetal (THOMPSON, 2003).

A descoberta da trealose é atribuída a H. A. Wiggers enquanto estudava soluções da cravagem do centeio (HARDING, 1923; KOCH e KOCH, 1925). Ela foi isolada do açúcar de cogumelos por Mitscherlich em 1858 e foi chamada de micose. No mesmo ano, Berthelot obteve amostras de casulo semelhante a concha do Oriente Médio, o qual é secretado por muitos insetos sobre as folhas (RICHARDS et al., 2002). Berthelot extraiu um novo açúcar destas conchas e o denominou de “glicose treálica” ou trealose (HARDING, 1923). Foi sugerida que esta substância é similar ao “maná” mencionado no livro do Êxodo do Antigo Testamento como uma fonte de alimento de sabor doce ingerida pelos israelitas durante sua jornada no deserto (BERGOZ, 1971).

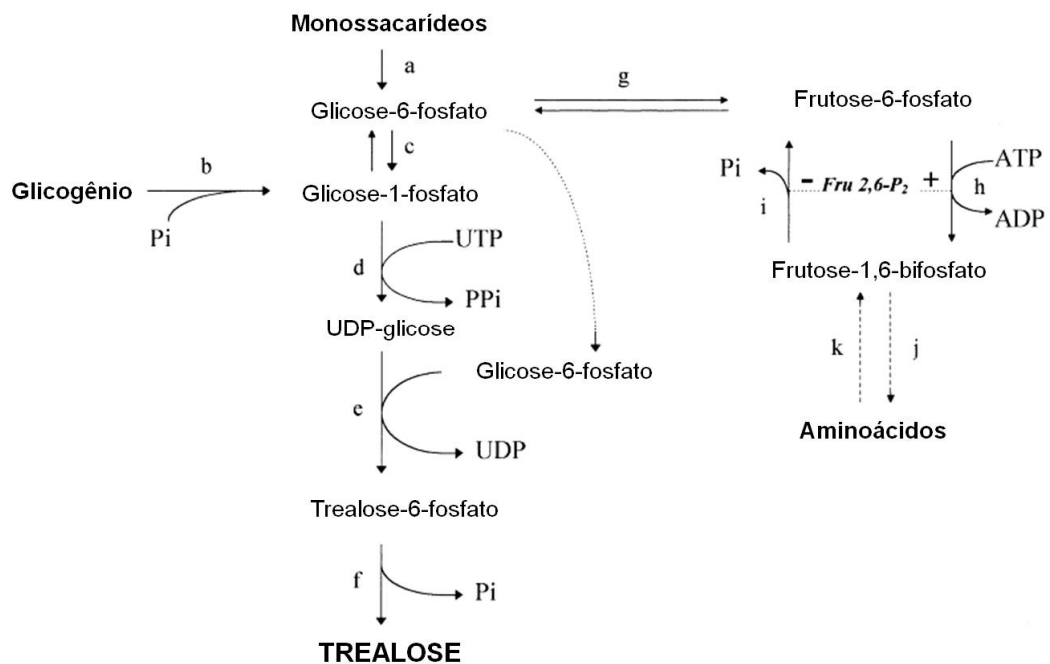
Embora os isômeros  $\alpha,\beta$ -trealose (neotrealose) e  $\beta,\beta$ -trealose (isotrealose) tenham sido sintetizados, eles são raramente encontrados na natureza (BEHM, 1997). A forma  $\alpha,\alpha$  é o isômero comumente referido como trealose ( $\alpha,\alpha$ -trealose,  $\alpha$ -D-glicopiranosil,  $\alpha$ -D-glicopiranosida, açúcar do cogumelo, micose) e é largamente distribuída em todo o reino animal e vegetal (BIRCH, 1963; ELBEIN, 1974; THOMPSON, 2003). A forma estrutural da trealose e dos seus isômeros é mostrada na figura 4 a seguir.



**Figura 4:** Estrutura da  $\alpha,\alpha$ -trealose com modelagem molecular comparada com seus isômeros  $\alpha,\beta$ - e  $\beta,\beta$ -trealose.

Fonte: Teramoto et al. (2008) com adaptações.

Sintetizada no corpo gorduroso seguida da digestão do açúcar da dieta, a trealose é um produto da condensação de dois intermediários glicolíticos, glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato (figura 5). Fontes alternativas de trealose são a degradação do glicogênio e a gliconeogênese. A síntese e degradação de trealose estão sob controle hormonal, envolvendo tanto fatores hipertrealossêmicos quanto hipotrealossêmicos (THOMPSON, 2003).



**Figura 5:** Via de biossíntese da trealose e a interconexão com os compostos precursores de trealose. Enzimas/vias metabólicas: **(a)** cinases e outras enzimas; **(b)** glicogênio fosforilase; **(c)** fosfoglicomutase; **(d)** glicose-1-fosfato uridil transferase; **(e)** trealose-6-fosfato sintase; **(f)** trealose-6-fosfato fosfatase; **(g)** fosfoglicose isomerase; **(h)** fosfofrutocinase-1; **(i)** frutose-1,6-bifosfatase; **(j)** glicólise; **(k)** gliconeogênese; +/- ativador/inibidor alostérico.

Fonte: Adaptado de Candy et al. (1997).

Acima de oitenta espécies foram listadas por Elbein (1974) por produzirem trealose, incluindo gêneros de plantas, algas, fungos, bactérias, insetos e demais invertebrados. Interessantemente, a trealose, isolada de todas as espécies de insetos examinadas, é o principal açúcar (aproximadamente 80 % - 90 %) encontrado na hemolinfa e pode constituir aproximadamente 20 % de todos os carboidratos durante estágios específicos do desenvolvimento do inseto (WYAT e KALF, 1956).

Em leveduras de cerveja, a biossíntese de trealose é catalisada por enzimas que facilitam a reação de UDP-glicose com glicose-6-fosfato, resultando em UDP e  $\alpha,\alpha$ -trealose-6-fosfato (CABIB e LELOIR, 1957). O fosfato é enzimaticamente removido levando à formação de uma molécula de trealose. Vários outros organismos produzem trealose por mecanismos similares (ELBEIN, 1974).

A degradação da trealose é realizada por uma enzima altamente específica, a trealase que hidrolisa a ligação glicosídica da trealose, liberando duas moléculas de glicose (BIRCH, 1963; HEY e ELBEIN, 1968; ELBEIN, 1974). A trealose, por sua

vez, não é encontrada em espécies superiores, como os mamíferos (RICHARDS et al., 2002).

Em organismos invertebrados, a trealose está apta para agir como uma fonte de energia durante certos estágios de desenvolvimento, tal como a germinação prematura de esporos (SUSSMAN e LINGAPPA, 1959). Em micobactérias, a trealose pode ser incorporada em glicolípídeos e, portanto, age como um componente estrutural (ELBEIN e MITCHELL, 1973). Em outros micro-organismos, derivados da trealose agem como metabólitos intermediários ou moléculas estruturais (ELBEIN, 1974). A trealose fornece a fonte de energia para o voo em uma variedade de insetos e é provável ser uma adaptação para voar (WYAT e KALF, 1957; CLEGG e EVANS, 1961).

Um dos muitos aspectos fascinantes da presença de trealose em vários organismos é a sua participação na estabilização de processos vitais em espécies que podem sobreviver tanto no frio quanto na desidratação (PAIVA e PANEK, 1996). Estudos mostram que a trealose fornece proteção ao frio em vários organismos (NEWMAN et al., 1993). Asahina e Tanno (1964) descobriram que o estágio larval de uma vespa pode sobreviver a temperaturas de -40 °C.

Embriões de camarão de água salgada que entram em dormência acumulam trealose em torno de 15 % de seu peso seco. Sabe-se que a trealose age tanto como um estabilizador durante a dormência, quanto fonte de energia para a emergência de embriões (CLEGG, 1965). As concentrações de trealose foram associadas com a sobrevivência de nematódeos durante a dissecação e é sugerido que a presença de trealose serve como um fator de proteção no choque térmico e estresse osmótico em outros organismos (WOMERSLEY e SMITH, 1981; NEWMAN et al., 1993).

O mecanismo por meio do qual a trealose pode estabilizar os sistemas vivos durante os ciclos de congelamento-descongelamento, quente-frio e/ou desidratação-reidratação estão possivelmente relacionados com sua conformação molecular (RICHARDS et al., 2002). Um estudo de modelagem molecular da trealose em solução sugeriu que ela pode proteger contra a remoção de água durante a desidratação ou congelamento pela substituição da água de hidratação normalmente associada com as estruturas biológicas (DONNAMARIA et al., 1994). Esta atividade poderia ajudar a estabilizar estas biomoléculas e inibir a desnaturação irreversível. Isto sugere que a trealose pode estabilizar bicamadas lipídicas pela ordenação das

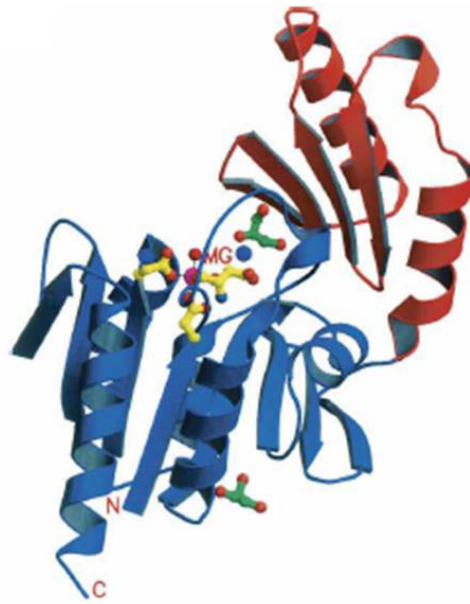
moléculas de água em torno da membrana, ou pela interação direta com biomoléculas polares quando a água é removida (KAWAI et al., 1992).

Somente carboidratos são efetivos na proteção de proteínas durante o processo de ressecamento. Desta forma, a trealose protege tanto proteínas quanto lipídeos de membrana da degradação durante os processos de ressecamento (CROWE et al., 1990). A trealose aparenta ter grande flexibilidade nas pontes glicosídicas entre as moléculas de glicose, quando comparada com outros dissacarídeos. Esta propriedade permite à trealose conformar-se com os grupos polares irregulares de macromoléculas (COLAÇO e ROSER, 1995). Em paralelo, a enzima trealose-6-fosfato fosfatase, presente na via da biossíntese do dissacarídeo trealose, é tida como uma enzima-chave na síntese deste dissacarídeo.

## 2.5 A enzima Trealose-6-fosfato fosfatase

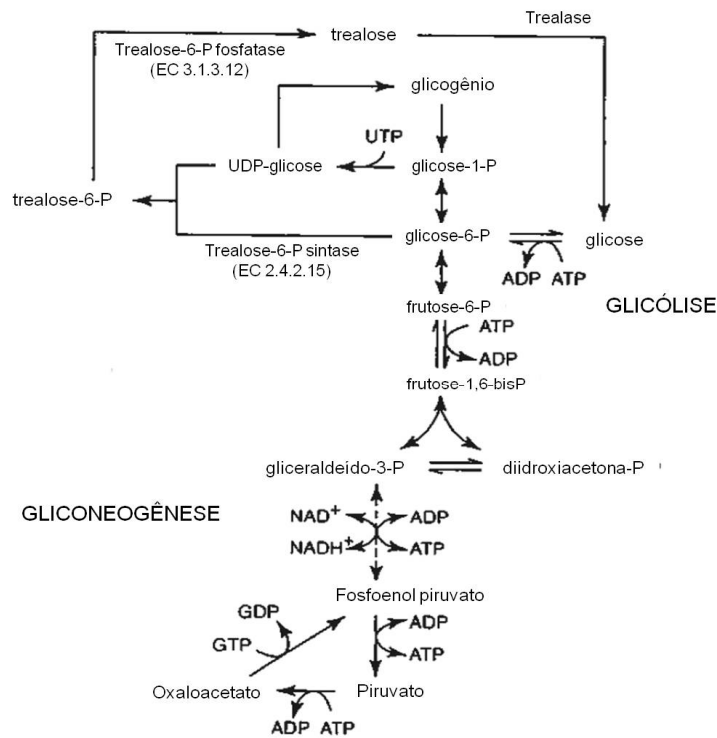
A trealose-6-fosfato fosfatase (TPP – EC 3.1.3.12) é um membro da superfamília dehalogenase haloácida (HAD) com significativa homologia de sequência com fosfoserina fosfatase, ATPases tipo-P e outros membros da família. A TPP possui um domínio central de dobra  $\alpha/\beta$ -hidrolase conhecida como dobra Rossmann, característica da família HAD, e um domínio capuz, com uma dobra terciária consistindo de quatro folhas- $\beta$  pregueadas com duas  $\alpha$ -hélices em cada lado da folha. Um sítio de ligação ao íon  $Mg^{2+}$  e uma molécula de glicerol que delimita na interface entre os dois domínios fornecem a compreensão do modo como o substrato se liga à enzima (RAO et al., 2006). De acordo com a literatura, a enzima trealose fosfatase atua nas ligações éster fosfato, liberando fosfato inorgânico como um dos produtos da reação (SELENGUT e LEVINE, 2000; WANG et al., 2001; RAO et al., 2006).

A figura 6 mostra a estrutura tridimensional da TPP de *Thermoplasma acidophilum*, onde a sua estrutura foi elucidada por estudos de cristalografia, com análise da sequência de aminoácidos e ensaios bioquímicos.



**Figura 6:** Representação tridimensional da estrutura da TPP de *T. acidophilum* (domínio hidrolase, em azul, e domínio do capuz, em vermelho). O íon  $Mg^{2+}$  (MG) seus resíduos coordenantes (amarelo) e o glicerol (verde) são mostrados no modelo bola-bastão. N, porção amino-terminal; C, porção carbóxi-terminal.  
Fonte: Rao et al. (2006).

Existem ao menos três diferentes vias que podem dar origem à trealose. A mais amplamente via relatada envolve duas enzimas chamadas trealose-6-fosfato sintase (TPS) e trealose fosfatase. A TPP remove o fosfato para produzir trealose livre (CABIB e LELOIR, 1958; MATULA et al., 1971; EASTMOND et al., 2002). Sua rota metabólica e seu mecanismo de ação são mostrados na figura 7.

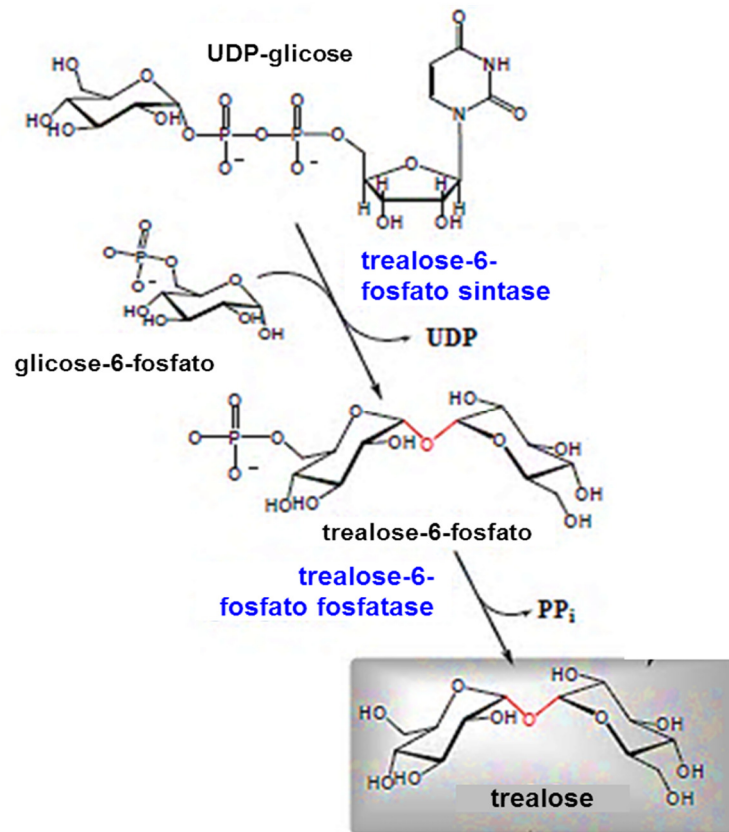


**Figura 7:** Via metabólica para a síntese de trealose e sua conexão com a glicólise e gliconeogênese, evidenciando as enzimas trealose-6-P sintase e trealose-6-P fosfatase.

Fonte: Adaptado de Thompson (2003).

A ligação  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -1 glicosídica da trealose é formada pela condensação, catalisada pela TPS, da glicose-6-fosfato com a porção glicose da uridina difosfoglicose (UDP-glicose) para formar trealose-6-fosfato (T6P) no corpo gorduroso dos insetos. A segunda reação, catalisada por TPP, envolve a hidrólise do éster fosfato, seguido da liberação de fosfato inorgânico e trealose livre na hemolinfa (THOMPSON, 2003; PAUL, 2007). Demonstração da ação da enzima TPP na via biossintética da trealose é mostrada na figura 8.





**Figura 8:** Via de biossíntese da trealose, demonstrando o papel da enzima trealose-fosfatase na síntese do dissacarídeo.

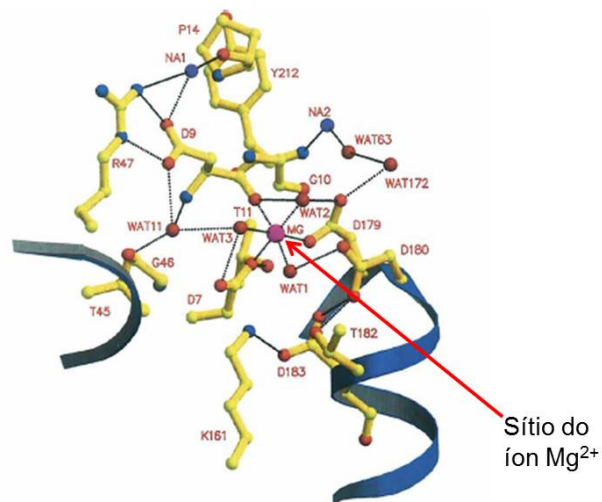
Fonte: Teramoto et al. (2008) com modificações.

O primeiro estudo de purificação e caracterização da enzima TPP, isolada da mosca varejeira (*P. regina*), foi relatado por Friedman (1966) onde demonstrou que a atividade desta enzima é determinada pela medida da produção de fosfato inorgânico. Uma unidade da atividade corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico liberado por minuto a 32 °C. A enzima é quase completamente inativa contra uma larga variedade de monossacarídeos fosfato, incluindo manose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ribose-6-fosfato, frutose 1,6-difosfato e glicose-1-fosfato. A glicose-6-fosfato, como substrato, é degradada a uma taxa de aproximadamente 8 % em relação ao seu substrato nominal. Esta especificidade ao substrato é demonstrada na figura 9 que mostra o sítio ativo da enzima ligado ao substrato onde ocorre a formação do complexo enzima-substrato (bolas em verde circundadas por alças de especificidade ao substrato identificadas com bolas vermelhas e azul). A alça de especificidade em vermelho são os resíduos coordenantes 144-155, enquanto a alça de especificidade em azul refere-se aos resíduos coordenantes 14-23 (RAO et al., 2006). A atividade de TPP necessita do metal bivalente  $\text{Mg}^{2+}$ , caso contrário torna-se inativa. A

presença do íon  $Mg^{2+}$  (bola na cor magenta) também foi demonstrada quando a enzima foi cristalizada, conforme mostra a figura 10.



**Figura 9:** Modelagem por cristalografia do substrato T6P na interface dos domínios central e do capuz. A cavidade é formada primariamente pela alça de especificidade ao substrato (em vermelho) e outra alça de especificidade (em azul). A bola em azul refere-se ao íon  $Mg^{2+}$ .  
Fonte: Rao et al. (2006).



**Figura 10:** Sítio ativo da TPP, evidenciando o sítio de ligação do íon  $Mg^{2+}$ .  
Fonte: Rao et al. (2006).

A TPP também foi purificada de extratos citosólicos de *Mycobacterium smegmatis*, fornecendo uma proteína de 27 kDa que foi específica para trealose-6-

fosfato como substrato (KLUTTS et al., 2003). Edavana e colaboradores (2004) identificaram uma proteína de 45 kDa traduzida do gene *Rv3372* de *Mycobacterium tuberculosis* como trealose fosfatase e compararam suas propriedades com a proteína purificada de *M. smegmatis*.

Entre os nematódeos, a TPP foi primeiramente identificada em *Caenorhabditis elegans* cuja redução de sua função causou defeitos letais estruturais e metabólicos no intestino (KORMISH e MCGHEE, 2005), demonstrando seu notável significado no nematódeo. Segundo Kormish e McGhee (2005) a letalidade do gene *gob-1* (tendo atividade de TPP) resulta do acúmulo do intermediário T6P no intestino.

Gancedo e Flores (2004) relatam que em *S. cerevisiae*, a baixa atividade de TPP leva ao aumento da sensibilidade da levedura à temperatura. Similarmente, em espécies de *Arabidopsis* a redução na função de TPP causa sensibilidade térmica (LEYMAN et al., 2001; EASTMOND e GRAHAM, 2003; EASTMOND et al., 2003; SCHLUEPMANN et al., 2004). Um ponto de debate recente, levantado a partir destas evidências, é que as enzimas sintéticas da trealose e/ou da via de T6P agem como “porteiros da glicólise”. Ao menos parte deste controle pode ser traçado pelo fato que T6P é um inibidor direto da hexocinase em *S. cerevisiae* (BLAZQUEZ et al., 1993; BLAZQUEZ e GANCEDO, 1994).

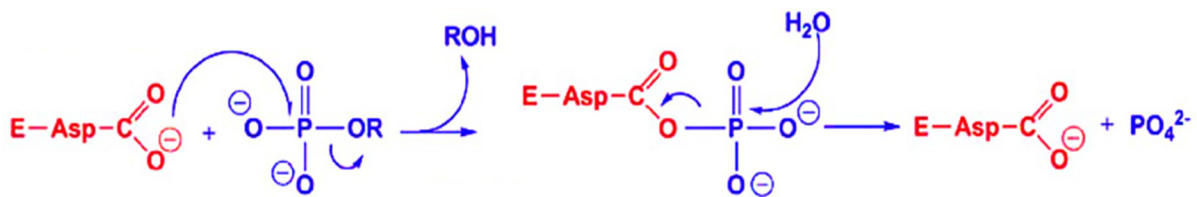
Organismos que utilizam a TPS para a síntese de trealose também contêm uma fosfatase que converte T6P em trealose livre, por isso a presença de TPP em *M. smegmatis* aparenta ser específica para o seu substrato, com atividade bastante baixa para glicose-6-fosfato ou outro açúcar fosfato. A enzima TPP em micobactérias desempenha um papel chave na biossíntese dos compostos de trealose e, portanto, pode representar um excelente alvo para a quimioterapia contra tuberculose e outras doenças micobacterianas (KLUTTS et al., 2003).

Segundo Kushwaha e colaboradores (2011) a TPP aparenta ser uma enzima vital para nematódeos filáricos e, assim, as reações envolvidas na biossíntese de trealose conota um excelente potencial de sítio-alvo para drogas. Um conhecimento compreensivo nas propriedades e funções das enzimas envolvidas na via metabólica da trealose seria necessário para a descoberta de agentes antifiláricos.

### 2.5.1 Mecanismo catalítico das fosfatases da superfamília HAD

A TPP, como membro da família das trealose fosfatases, catalisa a desfosforilação da trealose-6-fosfato em trealose e ortofosfato. Adicionalmente, esta família é membro da superfamília HAD (denominada assim devido ao seu ancestral comum, a enzima dehalogenase haloácida) (KOONIN e TATUSOV, 1994).

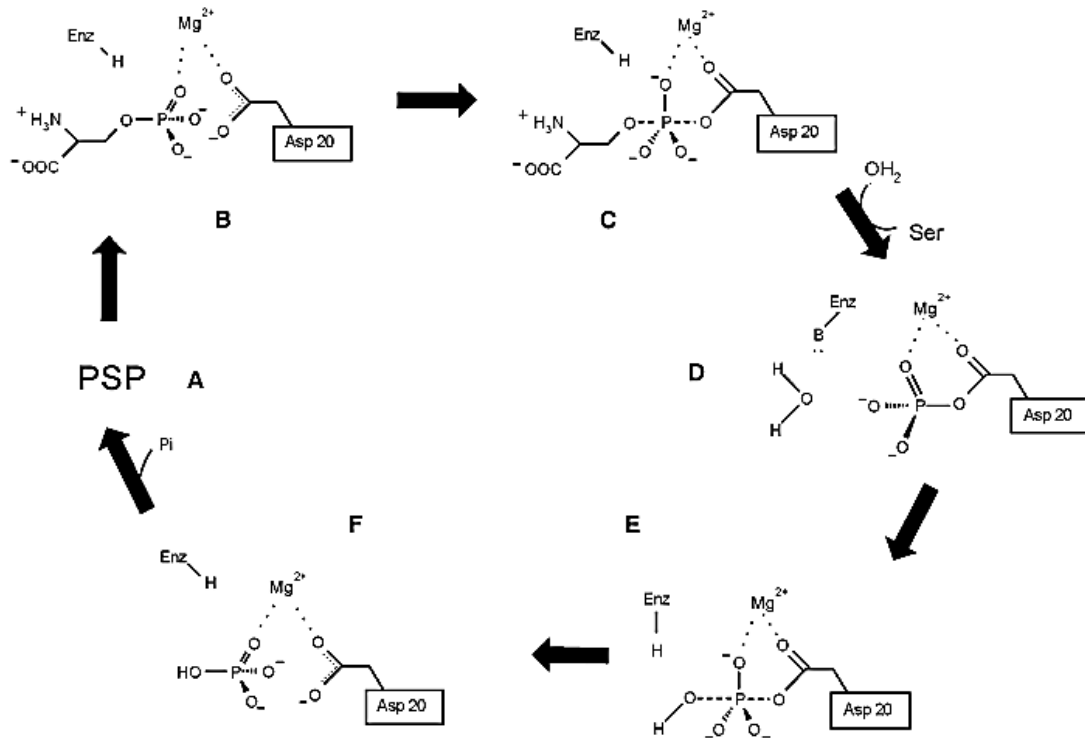
Esta superfamília inclui diversas enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforil ou carbonil de uma grande variedade de substratos, utilizando para tanto a carboxila de um resíduo de aspartato no sítio ativo como nucleófilo na reação (BURROUGHS et al. 2006) (figura 11). No caso das fosfotransferases, como a TPP, é também requerido o íon  $Mg^{2+}$  como cofator para a catálise (KOONIN e TATUSOV, 1994; ARAVIND et al., 1998).



**Figura 11:** Mecanismo de reação no sítio catalítico das fosfatases pertencentes à superfamília HAD. A carboxila de um resíduo de aspartato no sítio catalítico da enzima (em vermelho) atua como nucleófilo na reação de desfosforilação do substrato (em azul).

Fonte: Burroughs et al. (2006).

O sítio ativo da TPP sobrepõe-se muito bem com o sítio da fosfoserina fosfatase (PSP), uma outra enzima da superfamília HAD. As posições dos resíduos de aminoácidos catalíticos em TPP são muito similares aos da PSP, sugerindo que as duas enzimas empregam mecanismos catalíticos semelhantes (RAO et al., 2006). Para fins de elucidação, será descrito o mecanismo geral de reação da enzima PSP representado na figura 12.



**Figura 12:** Esquema geral do ciclo catalítico de PSP. (A) Conformação aberta da enzima. (B) O substrato liga-se ao sítio ativo apresentando o grupo fosfato ao Asp20. (C) Estado de transição com ataque nucleofílico do Asp20. (D) Intermediário covalente fosfoaspartil-enzima; estado de transição com ataque nucleofílico de uma molécula de água, causando a desfosforilação do Asp20. (E) Fosfato ligado não covalentemente no sítio ativo. (F) Enz-H indica o ácido geral Asp22, o qual após a protonação do grupo de saída serve como base catalítica Enz-B. Fonte: Peeraer et al. (2004).

Quando o substrato está posicionado corretamente, a enzima se fecha e o Asp20 realiza um ataque nucleofílico no fosfato císsil. O substrato é clivado, resultando no deslocamento do grupo de saída serina e a formação de um intermediário fosfoaspartil (Asp20). Um outro aspartato (Asp22) serve como ácido geral (Enz-H) doando um próton para a serina e, desse modo, facilitando a expulsão do grupo de saída. Uma molécula de água assume a posição no sítio do grupo de saída recém-desocupado. O ânion carboxilato do Asp22 (Enz-B), que foi formado durante a protonação do grupo de saída serina, pode agora servir como base catalítica na desfosforilação do intermediário fosfoenzima. O Asp22 retira um próton da molécula de água no sítio ativo, ativando, assim, a molécula de água para realizar um ataque nucleofílico no intermediário fosfoaspartil. A abertura da enzima e a dissociação do fosfato inorgânico completa o ciclo catalítico (PEERAER et al., 2004).

## 2.6 Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

As leveduras são fungos que têm sido utilizados pelo homem há milhares de anos e cuja manipulação causou grande impacto na produção de alimentos e fármacos e, conseqüentemente, no desenvolvimento social e econômico da humanidade.

No campo da pesquisa aplicada, as leveduras se destacaram como um forte candidato para a expressão de genes heterólogos de interesse biotecnológico. Embora a bactéria *Escherichia coli* represente um dos mais conhecidos sistemas de expressão heteróloga, muitas proteínas eucarióticas de interesse comercial e farmacêutico não puderam ser expressas eficientemente nesse micro-organismo. Entre as razões para esses insucessos podem-se citar: conformação incorreta da proteína, ausência de modificações pós-traducionais e baixos níveis de expressão (TORRES e MORAES, 2001).

*Sacharomyces cerevisiae* foi a primeira levedura utilizada com o propósito de produzir proteínas exógenas devido ao conhecimento acumulado sobre a genética e a fisiologia deste organismo, além de ser considerada micro-organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Entretanto, *S. cerevisiae* apresenta algumas limitações como hiperglicosilação, tornando a proteína muitas vezes imunogênica, ou de conformação não funcional; produção de etanol durante a fermentação que pode ser tóxico e, desta maneira, estas limitações podem torná-la uma hospedeira inadequada para a expressão de algumas proteínas heterólogas (CREGG et al., 1993).

Devido às limitações apresentadas por *S. cerevisiae*, como sistema de expressão heterólogo, a habilidade de certas leveduras como *Pichia pastoris* crescerem em meio contendo metanol como única fonte de carbono até altas densidades celulares, despertou imediato interesse para a sua utilização como fonte de alimento proteico para rações animais (SCP – *Single Cell Protein*). No começo da década de 1980, após verificar que o processo de produção destas leveduras não era comercialmente viável, a empresa Phillips Petroleum juntamente com o Salk Institute Biotechnology/ Industrial Associates Inc. (SIBIA, La Jolla, CA – USA) propuseram a utilização de *P. pastoris* como um sistema de expressão heteróloga, devido às suas características favoráveis para tal finalidade (CEREGHINO e CREGG, 2000).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* é um ascomiceto homotático, que normalmente encontra-se haplóide no estado vegetativo e multiplica-se por brotamento multilateral, e pode ser manipulada por métodos genéticos clássicos. Diferentemente de linhagens homotáticas de *S. cerevisiae*, as quais são diplóides, *P. pastoris* permanece haplóide a não ser que seja forçada a cruzar, como em cultivos com limitação de nitrogênio (CEREGHINO e CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

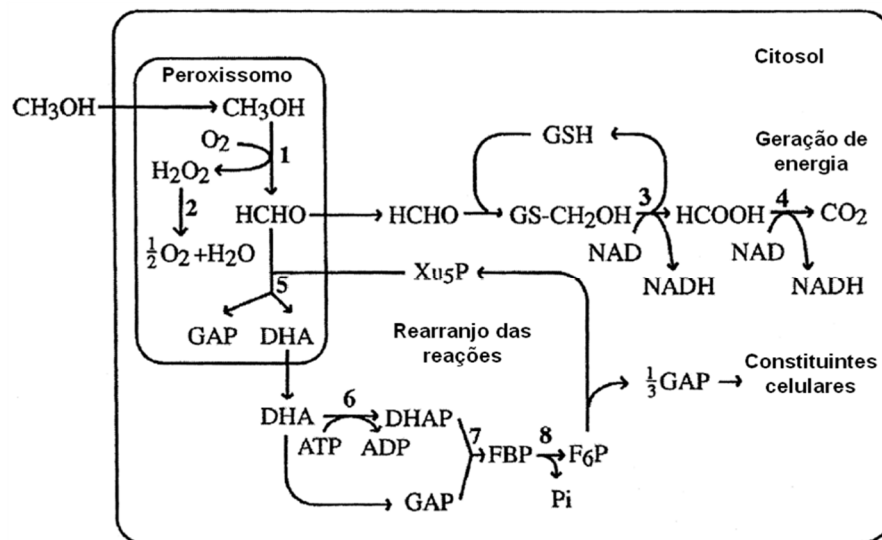
*P. pastoris* não é considerada uma forte fermentadora como *S. cerevisiae* e, por preferir a via respiratória, rende mais biomassa e não gera etanol como produto que, acumulado, atinge níveis tóxicos rapidamente (GURKAN e ELLAR, 2005). Também é capaz de executar diversas modificações pós-traducionais de eucariotos superiores como o dobramento proteico, processamento proteolítico, formação de pontes dissulfeto e glicosilação (CEREGHINO e CREGG, 2000; GURKAN e ELLAR, 2005; COS et al., 2006). A característica mais atraente da utilização de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga é a utilização de um promotor forte e altamente regulável, o promotor AOX 1 (álcool oxidase 1), induzido por metanol (MÜLLER, 2008).

### 2.6.1 Metabolismo do metanol (CH<sub>3</sub>OH)

*P. pastoris* é capaz de crescer utilizando o metanol como única fonte de carbono e energia na ausência de uma fonte de carbono que seja de assimilação mais rápida. O conceito-base para o sistema de expressão em *P. pastoris* originou-se da observação que algumas das enzimas requeridas para o metabolismo do metanol estão presentes em níveis substanciais apenas quando as células estão crescendo em metanol (CREGG et al., 1993).

A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua rápida oxidação para formaldeído pela enzima álcool oxidase, utilizando oxigênio molecular. Essa reação ocorre dentro do peroxissomo, quando é gerado peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como produto da transformação do metanol em formaldeído (GELLISSEN, 2000; GURKAN e ELLAR, 2005). Dentro do peroxissomo, a enzima catalase degrada rapidamente o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Grande quantidade do formaldeído gerado deixa esta organela e é oxidado no citosol celular até formar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por duas desidrogenases citoplasmáticas, reação esta que gera

energia para o crescimento celular na presença de metanol. O formaldeído que permanece no peroxissomo é utilizado como precursor de constituintes celulares (figura 13). As enzimas AOX têm baixa afinidade por  $O_2$ , o que é compensado pela produção de grandes quantidades da enzima, chegando a mais de 30 % das proteínas solúveis totais nas células cultivadas em metanol (COUDERC e BARATTI, 1980; CEREGHINO e CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).



**Figura 13:** Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*: 1- Álcool oxidase; 2- Catalase; 3- Formaldeído desidrogenase; 4- Formato desidrogenase; 5- Diidroxiacetona sintase; 6- Diidroxiacetona cinase; 7- Frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8- Frutose 1,6-bisfosfatase.

Fonte: Cereghino e Cregg (2000) com adaptações.

Existem dois genes que codificam a enzima álcool oxidase em *P. pastoris*: *AOX1* e *AOX2*. A expressão dos genes *AOX* é controlada a nível transcricional (CREGG et al., 1989). No crescimento em metanol, cerca de 5 % do RNA mensageiro total corresponde ao *AOX1*. Em células expostas ao metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor *AOX1* é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. O gene *AOX1* é responsável pela atividade majoritária das enzimas *AOX* na célula, mais de 90 %, enquanto que o gene *AOX2* é responsável pela produção de menos de 10 % desta enzima (COUDERC e BARATTI, 1980; COS et al., 2006).



A regulação do gene *AOX1* parece envolver dois mecanismos, um de repressão/desrepressão e outro de indução. O promotor *AOX1* é fortemente reprimido em células cultivadas em glicose, mas é induzido mais de 1000 vezes quando estas células são transferidas para meios contendo metanol como fonte de carbono (CREGG e RUSSELL, 1998). A ausência total de uma fonte de carbono repressora no meio de cultura não resulta em substancial transcrição do *AOX1*, sendo a presença do metanol essencial para induzir altos níveis de transcrição (CEREGHINO e CREGG, 2000).

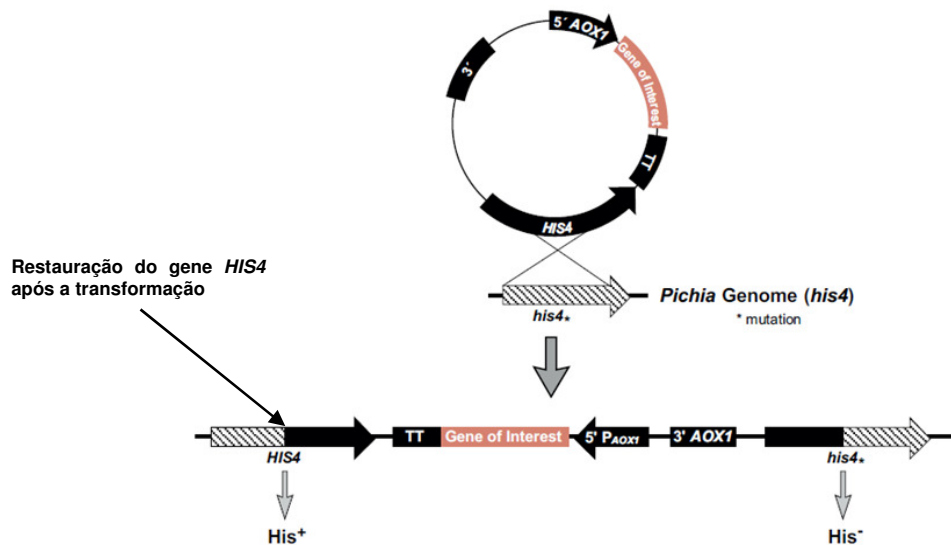
O início da transcrição a partir do promotor *AOX1* é altamente eficiente e comparável aos promotores dos genes constitutivos expressos na via glicolítica, a exemplo do promotor PGK do gene codificador da enzima fosfoglicerato cinase (PINTO, 2012). Baseado neste processo foi proposto uma variedade de vetores para *P. pastoris* que utilizam o promotor *AOX1* para a expressão em grande quantidade de proteínas recombinantes secretadas ou intracelulares (SEARS et al., 1998).

### **2.6.2 Transformação e Integração**

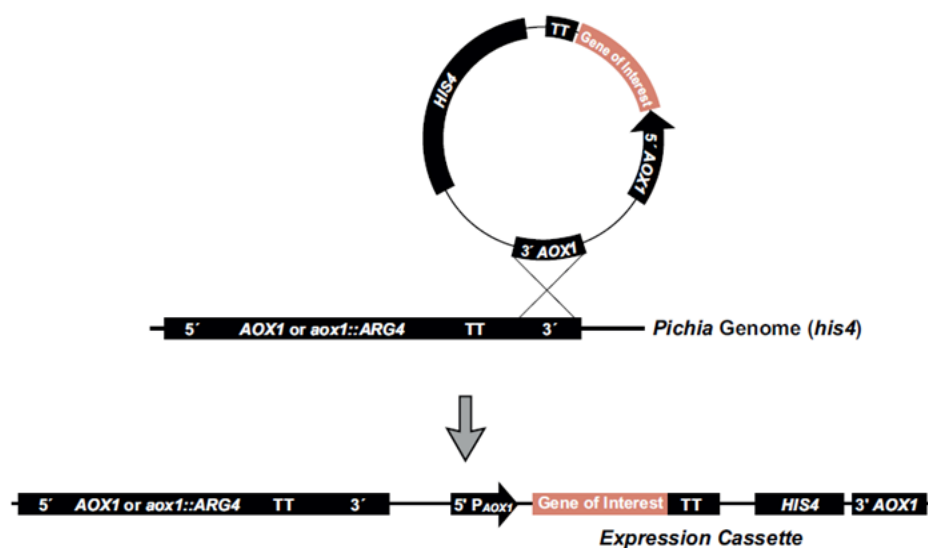
Em *P. pastoris* o DNA linear pode gerar transformantes estáveis por recombinação homóloga entre o DNA a ser transformado e regiões complementares no genoma da hospedeira (CREGG et al., 1985; 1989). Estes recombinantes apresentam alta estabilidade em meio de cultivo seletivo, mesmo quando em múltiplas cópias. Os vetores de expressão mais comumente utilizados carregam o gene *HIS4* como marca de seleção auxotrófica e o promotor *AOX1*. O cassete de expressão/vetor são linearizados pela digestão com endonucleases de restrição específicas, que pode ser uma marca gênica (*HIS4*) ou no promotor *AOX1*, e a integração pode ocorrer por adição ou substituição gênica (DALY e HEARN, 2005).

Na integração por adição gênica, os vetores de expressão devem ser linearizados em uma única marca de seleção, como no locus *HIS4* ou no promotor *AOX1*, e transformados em uma linhagem mutante auxotrófica apropriada. A extremidade de DNA livre após a linearização do vetor estimula eventos de recombinação homóloga destes fragmentos que resultam em uma integração por um evento de *cross over* simples, que ocorre com frequências de 50 % a 80 % de transformantes (CEREGHINO e CREGG, 2000). Este tipo de integração também pode resultar em integrações múltiplas *in tandem* devido a eventos de recombinação

repetidos numa taxa de 1-10 % dos transformantes (DALY e HEARN, 2005). A transformação de linhagens Mut<sup>+</sup> com vetores linearizados na região do gene *HIS4* gera transformantes Mut<sup>+</sup>, não alterando o fenótipo original da linhagem hospedeira. As figuras 14 e 15 mostram a integração do vetor ao genoma de *P. pastoris* por meio de recombinação homóloga com as regiões *HIS4* ou *AOX1* existentes nos vetores de expressão.



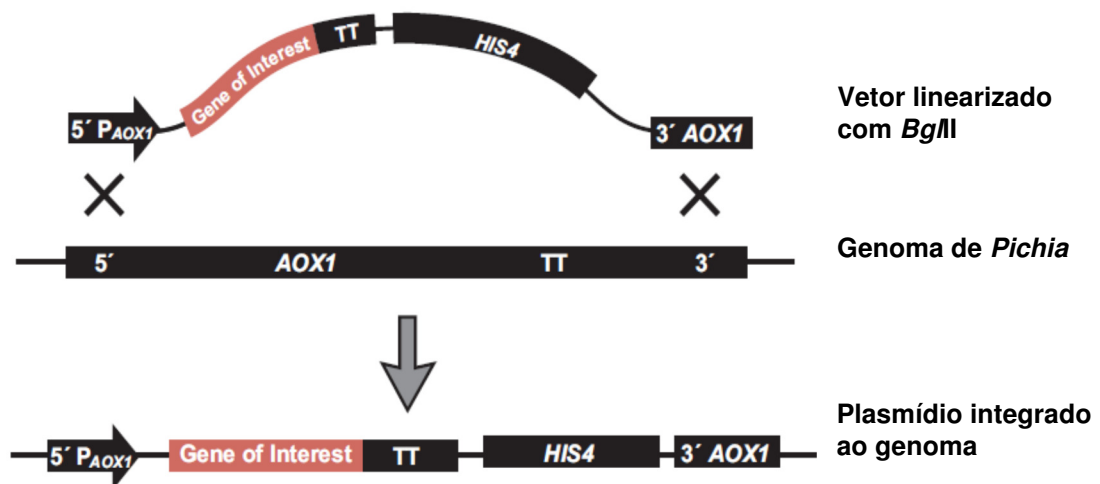
**Figura 14:** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região *HIS4* do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*. O gene *HIS4* mutado no genoma é restaurado durante a recombinação com a região *HIS4* não mutada do vetor.  
Fonte: Invitrogen (2010) com adaptações.



**Figura 15:** Integração por adição do vetor ao genoma de *Pichia pastoris*. A integração ocorre por recombinação simples entre a região 3'*AOX1* do vetor com a região homóloga no genoma de *P. pastoris*.  
Fonte: Invitrogen (2010).

Por ora, alguns vetores de expressão em *P. pastoris* podem ser digeridos duplamente de uma forma que o cassete de expressão e o vetor fiquem flanqueados pelas sequências 5' e 3' do locus *AOX1*. Eventos de integração por substituição gênica ocorrem por duplo *cross over* no locus *AOX1*, dando origem a transformantes de cópia única que são geralmente mais estáveis (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Aproximadamente, 10-20 % dos eventos de transformação resultam na substituição gênica, na qual o gene *AOX1* é deletado e substituído pelo cassete de expressão e gene de seleção. A deleção do gene *AOX1* força esta linhagem a depender da fraca transcrição do gene *AOX2* na presença de metanol e, como resultado, esta linhagem modifica seu fenótipo para Mut<sup>s</sup> conforme mostra a figura 16 (CREGG e MADDEN, 1987; CEREGHINO e CREGG, 2000).



**Figura 16:** Integração por substituição gênica do vetor com o genoma de *Pichia pastoris*. A substituição ocorre por recombinação dupla entre as duas regiões 5' *AOX1* (promotor) e 3' *AOX1* com as respectivas regiões homólogas no genoma de *P. pastoris*. Esse tipo de integração resulta em transformantes de fenótipo Mut<sup>s</sup>.  
Fonte: Invitrogen (2010) com adaptações.

A integração de múltiplas cópias do cassete de expressão no genoma da levedura é uma característica desejável, pois, geralmente, o aumento no número de cópias ocasiona um aumento na produção da proteína heteróloga (CLARE et al., 1991). Transformantes com múltiplas cópias podem ser gerados por variações no tipo de integração gênica ou repetições de um mesmo processo de integração (ROMANOS et al., 1998). Em *P. pastoris* o número de cópias do gene é identificado como um passo limitante da expressão heteróloga, e é proposto que estas limitações são devido às modificações pós-traducionais realizadas por *P. pastoris*,

como o dobramento correto da proteína junto ao retículo endoplasmático, translocação pela membrana e processamento da sequência sinal (GUSTAVSSON et al., 2001).

O tipo de integração no genoma da linhagem hospedeira, bem como o fenótipo de utilização de metanol, devem ser selecionados conforme a proteína a ser expressa. A utilização dos fenótipos Mut<sup>+</sup> e Mut<sup>s</sup> em processos específicos ainda não está bem definida, sendo sugerido o teste entre ambos os fenótipos para avaliação de qual expressa em maiores quantidades a proteína de interesse (CEREGHINO e CREGG, 2000).

### 2.6.3 Produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*

Genes exógenos podem ser expressos intracelular e extracelularmente em *P. pastoris*. A expressão extracelular, isto é, a expressão e secreção da proteína sintetizada é a mais requerida por facilitar a recuperação do produto e diminuir custos de purificação. A levedura *P. pastoris* tem como característica secretar baixos níveis de proteínas endógenas, sendo a proteína heteróloga secretada majoritariamente no meio de cultura (CEREGHINO e CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Para a secreção das proteínas é necessária a adição de uma sequência de nucleotídeos que irá codificar um peptídeo sinal, que é responsável pelo endereçamento da proteína na célula. Esta sequência deve estar localizada entre o promotor e o gene de interesse e, principalmente, deve estar em fase de leitura aberta com estas duas sequências (MÜLLER, 2008).

As sequências sinais mais comumente utilizadas em sistemas de expressão utilizando *P. pastoris* são a sequência sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* e o peptídeo sinal da fosfatase ácida (*PHO1*) de *P. pastoris* (CEREGHINO e CREGG, 2000). A sequência que codifica para o fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* é a mais comumente encontrada nos vetores de expressão para *P. pastoris* e, na maioria dos casos, este sinal de secreção é melhor do que as sequências sinais nativas das proteínas.

Horchstrasser e colaboradores (1998) demonstraram a funcionalidade da sequência sinal do fator  $\alpha$  com a eficiente secreção do cDNA da 6-frutosiltransferase de cevada em *P. pastoris*. Por outro lado, Minning e colaboradores (1998) obtiveram

60 mg de lipase ativa no sobrenadante da cultura utilizando a sequência sinal do fator  $\alpha$  para a secreção da enzima.

O pré-peptídeo do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* é uma sequência sinal que consiste em um pré-sinal de 19 aminoácidos seguido por uma sequência de 66 resíduos de aminoácidos contendo três sequências consenso para *N*-glicosilação e um sítio de dois resíduos de aminoácidos para clivagem com a protease Kex2 (KURJAN e HERSKOWITZ, 1982).

O processamento deste sinal ocorre em três etapas. A primeira é a retirada do pré-sinal por uma peptidase no retículo endoplasmático. Posteriormente, a endopeptidase Kex2 cliva a sequência de 66 aminoácidos entre os resíduos Arg-Lys e, rapidamente, a proteína Ste13 reconhece e cliva os resíduos repetidos de Glu-Ala, resultando, então, na proteína madura (BRAKE et al., 1984).

A produção de grandes quantidades da proteína heteróloga em frascos é difícil, devido às limitações do volume do meio de cultura, transferência de oxigênio, adição controlada e com variedades constantes de substrato e a impossibilidade de monitorar eficientemente os fatores importantes durante as fases de cultivo de *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Uma estratégia simples para aumentar a quantidade de proteína recombinante produzida em *P. pastoris* é aumentar a escala de fermentação e otimizar os meios de cultura utilizados (COS et al., 2006).

Clonagem e expressão heteróloga da enzima TPP utilizando leveduras como células hospedeiras são relatadas na literatura, onde estas tentativas de clonagem foram realizadas com sucesso. A enzima TPP, codificada pelo gene *TPP1<sup>+</sup>*, foi clonada e expressa em cepas de *Schizosaccharomyces pombe* sob condições de estresse osmótico e oxidativo (FRANCO et al., 2000). A enzima TPP do tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi expressa funcionalmente na levedura *S. cerevisiae* (WANG et al., 2005), do mesmo modo que esta levedura expressou em altos níveis a enzima TPP de *Arabidopsis thaliana* (VANDESTEENE et al., 2012).

No entanto, até o momento, não foram encontrados na literatura, estudos de clonagem, expressão e caracterização da enzima TPP do mosquito *A. gambiae*, sendo o presente trabalho o primeiro que propõe a caracterização da enzima TPP de *A. gambiae*, expressa em *P. pastoris*.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A malária humana por ser uma doença tropical e parasitária de relevância médica, social e econômica, representa um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, ocorrendo de forma endêmica em mais de 90 países (JORGE et al., 2001; BRASIL, 2002; FERREIRA, 2003; ALVES et al., 2004; GARCIA, 2010), onde cerca de 2,4 bilhões de pessoas convivem com o risco de transmissão (WHO, 2012). Mais de 90 % das mortes por malária ocorrem na África, principalmente entre as crianças (GARCIA, 2010).

Do ponto de vista médico, *A. darlingi* é o principal vetor do *P. falciparum*, responsável pela malária na região amazônica, onde a doença é uma epidemia preocupante, apresentando 234 mil casos em 2012 (BRASIL, 2013).

No entanto, as mudanças no comportamento dos mosquitos frente aos inseticidas, a resistência às drogas pelos parasitos, o custo elevado de novas drogas, as limitações no desenvolvimento de vacinas e os danos causados ao meio ambiente pela aplicação de pesticidas são fatores que levam à busca de novas alternativas no controle da malária.

Em vista à resistência do inseto-vetor aos inseticidas, a pesquisa de novas ferramentas para o controle do vetor tem sido proposta. Neste contexto, o conhecimento sobre as vias metabólicas do inseto-vetor como, por exemplo, a dos carboidratos, é um intrigante caminho para a descoberta destas novas ferramentas de controle.

A busca por novas formas de controle do vetor são necessárias, quer no controle das larvas quer no controle de mosquitos adultos. Neste ínterim, o conhecimento do metabolismo do mosquito tem proporcionado metas para a elaboração de inseticidas que sejam altamente eficazes e específicos no controle populacional do mosquito vetor. Uma das alternativas mais fascinantes baseia-se no uso de enzimas-chave que desempenham papel importante e fundamental no metabolismo e fisiologia do inseto (KRAMER e MUTHUKRISHNAN, 2005).

O metabolismo da trealose, o principal carboidrato encontrado na hemolinfa dos insetos, pode possivelmente servir como alvo, o qual seria muito útil no

desenvolvimento racional de agentes inseticidas, e a enzima trealose fosfatase torna-se um possível candidato na elaboração destes agentes, visto que o produto de sua catálise desempenha importantes papéis na fisiologia dos insetos como: (a) molécula de reserva de energia armazenada no corpo gorduroso; (b) crioprotetor, particularmente nos insetos sensíveis às baixas temperaturas; (c) molécula estabilizadora de proteínas e lipídeos de membrana, substituindo a água de hidratação da bicamada lipídica nos processos de dessecação e reidratação; (d) como molécula requerida na produção de energia pelas células musculares durante os processos de contração dos músculos de voo; e (e) como mecanismo modulador de resposta (*feedback* negativo) da síntese e liberação do hormônio adipocinético (AKH), quando este é requerido durante os processos de oxidação dos triglicerídeos de reserva armazenados no corpo gorduroso. Partindo destes pressupostos, a inibição desta enzima provocaria um efeito cascata sobre diferentes funções no metabolismo, tendo consequências deletérias sobre a fisiologia e à própria sobrevivência do inseto vetor, o que contribuiria para o seu controle populacional.

Portanto, a pesquisa básica desenvolvida neste trabalho contribui em reunir informações importantes sobre a expressão e caracterização bioquímica da enzima trealose-6-fosfato fosfatase de *A. gambiae*, proporcionando, no futuro, uma alternativa atraente na elaboração de um formulado que seja eficaz no controle do inseto vetor, de forma a diminuir sua capacidade em transmitir o parasito causador da malária humana.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral:**

Clonar e expressar o gene da trealose-6-fosfato fosfatase (*TPP*) de *Anopheles gambiae* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e caracterizar a enzima recombinante.

### **4.2 Objetivos Específicos:**

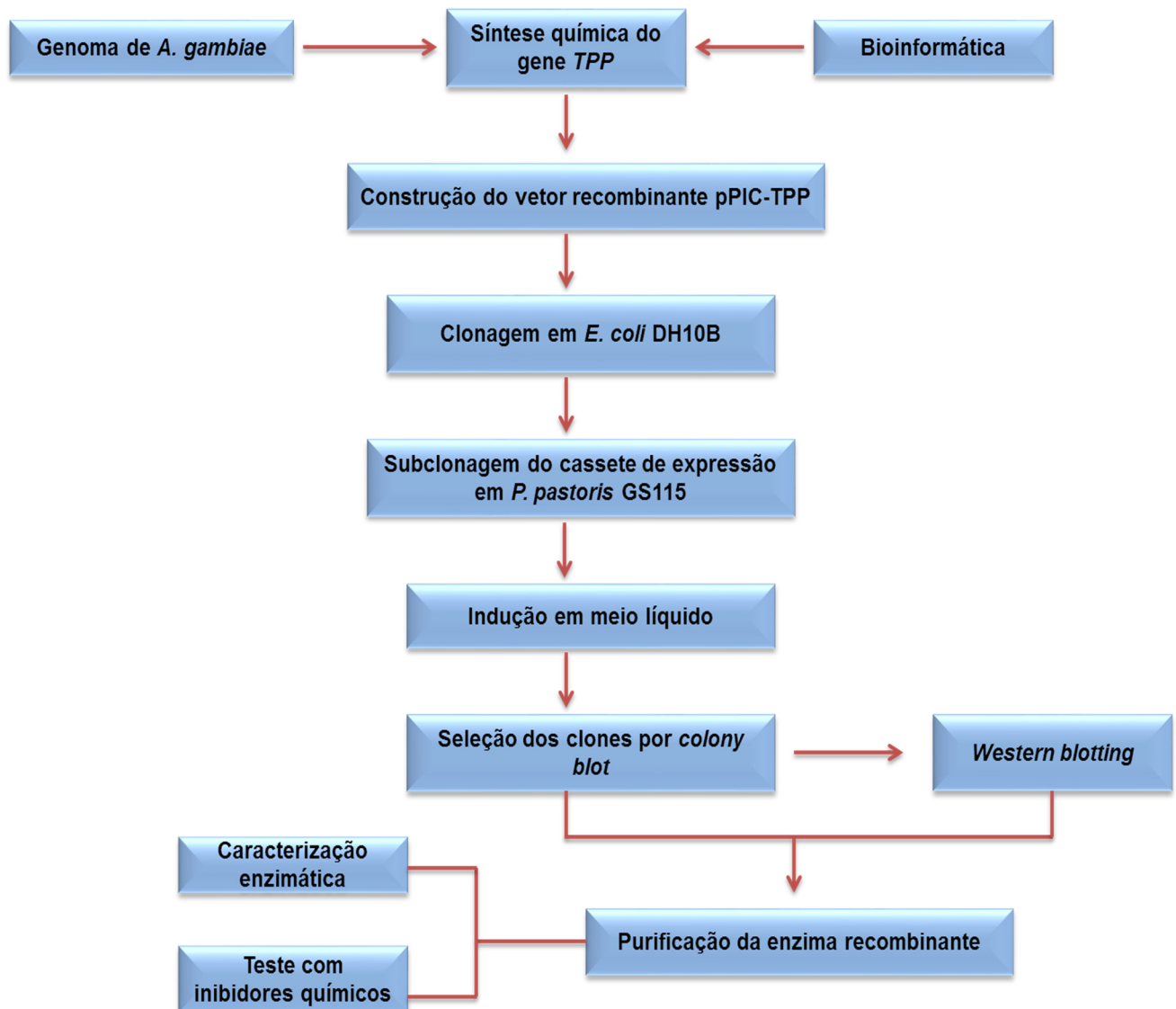
- I. Otimizar a sequência do gene de trealose-6-fosfato fosfatase para expressão eficiente em *P. pastoris*;
- II. Clonar o fragmento gênico no vetor pPIC9 e construir plasmídeo recombinante que carregue o gene *TPP* para expressão em *P. pastoris*;
- III. Obter clones transformantes da linhagem de *P. pastoris* GS115 capazes de expressar o gene *TPP* e secretar a enzima trealose-6-fosfato fosfatase (*TPP*) recombinante com atividade biológica;
- IV. Induzir a expressão/ secreção da *TPP* em *P. pastoris*;
- V. Purificar a enzima *TPP* por cromatografia de afinidade;
- VI. Caracterizar bioquimicamente a enzima *TPP* recombinante.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Estratégia Utilizada

O fluxograma abaixo (figura 17) resume as diferentes etapas executadas no desenvolvimento da tese.



**Figura 17:** Fluxograma das atividades desenvolvidas durante a tese.

## 5.2 Linhagens Hospedeiras

### ***Escherichia coli* DH10B:**

Linhagem de genótipo F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1 endA1 araD139*  $\Delta$  (*ara, leu*)7697 *galJ galK*  $\lambda$ - *rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124. Essas células são adequadas para clonagem de DNA, construção de bancos de genes e bibliotecas de cDNAs (Invitrogen). Foi utilizada nos procedimentos de manipulação de DNA.

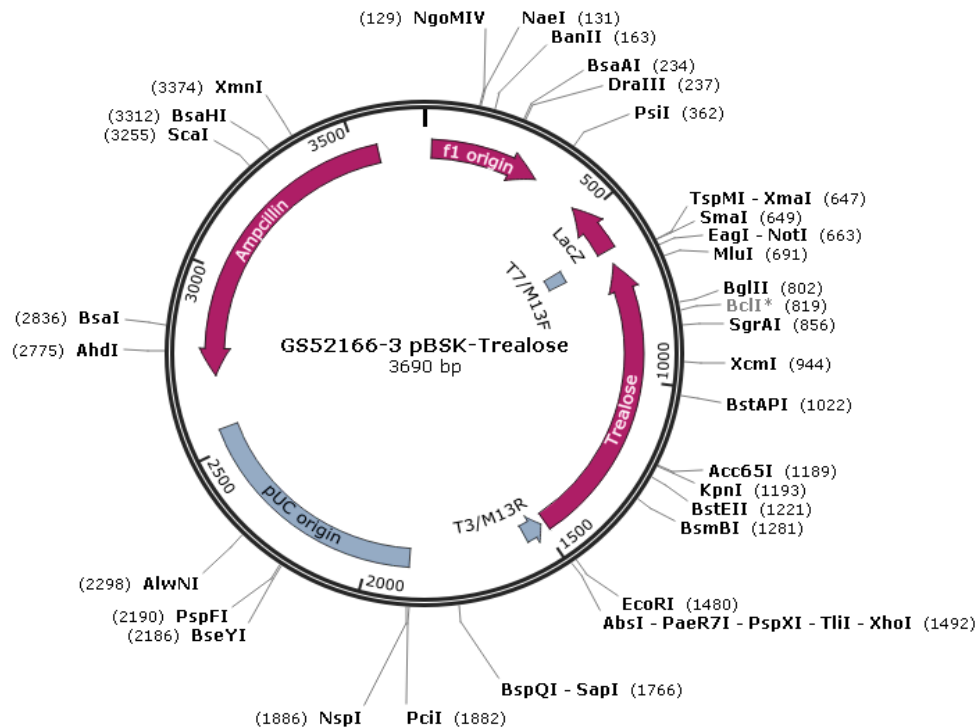
### ***Pichia pastoris* GS115:**

Linhagem de genótipo *HIS4* e fenótipo Mut<sup>+</sup>. Possui mutação no gene *his4* codificante da enzima histidinol desidrogenase, o que implica incapacidade de sintetizar o aminoácido histidina (His<sup>-</sup>), não crescendo em meio auxotrófico para esse aminoácido. Os transformantes são selecionados por sua habilidade de crescer em meio deficiente de histidina (INVITROGEN, 2010). Essa linhagem foi utilizada para expressão da enzima recombinante TPP de *A. gambiae* pela transformação com vetor carregando a marca de seleção auxotrófica *HIS4* e o gene *TPP*.

## 5.3 Vetores Utilizados

### **pBlueScript K (GenOne):**

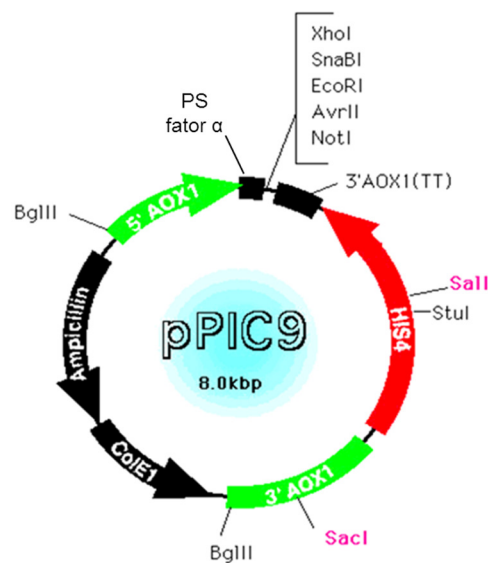
É um vetor usado em clonagem e sequenciamento. Possui um extenso *polylinker* com 21 sítios únicos de enzimas de restrição. Flanqueando o múltiplo sítio de clonagem estão os promotores da RNA polimerase T3 e T7 que podem ser usados para sintetizar RNA *in vitro*. Os promotores T3 e T7 e o múltiplo sítio de clonagem estão presentes na porção N-terminal do fragmento gênico *lacZ*. No vetor pBlueScript K o sítio de *SacI* é o sítio de restrição mais próximo ao promotor *lacZ* e o sítio *KpnI* é o mais distante. O mapa do vetor pBlueScript K é ilustrado na figura 18.



**Figura 18:** Mapa físico do vetor pBlueScript K com o gene de trealose-6-fosfato fosfatase inserido entre os promotores da RNA polimerase T3 e T7. O mapa físico foi construído com auxílio do programa SnapGene® Viewer versão 2.4.2 (2014).

### **pPIC9 (Invitrogen):**

É um vetor apropriado para expressão e secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* e apresenta as seguintes características: tamanho de 8023 pb; presença do promotor AOX1 do gene codificador da enzima álcool oxidase I, fortemente induzível por metanol; sequência codificadora do peptídeo sinal de secreção fator- $\alpha$  de *S. cerevisiae* (S); região de múltiplos sítios de clonagem com sítios de reconhecimento por endonucleases de clivagem *stick end* e *blunt end*; terminador de transcrição próprio (TT); origem de replicação funcional em *E. coli* (pBR322); sítios para integração no genoma de *P. pastoris* nas regiões HIS4 ou AOX1; marca de seleção auxotrófica HIS4; e gene de resistência à ampicilina, conforme ilustrado na figura 19.



**Figura 19:** Mapa físico do vetor de expressão/ secreção pPIC9 e suas principais regiões. PS – peptídeo sinal fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.  
 Fonte: <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g5/vec2.gif> (com modificações).

#### 5.4 Síntese química do gene codificador da trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) de *A. gambiae*

A sequência nucleotídica da região estrutural do gene da trealose-6-fosfato fosfatase foi obtida a partir de um banco de dados genômico de *A. gambiae* disponível no site KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – [www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)). Essa sequência foi otimizada pela tabela do *codon usage bias* para expressão em *P. pastoris*, levando em consideração os códons preferenciais dessa levedura e o equilíbrio proporcional entre o conteúdo de bases nitrogenadas citosina (C) com guanina (G) e adenina (A) com timina (T). A sequência otimizada do gene *TPP* apresentou 47 % de conteúdo GC. O gene foi flanqueado em 5' e 3' com sítios de restrição para reconhecimento específico das endonucleases *EcoRI* e *NotI*, respectivamente, o que viabilizou a sua subclonagem no vetor de expressão e secreção pPIC9. Na extremidade 3', antecedendo ao *stop* códon, foi inserida uma sequência codificadora para cauda de seis resíduos de histina (*his<sup>6</sup>-tag*) para detecção e confirmação da proteína expressa por meio de ensaios imunológicos, como forma de viabilizar sua purificação por afinidade em coluna de níquel. Essa construção gênica foi quimicamente sintetizada pela empresa *GenOne* e o gene sintético *TPP* foi clonado no vetor pBSK pela mesma empresa. Esse vetor carregando o gene sintético passou a ser denominado pBSK-Trealose.

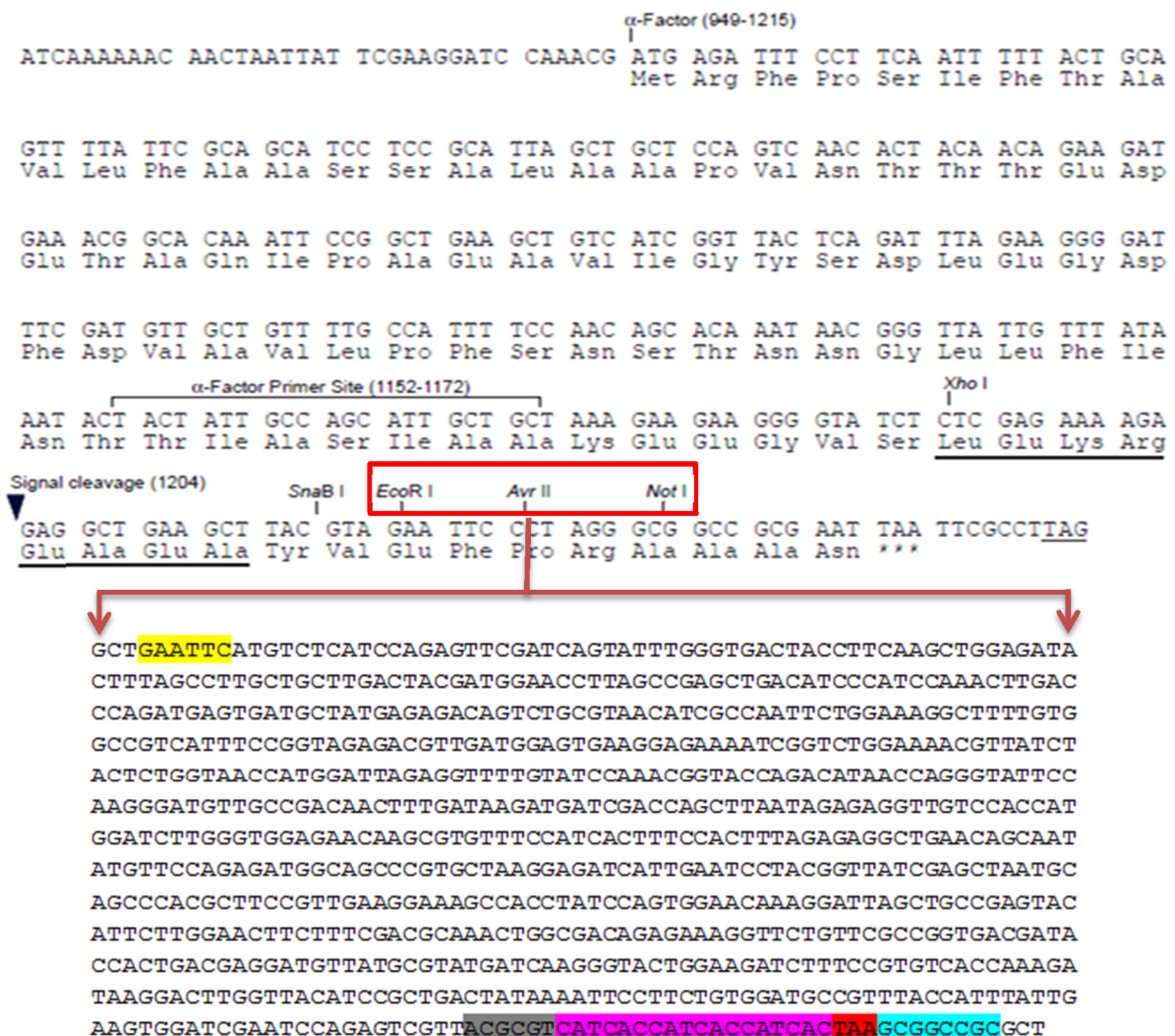
Durante a construção da sequência do gene *TPP* otimizado para expressão em *P. pastoris* foram utilizadas as ferramentas de bioinformática KEGG, BLAST, ExPasy, UniProt, CBS Prediction Servers, *NEBcutter V 2.0*, *ClustalW2* disponíveis em *sites* especializados na *internet*. A determinação das propriedades teóricas como a massa molecular, sítios de glicosilação, ponto isoelétrico (pI) e meia-vida da proteína recombinante traduzida a partir do gene *TPP* foi realizada com o auxílio das ferramentas de bioinformática *ExPASy* *ProtParam* *Tool* (<<http://web.expasy.org/protparam/>>), *NetNGlyc* *1.0* *Server* (<<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>>) e *NetOGlyc* *3.1* *Server* (<<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>>).

## 5.5 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-TPP

Para construção do vetor de expressão e secreção de trealose-6-fosfato fosfatase em *P. pastoris*, o gene sintético *TPP* foi primeiramente liberado do vetor de clonagem pBSK-Trealose por digestão dupla com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas seguintes condições: tampão NEB 3 10 X, 5 U de cada endonuclease, 2 µL de DNA (~60 ng/µL) em volume final de 10 µL. O sistema de reação foi mantido em repouso a 37 °C por 3 h. A visualização dos produtos da digestão se deu por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Em seguida, o fragmento correspondente ao gene sintético *TPP* foi purificado do gel de agarose utilizando-se o *kit* comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e ligado ao múltiplo sítio de clonagem do vetor de expressão e secreção pPIC9, previamente digerido com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* nas mesmas condições reacionais acima e também purificado com o *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A reação de ligação se deu por ação da enzima T4-DNA ligase (*New England BioLabs*), conforme as condições recomendadas pelo fabricante, e o sistema incubado por 24 horas a 16°C, respeitando as proporções de 3-5 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor. O plasmídeo recombinante resultante da ligação do vetor pPIC9 com o gene sintético *TPP* foi denominado pPIC-TPP, sendo constituído por 8830 pb. Esse plasmídeo foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes. A figura 20

mostra o múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9 e a sequência do gene *TPP* inserido logo após o fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, o qual coordena a secreção extracelular da proteína heteróloga. O promotor AOX, induzível em meio suplementado com metanol, encontra-se antes do fator  $\alpha$  (não mostrado na figura 20). O gene *TPP* está flanqueado pelos sítios de *EcoRI* e *NotI* (quadrado em vermelho), que estão localizados após o fator  $\alpha$  do vetor. Uma cauda com seis resíduos de histidina foi inserida na porção C-terminal do gene, localizada antes do códon de término da tradução. A cauda de histidina foi útil para a detecção em testes imunogênicos, os quais confirmaram a expressão da proteína codificada pelo gene *TPP*.



**Figura 20:** Múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9. O quadrado em vermelho evidencia os sítios de *EcoRI* e *NotI* que foram usados para subclonagem do inserto *TPP* ao vetor. A sequência em amarelo, indica o sítio de *EcoRI*; o sítio de *NotI* é mostrado em azul claro; a cauda de histidina é mostrada em rosa. TAA – códon de término da tradução. ACGCGT – sítio de *MluI*.

Fonte: Invitrogen (2010) com adaptações.

## **5.6 Transformação de células *Escherichia coli* DH10B com o vetor recombinante pPIC-TPP**

Uma alíquota de 50 µL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH 10B foi utilizada para a transformação com o vetor recombinante pPIC-TPP. Um microlitro do princípio transformante (inserto + plasmídeo) foi utilizado para a transformação genética por eletroporação, em pulso elétrico de 1900 volts, em aparelho eletroporador (Modelo Eletroporator 2510 Eppendorf, cubeta com passagem de 1,0 mm e capacidade de 100 µL de células competentes) para a inserção do plasmídeo na célula hospedeira. Imediatamente após o pulso elétrico, as células eletroporadas foram ressuspensas em 500 µL de meio LB (Luria Bertani, apêndice 10.A.1) e o conteúdo transferido para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi incubado a 37 °C por 1 hora sob agitação a 180 rpm. Logo após, realizou-se a semeadura (com volumes de células de 25 e 50 µL) em placas de Petri contendo aproximadamente 25 mL de meio LB agar e ampicilina na concentração de 100 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas para crescimento das colônias transformantes *E. coli* DH10B/pPIC-TPP.

## **5.7 Extração de DNA plasmidial**

Para a extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes crescidos em placa foi utilizado o *kit Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), o qual possui soluções atuantes nas fases de lise celular, desproteíntização, lavagem e eluição do DNA plasmidial. Os procedimentos foram realizados segundo as especificações do fabricante. O perfil eletroforético dos produtos de extração plasmidial se deu em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

## **5.8 Análise de restrição para confirmação do vetor recombinante pPIC-TPP**

O DNA plasmidial extraído da hospedeira *E. coli* DH10B/pPIC-TPP foi submetido à análise de restrição por endonucleases para confirmação da correta construção do plasmídeo engenheirado pPIC-TPP.

Na análise de restrição, o DNA plasmidial sofreu dupla digestão com as endonucleases *EcoRI* e *NotI* (*New England Biolabs*). As condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB 3 10X, BSA 100 µg/mL, 5 U de cada endonuclease, 1 µL de DNA em volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas. O perfil eletroforético dos produtos da digestão enzimática se deu em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

### **5.9 Transformação de *Pichia pastoris* GS115 com o cassete de expressão do vetor recombinante pPIC-TPP**

Inicialmente, uma alíquota de 50 µL de células leveduriformes de *P. pastoris* GS115 foi utilizada para a subclonagem do cassete de expressão presente no vetor de expressão pPIC-TPP. Para transformação das células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, o vetor pPIC-TPP foi digerido com a endonuclease *BglII* para liberação do cassete de expressão carregando o gene sintético *TPP*. As condições da reação de digestão foram as seguintes: tampão NEB3 10 X, 5 U de *BglII*, 10 µL de DNA em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 2 horas.

Para a eletroporação, foram utilizados 50 µL de células eletrocompetentes misturadas com 1 µL do DNA linearizado. O sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 2 mm previamente resfriada e incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à eletroporação com voltagem de 1500 volts em eletroporador. Imediatamente após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado para auxiliar na recuperação da parede celular. O conteúdo foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL e semeados volumes de 50 e 100 µL em placas de Petri contendo meio MD (Apêndice 10.A.2) sem o aminoácido histidina para seleção auxotrófica das células transformantes. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas.

### **5.10 Indução em placa dos clones pPIC-TPP**

Para a realização do experimento de indução da expressão heteróloga foram selecionados trinta e nove clones de *P. pastoris* recombinante e um clone pPIC9 sem inserto (controle negativo). Para aumento de massa celular, os clones



selecionados foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U (Apêndice 10.A.2) em placa de Petri e incubados a 30 °C por 18 a 24 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas para uma nova placa contendo aproximadamente 25 mL de meio BMMY-U (Apêndice 10.A.2). A indução do promotor AOX1, o qual sinaliza a transcrição do gene *TPP* integrado ao genoma da hospedeira, foi realizada por adição de metanol PA às culturas celulares a cada 24 horas, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada durante 120 horas a 30 °C em estufa bacteriológica.

Após o término desta indução a placa foi armazenada em geladeira à temperatura de 4 °C a fim de ser preservada e utilizada em experimentos posteriores.

### **5.11 Seleção por *colony blot* dos clones pPIC-TPP**

Esta etapa foi realizada em parceria com a Fiocruz/AM no laboratório de Biodiversidade em Saúde sob a coordenação dos pesquisadores Paulo Nogueira e Patrícia Orlandi. Quarenta clones recombinantes para trealose-fosfatase crescidos em placa suplementadas com metanol após 120 horas de indução foram submetidos ao procedimento de detecção de cauda de poli-histidina da porção C-terminal.

Primeiramente, uma membrana de nitrocelulose foi posta sobre a cultura celular, colocando várias camadas de papel de filtro e papel-toalha sobre a mesma. A transferência das proteínas marcadas com cauda de histidina para a membrana de nitrocelulose ocorreu por capilaridade em intervalo de 4 horas. Após 4 h, foram retiradas as camadas de papel e a membrana de nitrocelulose foi transferida para uma placa estéril com a superfície das colônias voltada para cima. Antes de se seguir para o próximo passo, foram dispostas sobre a bancada seis placas com papel de filtro no formato da membrana (úteis na absorção do excesso de solução, evitando a formação de bolhas) que seriam utilizadas no próximo passo.

Após o preparo prévio, seguiram-se os procedimentos: (a) incubar a membrana em solução SDS 10 % (p/v) por 10 min; (b) transferir a membrana para a solução desnaturante (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) e incubar por 5 min; (c) transferir e incubar em solução neutralizante (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris pH 7,4) – este procedimento foi repetido por mais uma vez; (d) transferir e incubar em solução SSC

2X (0,8765 g NaCl; 0,5025 g citrato de sódio diidratado preparado em volume de 50 mL) por 15 min; (e) lavar em tampão TBS (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl) por 10 min sob agitação. Este procedimento foi realizado segundo o protocolo de *colony blot* da Qiagen (*Protocol 4. Colony-blot procedure; The QIAexpressionist™*, pg. 43, June 2003).

Ao término desta etapa, seguiram-se os procedimentos de revelação e detecção da cauda de histina C-terminal conforme o protocolo de Imunodeteção Cromogênica Western Breeze da Invitrogen (*WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit*). Este protocolo foi o mesmo utilizado para análise *Western blotting* citada no item 5.13.

Após a revelação da membrana, clones transformantes positivos para trealose fosfatase foram selecionados para os experimentos posteriores.

## 5.12 Indução dos clones pPIC-TPP em frascos agitados

Para a realização do experimento de indução da expressão heteróloga em frascos agitados, foram selecionados seis clones de *P. pastoris* recombinante: cinco clones pPIC-TPP e um clone pPIC9 sem inserto (controle negativo). Para aumento de massa celular, os clones selecionados foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U (Apêndice 10.A.2) em erlenmeyer de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até a cultura atingir D.O.<sub>600</sub> entre 2-6, em tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O.<sub>600</sub> necessária, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 50 mL de meio BMMY-U (Apêndice 10.A.2) em erlenmeyer de 500 mL, de modo que a D.O.<sub>600</sub> inicial da cultura ficasse próximo a 1,0. A indução do promotor AOX1, o qual sinaliza a transcrição do gene *TPP* integrado ao genoma da hospedeira, foi realizada por adição de 250 µL de metanol PA às culturas celulares a cada 24 horas, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada durante 72 horas a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm.

Alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos a 4 °C e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para posterior análise.

Alíquotas do pré-inóculo (1mL) foram separadas a fim de serem preservadas em glicerol 50 % (1:1) e armazenadas em freezer -80 °C para experimentos posteriores.

### **5.13 Análise por *Western blotting* do sobrenadante da cultura para confirmação da expressão da proteína heteróloga**

Para confirmação da expressão da trealose fosfatase recombinante nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* GS115/pPIC-TPP durante o período de indução por metanol foi realizada a análise por *Western blotting*. Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot<sup>®</sup>SD, Semi-Dry Transf Cell, Bio-Rad) durante 1 h nas seguintes condições: 10 volts, 0,13 A, 1 W. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose com as proteínas imobilizadas foi tratada com os anticorpos e reagentes do kit *WesternBreeze<sup>®</sup>Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit*, cujos procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). Após a revelação da membrana, a imagem foi digitalizada em *scanner*.

### **5.14 Concentração e análise eletroforética da enzima produzida pelos clones recombinantes TPP 59 e TPP 61**

Primeiramente, o sobrenadante da cultura induzida por 72 h foi centrifugado por 20 minutos a 4.000 rpm em tubo cônico, tipo falcon, de 50 mL. O sobrenadante foi recuperado em tubo cônico novo (50 mL) e o precipitado descartado. Em seguida, o sobrenadante recuperado foi filtrado em filtro do tipo Millipore com malha de 0,45 µm de diâmetro aspirado com seringas descartáveis de 10 mL.

Após este procedimento, 2 mL das amostras foram concentrados em concentrador Amicon de 10 kDa (Amicon<sup>®</sup> Ultra 2 mL Centrifugal Filters, Millipore). As amostras foram submetidas à concentração por 20 min a 4000 rpm. O rendimento de proteína foi de 40 µL. Neste momento, foi montado um sistema de diluição para os dois clones, conforme demonstrado na tabela a seguir.

**Tabela 1:** Montagem do sistema de diluição de TPP após concentração em Amicon.

<b>Amostra</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>dH<sub>2</sub>O (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Tp amostra 2X (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>OBS.</b>
TPP 59	2	8	10	Am. conc.
TPP 59	2	8	10	Dil. 1:10
TPP 59	2	8	10	Dil. 1:25
TPP 61	2	8	10	Am. conc.
TPP 61	2	8	10	Dil. 1:10
TPP 61	2	8	10	Dil. 1:25

Nota: diluição 1:10  $\rightarrow$  1  $\mu\text{L}$  amostra concentrada + 9  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O

Diluição 1:25  $\rightarrow$  1  $\mu\text{L}$  amostra concentrada + 24  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O.

Cada amostra foi desnaturada por choque térmico em temperatura de 100 °C por cinco minutos com tampão de amostra 2X SDS-PAGE (200 mM Tris pH 6,8; 0,1 % azul de bromofenol (p/v); 4 % SDS (v/v); 4 %  $\beta$ -mercaptoetanol; 20 % glicerol (v/v)).

As amostras foram aplicadas em sistema de minigel com gradientes de poli-acrilamida de 5 % concentrador e 15 % separador. A eletroforese foi realizada em tempo aproximado de 1 hora nas seguintes condições: tensão 200 volts, corrente 50 mA e potência 30 W e, posteriormente, o gel foi corado com corante rápido (ácido acético [8 %]; etanol [25 %]; azul de Coomassie [120 mg]; VF: 100 mL) por aproximadamente 2 h e descorado em solução descorante (200 mL de etanol; 64 mL de ácido acético; 536 mL de água; VF: 800 mL) por 1 h, ou até que as bandas pudessem ser visualizadas.

### **5.15 Purificação da trealose fosfatase por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap™ HP**

Antes dos procedimentos de purificação, o sobrenadante do clone TPP 61 (escolhido para esta etapa após análise por *Western blotting*) foi filtrado em membrana de retenção, com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e aspirado com seringa

descartável de 10 mL. A amostra filtrada foi armazenada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até que se realizasse a purificação no aparelho ÄKTA purifier (GE Healthcare).

Cerca de 30 mL do sobrenadante filtrado foram colocados em seringa de 30 mL e a mesma foi acoplada à coluna HisTrap™ 1 mL (GE Healthcare). Por pressão manual, todo o volume contido na seringa foi passado na coluna e a amostra eluída foi recuperada em tubo falcon, sendo denominado de sobrenadante recuperado. Dois mililitros do tampão de ligação (20 mM de fosfato monossódico  $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ ; 0,5 M NaCl; pH 7,4) foram necessários para pré-equilibrar a coluna. Após isso, a coluna com a amostra ligada na resina de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) foi acoplada ao aparelho, dando início aos procedimentos automatizados de purificação.

A amostra foi eluída com tampão (20 mM de fosfato monossódico  $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ ; 0,5 M NaCl; pH 7,4) e um gradiente salino máximo de 0,5 M de Imidazol. Frações de 1 mL foram coletadas à temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL/min. Outros parâmetros da purificação foram assim determinados: coluna lavada com cinco volumes; coleta do lavado em 1 mL; gradiente em 5 volumes da coluna e manutenção do sal em 3 mL, após serem coletadas as frações. Cromatogramas da purificação, mostrando a concentração do Imidazol e da absorbância em UV foram salvos e impressos a fim de assessorar na análise dos resultados. A eluição foi monitorada em absorbância de 280 nm.

## 5.16 Análise da purificação

Frações da proteína recombinante purificada, analisadas através do perfil no cromatograma, foram escolhidas e submetidas à análise em SDS-PAGE 15 %. Inicialmente, 15  $\mu\text{L}$  destas frações foram misturados com 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra 5X e, então, fervidas por cinco minutos a  $100^{\circ}\text{C}$ . Após a eletroforese, o gel foi corado por aproximadamente 1h30min e descorado por 1h, conforme descrito no item 5.14. Após esse tempo, a solução descorante foi descartada e o gel foi imerso em água deionizada até que as bandas fossem reveladas. Uma alíquota do clone TPP 61 não purificado foi utilizada como controle positivo nesta análise.

### 5.17 Ensaio para quantificação de proteína total

A quantificação da proteína recombinante purificada foi realizada utilizando-se o *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). A reação foi realizada conforme especificações do fabricante. As amostras submetidas neste ensaio foram as frações 8, 9 e 10 eleitas após análise em SDS-PAGE 15 %, conforme descrito no item 5.16. O ensaio foi feito em triplicata, tendo como controle negativo uma alíquota do tampão de eluição descrito no item 5.15. A quantificação de proteínas totais foi determinada pela equação de uma curva padrão feita com solução de albumina de soro bovino em concentrações na faixa de 0 a 250 µg/mL.

### 5.18 Caracterização enzimática da trealose-6-fosfato fosfatase recombinante

Antes dos procedimentos de caracterização foram estabelecidas as condições experimentais de análise. A concentração de 203 ng/µL da enzima foi selecionada por meio da cinética de tempo de 10 min por apresentar o melhor perfil cinético em relação às concentrações de 500 ng/µL e 1000 ng/µL, enquanto que a concentração de 1 mM do substrato T6P foi estabelecida seguindo os parâmetros descritos no trabalho de Klutts e colaboradores (2003).

Além disso, a curva padrão de fosfato inorgânico, útil na determinação da atividade enzimática, foi construída utilizando-se concentrações variáveis de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) na faixa de 0 a 100 µM por um tempo de reação de 10 min.

A caracterização enzimática de TPP foi realizada para determinar os parâmetros cinéticos: pH ótimo, temperatura ótima e as constantes cinéticas  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . Os ensaios foram feitos em triplicata. Os dados (média + desvio-padrão) foram analisados usando análise simples de variância (ANOVA), através do software estatístico GraphPad Prism versão 5.04 (2010).

#### 5.18.1 Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo para a atividade da enzima recombinante produzida por *P. pastoris* foram utilizados tampões com pH entre 5,0 a 11,0 [5,0 a

7,0 tampão MES (ácido morfolinoetanossulfônico); 7,0 a 9,0 tampão Tris-HCl; 8,0 a 11,0 tampão Glicina]. A metodologia utilizada para a determinação da atividade enzimática em diferentes pHs foi a de Klutts e colaboradores (2003) onde a concentração de fosfato inorgânico liberado determina a atividade por meio da reação com os reagentes molibdato de amônio e verde de malaquita.

### **5.18.2 Determinação da temperatura ótima**

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade da trealose fosfatase recombinante, o sistema de reação foi incubado, em um primeiro experimento, em temperaturas na faixa entre 30 °C a 80 °C, com o pH ótimo de atividade determinado para a enzima. Após o estudo nessa ampla faixa de temperatura, a atividade foi estimada em uma faixa de temperatura mais restrita, variando entre 30 °C a 40 °C, onde, então, foi determinada a temperatura ótima da enzima. Para este experimento foi utilizado o método de Klutts e colaboradores (2003).

### **5.18.3 Cinética enzimática**

A cinética enzimática foi realizada utilizando o pH ótimo e a temperatura ótima da enzima, sendo a atividade enzimática determinada de acordo com a metodologia proposta por Klutts e colaboradores (2003). Foram utilizadas concentrações de 1mM a 8 mM do substrato trealose-6-fosfato (10 mg, PM 498,46 – Sigma-Aldrich) em função do tempo de 10 min de reação.

O ensaio foi realizado em um volume final de 50 µL, contendo os seguintes componentes: concentrações variáveis (1 mM – 8 mM) de trealose-6-fosfato, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e 1 µL da enzima. Os dados obtidos foram utilizados para a confecção da curva de Michaelis-Menten e do gráfico Lineweaver-Burk.

A reação era bloqueada com dois volumes de solução corante filtrada (0,15 % de verde de malaquita, 1 % de molibdato de amônio e 12,5 % (v/v) de HCl concentrado), sendo que os microtubos foram sempre conservados em gelo. A absorbância da mistura foi lida em 630 nm.

#### 5.18.4 Teste com inibidores químicos

Para o teste de inibição de trealose fosfatase foram utilizados quatro compostos químicos: EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), NaF (fluoreto de sódio),  $\text{CaCl}_2$  (cloreto de cálcio) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (nitrato de cálcio). Estes reagentes foram selecionados conforme ensaios relatados na literatura (FRIEDMAN, 1966; MURDOCH, 1971; PEERAER et al., 2004).

Os ensaios foram realizados em triplicata com os inibidores químicos nas concentrações de 5 mM e 25 mM, com volume final de 50  $\mu\text{L}$  e tempo de reação de 10 min. Uma reação controle sem a presença de inibidor foi utilizada neste experimento em cada concentração.

Para se determinar a significância do resultado do teste de inibição, os dados foram analisados utilizando a análise de variância com dois fatores (*two-way* ANOVA) com correção de Bonferroni, através do software estatístico GraphPad Prism versão 5.04 (2010).



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Design do gene sintético TPP

A ausência da disponibilidade da sequência completa do genoma de *A. darlingi* em bancos de dados genômicos, na época em que foram realizados os procedimentos de *design* do gene sintético, levou à alternativa de que o processo de síntese química do gene codificador de trealose fosfatase fosse baseado em um mosquito de espécie próxima, pertencente ao mesmo gênero. Em virtude disso, o gene para trealose fosfatase foi baseado no banco de dados genômicos de *Anopheles gambiae*, disponível no site KEGG.

Desta forma, foi escolhido o gene de trealose fosfatase por ser considerada uma enzima de relevante importância no metabolismo e fisiologia do mosquito *A. gambiae*, um importante vetor de *P. falciparum*, o parasito transmissor da forma mais grave da malária humana no continente africano. Os dados das sequências nucleotídica e de aminoácidos do gene *Agatpp* estão organizados no seguinte acesso: *Anopheles gambiae* (mosquito): AgaP\_AGAP008225-PA. As informações disponíveis no KEGG, a respeito deste gene, estão em consonância com a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e UniProtKB (*Protein Knowledgebase* - **AgTpp** AGAP008225/ AgaP\_AGAP008225), visto que estas plataformas de pesquisa possuem base de dados intercruzadas, o que sustentou a aquisição de informações fideis e verdadeiras em relação a este gene.

O gene *TPP* foi selecionado porque a proteína que codifica participa da via metabólica dos carboidratos nos insetos, particularmente estando envolvida na formação do dissacarídeo trealose, um açúcar não-redutor que está presente em grande concentração na hemolinfa dos insetos (KEGG *Pathway*, número do acesso: ec00500).

A escolha da enzima para clonagem e expressão teve como razão o fato de seu produto catalítico (trealose) não ser essencial para células de mamíferos, visto que nestes a glicose é o carboidrato particularmente requerido em muitas vias

metabólicas, ou, até mesmo, está ausente conforme relatado na literatura (KLUTTS et al., 2003; KORMISH e MCGHEE, 2005; KARTHIK et al., 2011; KUSHWAHA et al., 2011). Isso é corroborado quando a sequência de aminoácidos foi comparada com sequências de mamíferos no BLASTP, dando como resultado uma similaridade de 13 % com isoformas da proteína pré-sináptica da citomatrix, de *Rattus norvegicus*, e 29 % com hialuronidase do mesmo mamífero.

Em análise pelo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no site UniProtKB, a sequência de aminoácidos de trealose fosfatase (TPP, número de acesso: Q7PJ67) foi comparada com sequências de TPP de outros organismos. O resultado mostrou que a sequência foi similar em 89 % com a TPP de *A. darlingi* (W5JSV8), 88 % com a enzima TPP de *A. aquasalis* (T1E9M2), seguida por 72 % com a TPP de *Culex quinquefasciatus* (B0WQL2) e 65% com a TPP de *Aedes aegypti* (Q16S69).

Estes organismos desempenham um papel importante como mosquitos vetores de doenças transmitidas por parasitos. *A. darlingi* é o principal vetor da malária no Brasil, *A. aquasalis* é vetor da malária no litoral brasileiro, *C. quinquefasciatus* transmite a filariose bancroftiana, o vírus Oropouche e a febre do Nilo, e, por fim, *A. aegypti* é vetor da febre amarela e dengue.

Quando se analisa a sequência de alinhamento traducional do gene *TPP* que está localizado após a sequência do fator  $\alpha$  do peptídeo sinal do vetor pPIC9, foi possível observar que a tradução está prevista para ocorrer devidamente em fase, gerando uma proteína com 269 resíduos de aminoácidos, incluindo os seis resíduos da cauda de histidina na região C-terminal.

Outras análises com as ferramentas de bioinformática *NetNGlyc 1.0 Server* e *NetOGlyc 4.0 Server* revelaram a existência de dois sítios previstos de N-glicosilação nas posições 38 e 95 e um sítio previsto de O-glicosilação na posição 258. Estes sítios de N- e O-glicosilação são mostrados na figura 21 que mostra o *design* das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína em seu estágio final de construção.

GCTGAATTCATGTCTCATCCAGAGTTCGATCAGTATTTGGGTGACTACCTTCAA **A**  
 GCTGGAGATACTTTAGCCTTGCTGCTTGACTACGATGGAACCTTAGCCGAGCTG  
 ACATCCCATCCAACTTGACCCAGATGAGTGATGCTATGAGAGACAGTCTGCGT  
 AACATCGCCAATTCTGGAAAGGCTTTTGTGGCCGTCATTTCCGGTAGAGACGTT  
 GATGGAGTGAAGGAGAAAATCGGTCTGGAAAACGTTATCTACTCTGGTAACCAT  
 GGATTAGAGGTTTTGTATCCAAACGGTACCAGACATAACCAGGGTATTCCAAGG  
 GATGTTGCCGACAACCTTTGATAAGATGATCGACCAGCTTAATAGAGAGGTTGTC  
 CACCATGGATCTTGGGTGGAGAACAAGCGTGTTTCCATCACTTTCCACTTTAGA  
 GAGGCTGAACAGCAATATGTTCCAGAGATGGCAGCCCGTGCTAAGGAGATCATT  
 GAATCCTACGGTTATCGAGCTAATGCAGCCCACGCTTCCGTTGAAGGAAAGCCA  
 CCTATCCAGTGGAACAAAGGATTAGCTGCCGAGTACATTCTTGGAACCTTCTTTC  
 GACGCAAACCTGGCGACAGAGAAAGGTTCTGTTCGCCGGTGACGATACCACTGAC  
 GAGGATGTTATGCGTATGATCAAGGGTACTGGAAGATCTTCCGTGTCACCAAA  
 GATAAGGACTTGTTACATCCGCTGACTATAAAATTCCTTCTGTGGATGCCGTT  
 TACCATTTATTGAAGTGGATCGAATCCAGAGTCGTTACGCGTCATCACCATCAC  
 CATCACATAAGCGGCCGCGCT

Sítio de *EcoRI*

Azul: sequência do gene de trealose-6-fosfato fosfatase de *A. gambiae* com 810 pb.

Sítio de *MluI*

Códons da cauda de histidina

Códon de terminação

Sítio de *NotI*

MSHPEFDQYLG DY LQAGDTLALLLDYDGT LAELTSHPNLTQMS **B**  
 DAMRDSLRLNIANS GKAFVAVI SGRDVDGVKEKIGLE NVIYSGN  
 HGLEVLYPNGTRHNQGI PRDVADNFDKMI DQLNREVVH HGSWV  
 ENKRVSITFHFREAEQQYVPEMAARAKEI IESYGYRANA AHAS  
 VEGKPIIQWNKGLAAEYILGTSFDANWRQRKVL FAGEDD TDED  
 VMRMIKGTGRSFRVTKDKDLVTSADYKIPSVDAVYHLLK WIES  
 RVVTRHHHHH\*

Azul-escuro: sequência da enzima de trealose-6-fosfato fosfatase de *A. gambiae* com 269 aa.

Sítios de N-glicosilação: **N**

Sítio de O-glicosilação: **S**

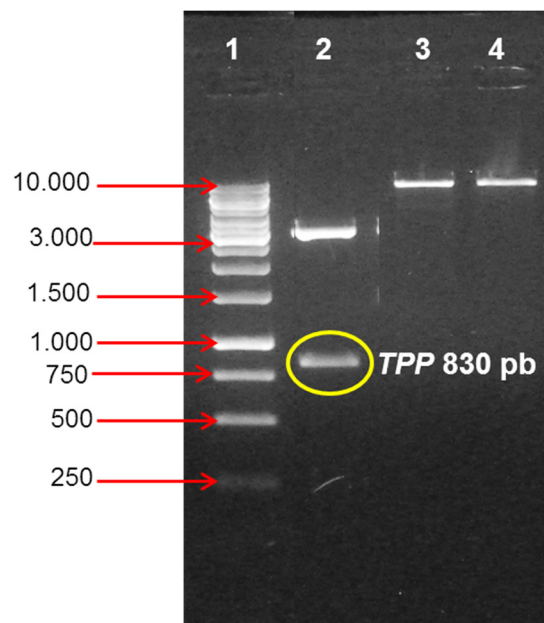
Cauda de histidina: 6 aa

\* - Códon de terminação

**Figura 21:** Sequência nucleotídica e de aminoácidos da enzima TPP de *A. gambiae*. Em **(A)** é mostrada a sequência nucleotídica do gene *TPP* que está situado a montante da sequência do fator  $\alpha$ , bem como os sítios de enzimas de restrição e os códons da cauda de histidina. Em **(B)** é mostrada a tradução em fase, gerando um polipeptídeo de 269 resíduos de aminoácidos incluindo os seis resíduos da cauda de histidina na região C-terminal. Também é mostrada a existência de dois sítios sinais para N-glicosilação (em laranja) e um sítio sinal para O-glicosilação (em azul-claro) na sequência polipeptídica da TPP.

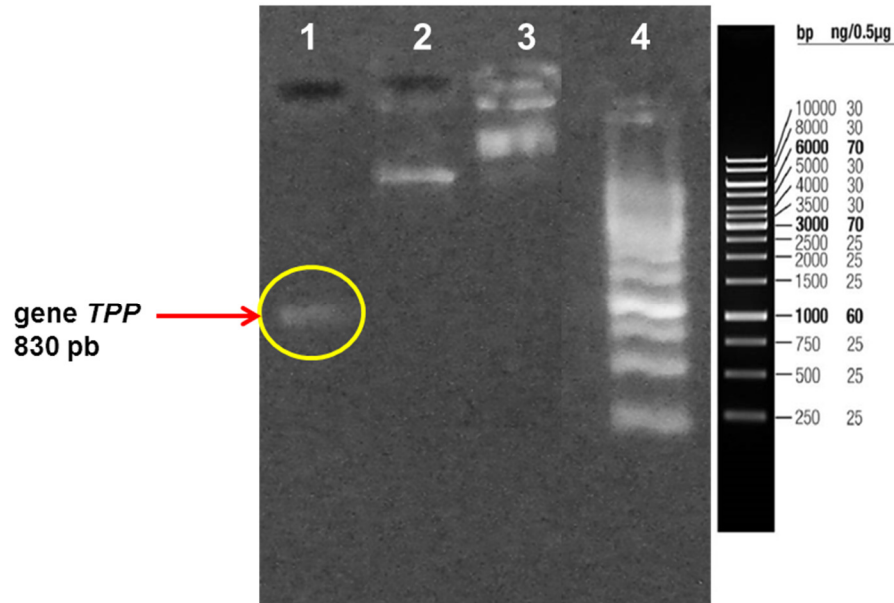
## 6.2 Construção do plasmídeo recombinante pPIC-TPP

A liberação do gene sintético *TPP* de 830 pb do plasmídeo pBSK-Trealose foi realizada por meio de digestão dupla desse vetor com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. O fragmento gênico *TPP* liberado foi purificado e ligado ao múltiplo sítio de clonagem do vetor pPIC9, previamente linearizado com as mesmas endonucleases. Na figura 22 são mostrados os perfis eletroforéticos resultantes da digestão do plasmídeo pBSK-Trealose, onde é mostrado o fragmento gênico com tamanho correto em pares de base, correspondente ao gene *TPP*, e o vetor linearizado.



**Figura 22:** Perfil eletroforético em gel 0,8 % de agarose do resultado da dupla digestão do plasmídeo pBSK-trealose com as endonucleases *EcoRI* e *NotI*. 1- Marcador GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas); 2- pBSK-trealose digerido com *EcoRI/NotI*; 3- pPIC9 digerido com *EcoRI*; 4- pPIC9 digerido com *NotI*.

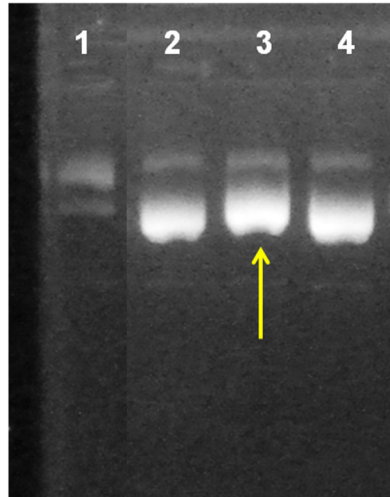
Após a análise por eletroforese da digestão dupla tanto do plasmídeo pBSK-trealose, que liberou o fragmento gênico *TPP*, quanto do vetor pPIC9 linearizado, sendo que estes foram submetidos previamente à purificação, o inserto *TPP* e o vetor pPIC9 linearizado foram ligados com T4 DNA ligase e o produto dessa ligação foi usado para transformar *E. coli* DH10B. Na figura 23 é apresentado o resultado da digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* dos plasmídeos recombinantes clonados em *E. coli* DH10B, que abrigaram o novo sistema pPIC-TPP.



**Figura 23:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % do resultado da digestão dupla com as enzimas *EcoRI* e *NotI* após purificação do gene *TPP*. 1- gene da trealose fosfatase; 2- pPIC9 digerido com *EcoRI* e *NotI*; 3- pPIC9 não digerido; 4- Marcador GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

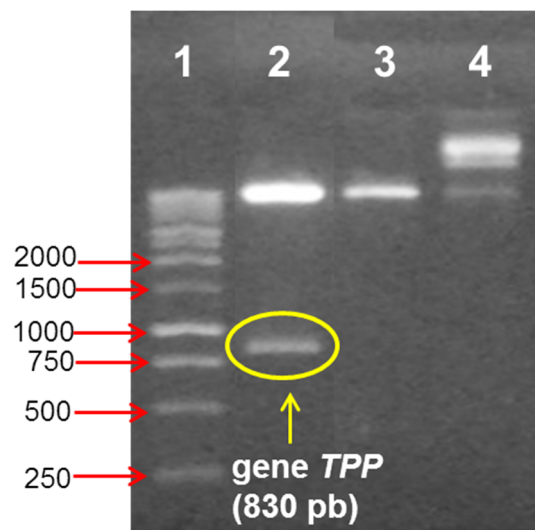
Na figura 24 é mostrado o mapa físico do plasmídeo recombinante pPIC-TPP após os procedimentos de purificação, como resultado da inserção do gene *TPP* no vetor de expressão/secreção pPIC9. O gene está localizado a montante do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, que funciona como um peptídeo sinal e, por isso, coordena a secreção da proteína heteróloga em sistemas de expressão.





**Figura 25:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % dos plasmídeos recombinantes extraídos dos clones de *E. coli*, transformados geneticamente. (1) pPIC9 sem inserto; (2) clone 1 da trealose fosfatase; (3) clone 2 da trealose fosfatase; (4) clone 3 da trealose fosfatase.

O clone transformante identificado pela seta na figura 25 foi selecionado para experimentos posteriores de extração do DNA plasmidial e confirmação da correta construção do vetor recombinante pPIC-TPP por análise de restrição endonucleásica. Na figura 26, é apresentado o perfil eletroforético dessa análise, confirmando a correta construção do vetor recombinante pPIC-TPP: os fragmentos liberados correspondem ao tamanho do vetor pPIC9 (8023 pb) e do gene *TPP* (830 pb).



**Figura 26:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 % mostrando o produto da digestão dupla do plasmídeo recombinante pPIC-TPP com *EcoRI* e *NotI*. (1) Marcador GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas); (2) gene da trealose fosfatase; (3) pPIC9 sem inserto digerido com *EcoRI* e *NotI*; (4) pPIC9 não digerido.

Após essa confirmação, seguiram-se os experimentos de subclonagem e expressão na cepa de levedura *P. pastoris* GS115 que foi transformada por eletroporação, abrigoando o DNA plasmidial com o gene *TPP*. Uma placa com meio MD foi utilizada para a seleção dos clones transformantes de *P. pastoris*, submetidos a crescimento por 72h.

A placa com meio MD apresentou um alto crescimento de colônias transformantes da levedura após 72 h de crescimento. Neste momento, foi realizada a seleção dos clones transformantes que seriam utilizados a partir de então. Os clones escolhidos foram transferidos, por meio de palitos estéreis, para uma placa com meio BMGY. O objetivo do crescimento em meio BMGY é obter aumento da massa celular dos clones crescidos em meio MD, já que este último não oferece nutrientes essenciais para o crescimento da massa de células, por se tratar de um meio mínimo com glicose e sem histidina, útil apenas na seleção de células transformantes de *P. pastoris*.

### **6.3 Análise por *colony blot* e *Western blotting* da proteína recombinante no sobrenadante da cultura**

Testes de *colony blot*, após indução por 72 h em meio BMMY suplementado com 0,5 % de metanol, com anticorpo contra cauda de histidina, foram necessários para confirmar ou não clones positivos na expressão heteróloga de trealose fosfatase.

A indução com metanol é necessária com a finalidade de se obter uma boa expressão da enzima TPP subclonada em *P. pastoris*. A indução revelou que as linhagens de *P. pastoris* recombinante cresceram continuamente durante todo o período, indicando a capacidade dessas células em metabolizar o metanol para geração de energia e constituintes celulares.

Isto é devido ao promotor AOX de *P. pastoris* ser regulado transcricionalmente por metanol, sendo considerado um forte promotor usado para transcrever genes heterólogos. Entretanto, para ser ativado, o promotor AOX1 requer a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Por isso, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores.

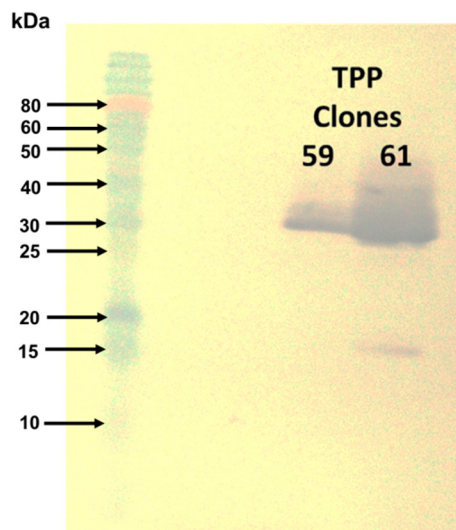


Com o término da indução por 72 h, a expressão da proteína TPP nos clones transformantes de *P. pastoris* foi confirmada em um processo de duas etapas:

Na primeira etapa, os clones foram submetidos ao teste de *colony blot* que consiste em transferir por um período de 4 h a colônia marcada com *his<sup>6</sup>-tag* para uma membrana de nitrocelulose por meio da imobilização desta molécula imunogênica. O princípio do método é muito semelhante aos experimentos de *Northern blotting*. Após as 4 h de transferência, foram prosseguidos os passos do teste de *colony blot* descritos na seção 5.11 de Materiais e Métodos.

O resultado desta primeira etapa indicou que dos quarenta clones previamente selecionados em meio MD, apenas dois foram positivos na expressão da enzima TPP. Estes clones foram identificados como TPP 59 e TPP 61, os quais foram submetidos à indução por metanol por um novo período de 72 h em meio BMMY líquido.

A segunda etapa consistiu na análise em *Western blotting* da expressão da proteína TPP nos clones TPP 59 e TPP 61. A figura 27 mostra o resultado do teste com anticorpo contra cauda de poli-histidina na porção C-terminal.



**Figura 27:** *Western blotting* dos clones induzidos por 72 h em meio BMMY após o teste de *colony blot* em placa. O marcador de proteína utilizado foi *Color Plus Prestained Protein Ladder Broad Range 10-230 kDa* (Biolabs). Massas moleculares em kDa são indicadas no lado direito da figura.

Conforme indica a figura 27, os clones TPP 59 e TPP 61 foram positivos na expressão da enzima TPP, demonstrando que a clonagem e expressão da proteína heteróloga em *P. pastoris* foi bem-sucedida. Além disso, o resultado indica que a proteína TPP foi eficientemente secretada no sobrenadante da cultura. A presença

da cauda de histidina na porção C-terminal do gene sintético de *TPP*, sustenta esse dado.

Este resultado é suportado pelo fato que a análise por *Western blotting* ser altamente específica na detecção de proteínas ou moléculas marcadas (cauda de histidina, por exemplo), principalmente quando o anticorpo é de origem murina (camundongos, *Mus musculus*), pois estes anticorpos são monoclonais e mais específicos na detecção de moléculas marcadas do que os anticorpos policlonais de origem leporina (coelhos), que são mais sensíveis, porém menos específicos e, portanto, suscetíveis a resultados falso-positivos. Uma elucidação disso é feita por Edavana e colaboradores (2004) quando relatam que anticorpos policlonais contra a proteína TPP de 27 kDa de *M. smegmatis* não reagiram com a proteína TPP de 45 kDa na análise em gel ou pelo *Western blotting*, tampouco o anticorpo contra a proteína de 45 kDa fez reação cruzada com a proteína de 27 kDa.

Como se observa na figura 26, os clones para a TPP apresentaram alta expressão e secreção, destacando-se entre eles o clone TPP 61, cuja expressão foi mais proeminente do que a do clone TPP 59. Este resultado mostra, ainda, que o tempo de 72 h é um bom período para a expressão da enzima TPP recombinante nos dois clones, particularmente no clone TPP 61. Pelo fato do clone TPP 61 ter apresentado expressão mais acentuada da enzima, este foi escolhido para os estudos de caracterização da enzima.

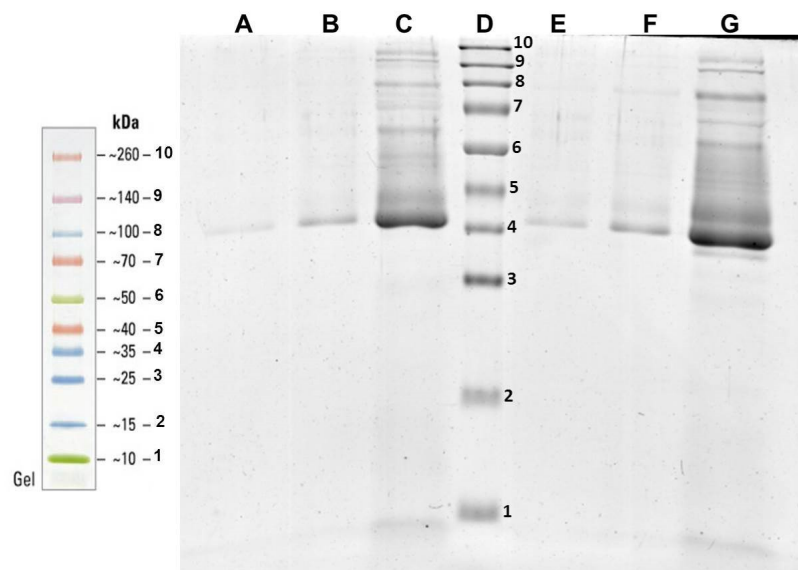
#### **6.4 Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes concentrados dos clones recombinantes TPP 59 e TPP 61**

Com a confirmação da expressão e secreção da enzima TPP no sobrenadante dos dois clones, a partir do *Western blotting*, foi sugerida uma nova indução com os mesmos parâmetros determinados para os testes anteriores.

O sobrenadante dos clones TPP 59 e TPP 61, após centrifugação, foram recuperados em 50 mL de cultura induzida, filtrados e armazenados. Dois mililitros de cada clone foram separados para serem concentrados por ultrafiltração (Amicon com corte de massa de 10 kDa, Millipore). As amostras tiveram seus volumes reduzidos a 40 µL após quatro ciclos de centrifugação, indicando que as mesmas foram concentradas 50 vezes em relação ao seu volume inicial.

O concentrador Amicon é aplicado para a concentração de amostras biológicas contendo proteínas de interesse, além de servir como um meio de purificação de componentes macromoleculares encontrados em extratos de cultura tecidual ou lisado celular onde a seleção e exclusão é feita por tamanho, dependendo do diâmetro do poro da membrana de filtração (MILLIPORE, 2012).

A análise em gel SDS-PAGE 15 % dos sobrenadantes concentrados dos clones recombinantes TPP 59 e TPP 61 é mostrada na figura 28.



**Figura 28:** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 15 % de diferentes quantidades de clones TPP 59 e TPP 61. **A-** TPP 59 dil. 1:25; **B-** TPP 59 dil. 1:10; **C-** TPP 59 concentrado; **D-** Marcador *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); **E-** TPP 61 dil. 1:25; **F-** TPP 61 dil. 1:10; **G-** TPP 61 concentrado. Os números indicam os tamanhos aproximados do marcador mostrado no lado direito da figura.

Conforme mostra a figura 28, os clones apresentam a proteína TPP recombinante com tamanho maior do que o esperado para a proteína nativa. Em análise de bioinformática, usando os portais de pesquisa *ExpPASy* e *ProtParam*, a massa molecular estimada de TPP não glicosilada foi de 29,3 kDa. No entanto, com base no SDS-PAGE de proteínas mostrado, a banda correspondente à TPP recombinante teve migração eletroforética equivalente à massa de 36 kDa.

Considerando-se a existência de dois sítios potenciais de N-glicosilação e um de O-glicosilação na sequência polipeptídica de TPP (ver figura 20), e que a glicosilação afeta a migração eletroforética das proteínas no gel SDS-PAGE, infere-se que a elevação da massa estimada da TPP recombinante de 29,3 kDa para

aproximadamente 36 kDa, obtida nos experimentos realizados neste trabalho, deve ser resultado da ocorrência de glicosilação durante o processamento pós-traducional da proteína recombinante na via de secreção.

A presença de proteínas glicosiladas nos insetos foi classificada no estudo de Vandendorre e colaboradores (2011), tendo como base os processos biológicos no qual estas proteínas estão envolvidas. Neste estudo, uma grande parte das glicoproteínas foi associada com muitos processos metabólicos. Quando as proteínas foram categorizadas de acordo com a sua função molecular, algumas delas estiveram envolvidas com a atividade de hidrolase, sendo 19 % em *Tribolium castaneum*, 34 % em *Bombix mori*, 27 % em *Apis mellifera*, 31 % em *Drosophila melanogaster* e 27 % em *Acyrtosiphon pisum*.

Tang e colaboradores (2011) demonstraram que a outra enzima da via de síntese de trealose, a trealose-6-fosfato sintase (TPS), também contém sítios prováveis de glicosilação quando realizou estudos de clonagem e expressão do cDNA de TPS de *Catantops pinguis*. A presença de sítios de glicosilação é bem distribuída em muitas enzimas como proteases, esterases, hidrolases, lipases ou fosfatases encontradas em diferentes espécies de insetos.

O perfil eletroforético de proteínas glicosiladas expressas pode apresentar variações também em animais vertebrados, como demonstra o estudo de Flintegaard e colaboradores (2010) onde uma variante recombinante N-glicosilada do GH humano teve migração em gel SDS-PAGE com mobilidade correspondente à massa aproximada de 25 kDa, enquanto que no tipo natural não glicosilado a migração correspondeu à massa de 22 kDa, corroborando com a suposição levantada por Pinto (2012) de que o GH de tambaqui clonado e expresso por ele em *P. pastoris* encontra-se na forma glicosilada, onde a análise em SDS-PAGE mostrou migração eletroforética equivalente à massa de 23 kDa comparada com a do GH recombinante não glicosilado de 21,5 kDa.

O efeito da glicosilação sobre o tamanho da proteína é verificado por Volpert e colaboradores (2014) quando foram expressas e comparadas três variantes recombinantes da proteína CRISP3 de ratos. Pela análise de *Western blotting*, a proteína recombinante com dois sítios de glicosilação apresentou um tamanho aproximado de 35 kDa, já a proteína com um sítio de glicosilação mostrou um tamanho aproximado de 30 kDa, enquanto que a proteína recombinante sem sítio de

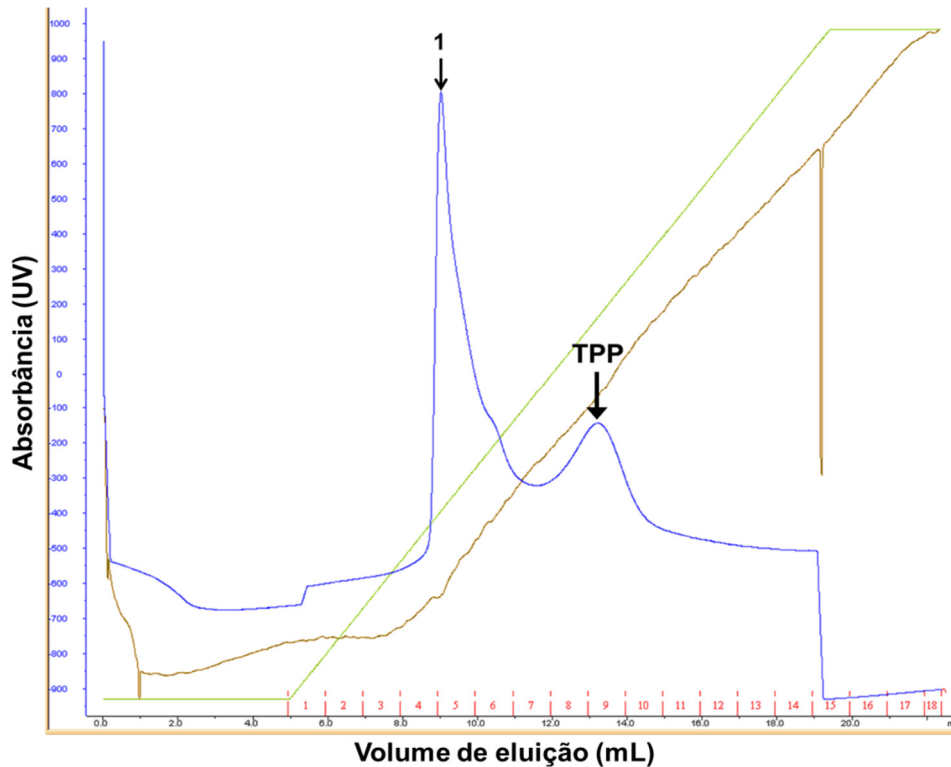
glicosilação apresentou um tamanho de 25 kDa, o mesmo observado para a proteína nativa isolada da glândula salivar que não é glicosilada.

Em análise de bioinformática, por meio do portal *ProtParam*, a meia-vida da TPP recombinante não glicosilada pôde ser estimada em 30 h em células de mamíferos *in vitro*, >20 h em células de leveduras *in vivo* e >10 h em células de *E. coli in vivo*. O ponto isoelétrico (pI) teórico da TPP recombinante foi de 5,6.

Estudos com proteínas heterólogas em *P. pastoris* têm demonstrado que os níveis de expressão de uma proteína recombinante nessa levedura dependem de vários fatores, dentre os quais estão a sequência nativa do cDNA a ser expresso, o *codon bias*, o número de cópias do cassete de expressão integrado ao genoma da levedura, a temperatura, o pH, o tempo de indução, a concentração do indutor e a aeração (CREGG et al., 1993; D'ANJOU e DAUGULIS, 2000; DAMASCENO et al., 2004; KHATRI, 2011).

## **6.5 Purificação da trealose fosfatase recombinante a partir do sobrenadante do clone TPP 61**

Utilizou-se para purificar a TPP, após a concentração por ultrafiltração em Amicon, a cromatografia de afinidade com resina de Ni<sup>2+</sup>. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 29 a seguir.



**Figura 29:** Perfil cromatográfico de afinidade em  $\text{Ni}^{2+}$  (HisTrap HP) para purificação de trealose fosfatase. A seta maior indica o pico da proteína ao ser eluída com aproximadamente 300 mM de imidazol. O número 1 indica o pico formado por proteínas contaminantes. No eixo y, absorbância em UV da proteína eluída no tampão B. No eixo x, volume de eluição em mL. Gradiente da concentração do Imidazol é mostrado pela linha ascendente verde. Em vermelho, as frações coletadas.

Durante a eluição inicial com o tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM pH 7,4 foi obtido um pico de atividade de trealose fosfatase contido nas frações 8, 9 e 10. De acordo com o perfil de purificação, a enzima TPP foi eluída em 60 % da concentração total de imidazol presente no tampão de eluição, ou seja, em 300 mM de imidazol. Ainda, de acordo com o perfil cromatográfico da figura 29, verifica-se que a atividade da TPP foi obtida em um único pico.

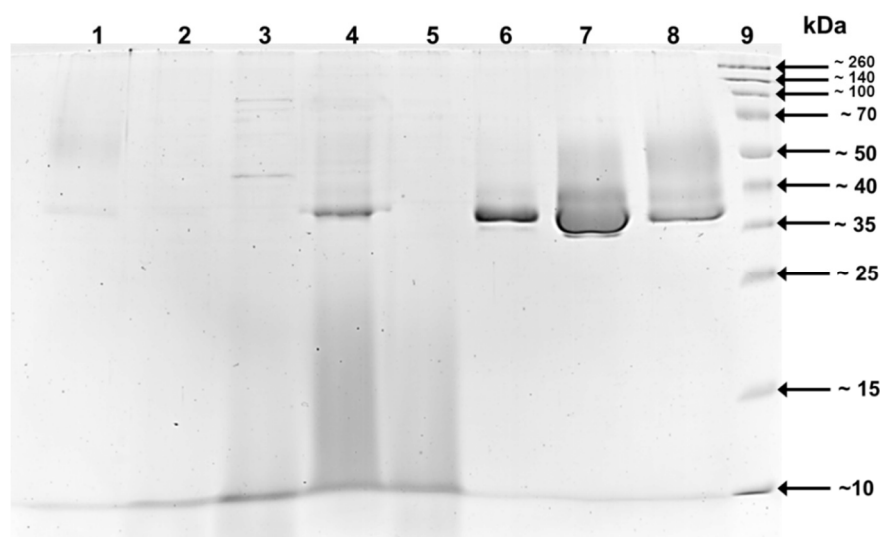
Comportamentos distintos foram observados na purificação da enzima TPP, objeto deste estudo pelo mesmo procedimento utilizado, em comparação com a enzima identificada em outras espécies de organismos. Li e colaboradores (2012) purificaram a enzima TPP da bactéria psicrotrofica *Arthrobacter* sp. cepa A3 quando a mesma foi eluída com 250 mM de imidazol. Comportamentos semelhantes a este, em relação à concentração de imidazol, também são relatados em outros trabalhos (KLUTTS et al., 2003; EDAVANA et al., 2004; KUSHWAHA et al., 2011). Petruzzello

(2009) obteve a purificação da enzima TPP de *Herbaspirillum seropedicae* quando esta foi eluída em 240 mM de imidazol.

Por outro lado, a levedura *P. pastoris* é conhecida por secretar em meio de cultura uma baixa quantidade de proteínas homólogas, o que facilita o processo de purificação de proteínas.

Durante o procedimento de purificação foi observado que a enzima TPP purificada obteve uma absorbância em torno de 200 nm observada durante o pico de atividade, conforme mostra a figura 29. Este pico de absorbância em UV foi verificado nas frações eluídas 8, 9 e 10, e isto se deve porque determinadas proteínas possuem diferente absorção para diferentes comprimentos de onda, em virtude da composição destas proteínas com os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são os principais responsáveis pela absorção de luz das proteínas, por possuírem o anel benzênico em sua estrutura química, além da ligação peptídica, que devido à presença da carbonila, também absorve luz.

A enzima TPP purificada foi submetida à análise em gel SDS-PAGE 15 %. Foram submetidas a esta análise as frações 5, 6, 7, 8, 9 e 10, assim como o eluato da lavagem da coluna (denominada de sobrenadante recuperado) e o clone TPP 61 concentrado em Amicon. O resultado da análise em SDS-PAGE é mostrado na figura 30.



**Figura 30:** Perfil eletroforético da análise em gel SDS-PAGE 15 % da enzima TPP purificada por cromatografia de afinidade do clone TPP 61. **1-** Fração 7; **2-** Fração 6; **3-** Fração 5; **4-** TPP 61 não purificada; **5-** Eluato do tampão de lavagem; **6-** Fração 10; **7-** Fração 9; **8-** Fração 8; **9-** Marcador *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); kDa- massas moleculares aproximadas do marcador variando de 10 a 260 kDa.

Conforme mostra a figura 30, a enzima TPP foi eluída em grande quantidade na fração 9, em comparação com as frações 8 e 10. Além disso, de acordo com o perfil eletroforético da figura 28, a enzima recombinante observada nas três frações (8, 9 e 10) apresenta uma massa molecular em torno de 36 kDa. Esta mesma massa também é verificada no controle positivo (TPP 61 não purificada).

A quantificação da proteína total pelo método do BCA da enzima eluída nas frações 8, 9 e 10 indicou as seguintes concentrações totais: 215,9 µg/mL na fração 8; 206,6 µg/mL na fração 9; e 203,4 µg/mL na fração 10. Os dados relatados neste trabalho mostram que a concentração de proteína total pode variar entre os clones recombinantes, conforme as condições de clonagem e expressão.

A clonagem e expressão desta enzima em espécies de reinos diferentes também mostra resultados variados em relação ao tamanho. Klutts e colaboradores (2003) determinaram o peso molecular da enzima recombinante de *M. smegmatis* em torno de 27 kDa, com base na purificação por gel de filtração. Petruzziello (2009) ao estudar a enzima TPP de *H. seropedicae* clonada em *E. coli*, demonstrou, por análise em gel, que a enzima purificada do sobrenadante apresentou um tamanho de 28 kDa. Edavana e colaboradores (2004) clonaram e expressaram o cDNA da enzima TPP de *M. tuberculosis* em *E. coli* e confirmaram, após purificação em coluna de níquel, que a mesma possui um tamanho de 45 kDa.

Trabalhos pioneiros de caracterização da enzima TPP, tendo como fonte de origem os insetos, demonstram que a mesma apresenta tamanhos variados de espécie para espécie. Friedman e Hsueh (1979) ao caracterizarem a enzima da barata (*P. americana*), identificaram-na com um tamanho de 108 kDa. Friedman (1971) isolou a TPP da mosca varejeira (*P. regina*), determinando seu peso molecular em 26 kDa.

Desta forma, verifica-se que a enzima possui tamanhos que variam de organismo para organismo, independente do reino ao qual pertençam. Por ora, atesta-se, por meio da análise qualitativa, que a enzima TPP recombinante de *A. gambiae*, subclonada em *P. pastoris*, foi expressa com um tamanho aproximado de 36 kDa, cujo resultado acima do esperado (29,3 kDa) deve-se, muito provavelmente, aos sítios de N- e O-glicosilação que a enzima em discussão apresenta na sua sequência de aminoácidos, quando submetida à análise em *sites* especializados na predição de sítios de glicosilação.



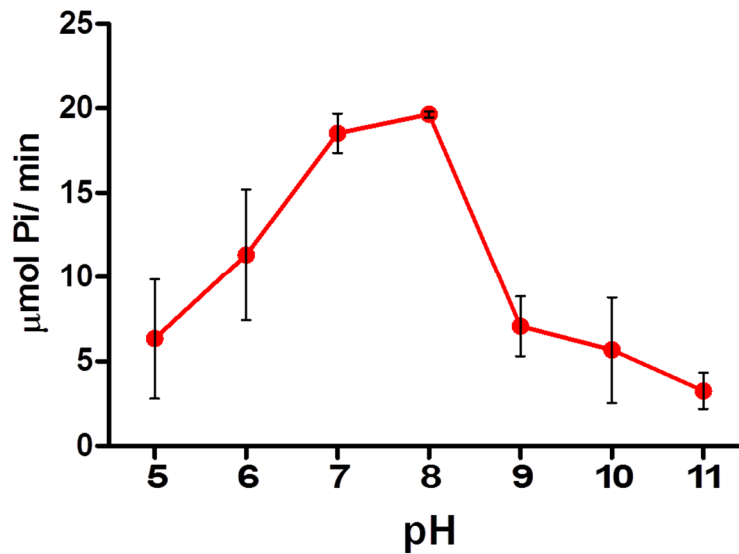
## 6.6 Caracterização bioquímica da enzima TPP recombinante

A cinética enzimática lida com fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os fatores mais importantes são a concentração da enzima, concentrações de ligantes (substratos, inibidores, ativadores), pH, força iônica e temperatura. Quando estes fatores são analisados apropriadamente, é possível conhecer-se sobre a natureza da reação enzimática. Constantes cinéticas, como  $K_M$  e  $V_{máx}$ , podem ser determinadas e, a partir destas, pode-se deduzir as concentrações intracelulares de substratos e produtos e o sentido fisiológico da reação. De outro modo, a cinética de uma reação pode indicar o modo pelo qual a atividade da enzima é regulada *in vivo* (SEGEL, 1979).

Em decorrência disso, a fração 10 purificada da enzima TPP recombinante foi analisada bioquimicamente quanto aos pH e temperatura de melhor ação catalítica, seus parâmetros cinéticos e teste com inibidores químicos.

### 6.6.1 Atividade enzimática em diferentes pHs

As variações no pH podem exercer muitas alterações nas reações catalisadas por enzimas. A enzima TPP recombinante teve o pH de melhor atividade avaliada sob o efeito do tampão MES-Tris-Glicina com potencial hidrogeniônico variando de 5,0 a 11,0 com intervalos de 1,0 ponto. O resultado da atividade enzimática do clone TPP 61 nos diferentes pHs pode ser observado na figura 31.



**Figura 31:** Efeito do pH sobre a atividade da TPP recombinante da fração 10 purificada.

Os dados mostram que a enzima secretada por *P. pastoris* apresenta melhor funcionalidade entre os pHs 7,0 e 8,0, tendo atividade enzimática máxima no pH 8,0. A ação catalítica da enzima recombinante da fração 10 foi medida pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado na reação. Desta forma, a enzima TPP liberou 19,65  $\mu\text{mol Pi/min}$  no pH 8,0, onde se obteve o máximo de atividade sendo considerado, portanto, o pH ótimo da enzima. Em relação ao pH 7,0 a atividade catalítica da enzima foi de 18,53  $\mu\text{mol/min}$ .

Quando exposta a pHs ácidos a enzima TPP apresenta uma atividade relativamente maior comparado com os pHs alcalinos. Nos pHs 5,0 e 6,0 a atividade foi de 6,34  $\mu\text{mol/min}$  e 11,32  $\mu\text{mol/min}$ , respectivamente. Por outro lado, nos pHs alcalinos a atividade enzimática foi de 7,08  $\mu\text{mol Pi/min}$  para o pH 9,0, 5,67  $\mu\text{mol Pi/min}$  para o pH 10,0 e 3,25  $\mu\text{mol Pi/min}$  para o pH 11,0.

O pH ótimo para trealose fosfatase varia muito de organismo para organismo. Em micro-organismos varia de 5,0 a 7,5 (KLUTTS et al., 2003; EDAVANA et al., 2004; LI et al., 2012). Em plantas, a enzima possui maior atividade em pHs que variam de 6,5 a 7,0 como relatado por Shima e colaboradores (2007). Dentre a classe de animais estudados, a enzima TPP do protozoário *Brugia malayi* apresentou pico de atividade no pH 7,0 (KUSHWAHA et al., 2011).

Entre a classe dos insetos, a enzima TPP da barata *P. americana* tem sua máxima atividade no pH 7,0 (FRIEDMAN e HSUEH, 1979), do mesmo modo que a

TPP da mosca varejeira (*P. regina*) que apresenta melhor atividade no pH 7,0, mantendo uma relativa atividade entre pH 6,0 e 8,5 (FRIEDMAN, 1966). Como pode ser verificado o pH ótimo desta enzima não possui uma variação tão marcante entre as diferentes classes de organismos.

O fato de o pH influenciar a velocidade de uma reação enzimática é decorrente de que os sítios ativos nas enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo, liguem-se a substratos e catalisem a reação. Além disso, os próprios substratos podem conter grupos ionizáveis e, normalmente, somente uma forma iônica deste substrato pode se ligar à enzima ou sofrer catálise.

De outro modo, a estabilidade de uma enzima ao pH depende de fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima. Em muitos casos, um substrato pode induzir uma mudança conformacional na enzima para uma forma que será mais ou menos resistente à desnaturação pelo pH (SEGEL, 1979).

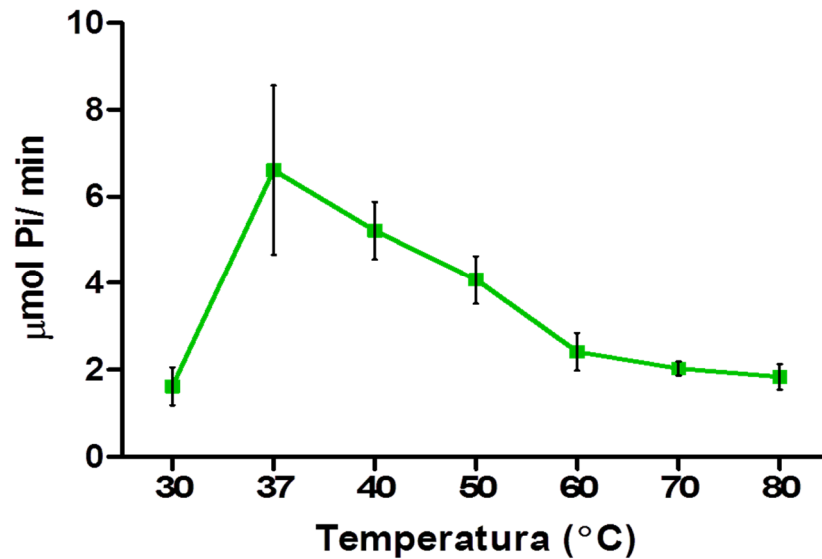
Características diferenciadas de enzimas produzidas no sistema de expressão heteróloga de *P. pastoris* pode ser devido à habilidade da levedura em realizar diversas modificações pós-traducionais. Variações na ação catalítica da enzima em diferentes pHs pode ser dada pelas características dos próprios aminoácidos constituintes da enzima recombinante que, dependendo de suas cadeias laterais, agem como ácidos ou bases fracos e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima, alterando, por fim, sua funcionalidade.

### **6.6.2 Atividade enzimática em diferentes temperaturas**

A temperatura é um dos fatores que muito influenciam na eficiência da atividade enzimática, pois pode aumentar ou diminuir a energia disponível para as reações. Muitas vezes, pode ser considerado um fator limitante para a utilização de certas enzimas ou proteínas, principalmente em processos industriais.

A TPP purificada (fração 10) foi avaliada, em primeiro momento, para a determinação de atividade máxima nas temperaturas que variaram de 30 °C a 80 °C em tampão Tris-HCl pH 8,0 como pode ser visto na figura 32. Em seguida, foi

avaliada sua ação catalítica em uma faixa mais restrita de temperatura, variando entre 30 °C a 40 °C (figura 33).

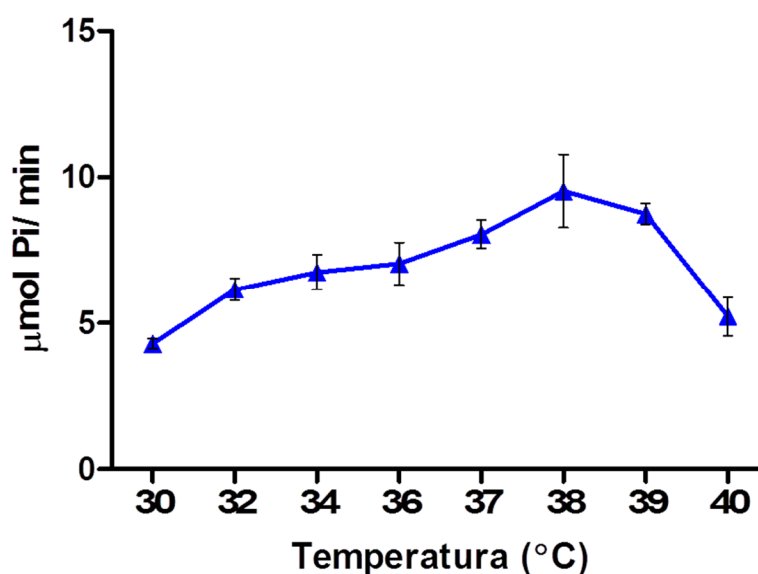


**Figura 32:** Efeito da temperatura na atividade de fosfatase da TPP purificada.

Pela observação da figura 32, nota-se que a enzima TPP obteve um pico de atividade na temperatura de 37 °C correspondente a 6,61 μmol Pi/min, sendo esta temperatura utilizada desde os primeiros ensaios com a TPP recombinante.

Na temperatura de 40 °C, a TPP recombinante apresentou atividade de 5,22 μmol Pi/min, e em 50 °C 4,08 μmol de Pi/min, indicando uma atividade 15 % menor em 40 °C e cerca de 35 % menor em 50 °C. A partir da temperatura de 40 °C, a atividade da enzima TPP foi diminuindo até os níveis de 2 μmol Pi/min quando esta foi submetida às temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C, mantendo cerca de 30 % de sua atividade registrada na temperatura de 37 °C.

A partir do resultado resolveu-se fazer um novo experimento para avaliar a atividade da enzima TPP em função da temperatura, porém foram analisadas novas temperaturas entre 30 °C e 40 °C, como pode ser verificado na figura 33 a seguir.



**Figura 33:** Determinação da temperatura ótima da enzima TPP recombinante a partir de uma faixa de temperatura restrita entre 30 °C – 40 °C.

Conforme visto na figura acima, a temperatura de 38 °C apresentou a atividade máxima da enzima TPP recombinante, liberando 9,53 μmol Pi/min, bem maior do que o demonstrado por outras faixas de temperatura analisadas. A partir deste resultado, a temperatura de 38 °C foi considerada a temperatura ótima para a atividade catalítica de TPP.

Neste segundo teste, verifica-se que à medida que a temperatura foi aumentando gradativamente nas condições experimentais, a atividade enzimática de TPP também aumentou até 38 °C, onde a enzima alcançou a sua ação catalítica máxima. A partir de 39 °C e 40 °C, os níveis de Pi liberado na reação foi diminuindo, até chegar em torno de 5 μmol/min (40 °C), valor compatível com a temperatura indicada na figura 32.

Outras enzimas TPP recombinantes apresentaram baixa atividade quando submetidas a temperaturas elevadas. Um estudo com TPP de arroz indicou que a enzima TPP foi completamente inativada após incubação a 50 °C por 4 min, demonstrando que esta é termolábil. Os dados sugerem, ainda, que a taxa de renovação desta enzima é relativamente alta e que sua rápida renovação seria em permitir um forte controle dos níveis de trealose e trealose-6-fosfato nas células, já que estes compostos estão envolvidos na regulação de respostas ao estresse em plantas superiores (SHIMA et al., 2007). A enzima TPP da bactéria psicrotrofica

*Arthrobacter* sp. perdeu 70% de sua atividade quando submetida à temperatura de 50 °C por 6 min (LI et al., 2012). Em contrapartida, a enzima TPP de *M. smegmatis* não perdeu atividade, mesmo com incubação por 6 min a 60 °C (KLUTTS et al., 2003), e a TPP de *E. coli* perdeu somente 10 % de sua atividade original após incubação por 30 min a 50 °C (SEO et al., 2000).

Na literatura a atividade máxima da enzima varia de acordo com a espécie estudada. A TPP pode apresentar pico de atividade em altas temperaturas como 50°C para *H. seropedicae* (PETRUZZIELLO, 2009) ou, até mesmo, 70 °C como reportado para *Thermus thermophilus* (SILVA et al., 2005). Em outros casos, pode manter-se constante em uma faixa de temperatura que varia de 30 °C a 50 °C (SEO et al., 2000; LI et al., 2012). Por outro lado, a enzima pode ter um pico de atividade na temperatura fisiológica de 37 °C como foi relatado para a TPP do protozoário *B. malayi*, agente etiológico da filariose linfática juntamente com *Wuchereria bancrofti* e *Brugia timori* (KUSHWAHA et al., 2011). Quanto aos insetos, na mosca varejeira *P. regina*, a trealose fosfatase obteve sua melhor atividade na temperatura de 46 °C, mantendo 85 % de atividade a 57 °C por 15 min (FRIEDMAN, 1966). Esses resultados indicam que a TPP também demonstra possuir perfis de temperatura muito variados, assim como é demonstrado para o perfil de pH.

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática deve ser entendida em dois diferentes cenários. Em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos da velocidade da reação por aumentar a energia cinética das moléculas do sistema, ocasionando um maior número de colisões produtivas entre a enzima e o substrato por unidade de tempo. Já as temperaturas acima do intervalo compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima alteram interações fracas intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio, que mantêm sua estrutura tridimensional, ocasionando a perda da conformação nativa e poder de catálise enzimática, visto que a molécula absorve energia demais, sua estrutura terciária se rompe e a enzima desnatura.

Por outro lado, o efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH e a força iônica do meio na presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor porque na interação enzima-substrato, a partir de interações fracas e não covalentes, pequena quantidade de energia é liberada, e a energia derivada dessa interação é chamada de energia de ligação, que é a principal

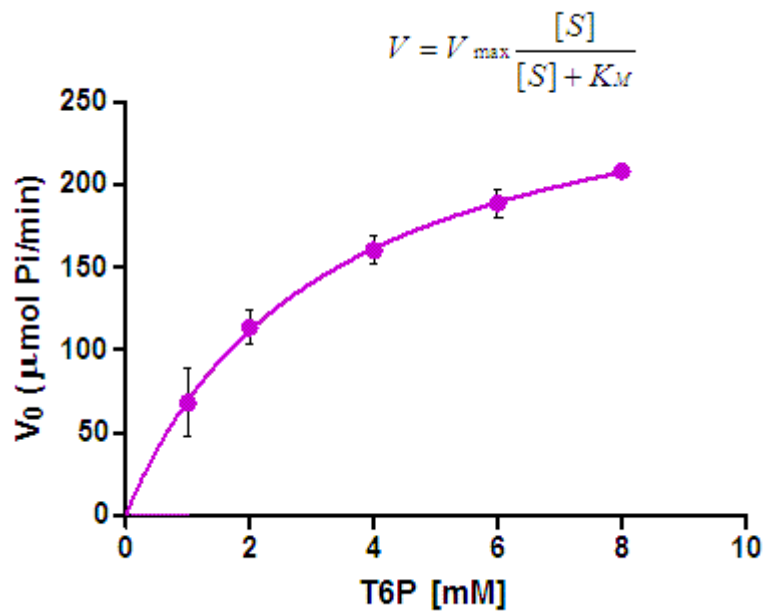
fonte de energia livre utilizada pelas enzimas para acelerar reações (COX et al., 2012).

Enzimas de baixo peso molecular compostas de uma única cadeia polipeptídica, e possuindo ligações dissulfeto, são mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas. Isto porque as ligações dissulfeto mantêm as porções da enzima unidas, tornando-a mais estável se enovelada na forma correta. Além disso, essas pontes são frequentes em proteínas secretadas para o meio extracelular e, raramente, encontradas em proteínas intracelulares, devido o caráter redutor dos ambientes intracelulares que as tornam instáveis no citoplasma. Além disso, as enzimas monoméricas são formadas por um único sítio ativo, ao contrário das oligoméricas que podem possuir diversos sítios de atividade catalítica, formando complexos multi-enzimáticos (DAMODARAN et al., 2010).

### **6.6.3 Constantes Cinéticas**

A atividade da enzima foi testada em função de diferentes concentrações do substrato trealose-6-fosfato. O aumento da concentração do substrato eleva a velocidade de reação, mas somente até um determinado ponto que corresponde ao valor da concentração de trealose-6-fosfato em que a capacidade catalítica da TPP atinge o máximo (velocidade máxima), não aumentando mesmo que a concentração do substrato seja aumentada. A figura 34 demonstra essa relação onde a velocidade da atividade da TPP é crescente até certas concentrações de trealose-6-fosfato.

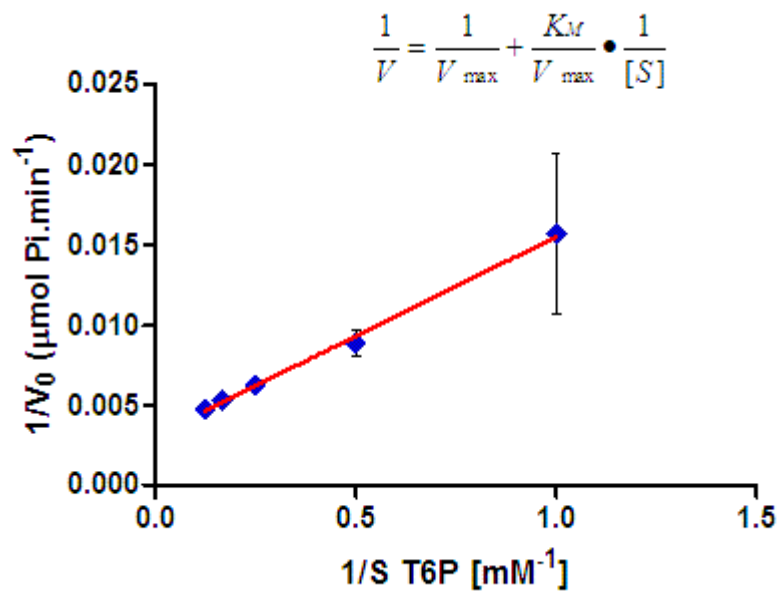
A atividade enzimática da TPP recombinante foi avaliada pela liberação de fosfato inorgânico no ensaio para fosfatase (BARTLETT, 1959; BAGINSKI et al., 1967; FRIEDMAN e HSEUH, 1979). A enzima possui atividade específica para o substrato trealose-6-fosfato, onde o radical éster fosfato é liberado, resultando na formação do dissacarídeo trealose na presença de água, o que é característico das enzimas da família hidrolase com atividade de fosfatase (KLUTTS et al., 2003; KORMISH e MCGHEE, 2005; RAO et al., 2006; ELBEIN, 2009).



**Figura 34:** Curva de Michaelis-Menten onde é expressa a velocidade inicial da reação em função da concentração do substrato.

Para estimativa de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foi construído o gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk apresentado na figura 35. Esse tipo de gráfico é resultado da relação dos valores inversos da velocidade inicial ( $V_0$ ) e concentração do substrato  $[S]$  que terá inclinação  $K_M/V_{m\acute{a}x}$  na qual a intercepção será  $1/V_{m\acute{a}x}$  no eixo de  $1/V_0$  e intercepção de  $-1/K_M$  no eixo de  $1/[S]$ , permitindo determinar com mais precisão a  $V_{m\acute{a}x}$  em comparação com o gráfico de  $V_0$  em função da  $[S]$  (MÜLLER, 2008; CARMO, 2010).





**Figura 35:** Gráfico Lineweaver-Burk obtido pela cinética enzimática da TPP eluída na fração 10.

Observa-se na figura 34 que a curva de concentração do substrato (T6P [mM]) *versus* a velocidade inicial ( $V_0$ ) apresenta o formato de uma curva típica de Michaelis-Menten. Em uma baixa concentração de substrato, a velocidade inicial da reação é aproximadamente proporcional à concentração do substrato T6P, e a reação, desta forma, é aproximadamente de primeira ordem em relação ao substrato. À medida que a concentração do substrato aumenta, a velocidade inicial da reação diminui e deixa de ser proporcional à concentração do substrato.

O formato hiperbólico da curva, típico de enzimas de caráter michaeliano e ilustrado na figura 34, mostra que a enzima recombinante tem alta afinidade ao seu substrato, como largamente reportado na literatura (FRIEDMAN, 1966; FRIEDMAN e HSUEH, 1979; EDAVANA et al., 2004; WANG et al., 2005; KUSHWAHA et al., 2011).

A concentração de trealose-6-fosfato para atividade máxima foi 6 mM e a partir daí, é observada a saturação da enzima. No gráfico, o valor da concentração do substrato necessário para se alcançar a metade da velocidade máxima ( $1/2 V_{\max}$ ) corresponde a  $K_M$ , a constante de Michaelis-Menten (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

O valor dessa constante ( $K_M$ ) é muito importante na caracterização da cinética enzimática, pois uma enzima pode ter o mesmo valor de atividade máxima que

outras, porém dificilmente terá o mesmo valor de  $K_M$ , que indicará a diferença na quantidade necessária de substrato para saturar a enzima (VIEIRA, 2003, CARMO 2010).

A constante de Michaelis ( $K_M$ ) é uma grandeza que expressa a relação entre as concentrações reais no estado estacionário, além disso, representa uma constante muito valiosa que relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração do substrato. Em outras palavras, a  $K_M$  é equivalente à concentração de substrato que fornece metade da velocidade máxima (SEGEL, 1979).

A enzima trealose fosfatase em discussão apresentou uma  $V_{m\acute{a}x}$  de  $290,0 \pm 3,79 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  e um  $K_M$  de  $3,19 \pm 0,10 \text{ mM}$ , o que foi relativamente maior comparado com os valores descritos na literatura para outras TPP:  $2,5 \pm 0,1 \text{ mM}$  (SEO et al., 2000);  $1,6 \text{ mM}$  (KLUTTS et al., 2003);  $1,5 \text{ mM}$  (SILVA et al., 2005);  $2,5 \text{ mM}$  (PETRUZIELLO, 2009);  $0,42 \text{ mM}$  (KUSHWAHA et al., 2011); e  $0,39 \pm 0,16 \text{ mM}$  (LI et al., 2012). Entretanto, o valor de  $K_M$  descrito neste trabalho foi próximo da metade do valor relatado por Nobre e colaboradores (2008) em relação à enzima TPP de *Rubrobacter xylanophilus* que apresentou  $K_M$  de  $6,1 \pm 1,5 \text{ mM}$ .

É conhecido que um baixo valor de  $K_M$  indica uma maior afinidade para o substrato. Entretanto, quando o  $K_M$  é alto isto pode ser resultado de uma constante catalítica ( $k_{cat}$ ) muito grande ou, então, um  $K_M$  mais elevado indica que a taxa de dissociação é significativamente maior do que a taxa de associação e que a enzima se liga ao substrato fracamente (ROGERS e GIBON, 2009). Neste caso, considera-se que a enzima TPP recombinante de *A. gambiae* expressa em *P. pastoris*, pelo valor de  $K_M$ , possui alta afinidade ao seu substrato.

O valor numérico de  $K_M$  é de interesse por diversas razões: (i) estabelece um valor aproximado para o nível intracelular de substrato; (ii) seu valor numérico fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes organismos, diferentes tecidos do mesmo organismo, ou do mesmo tecido em diferentes estágios de desenvolvimento; (iii) uma variação no valor real dessa constante induzida por um ligante é uma maneira de regular a atividade de uma enzima, visto que com os efeitos de diferentes compostos sobre a  $K_M$ , pode-se identificar inibidores fisiologicamente importantes; (iv) por fim, essa constante indica a adequacidade relativa de substratos alternativos para uma determinada enzima, isto é, o substrato

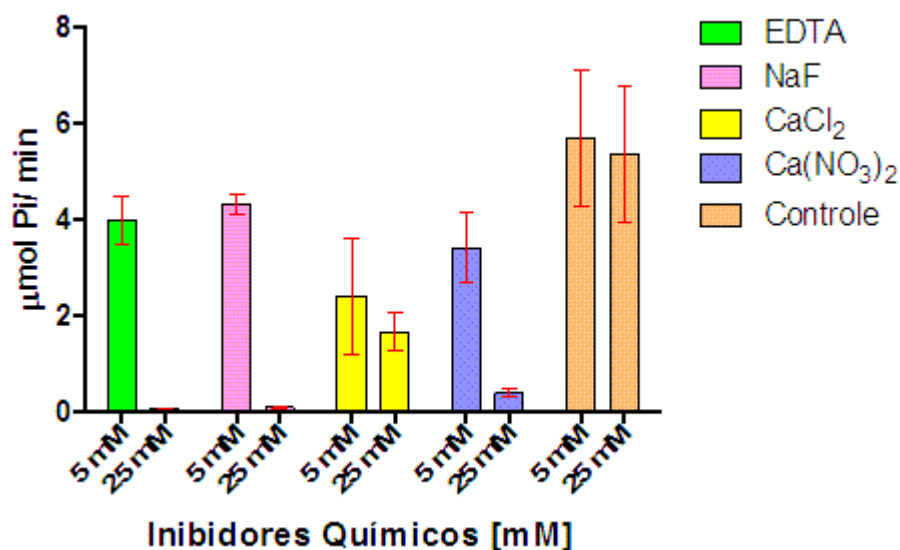
com valor mais baixo de  $K_M$  tem uma afinidade aparente maior para a enzima (SEGEL, 1979).

A afinidade da enzima trealose fosfatase com o substrato trealose-6-fosfato (T6P) é bem reportada na literatura. Thompson (2003) afirma que a enzima tem uma afinidade muito mais elevada para o substrato T6P comparado com outros substratos açúcar fosfato que liberam fosfato inorgânico na hidrólise catalítica. Behm (1997) afirma que a enzima TPP isolada de diferentes classes de nematódeos possui uma afinidade elevada ao substrato T6P e hidrolisa-o muito rapidamente, gerando trealose livre.

Vandercammen e colaboradores (1989), ao estudarem a enzima isolada do extrato celular de *S. cerevisiae*, relatam que a atividade desta enzima foi medida pela quantidade de trealose formada a partir da degradação do substrato T6P. Os autores afirmam ainda que a enzima pode ser separada de outros grupos de fosfatase devido à sua especificidade ao substrato.

#### 6.6.4 Teste de inibição para TPP recombinante

O teste de inibição foi realizado na tentativa de ser encontrado algum inibidor químico orgânico ou inorgânico. A figura 36 mostra o resultado do teste com inibidores químicos que apresentaram inibição da atividade da TPP recombinante nas concentrações de 5 mM e 25 mM.



**Figura 36:** Resultado do teste de inibidores químicos para TPP recombinante.

Como pode ser notado na figura 36, todos os compostos químicos utilizados inibiram a atividade de TPP na concentração de 25 mM, enquanto que na concentração de 5 mM somente dois destes inibiram significativamente a atividade de TPP:  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Os dados referentes à inibição que estão representados na figura 36 foram submetidos à análise de variância de dois fatores (*two-way ANOVA*) com correção de Bonferroni, a fim de ser verificado o nível de significância de cada inibidor testado em comparação com a amostra controle, com intervalo de confiança (CI) de 95 %. Os dados estão sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Detalhamento da análise de variância com dois fatores entre a amostra controle e os inibidores químicos.

<b>Controle vs EDTA</b>				
Concentração	Controle	EDTA	Diferença	IC 95%
5 mM	5,695	3,981	-1,714	-3,717 a 0,2879
25 mM	5,362	0,064	-5,298	-7,300 a -3,295
Concentração	Diferença	t	P valor	Resumo
5 mM	-1,714	2,616	P > 0,05	ns
25 mM	-5,298	8,083	P < 0,0001	****
<b>Controle vs NaF</b>				
Concentração	Controle	NaF	Diferença	IC 95%
5 mM	5,695	4,314	-1,381	-3,383 a 0,6213
25 mM	5,362	0,0997	-5,262	-7,264 a -3,260
Concentração	Diferença	t	P valor	Resumo
5 mM	-1,381	2,107	P > 0,05	ns
25 mM	-5,262	8,029	P < 0,0001	****
<b>Controle vs <math>\text{CaCl}_2</math></b>				
Concentração	Controle	$\text{CaCl}_2$	Diferença	IC 95%
5 mM	5,695	2,409	-3,286	-5,288 a -1,283
25 mM	5,362	1,671	-3,69	-5,693 a -1,688
Concentração	Diferença	t	P valor	Resumo
5 mM	-3,286	5,013	P < 0,001	***
25 mM	-3,69	5,631	P < 0,001	***
<b>Controle vs <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2</math></b>				
Concentração	Controle	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Diferença	IC 95%
5 mM	5,695	3,421	-2,274	-4,276 a -0,2716
25 mM	5,362	0,3854	-4,976	-6,978 a -2,974
Concentração	Diferença	t	P valor	Resumo
5 mM	-2,274	3,469	P < 0,05	*
25 mM	-4,976	7,593	P < 0,0001	****

Correção de Bonferroni (*post hoc*) de comparações múltiplas.

IC 95 %: Intervalo de confiança de 95 %.

t – teste de média para amostras pareadas.

P valor: (<0,05 = <5 %; >0,05 = >5 %; <0,001 = <0,1 %; <0,0001 = <0,01 %) com nível de significância de 5 %. Resumo: \*/ \*\*\*/ \*\*\*\* = significativo para inibição; ns = não significativo.

Pelos resultados apresentados na tabela 2, todos os inibidores químicos testados na concentração de 25 mM apresentaram significância (*p value* <0,001; <0,0001) no teste de inibição contra a amostra controle, mostrando que estes compostos químicos foram efetivos em inibir a atividade enzimática da TPP recombinante na referida concentração.

Entretanto, quando são analisados os dados referentes à concentração de 5 mM, observa-se pelo resultado da tabela 2, que apenas dois compostos [ $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; *p value* <0,001 e <0,05, respectivamente] foram efetivos na inibição da TPP recombinante.

Pelos resultados da análise de variância de dois fatores (ANOVA), evidencia-se que os compostos contendo o cátion divalente  $\text{Ca}^{2+}$  são mais efetivos em inibir a enzima TPP porque este íon compete com o íon  $\text{Mg}^{2+}$  pelo sítio ativo da enzima, particularmente pelo grupo fosfato do substrato presente no sítio ativo, o que caracteriza uma inibição do tipo competitiva.

Contudo, o  $\text{CaCl}_2$  em relação ao  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  foi mais eficiente na inibição da atividade de TPP, o que se deve, muito provavelmente, ao tamanho da molécula de cada composto, pois o íon  $\text{Cl}^-$  possui um tamanho menor em relação ao  $\text{NO}_3^-$  o que facilita, sobremaneira, a ligação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  do primeiro composto ao grupo fosfato do sítio ativo.

Além disso,  $\text{CaCl}_2$  é muito relatado e comprovadamente apontado na literatura por seu efeito inibidor contra fosfatases (MAMEDOV et al., 2001; KIM et al., 2004; PEERAER et al., 2004), ao contrário de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  que não possui registro de ter efeito inibitório sobre a TPP. Neste trabalho, a inibição por este composto na concentração de 5 mM foi muito baixa ( $p = <0,05$ ), comparada com  $\text{CaCl}_2$  que obteve uma maior inibição ( $p = <0,001$ ).

O efeito inibitório do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre as fosfatases é muito relatado na literatura. PetruzzIELLO (2009) descreve que ao se adicionar  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio, a atividade da enzima TPP de *H. seropedicae* diminuiu conforme a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentou. Neste caso, o  $\text{Ca}^{2+}$  estaria gradativamente substituindo o  $\text{Mg}^{2+}$  no sítio ativo, inibindo, assim, a atividade da TPP ao diminuir sua afinidade pelo substrato. Outras enzimas como a fosfoglicolato fosfatase também apresentam este efeito de

inibição pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo que o íon age como um inibidor competitivo em relação ao  $\text{Mg}^{2+}$  para a ligação do substrato ao sítio ativo (MAMEDOV et al., 2001; KIM et al., 2004).

Segundo Peeraer e colaboradores (2004) quando o  $\text{Mg}^{2+}$  é substituído por  $\text{Ca}^{2+}$  no sítio ativo ocorre um aumento na distância entre os resíduos que se ligam ao metal, com distâncias de 2,1 Å para  $\text{Mg}^{2+}$  e 2,4 Å para  $\text{Ca}^{2+}$ . Por exemplo, no sítio ativo da enzima fosfoserina fosfatase humana o íon  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se tanto aos átomos de oxigênio quanto ao resíduo Asp20, desse modo, prevenindo-o de fazer um ataque nucleofílico no átomo de fósforo do substrato. Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  provoca no sítio ativo distâncias maiores entre os ligantes quando comparado com o íon  $\text{Mg}^{2+}$ . Como consequência, a carga positiva parcial no átomo de fósforo da fosfoserina fosfatase é menor se o  $\text{Ca}^{2+}$  ocupa a posição no sítio ativo. Desta maneira, o  $\text{Ca}^{2+}$  dificulta ainda mais o ataque nucleofílico do resíduo de Asp20 no substrato.

Conforme conclui Peeraer e colaboradores (2004), o íon  $\text{Mg}^{2+}$  no sítio ativo da fosfoserina fosfatase humana é essencial para a atividade enzimática normal, isto é, este íon promove o ataque nucleofílico do resíduo de Asp20 com a consequente retirada do átomo de fósforo do substrato. Além disso, o cátion divalente é essencial para a orientação correta do resíduo Asp20 que está voltado para o substrato. O íon  $\text{Ca}^{2+}$ , contudo, torna o Asp20 um ligante bidentado e, desse modo, inibe o ataque nucleofílico deste resíduo catalítico. Além do mais, parece que o sítio de ligação do  $\text{Mg}^{2+}$  na fosfoserina fosfatase está fracamente protegido contra a ligação de outros cátions divalentes, como o  $\text{Ca}^{2+}$ , que desempenha propriedades inibidoras mesmo na presença de  $\text{Mg}^{2+}$ . Portanto, é provável que a fosfoserina fosfatase, enzima membro da família HAD, tenha escolhido o  $\text{Mg}^{2+}$  como um cofator durante a evolução baseado, principalmente, na abundância natural de  $\text{Mg}^{2+}$  em células vivas.

Por outro lado, o fato de EDTA e NaF terem inibido apenas na concentração de 25 mM deve-se, provavelmente, às razões discutidas quanto ao seu papel na inibição de TPP e outras enzimas da classe das fosfatases. Estes dois compostos são considerados, conforme a literatura, inibidores não competitivos, sendo que a sua inibição é do tipo reversível, isto é, a enzima pode voltar a apresentar atividade se a concentração desses compostos for diminuída, ou se a concentração do

substrato, da enzima ou do cofator for aumentada, dado este que é suportado segundo os trabalhos realizados por Friedman (1966) e Murdoch (1971).

A ação do EDTA como agente inibidor também é relatada na literatura quando foi testada a enzima TPP da bactéria *M. smegmatis* (MATULA et al., 1971) e do protozoário *B. malayi* (KUSHWAHA et al., 2011). A inibição por esse composto orgânico é demonstrada por se tratar de um agente quelante que forma complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, dentre estes o  $Mg^{2+}$ , cofator da enzima, em valores de pH acima de 7 (HOLLEMAN e WIBERG, 2001). Assim, o EDTA com esta característica pode tornar a enzima não-funcional.

Segundo Murdoch (1971) ao estudar as propriedades cinéticas da fosfatase alcalina do endométrio de ovelha, foi observado o efeito da concentração do EDTA na inibição. O EDTA em uma concentração de  $10^{-5}$  M foi inefetivo na atividade enzimática. Todavia, nenhum efeito estimulante do composto foi encontrado em qualquer concentração usada, e em concentrações maiores, entre  $10^{-4}$  e  $10^{-1}$  M, o EDTA inibiu grandemente a atividade. O efeito protetor do substrato contra a inibição por EDTA da fosfatase alcalina isolada do endométrio de ovelhas é semelhante àquele descrito para a fosfatase de placentas humanas (HARKNESS, 1968) e indica que o substrato e o EDTA competem pelo sítio ativo contendo o íon  $Mg^{2+}$  nestas enzimas.

A inibição da atividade de fosfatase alcalina por EDTA e sua estimulação por  $Mg^{2+}$  sugere que a fosfatase alcalina extraída do endométrio de ovelha é uma metaloenzima com o íon  $Mg^{2+}$  sendo considerado um componente funcional. Todavia, Agus e colaboradores (1966) afirmam que o EDTA pode remover o  $Mg^{2+}$  das metaloenzimas, porém a rápida recuperação da fosfatase, quando em alta concentração de  $Mg^{2+}$ , sugere que um complexo metal-EDTA é formado na enzima, mas este composto não foi capaz de dissociar o metal da enzima. No trabalho de Rao e colaboradores (2006) quando a enzima TPP de *T. acidophilum* foi tratada com EDTA, esta perdeu sua atividade, sugerindo que ela é uma enzima dependente de  $Mg^{2+}$ .

De outro modo, o NaF tem efeito inibitório porque este composto inorgânico age como um inibidor não competitivo da fosfatase (MATULA et al., 1971). A concentração de 25 mM relatada neste trabalho para o NaF, que tornou a TPP recombinante inativa, também foi verificada no estudo realizado por Friedman (1966)

quando este composto inibiu em 70 % a atividade da enzima TPP produzida por *P. regina*.

Os sais de fluoreto são comumente usados em ensaios biológicos para inibir a atividade de fosfatases, tais como serina/treonina fosfatases (NAKAI e THOMAS, 1974). O fluoreto mimetiza o íon hidróxido nucleofílico no sítio ativo destas enzimas (SCHENK et al., 2008). Alguns compostos contendo fluoreto, como fluoreto de berílio e fluoreto de alumínio, também são usados como inibidores de fosfatases, uma vez que estes compostos podem ser moléculas miméticas do grupo fosfato e podem assumir papéis de análogos no estado de transição da reação (CHO et al., 2001; WANG et al., 2002).

Segundo Wang e colaboradores (2002) a estrutura da fosfatase em complexo com o fluoreto fornece um intermediário que mimetiza o grupo fosfato ligado ao resíduo de aspartato. Os íons fluoreto, essencialmente, sobrepõem-se aos três átomos de oxigênio do grupo fosfato. Eles também formam o mesmo conjunto de ligações de hidrogênio com resíduos do sítio ativo.

O fluoreto é também um inibidor não competitivo de fosfatases ácidas sendo que sua atividade inibitória é altamente reversível (NAGDAS e BHATTACHARYYA, 1984; WANG et al., 1995; TSO e CHEN, 1997). Entretanto, seu efeito inibitório pode ser parcial ou o nível de inibição variar de acordo com a fonte de origem da enzima (MOORE et al., 1987) ou, ainda, variar de uma enzima para outra (ARNOLD et al., 1987). Contudo, em algumas fosfatases o fluoreto pode não apresentar inibição (KLUTTS et al., 2003; KUSHWAHA et al., 2011).

Portanto, embora a enzima TPP recombinante tenha cauda de histidina (*his<sup>6</sup>-tag*), o fato dos resultados da cinética e influência do pH e temperatura terem sido compatíveis com os resultados da literatura, indica que essa pequena sequência de histidinas adicionada na posição C-terminal não deve estar interferindo no centro ativo da enzima e, desta forma, podem dar-se continuidade aos trabalhos com esta enzima recombinante.



## 7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- O sistema de expressão em *P. pastoris* utilizando o vetor pPIC9, sob o controle do promotor AOX1, revelou ser um sistema eficiente para a produção de TPP devido à sua capacidade de secretar altos níveis da proteína.
- Com base nas análises de bioinformática da sequência polipeptídica da TPP, sua massa teórica como proteína não glicosilada seria de 29,3 kDa. No entanto, o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE revelou que a enzima TPP recombinante expressa por *P. pastoris* tem massa molecular de ~36 kDa. Esse fato deve-se, possivelmente, por ter-se obtido a forma glicosilada da enzima TPP, tendo em vista a existência de três sítios potenciais de glicosilação na sequência de aminoácidos;
- A expressão de TPP recombinante em *P. pastoris* foi confirmada através da reação de imunodeteção, a qual apontou que o período de 72 h de indução foi eficiente para a produção da TPP recombinante;
- Ficou demonstrado que a enzima recombinante mostrou atividade máxima em pH alcalino (pH 8,0) e temperatura ótima (38 °C) muito próxima da temperatura fisiológica;
- O valor de  $K_M$  de  $3,19 \pm 0,10$  mM indicou que a enzima purificada possui alta afinidade ao seu substrato;
- A enzima recombinante foi inibida por EDTA e NaF, sendo considerados inibidores não competitivos, e por  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , os quais foram considerados inibidores competitivos.

## 8. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho abrem as seguintes perspectivas:

- ❖ Fazer modelagem molecular comparativa da enzima com a estrutura tridimensional da TPP de *Thermoplasma acidophilum* (PDB: 1U02);
- ❖ Determinação da massa molar da enzima por espectrometria de massas;
- ❖ Prospecção de inibidores naturais efetivos a partir de extratos de plantas amazônicas por:
  - i. Ressonância plasmônica de superfície (SPR);
  - ii. *Screening* virtual por *docking* molecular;
  - iii. Ensaios diretos de inibição da enzima.
- ❖ Silenciamento do gene *TPP* por RNAi;
- ❖ Planejamento e desenvolvimento de um inseticida eficaz para o controle populacional do mosquito vetor.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, S. G.; COX, R. P.; GRIFFIN, M. J. Inhibition of alkaline by cysteine and its analogues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 118, n. 2, p. 363-370, 1966.

ALVES, M. J. C. P.; MAYO, R. C.; DONALISIO, M. R. História, epidemiologia e controle da malária na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, 1980 a 2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 41-45, 2004.

ANDERSON, R. J.; HANNAN, C. M.; GILBERT, S. C.; LAIDLAW, S. M.; SHEU, E. G.; KORTEN, S.; SINDEN, R.; BUTCHER, G. A.; SKINNER, M. A.; HILL, A. V. Enhanced CD8<sup>+</sup> T cell immune responses and protection elicited against *Plasmodium berghei* malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. **J. Immunol.**, v. 172, n. 5, p. 3094-100, 2004.

ARAVIND, L.; GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 127–129, 1998.

ARNOLD, W. N.; SAKAI, K. H.; MANN, L. C. Selective inactivation of an extra-cytoplasmic acid phosphatase of yeast-like cells of *Sporothrix schenckii* by sodium fluoride. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p. 1503-1509, 1987.

ASAHINA, E.; TANNO, K. S. A large amount of trehalose in a frost-resistant insect. **Nature**, v. 204, p. 1222, 1964.

BAILEY, E. Biochemistry of insect flight. 2. Fuel supply. *In*: Candy, D. J.; Kilby, B. A. (Eds.). **Insect Biochemistry and Function**. Chapman & Hall, London, 1975, p 89-176.

BAGINSKI, E. S.; FOÀ, P. P.; ZAK, B. Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids, and total phosphate in biological materials. **Clinical Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 326-332, 1967.

BALDACCI, P.; MENARD, R. The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 298-306, 2004.

BALDEZ, M. A. G. **A malária e o processo de descentralização das ações de epidemiologia e controle de doenças em Rondonia**. 2005. 172f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 128 – 136, 1995.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 3, p. 466-468, 1959.

BAYKOV, A. A.; EVTUSHENKO, O. A.; AVAEVA, S. M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. **Analytical Biochemistry**, v. 171, p. 266-270, 1988.

BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A. Insect flight muscle metabolism. **Insect Biochem.**, v. 14, n. 3, p. 243-260, 1984.

BEHM, C. A. The role of trehalose in the physiology of nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 215-229, 1997.

BERGOZ, R. Trehalose malabsorption causing intolerance to mushrooms. **Gastroenterology**, v. 60, p. 909-912, 1971.

BIRCH, G. G. Trehalose. *In*: Wolfrom, M. L.; Tyson, R. S. (Eds.). **Advances in Carbohydrate Chemistry**. Academic Press, New York, 1963, v. 18, p. 201-225.

BLAZQUEZ, M. A.; GANCEDO, C. Identification of extragenic suppressors of the *cif1* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 25, p. 89-94, 1994.

BLAZQUEZ, M. A.; LAGUNAS, R.; GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. **FEBS Lett.**, v. 329, p. 51-54, 1993.

BRAKE, A. J.; MERRYWEATHER, J. P.; COIT, D. G.; HEBERLIN, U. A.; MASIARZ, F. R.; MULLENBACH, G. T.; URDEA, M. S.; VALENZUELA, P.; BARR, P. J.; Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Sacharomyces cerevisiae*. **Protocol of National Academic Science USA**, v. 81, p. 4642-4646, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da malária**: diretrizes técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995a.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. **Diagnóstico e tratamento no controle da malária**: manual para pessoal de saúde de nível médio. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Secretaria de Políticas de Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Ações de controle de endemias**: malária: manual para agentes comunitários de saúde e agentes de controle de endemias. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Sala de Apoio à Gestão Estratégica. **Indicadores epidemiológicos de malária na Amazônia Legal**. Brasília: Sistema Único de

Saúde, 2013. Disponível em: <<http://189.28.128.178/sage/>>. Acessado em: 05/01/2014.

BURROUGHS A. M.; ALLEN K. N.; DUNAWAY-MARIANO D.; ARAVIND L. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. **J Mol Biol.**, v. 361, n. 5, p.1003-1034, 2006.

CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **J. Biol. Chem.**, v. 231, p. 259-275, 1958.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. Thomson, [S. l.]. 2007. 265pp.

CANDY, D. J. Hormonal regulation of locust flight muscle metabolism by octopamine and other compounds. **Insect Biochemistry**, v. 8, p. 177-181, 1981.

CANDY, D. J.; KILBY, B. A. The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. **Biochem. Journal**, v. 78, p. 531-536, 1961.

CANDY, D. J.; BECKER, A.; WEGENER, G. Coordination and integration of metabolism in insect flight. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117 B, n. 4, p. 497-512, 1997.

CARLSEN, J.; HERMAN, W. S.; CHRISTENSEN, M.; JOSEFSSON, L. Characterization of a second peptide with adipokinetic and red pigment-concentrating activity from the locust corpora cardiac. **Insect Biochem.**, v. 9, p. 497-501, 1979.

CARMO, E. Jr. **Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris***. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2010.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHARLWOOD, J. D. Biological variation in *Anopheles darling* Root. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 391-8, 1996.

CHO, H.; WANG, W.; KIM, R.; YOKOTA, H.; DAMO, S.; KIM, S.-H.; WEMMER, D.; KUSTU, S.; YAN, D.  $\text{BeF}_3^-$  acts as a phosphate analog in proteins phosphorylated on aspartate: structure of a  $\text{BeF}_3^-$  complex with phosphoserine phosphatase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 15, p. 8525–8530, 2001.

CLARE, J. J.; ROMANOS, M. A.; RAYMENT, F. B.; ROWEDDER, J. E.; SMITH, M. A.; PAYNE, M. M.; SREEKRISHNA, K.; HENWOOD, C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, v. 105, p. 205-212, 1991.

CLEGG, J. S. The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 14, p. 135-143, 1965.

CLEGG, J. S.; EVANS, D. R. The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly. **J. Exp. Biol.**, v. 38, p. 771-792, 1961.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. **Development and Nutrition, Reproduction**. Chapman & Hall. London. 1992, v. I, 509 p.

COGAN, E. B.; BIRRELL, G. B.; GRIFFITH, O. H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. **Anal. Biochem.**, v. 271, p. 29-35, 1999.

COLAÇO, C. A. L. S.; ROSER, B. Trehalose – a multifunctional additive for food preservation. *In*: Mathlouthi, M. (Ed.). **Food Packaging and Preservation**. Blackie Professional, London, 1995, p. 123-140.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1994, 228 p.

\_\_\_\_\_. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora FIOCRUZ, 1998. 228 p.

COS, O.; RAMÓN, R.; VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 17, 2006.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agriculture Biology and Chemistry**, v. 44, p. 2279-2289, 1980.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLEY, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. *In*: Stewart, G. G.; Russell, I.; Klein, R. D.; Hiebsch, R. R. (Ed.). **Biological Research on Industrial Yeasts**. [S.1.]: CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1987. v. II, p. 1-18.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 1316-1323, 1989.

CREGG, J. M.; RUSSELL, K. A. Transformation. *In*: Higgins, D. R.; Cregg, J. M. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. [S.1.]: Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998. v. 103 *Pichia* Protocols, cap. 3, p. 27-39.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **BioTechnology**, v. 11, p. 905-910, 1993.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors: a comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Cryobiology**, v. 27, p. 219-231, 1990.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 1-11, 2000.

DAMASCENO, L. M.; PLA I.; CHANG, H. J.; COHEN, L.; RITTER, G.; OLD, L. J.; BATT, C. A. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 37: 18-26p, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010, 900 p.

DANTAS-OLIVEIRA, C. **Características biológicas e moleculares na ovogênese de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DIPTERA: CULICIDAE)**. Tese (Doutorado em Entomologia). 2011. 113 f. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2011.

DEANE, L. M. A Cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, Suppl. IV, p. 149-156, 1989.

DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, Suppl. II, 1986.

DEANE, L.; TAUIL, P.; SABROZA, P.; RIBEIRO, C. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, p. 74-111, 1985.

DONNAMARIA, M. C.; HOWARD, E. I.; GRIGERA, J. R. Interaction of water with  $\alpha,\alpha$ -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions**, v. 90, p. 2731-2735, 1994.

DUARTE, E. C.; SCHNEIDER, M. C.; PAES-SOUSA R.; RAMALHO, W. M.; SARDINHA, L. M. V.; JÚNIOR J. B. S. et al. **Epidemiologia das desigualdades em saúde no Brasil: um estudo exploratório**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2002.

EASTMOND, P. J.; GRAHAM, I. A. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 6, p. 231-235, 2003.

EASTMOND, P. J.; LI, Y.; GRAHAM, I. A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? **J. Exp. Bot.**, v. 54, p. 533-537, 2003.

EASTMOND, P. J.; VAN DJIKEN, A. J. H.; SPIELMAN, M.; KERR, A.; TISSIER, A. F.; DICKINSON, H. G.; JONES, J. D. G.; SMEEKENS, S. C.; GRAHAM, I. A. L. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. **Plant Journal**, v. 29, p. 225-235, 2002.

EDAVANA, V. K.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, J. D.; THAMPI, P.; ABRAHAM, E. C.; ELBEIN, A. D. Cloning and expression of the trehalose-phosphate phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison to the enzyme from *Mycobacterium smegmatis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 250-257, 2004.

ELBEIN, A. D. The metabolism of  $\alpha,\alpha$ -trehalose. In: Tipson, R. S.; Horton, D. (Eds.) **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. Academic Press, New York, 1974, v. 30, pp. 227-256.

ELBEIN, A. D.; MITCHELL, M. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 113, p. 863-873, 1973.

ELBEIN, A. D. Cytoplasmic carbohydrate molecules: trehalose and glycogen. In: Moran, A. P.; Holst, O.; Brennan, P.; von Itzstein, M. (Eds.). **Microbial Glycobiology: Structures, relevance and applications**. Academic Press, London, 2009, pp. 1020.

FARIA, L. R. Os primeiros anos da reforma sanitária no Brasil e a atuação da Fundação Rockefeller (1915 – 1920). Physis. **Revista de Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 109 – 127, 1995.

FENG, J.; CHEN, Y.; PU, J.; YANG, X.; ZHANG, C.; ZHU, S.; ZHAO, Y.; YUAN, Y.; YUAN, H.; LIAO, F. An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. **Anal. Biochem.**, v. 409, n. 1, p. 144-149, 2011.

FERREIRA, M. S.; ALVARADO, C. A. Malária. In: Veronesi, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8ª. Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991, 1082 p.

FERREIRA, P. Malária. **Revista de Manguinhos: FIOCRUZ**, n. 3. Rio de Janeiro, 2003.

FLINTEGAARD, T. V.; THYGESEN, P.; RAHBK-NIELSEN, H.; LEVERY, S. B.; KRISTENSEN, C.; CLAUSEN, H.; BOLT, G. N-Glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5326–5336, 2010.



FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: Identificação, biologia e epidemiologia.** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002, v. 2, 860 p.

FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annual Review Entomology**, v. 40, p. 443-474, 1995.

FRANCO-AGUDELO, S. **Saúde e imperialismo: a ação antimalárica na América Latina e a Fundação Rockefeller.** Centro de Investigaciones Médicas. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 1981.

FRANCO, A.; SOTO, T.; VICENTE-SOLER, J.; GUILLEN, P. V.; CANSADO, J.; GACTO, M. Characterization of *tpp 1 (+)* as encoding a main trehalose-6P phosphatase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5880-5884, 2000.

FRIEDMAN, S. Trehalose-6-phosphate phosphatase from insects. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 372-374, 1966.

FRIEDMAN, S. Interactions among sites responsible for trehalose 6-phosphate and trehalose-activated glucose 6-phosphate hydrolysis on trehalose phosphatase isolated from *Phormia regina*. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 4122-4130, 1971.

FRIEDMAN, S.; HSUEH, T.-F. Insect trehalose-6-phosphatase: the unactivated type, as illustrated in *Periplaneta americana*, and a survey of the ordinal distribution of the two presently known types. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 64B, p. 339-344, 1979.

GANCEDO, C.; FLORES, C. L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeast and fungi. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 351-359, 2004.

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, p. 93-129, 2010.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other haemosporidia.** University of London. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966, 1114 p.

GELADOPOULOS, T. P.; SOTIROUDIS, T. G.; EVANGELOPOULOS, A. E. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 192, p. 112-116, 1991.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GOLDSWORTHY, G. J.; MORDUE, W.; GUTHKELCH, J. Studies on insect adipokinectic hormones. **Gen. Comp. Endocr.**, v. 18, p. 545-551, 1972.

GRAPHPAD SOFTWARE, Inc. Prism (data analysis software system), version 5.04. **Software e Guia de Usuário.** 2010.

GUIMARÃES, F. R. **Obtenção e caracterização molecular de mosquitos *Aedes fluviatilis* transgênicos para o bloqueio da malária aviária.** 2007. 174f. Tese

(Doutorado em Ciências). Centro de Pesquisa René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 33, 2005.

GUSTAVSSON, M.; LEHTIO, J.; DENMAN, S. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Engineering**, v. 14, n. 9, p. 711-715, 2001.

HARDING, T. S. History of trehalose, its discovery and methods of preparation. **Sugar**, v. 25, p. 476-478, 1923.

HARKNESS, D. R. Studies on human placental alkaline phosphatase: II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 126, n. 2, p. 513-523, 1968.

HATI, A. K. Urban malaria vector biology. **Indian J. Med. Res.**, v. 106, p. 149-163, 1997.

HEY, A. E.; ELBEIN, A. D. Partial purification of a trehalose from *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Bacteriology**, v. 96, p. 105-110, 1968.

HOCHSTRASSER, U.; SCHIER, M. L.; VIRGILIO, C. D.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, v. 440, p. 356-360, 1998.

HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Inorganic Chemistry**. San Diego: Academic Press, 2001.

INVITROGEN. **WesternBreeze**: Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit. User Manual version F. IM-1004, 2003.

INVITROGEN. ***Pichia* expression kit for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris***. Manual part n. 25-0043, 2010.

ISHINO, T.; YANO, K.; CHINZEL, Y.; YUDA, M. Cell passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. **Plos Biol.**, v. 2, E4, 2004.

JORGE, M. H. P. M.; GOTLIEB, S. L. D.; LAURENTI, R. **A saúde no Brasil**: análise do período 1996 a 1999. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde; 2001.

KARTHIK, L.; MALATHY, P.; TRINITTA, A.; GUNASEKARAN, K. Molecular docking with trehalose-6 phosphate phosphatase: A potential drug target of filarial parasite "*Brugia malayi*". **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 8, p. 363-370, 2011.

KHATRI, N. K. **Optimisation of recombinant protein production in *Pichia pastoris***. (Academic Dissertation). 2011, 57 p. University of Oulu, Faculty of Technology, Department of Process and Environmental Engineering, 2011.

KAWAI, H.; SAKURAI, M.; INOUE, Y.; CHUJO, R.; KOBAYASHI, S. Hydration of oligosaccharides: anomalous hydration ability of trehalose. **Cryobiology**, v. 29, p. 599-606, 1992.

KERN, C.; WOLF, C.; BENDER, F.; BERGER, M.; NOACK, S.; SCHMALZ, S.; ILG, T. Trehalose-6-phosphate synthase from the cat flea *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster*: gene identification, cloning, heterologous functional expression and identification of inhibitors by high throughput screening. **Insect Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 456-471, 2012.

KIM, Y.; YAKUNIN, A. F.; KUZNETSOVA, E.; XU, X.; PENNYCOOKE, M.; GU, J.; CHEUNG, F.; PROUDFOOT, M.; ARROWSMITH, C. H.; JOACHIMIAK, A.; EDWARDS, A.; CHRISTENDAT, D. Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 1, p. 517-526, 2004.

KLOWDEN, M. J. **Physiological Systems in Insects**. 3<sup>rd</sup> Edition, 2013. Academy Press, University of Idaho, Moscow, p. 293-355.

KLUTTS, S.; PASTUSZAK, I.; EDAVANA, V. K.; THAMPI, P.; PAN, Y-T.; ABRAHAM, E. C.; CAROLL, J. D.; ELBEIN, A. D. Purification, cloning, expression, and properties of mycobacterial trehalose-phosphate phosphatase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 2093-2100, 2003.

KOCH, E. M.; KOCH, F. C. The presence of trehalose in yeast. **Science**, v. 61, p. 570-572, 1925.

KOONIN, E. V.; TATUSOV, R. L. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an interactive approach to database search. **J. Mol. Biol.**, v. 244, p. 125-132, 1994.

KORMISH, J. D.; MCGHEE, J. D. The *C. elegans* lethal gut-obstructed *gob-1* gene is trehalose-6-phosphate phosphatase. **Develop. Biology**, v. 287, p. 35-47, 2005.

KURJAN, J.; HERSKOWITZ, I. Structure of a yeast pheromone gene (mf alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. **Cell**, v. 30, p. 933-943, 1982.

KUSHWAHA, S.; PRASHANT, K. S.; RANA, A. K.; MISRA-BHATTACHARYA, S. Cloning, expression, purification and kinetics of trehalose-6-phosphate phosphatase of filarial parasite *Brugia malayi*. **Acta Tropica**, v. 119, p. 151-159, 2011.

LEHR, M. A.; KILPATRICK, C. W.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. **Annal Entomology Society American**, v. 98, p. 908-917, 2005.

LEYMAN, B.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. **Trends Plant Sci.**, v. 6, p. 510-513, 2001.

LEVASHINA, E. Immune responses in *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, p. 673-78, 2004.

LI, C.; WILKERSON, R. C. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 495-500, 2005.

LI, Y-T.; ZHANG, H-H.; SHENG, H-M.; AN, L-Z. Cloning, expression and characterization of trehalose-6-phosphate phosphatase from a psychrotrophic bacterium, *Arthrobacter* strain A3. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 2713-2721, 2012.

LOIOLA, C. C. P.; MANGABEIRA, C. J.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **J. Pan Am Public Health**, v. 11, n. 4, 2002.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MAMEDOV, T. G.; SUZUKI, K.; MIURA, K.; KUCHO, K.-I., FUKUZAWA, H. Characteristics and sequence of phosphoglycolate phosphatase from a eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 45573–45579, 2001.

MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; MARTÍNEZ-VICENTE, E.; GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; ROS, J. M.; GARCÍA-PEÑARRUBIA, P.; ARGÜELLES, J.-C. Role of trehalose-6P phosphatase (*TPS2*) in stress tolerance and resistance to macrophage killing in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 453-464, 2009.

MATIAS, F.; LIMA, A. M. **Síntese da formação histórica do Estado de Rondônia: do século XVI ao século XX**. Porto Velho, 2005.

MATULA, M.; MITCHELL, M.; ELBEIN, A. D. Partial purification and properties of a highly specific trehalose phosphate phosphatase from *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**, v. 107, p. 217-222, 1971.

MILLIPORE. **Amicon ultra-2 mL centrifugal filters for protein purification and concentration**. 2012.

MINNING, S.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R. D. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 147-156, 1998.

MOORE, R. C.; MECLELEN, E.; SMITH, H. S. Phosphatases. In K. C. Vaughn (ed.), **Handbook of Plant Cytochemistry**, v. 1. Cytochemical localization of Enzymes, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 37-65, 1987.

MORDUE, W.; GOLDSWORTHY, G. J. The physiological effects of corpora cardiaca extracts in locusts. **Gen. Comp. Endocr.**, v. 12, p. 360-369, 1969.

MOTOKI, M. T.; WILKERSON, R. C.; SALLUM, M. A. The *Anopheles albitarsis* complex with recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 823-850, 2009.

MÜLLER, G. **Clonagem e expressão do gene da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris***. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2008.

MURDOCH, R. N. Some biochemical and kinetic properties of sheep uterine endometrial alkaline phosphatase. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 24, p. 331-343, 1971.

NAGDAS, S. K.; BHATTACHARYYA, A. K. The kinetics of inhibition of human seminal plasma acid phosphatase by sodium fluoride. **Biochem. Internatl.**, v. 5, p. 659-668, 1984.

NAKAI, C.; THOMAS, J. A. Properties of a phosphoprotein phosphatase from bovine heart with activity on glycogen synthase, phosphorylase, and histone. **Chem.**, v. 249, n. 20, p. 6459-6467, 1974.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, p. 1965-1975, 1975.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11a. edição. Atheneu, 2005. 524 p.

NEWMAN, Y. M.; RING, S. G.; COLACO, C. The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 11, p. 263-294, 1993.

NOBRE, A.; ALARICO, S.; FERNANDES, C.; EMPADINHAS, N.; DA COSTA, M. S. A unique combination of genetic systems for the synthesis of trehalose in *Rubrobacter xylanophilus*: properties of a rare actinobacterial TreT. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 24, p. 7939-7946, 2008.

PAIVA, C. L.; PANEK, A. D. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. **Biotechnology Annual Reviews**, v. 2, p. 293-314, 1996.

PAUL, M. Trehalose 6-phosphate. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 303-309, 2007.

PEERAER, Y.; RABIJNS, A.; COLLET, J-F.; VAN SCHAFTINGEN, E.; DE RANTER, C. How calcium inhibits the magnesium-dependent enzyme human phosphoserine phosphatase. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3421-3427, 2004.

PETRUZZIELLO, S. **Caracterização *in silico*, clonagem, superexpressão e purificação da proteína trealose-6-fosfato fosfatase de *Herbaspirillum seropedicae***. 2009. 80 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

PIERCE, W. D. The uses of certain weevils and weevil products in food and medicine. **Proc. Entomol. Soc. Wash.**, v. 17, p. 151-154, 1915.

PINTO, E. A. S. **Clonagem e expressão do gene codificador do hormônio de crescimento de tabaqui (*Colossoma macropomum*) em *Pichia pastoris***. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2012.

QIAGEN. **The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins**. Fifth edition, 2003.

RACHOU, R. G. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 145-181, 1958.

RAO, K. N.; KUMARAN, D.; SEETHARAMAN, J.; BONANNO, J. B.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S. Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: Biochemical and biological implications. **Protein Sciences**, v. 15, p. 1735-1744, 2006.

RICHARDS, A. B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L. B.; SCHMID, H.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WAALKENS-BERENDSEN, D. H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 871-898, 2002.

RODRIGUES, I. B. **Controle da malária: Avaliação da efetividade em laboratório e em campo de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 nos municípios de Manaus, Iranduba e Novo Airão**. 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2006.

ROGERS, A.; GIBON, Y. Enzyme kinetics: Theory and practice. *In*: Schwender, J. (ed.). **Plant Metabolic Networks**. Springer Science Business Media, LLC, New York, NY, USA. 2009, 343 p.

ROMANOS, M.; SCORER, C.; SREEKRISHNA, K.; CLARE, J. The generation of multicopy recombinant strain. **Methods Mol. Biol.**, v. 103, p. 55-72, 1998.

ROSA-FREITAS, M. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PINTO, C. J.; FLORES-MENDOZA, C.; SILVA DO NASCIMENTO, T. F. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 651-65, 1998.

SABBATANI, S.; FIORINO, S.; MANFREDI, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, p. 299-309, 2010.

SCHENK, G.; ELLIOTT, T. W.; LEUNG, E.; CARRINGTON, L. E.; MITIĆ, N.; GAHAN, L. R.; GUDDAT, L. W. Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle. **BMC Struct. Biol.**, v. 8, p. 6, 2008.

SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBBER, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. **Plant Physiol.**, v. 135, p. 879-890, 2004.

SEARS, I. B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O. W.; GLICK, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 14, p. 783-790, 1998.

SEGEL, I. H. **Bioquímica: teoria e problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora. 1979, 527 p.

SELENGUT, J. D.; LEVINE, R. L. MDP-1: A novel eukaryotic magnesium-dependent phosphatase. **Biochemistry**, v. 39, p. 8315-8324, 2000.

SEO, H. S.; KOO, Y. J.; LIM, J. Y.; SONG, J. T.; KIM, C. H.; KIM, J. K.; LEE, J. S.; CHOI, Y. D. Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2484-2490, 2000.

SHIMA, S.; MATSUI, H.; TAHARA, S.; IMAI, R. Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes. **FEBS Journal**, v. 274, p. 1192-1201, 2007.

SHUMAN, E. K. Global climate change and infectious diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 12, p. 1061-1063, 2010.

SILVA, Z.; ALARICO, S.; DA COSTA, M. S. Trehalose biosynthesis in *Thermus thermophilus* RQ-1: biochemical properties of the trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. **Extremophiles**, v. 9, p. 29-36, 2005.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil**. Brasília: Organização Pan-americana de Saúde; 2001.

SMALLEGANGE, R. C.; VERHULST, N. O.; TAKKEN, W. Sweaty skin: an invitation to bite? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 143-148, 2011.

SNAPGENE VIEWER. **Free software for Windows to plasmid mapping, primer design, and restriction sites analysis, version 2.4.2**. 2014. Disponível em: <[http://www.snapgene.com/products/snapgene\\_viewer/](http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/)>.

SOUZA-SANTOS, R. Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 1813-1818, 2002.

STEELE, J. E. Glycogen phosphorylase in insects. **Insect Biochemistry**, v. 12, p. 131-147, 1982.

SUSSMAN, A. S.; LINGAPPA, B. T. Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. **Science**, v. 130, p. 1343, 1959.

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A. I.; ISMAIL, N.; RUBIO, J. M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, p. 68, 2014.

TADEI, W. P.; DUTARY-THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 42, p. 87-94, 2000.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; COSTA, W. L. S.; SCARPASSA, V. M. Biologia de anofelinos amazônicos. XII Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 30, p. 221-251, 1988.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 325-335, 1998.

TANG, B.; ZHENG, H-Z.; XU, Q.; ZOU, Q.; WANG, G-J.; ZHANG, F.; WANG, S-G.; ZHANG, Z-H. Cloning and pattern of expression of trehalose-6-phosphate synthase cDNA from *Catantops pinguis* (Orthoptera: Catantopidae). **Eur. J. Entomol.**, v. 108, p. 355-363, 2011.

TERAMOTO, N.; SACHINVALA, N. D.; SHIBATA, M. Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. **Molecules**, v. 13, p. 1773-1816, 2008.

THOMPSON, S. N. Trehalose – the insect “blood” sugar. **Advances in Insect Physiology**, v. 31, p. 205-285, 2003.

THOMPSON, S. N.; BORCHARDT, D. B.; WANG, L.-W. Dietary nutrient levels regulate protein and carbohydrate intake, gluconeogenic/ glycolytic flux and blocks trehalose level in the insect *Manduca sexta* L. **J. Comp. Physiol.**, v. B 173, p. 149-163, 2003.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 20-22, 2001.

TSO, S. C.; CHEN, Y. R. Isolation and characterization of a group III of acid phosphatases from rice plants. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 38, p. 245-250, 1997.



VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; GHESQUIÈRE, B.; MENSCHAERT, G.; RAO, R. N.; GEVAERT, K.; VAN DAMME, E. J. M. Diversity in protein glycosylation among insect species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2011.

VANDERCAMMEN, A.; HERS, J. F.; HERS, H. G. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 182, p. 613-620, 1989.

VANDESTEEENE, L.; LÓPEZ-GALVIS, L.; VANNESTE, K.; FEIL, R.; MAERE, S.; LAMMENS, W.; ROLLAND, F.; LUNN, J. E.; AVONCE, N.; BEECKMAN, T.; VAN DIJCK, P. Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 160, p. 884-896, 2012.

VEJBJERG, K.; NORMANN, T. C. Secretion of hyperglycaemic hormone from the corpus cardiacum of flying blowflies, *Calliphora erythrocephala*. **J. Insect Physiol.**, v. 20, p. 1189-1192, 1974.

VIEIRA, R. **Fundamentos de bioquímica**. Universidade Federal do Pará, [S. l]. 2003. 147pp.

VOLPERT, M.; MANGUM, J. E.; JAMSAI, D.; D'SYLVA, R.; O'BRYAN, M. K.; McINTYRE, P. Eukaryotic expression, purification and structure/function analysis of native, recombinant CRISP3 from human and mouse. **Scientific Reports: Nature**, v. 4, p. 4217, DOI: 10.1038/srep04217, 2014.

WANG, M. C.; TSO, S. C.; CHEN, Y. R. Inhibitory effect of sodium fluoride on activity of acid phosphatase in rice plants. **Taiwania**, v. 40, p. 291-298, 1995.

WANG, W.; KIM, R.; JANCARIK, J.; YOKOTA, H.; KIM, S.-H. Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.8 Å resolution. **Structure**, v. 9, p. 65-71, 2001.

WANG, W.; CHO, H. S.; KIM, R.; JANCARIK, J.; YOKOTA, H.; NGUYEN, H. H.; GRIGORIEV, I. V.; WEMMER, D. E.; KIM, S.-H. Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic "snapshots" of intermediate states. **J. Mol. Biol.**, v. 319, p. 421-431, 2002.

WANG, Y.-J.; HAO, Y.-J.; ZHANG, Z.-G.; CHEN, T.; ZHANG, J.-S.; CHEN, S.-Y. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 2, p. 215-223, 2005.

WOMERSLEY, C.; SMITH, L. Anhydrobiosis in nematodes. I. The role of glycerol, myo-inositol and trehalose to age, race, and mucosal damage. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 70B, p. 579-586, 1981.

World Health Organization – WHO. **World Malaria Report 2012**. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/report/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html)>. Acessado em: 14/11/2013.

WYATT, G. R. **The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects**. Yale University, New Haven, Connecticut. 1967, p. 287-360.

WYATT, G. R.; KALF, G. F. Trehalose in insects. **Fed. Proc.**, v. 15, p. 388, 1956.

YAKOB, L.; BONSALL, M. B.; YAN, G. Modelling knowlesi malaria transmission in humans: vector preference and host competence. **Malaria Journal**, v. 16, p. 329, 2010.

YEO, M.; LIN, P. S.; DAHMUS, M. E.; GILL, G. N. A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 26078-26085, 2003.

## ***10. APÊNDICES***

## 10.A - MEIOS DE CULTIVO

### 10.A.1 Meios de cultivo bacteriano

**Meio LB (Luria Bertani): cultivo da cepa de *E. coli* TOP 10.**

Peptona.....	10 g/L
Extrato de levedura.....	5 g/L
NaCl.....	5 g/L
Ágar.....	15 g/L

Os meios foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos. A seguir adicionava-se o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina, na concentração final de 100 µg/mL, quando necessário.

### 10.A.2 MEIOS DE CULTIVO DE LEVEDURAS *P. pastoris*

**Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*): manutenção da linhagem *P. pastoris* GS115.**

Extrato de levedura.....	10 g/L
Peptona.....	20 g/L
Glicose.....	2 %
Ágar.....	20 g/L

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e as soluções de glicose previamente filtrada e ampicilina na concentração de 100 µg/mL foram adicionadas posteriormente.

**MD (*Minimal Dextrose Medium*) - meio mínimo com glicose e sem histidina para seleção de células transformantes de *P. pastoris*.**

YNB.....	1,34 %
Biotina 500 X.....	1 %
Glicose.....	2 %
Ágar.....	20 g/L

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e adicionados 100 µg/mL de ampicilina.

**MM (*Minimal Methanol Medium*) - meio mínimo com metanol sem histidina para seleção de clones com fenótipos Mut<sup>s</sup>.**

YNB.....	1,34 %
Biotina 500 X.....	1 %
Metanol PA .....	0,5 %
Ágar.....	20 g/L

A mistura foi completada para o volume final com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e recebeu ampicilina na concentração 100 µg/mL.

**BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*) - meio complexo tamponado, com glicerol para o aumento de massa celular de *P. pastoris*.**

Extrato de levedura.....	10 g/L
Peptona.....	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0.....	100 mM
YNB.....	1,34 %
Biotina 500 X.....	1 %
Glicerol.....	1 %

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina.

**BMMY-U (*Buffered Methanol Complex Medium*) - meio complexo tamponado, com metanol para indução da expressão da proteína heteróloga**

Extrato de levedura.....	10 g/L
Peptona.....	20 g/L
Tampão fosfato pH 6,0.....	100 mM
YNB.....	1,34 %
Biotina 500 X.....	1 %
Metanol PA.....	0,5 %

A mistura foi completada com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina.

As soluções utilizadas na preparação de meios de culturas e todas outras suspensões ou soluções utilizadas ao longo dos experimentos foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração.

**10.A.3 SOLUÇÕES ESTOQUES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO PARA *P. pastoris***

**10X YNB**

Yeast Nitrogen Base.....	3,4 %
Sulfato de amônio.....	10 %

Dissolver 3,4 g de YNB em 90 mL de água destilada. Adicionar 10 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e esperar dissolver. Esterilizar por filtração. A solução foi estocada a 4 °C.

**500X Biotina (0,02 %)**

Para o preparo desta solução, 20 mg de biotina foi dissolvida em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

**100X Histidina (0,4 %)**

A solução foi preparada utilizando 400 mg de L-histidina foram dissolvidas em 100 mL de água destilada. Esta solução pode ser aquecida até 50°C para facilitar a dissolução. Em seguida foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

**10X Glicerol (10 %)**

Glicerol no volume de 5 mL de glicerol foi misturado a 900 mL de água e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

**10X Glicose (20%)**

Vinte gramas (20 g) de glicose foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

**Tampão fosfato 1M, pH 6,0 (500mL)**

A quantidade de 87,09 g de  $K_2HPO_4$  (fosfato de potássio dibásico) foi combinada com 68,05 g de  $KH_2PO_4$  (fosfato de potássio monobásico). O pH teve de ser confirmado e ajustado com  $H_3PO_4$  (ácido fosfórico) 4 M. Foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.