

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MOLECULAR

**O USO POTENCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE
DE TRIGO 0.53 NO CONTROLE DE BRUQUÍDEOS**

JANAÍNA DO NASCIMENTO LIMA MATIAS DE PAULA

**Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi de Sa
Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular**

Brasília-DF
2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MOLECULAR

O USO POTENCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE DE TRIGO 0.53 NO CONTROLE DE BRUQUÍDEOS

Janaína do Nascimento Lima Matias de Paula
Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi de Sa

Dissertação de Mestrado desenvolvido no *Laboratório de Interação Molecular Planta Praga-LIMPP*, submetida ao Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Brasília-DF
2006.

FICHA CATALOGRÁFICA

de PAULA, JANAÍNA DO NASCIMENTO LIMA MATIAS

O Uso Potencial do Inibidor de α -amilase de Trigo 0.53 no Controle de Bruquídeos [Distrito Federal] 2006.

xviii, 67 p., 210 x 297 mm (DPM/FM/UnB, M.Sc., Patologia Molecular, 2006).

Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília. Faculdade de Medicina.
Departamento de Patologia Molecular

- | | |
|----------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Interação Molecular Planta Praga | 2. Inibidor 0.53 |
| 3. Controle de Bruquídeos em Feijão | 4. Inibidor de α -amilase |
| 5. Expressão em <i>Pichia pastoris</i> | 6. Patologia Molecular. |

I. DPM/FM/UnB II. Título (série)

Referência Bibliográfica

de PAULA, J.N.L.M.; 2006. O Uso Potencial do Inibidor de α -amilase de Trigo 0.53 no Controle de Bruquídeos [Distrito Federal] 2006. Dissertação de Mestrado, Publicação N°.: E.DM-001A/06, Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 67 p.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Janaína do N. Lima Matias de Paula.

Título da Dissertação de Mestrado: O Uso Potencial do Inibidor de α -amilase do Trigo 0.53 no Controle de Bruquídeos

Grau: Mestre em Ciências

Ano: 2006

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Janaína do N. Lima Matias de Paula.
SQSW 105 Bloco A Aptº 117
70.670-421 - Sudoeste - Brasília - DF

Brasília-DF, 25 de outubro de 2006.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

O USO POTENCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE DE TRIGO 0.53 NO CONTROLE DE BRUQUÍDEOS

Janaína do N. Lima Matias de Paula

Dissertação de Mestrado desenvolvido no *Laboratório de Interação Molecular Planta Praga-LIMPP*, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Submetida ao Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Aprovada por:

Orientadora:

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, D.Sc (UnB/Embrapa-Cenargen)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, PhD (UCB/DF)

Dr. Thales Lima Rocha, PhD (Embrapa-Cenargen)

Suplente:

Maria Cristina Mattar da Silva, PhD (Embrapa-Cenargen)

Brasília, 25 de outubro de 2006.

Eu dedico este trabalho ao meu grande amor - meu marido José Humberto - pelo apoio, incentivo, ensinamentos e carinho. É certo que jamais conseguirei exprimir o tamanho da minha gratidão e admiração. Você sempre foi e sempre será um exemplo de vida pra mim. Agradeço a Deus todos os dias pelo privilégio de poder conviver com você dia-a-dia...

Aos meus amados filhos, Larissa, Giovanna e Diego, por terem aparecido sem explicação na minha vida. Obrigado pela tolerância e paciência no decorrer desses anos. Vocês são a alegria da minha vida. Coisas de Deus,... Não se explica. Amo vocês!

AGRADECIMENTO

Um especial agradecimento aos pesquisadores colombianos Arnúbio Valença e Jorge Arboleda. Vocês foram “A LUZ NO FIM DO TÚNEL”. Pude aprender que na ciência tudo se transforma em resultado, tudo é possível quando se acredita naquilo que se está fazendo. Obrigado por terem acreditado no meu trabalho e pela perseverança que tiveram durante a realização dos ensaios *in vitro*.

À Dra. Fátima Grossi por tudo que já fez e continua fazendo por mim. Afinal são mais de cinco anos que estou aprendendo a pesquisar em seu laboratório. Sem dúvida você é a pessoa mais importante no decorrer desse processo de aprendizagem. Obrigado pela oportunidade de poder estar ao seu lado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio e oportunidade de desenvolver esta pesquisa em suas dependências e muitas outras que não entraram nesta dissertação.

Aos professores Fernando Araripe e Lídia Pepe, por toda ajuda e atenção a mim prestada durante o desenvolvimento da expressão em levedura.

A todos os colegas do laboratório pelo convívio durante este período e por aqueles momentos de descontração na hora da pipoca na mesa de reuniões.

À Sineidinha, obrigado pela companhia, torcida e carinho durante a fase dos experimentos na bancada, por ter sempre me ajudado com os frascos para expressão. Também, pelos momentos de felicidade que pudemos desfrutar juntas.

À Lecir pela amizade, companhia, torcida e conselhos. Obrigado por sempre ter me atendido prontamente quando precisei de você. Você é uma pessoa muito especial pra mim.

Às amigas Liziane e Fernanda, pela companhia incondicional durante todos esses anos. Eu amo vocês! Foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Valeu por tudo! Pelas horinhas de descontração quando íamos ao Mc Donalds no meio da tarde (e que ninguém saiba dos vestidos...), ou tomar sorvete na Palato (banana split de 3 bolas) daquele jeito! Temos muitas histórias pra contar,... Momentos inesquecíveis.

Ei baixinha!... Pensou que eu ia esquecer de você? Obrigado Railene pelo privilégio de poder ter convivido com você durante esses anos. Fugíamos, também, para comer tortelete de morango: bem vermelho e, ainda, lotado de morangos com gelatina por cima. Você adorava, coisa de pobre!...

A minha amiga Simoni,... Minha véia, eu adoro você!... Que bom que você existe. Pelos momentos de grande alegria que passamos juntas durante este período da minha vida. É certo que ainda vamos poder conviver daqui pra frente. Todas as vezes que precisei de você, prontamente, me atendeu, me escutou pacientemente. Obrigado pela alegria, por ter me tirado do tédio da escrita e me chamar para ver seus e-mails, contar histórias absurdas,... E agente chorar de tanto rir.

A Francine, pela ajuda prestada no começo do trabalho. Pelo tempo que pudemos estar juntas batalhando no início da expressão e pela amizade durante todos esses anos.

Obrigado brilhante Osmundo, pela valiosa ajuda no começo deste trabalho. Estivemos juntos durante toda a primeira fase. Por torcer por mim. Por gostar de mim. Pela troca de “energia cósmica” para o trabalho dar certo. Pelos conselhos trocados, profissionais e pessoais, durante esses anos. Você é um grande amigo.

A Neudiane (eternamente Didi), por ter cuidado carinhosamente dos meus filhos Giovanna e Diego, como se fossem seus. Obrigado pela paciência que você teve com eles durante esses eternos momentos. Você me proporcionou tranquilidade para que eu pudesse realizar este trabalho. De coração, ... OBRIGADA!

À Ana Maria pelo carinho comigo e com meus filhos. Pela leitura criteriosa, sugestões e principalmente pela boa vontade que sempre teve comigo.

Ao meu querido e amado José, por ser quem você é...meigo, carinhoso, amigo e companheiro. Obrigado pelas horinhas de descontração que passamos juntos durante esses anos. Quem sabe no Doutorado você possa me ajudar novamente com o nitrogênio líquido? Com certeza vou precisar de você para me fazer companhia quando eu for trabalhar a noite no laboratório.

À Dona Dalva por tudo que faz por mim e pelos meus filhos. Obrigado por cuidar da Giovanna e do Diego com tanto carinho. Por sempre ter torcido por mim. Por compartilhar os momentos difíceis e felizes deste trabalho e se preocupar dia-a-dia com o final disso tudo. Nesse momento tão delicado a senhora foi como uma mãe pra mim.

À minha mãe por ter me concebido. Por ter me dado a oportunidade de viver e estar aqui hoje feliz, por ter terminando mais esta etapa. Por sempre estar ao meu lado. Mãe, obrigada por você ser esta pessoa linda por dentro e por fora. Te amo!

Aos meus irmãos Kátia, Márcia e John pelo carinho comigo, por torcerem por mim e por estarem sempre ao meu lado. Eu amo todos vocês!

E, finalmente obrigado a minha família, aos meus filhos Larissa, Giovanna e Diego pela paciência,... E perdão da minha ausência. Obrigado Larissa, pelo apoio incondicional e incentivo que você sempre me deu. Obrigado Beto, por ter me incentivado quando eu pensei em desistir, por ter me dado apoio incondicional durante todo este período. Por acreditar em mim.

Bebê obrigado, principalmente, por ter me dado nesses últimos dois anos, uma família linda!

MAMÃE, PAPITO, LARISSA, GIOVANNA E DIEGO,... Este trabalho é nosso!

É,... Uma coisa bela é uma alegria para sempre,... E como foram belos esses dias!...

“... Mire veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam e desafinam. Verdade maior...”
“O melhor do homem é que ele não veio pronto. Necessita acabamento...”

“Digo: o real não está na saída nem na chegada, ele se dispõe pra gente é no meio da travessia.”

“... É que a gente deve estar sempre contente de alegre, mesmo com todas as coisas ruins que acontecem acontecendo...”

“Felicidade se acha em horinhas de descuido...”
“Coraçãomente, pensamor...”

Aforismos,... Riobaldo e seus provérbios.
Uma saudação a Guimarães Rosa, que foi e é
nosso, que é de todos.
Grande sertão: veredas; 50 anos

RESUMO

Inibidores de α -amilase de plantas apresentam um grande potencial para uso biotecnológico, através de transformação de plantas visando resistência a insetos-praga. Neste contexto, estudou-se o potencial inseticida do inibidor de α -amilase 0.53 sobre os insetos-praga de grãos armazenados de feijão, visando sua utilização em programas de melhoramento genético. Plantas de trigo foram escolhidas como fonte vegetal devido a presença de inúmeras isoformas de inibidores de α -amilases em suas sementes. Os inibidores de α -amilases, presentes em sementes de trigo (*Triticum aestivum*), foram purificados e caracterizados e o gene para o inibidor 0.53 foi isolado utilizando técnicas de RT-PCR, utilizando cDNAs como molde. A sequência para o inibidor 0.53 foi então subclonada no vetor de expressão pPICZ α A (pFSP-pPICZ α A-0.53) e a expressão da proteína recombinante foi realizada em células de levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Após estabelecimento das condições de expressão, a proteína recombinante, expressa e secretada no meio de cultura, foi purificada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Ensaio *in vitro* utilizando as α -amilases dos insetos-praga: *Acanthocelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* e a α -amilase pancreática de Porco (PPA), mostraram que a atividade desse inibidor é altamente dependente das condições de pH. Em pH 4,5, o inibidor 0.53 foi capaz de inibir unicamente as α -amilases dos diferentes insetos, não apresentando nenhuma atividade para a amilase de mamífero PPA. Porém, em pH 7,2, o inibidor recombinante 0.53 atuou unicamente sobre a PPA, inibindo cerca de 90% de sua atividade, não sendo ativo para α -amilases dos diferentes insetos alvo testados. Desta forma, o inibidor recombinante 0,53 poderá ser utilizado em diversos estudos de toxicidade em mamíferos, estudos complementares de interação molecular, a fim de verificar sua segurança alimentar e potencial uso biotecnológico.

ABSTRACT

α -Amylase plant inhibitors exhibit a great potential for biotechnological use, using plants of transformation aiming resistance against insects-pest. This work studies the potential insecticidal effects of α -amylases inhibitor 0.53 against insects-pest in stored bean grains, and also the possibility of its use for the plant genetic improvement. Seeds from wheat plants were chosen as a vegetable source due to their presence of several α -amylases inhibitors isoforms. Firstly, the α -amylases inhibitors synthesized in wheat seeds (*Triticum aestivum*), were isolated, characterized and the gene encoding the 0.53 inhibitor isolated by RT-PCR techniques, using cDNAs as template. The 0.53 inhibitor coding sequence was then subcloned into the expression vector pPICZ α A (pFSP-pPICZ α A-0.53) and the recombinant protein expression was carried by metilotrophic yeast *Pichia pastoris* cell. After the establishment expression conditions, the recombinant protein, secreted in the culture, medium was purified by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). *In vitro* assays using α -amylases from the insect-pest: *Acanthocelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* and α -amylase from pancreatic porcine (PPA), had shown that the activity of this inhibitor is highly dependent of the pH conditions. In pH 4,5, the 0.53 inhibitor was able capable to inhibit solely insects α -amylases, but showed no activity for PPA. Otherwise, in pH 7,2, 0.53 recombinant inhibitor act only against PPA, inhibiting about 90%, not being active for insects α -amylases tested. Due to the characteristics described above the 0.53 recombinant inhibitor could be used in several studies in mammals toxicity tests, complementary studies of molecular interaction, in order to verify its alimentary security and potential biotechnological use.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	(A) Inseto adulto de <i>A. obtectus</i> ; (B) Grãos de feijão infestados por <i>A. obtectus</i>	10
Figura 2.2	(A) Inseto adulto de <i>Z. subfasciatus</i> . (B) Grãos de feijão infestados por <i>Z. subfasciatus</i>	11
Figura 2.3	(A) Inseto adulto de <i>C. maculatus</i> . (B) Grãos de feijão infestados por <i>C. maculatus</i>	12
Figura 2.4	Substituição Gênica por duplo <i>crossover</i> no <i>AOX1</i> em <i>P. pastoris</i>	21
Figura 2.5	Inserção Gênica por simples <i>crossover</i> do <i>HIS4</i> em <i>P. pastoris</i>	22
Figura 3.1	Representação esquemática do vetor pFSP-pPICZ α A-0.53, utilizado para a expressão do gene do Inibidor 0.53 de trigo, em <i>P. pastoris</i> .	23
Figura 3.2	Sequência gênica e a tradução do cDNA do inibidor 0.53. Acesso DQ534754 depositada no banco de dados NCBI.	24
Figura 3.3	Estratégia de clonagem do inibidor 0.53 no vetor de expressão pFSP-pPICZ α A-0.53	37
Figura 4.1	Perfil eletroforético do PCR para isolar a seqüência de nucleotídeos do inibidor 0.53 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%.	41
Figura 4.2	A: Perfil eletroforético do PCR de colônia para confirmar presença do inibidor 0.53 nas células de <i>E. coli</i> transformadas com vetor pPICZ α -A, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%. B: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%, da digestão do vetor pPICZ α -A com <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> para confirmar inserção do gene no vetor.	42
Figura 4.3	Expressão heteróloga do inibidor 0.53 em <i>Pichia pastoris</i> e análise em gel SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata.	43
Figura 4.4	A Perfil cromatográfico do inibidor 0.53 em coluna líquida de alta pressão (BioRad C18). A fração 5 contendo o inibidor ativo foi eluída em 49% de acetonitrila sob fluxo de 1 ml/min. B Perfil protéico da fração 5 em gel de bis-acrilamida 15%, corado com prata.	
Figura 4.5	Alinhamento de seqüências de aminoácidos do inibidor do trigo 0.53 com outros inibidores α -amilases de trigo	45
Figura 4.6	Efeitos da temperatura na atividade amilolítica de <i>A. obtectus</i> . Ensaio realizado com extrato total de larvas em diferentes temperaturas, utilizando amido 0.25% em tampão succínico com 0.02 M de CaCl ₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4.5 a 37° C.	46
Figura 4.7	Determinação das melhores condições da atividade enzimática da α -amilase de <i>A. obtectus</i> em diferentes pH . Ensaio realizado com extrato total de larvas. A enzima foi encubada com amido 0.25% em tampão	47

succínico com 0.02 M de CaCl₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4, 5 e 6 e em tampão Tris-HCl 0.1 M pH 7 e 8 a 37°C.

- Figura 4.8 Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 (6 μ g/ μ l) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2 e temperatura de 37°C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga. 47
- Figura 4.9 Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 (6 μ g/ μ l) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão succínico com 0.02 M de CaCl₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4.5 em temperatura de 37°C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Produção de feijão nos principais países produtores no mundo	8
Tabela 3.1	Oligonucleotídeos utilizados	25

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

μF	Microfaraday (10^{-6} F)
μg	Micrograma (10^{-6} g)
μl	Microlitro (10^{-6} l)
μm	Micrometro (10^{-6} m)
μM	Micromolar (10^{-6} M)
Amp	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
<i>AOX1</i>	Gene da álcool oxidase 1
<i>AOX2</i>	Gene do álcool oxidase 2
APS	Persulfato de amônio
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina trifosfato
AUG	Códon de iniciação da transcrição
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Cenargen	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
CLUSTAL W	Programa de alinhamento de multiplas sequencias
cm	Centímetro
CNPAF	Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão
ColE1	Origem de replicação de <i>Escherichia coli</i>
C-terminal	Extremidade carboxi - terminal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DPM	Departamento de Patologia Molecular da Universidade de Brasília
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ER	Retículo Endoplasmático
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>

g	Grama
h	Hora
ha	Hectare
HCl	Ácido Clorídrico
His 4	Gene histidinol desidrogenase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSA	α -amilase de Saliva Humana
http	<i>Hiper Text Transfer Protocol</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
l	Litro
LIMPP	Laboratório de Interação Molecular Planta Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligrama
min	Minuto
MIP	Manejo Integrado de Pragas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ms	Milisegundo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma (10^{-9} g)
nm	Nanometro (10^{-9} m)
°C	Grau Celsius
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
Ori	Origem de replicação
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato - Salina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pep 4	Linhagem protease menos
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol (10^{-12} mol)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
PPA	α -amilase Pancreática de Porco
RIP	Proteína de Transferência de Lipídeos
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS)
t	Tonelada
TCA	Ácido tricloro acético
TEB	Tris –Ácido Bórico-EDTA, na concentração 10 X
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodimetilamina
TFA	Ácido Trifluoracético
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
U	Unidade enzimática
UCB	Universidade Católica de Brasília
UnB	Universidade de Brasília
UTR	Região não traduzida do gene
UV	Raios ultravioleta
v	Volume
v/v	Volume/volume
www	<i>world wide web</i>
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium</i>
YPDS	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol</i>
YPDS-ágar	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol - ágar</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	JUSTIFICATIVA DESTE TRABALHO	2
1.2	OBJETIVOS	3
1.2.1	Objetivos Gerais	3
1.2.2	Objetivos específicos	3
1.3	CONTEÚDO DA DISSERTAÇÃO	4
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	ORIGEM HISTÓRICA DO FEIJÃO	6
2.2	IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO FEIJÃO NO BRASIL E NO MUNDO	6
2.3	INSETOS-PRAGA NA CULTURA E EM GRÃOS ARMAZENADOS	9
2.3.1	Descrição e biologia de <i>Acanthocelides obtectus</i>	9
2.3.2	Descrição e biologia de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	11
2.3.3	Descrição e biologia de <i>Callosobruchus maculatus</i>	12
2.3.4	Principais Estratégias no Controle de Bruquídeos	12
2.4	PROTEÍNAS DE DEFESA VEGETAL	13
2.5	INIBIDORES DE α -AMILASE	15
2.5.1	Inibidores de α-amilase tipo cereal	16
2.6	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>Pichia pastoris</i>	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
3.2	MATERIAIS	23
3.2.1	Linhagem Bacteriana	23
3.2.2	Linhagem de Levedura	24
3.2.3	Plasmídeos Utilizados	24
3.2.4	Oligonucleotídeos	24
3.2.5	Meios de cultura	25
3.2.5.1	Meio de Cultura para Bactérias	25
3.2.5.2	Meio de Cultura para Leveduras	25
3.2.5.2.1	Soluções Estoque para Meio de Cultura de <i>Pichia pastoris</i>	26

3.2.6	Soluções Estoques de Inibidores de Proteases	27
3.2.7	Soluções e Tampões de Uso Generalizado	27
3.2.8	Soluções para Extração de DNA Plasmidial	27
3.2.9	Tampões de Endonucleases de Restrição	28
3.2.10	Endonucleases de Restrição	28
3.2.11	Antibióticos	28
3.2.12	Soluções para Cromatografia	29
3.2.13	Soluções de uso Geral	29
3.2.14	Soluções para Eletroforese em Gel de Agarose e de Poliacrilamida	29
3.2.15	Marcadores de massa molecular	30
3.2.15.1	Marcadores de massa molecular (MM) para proteínas e DNA	30
3.2.16	Material Biológico	31
3.2.17	Soluções e Tampões para Ensaio Enzimático	31
3.3	MÉTODOS	32
3.3.1	Preparação de DNA Plasmidial em Pequena Escala	32
3.3.2	Amplificação e Subclonagem do Inibidor 0.53	32
3.3.2.1	Amplificação do Inibidor 0.53 por PCR, Clonado no Vetor PFSB-PGEM TEASY-0.53	32
3.3.3	Análise de DNA em Gel de Agarose	33
3.3.4	Digestão do DNA com Endonucleases de Restrição	33
3.3.5	Eluição de fragmentos de DNA	33
3.3.6	Construção do Vetor de Expressão	33
3.3.6.1	Ligação do inibidor 0.53 no pFSP-pPICZ α A-0.53	33
3.3.7	Preparação de DNA para transformação de <i>Pichia pastoris</i>	34
3.3.8	Transformação da levedura <i>P. pastoris</i> por eletroporação	34
3.3.9	Expressão de Proteínas Recombinantes em <i>P. pastoris</i>	35
3.3.10	Precipitação de Proteína com TCA	36
3.3.11	Análise de Proteínas em Gel de SDS-PAGE	36
3.3.12	Coloração com Prata	38
3.3.13	Cromatografia Líquida de Alta Pressão em BioRad C18	38
3.3.14	Quantificação de Proteínas	38
3.3.15	Extração das Enzimas Digestivas de Insetos	38
3.3.16	Ensaio <i>in vitro</i> do Inibidor de α-amilase 0.53	39
3.3.17	Ensaio de Atividade Enzimática de <i>A. obtectus</i> em Diferentes Temperaturas	39
3.3.18	Determinação da Atividade Inibitória em Diferentes pHs	39

4 RESULTADOS	41
4.1 SUBCLONAGEM DO INIBIDOR 0.53 EM VETOR DE EXPRESSÃO EM <i>P. pastoris</i>	41
4.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO INIBIDOR 0.53 EM <i>P. pastoris</i>	42
4.2.1 Purificação do inibidor 0.53 por HPLC	44
4.3 ANÁLISE E COMPARAÇÃO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DO INIBIDOR 0.53	44
4.4 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE α -AMILASE	45
5 DISCUSSÃO	49
5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO INIBIDOR 0.53 EM <i>P. pastoris</i>	49
5.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE PELO INIBIDOR 0.53	51
6 CONCLUSÃO	53
7 PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O feijão, *Phaseolus vulgaris* Linnaeus, 1753 (Fabaceae), é a leguminosa de maior importância como fonte de proteína vegetal que, combinado com o arroz, constitui a dieta básica do brasileiro. O Brasil é o maior consumidor dessa leguminosa, com um consumo *per capita*, em 2003, de cerca de 16 Kg/ano, equivalente a 44 g /dia (Vieira *et al.*, 2006). Atualmente, o Brasil tem produzido em torno de 3,1 milhões de toneladas em aproximadamente 4 milhões de hectares, o que o coloca como o maior produtor mundial de feijão. O feijão, após a colheita, pode perder sua qualidade rapidamente se armazenado de forma incorreta, especialmente devido à infestação por insetos. Os danos causados pelos insetos ao grão de feijão reduzem a qualidade do mesmo, afetando sua aparência, palatabilidade e aceitabilidade pelo consumidor, tornando-se inviáveis para o consumo devido ao mau aspecto, mau cheiro e alteração do sabor. As espécies *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) e *Acanthoscelides obtectus* (Say 1831) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae), conhecidos como carunchos do feijão, são as principais pragas do feijão armazenado, causando grandes perdas qualitativas e quantitativas em grãos e sementes, especialmente nas regiões mais quentes do mundo.

O uso de variedades resistentes de feijão aliadas a outras medidas integradas de manejo de insetos-praga tem recebido cada vez mais atenção como alternativas para o controle dos carunchos, sem as desvantagens dos inseticidas químicos.

O uso potencial do inibidor de α -amilases de trigo 0.53 no controle de bruquídeos foi o que motivou as pesquisas durante o desenvolvimento desta dissertação. Por apresentar inúmeras isoformas de inibidores de α -amilases, escolheu-se o trigo como fonte desta pesquisa visando identificar um inibidor com forte capacidade inibitória e alta especificidade sobre as α -amilases de insetos-praga que atacam grãos armazenados de feijão.

Em 2000, Franco e colaboradores caracterizaram a especificidade *in vitro* dos inibidores de α -amilases presentes em sementes de trigo (*Triticum aestivum*). O inibidor 0.53, demonstrou capacidade de inibir as α -amilases dos insetos: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), de forma diferenciada. Em ensaios em pH 5,5 o inibidor 0.53 apresentou preferencialmente atividade contra as α -amilases dos bruquídeos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, e apresentou baixa atividade para α -amilase, PPA. Estes dados indicaram o inibidor 0.53 como promissor para uso biotecnológico no controle de bruquídeos (Franco, 2000).

Com relação às especificidades, foi a primeira vez que se observou uma diferença funcional (relacionado a PPA) entre os inibidores 0.19 e 0.53. Outro importante resultado dessa pesquisa foi a demonstração da atividade inibitória do inibidor 0.53 contra α -amilases do *A. obtectus*. Esta foi também a primeira vez que um inibidor de α -amilase apresentava-se ativo *in vitro*, contra as α -amilases deste importante inseto-praga de grãos armazenados de feijão (Franco, 2000).

Visando a utilização do inibidor 0.53 no controle de insetos-praga de armazenamento, num primeiro momento, o gene que codifica este inibidor foi isolado a partir de cDNAs de sementes de trigo, cultivar BR35 (Franco, 2000). Com base nestes dados e dando continuidade as pesquisas, este projeto teve como objetivo expressar o cDNA do inibidor 0.53 em células de levedura metilotrófica, *Pichia pastoris* e avaliar o efeito inibitório *in vitro* do inibidor recombinante sobre as α -amilases de diferentes insetos-praga de grãos de feijão armazenados para posterior aplicação biotecnológica.

1.1 JUSTIFICATIVA

Segundo a FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – estima-se que a população mundial deverá dobrar até 2040. Desta forma, a produção de alimentos e produtos da agricultura deve aumentar proporcionalmente e as principais alternativas para se elevar à produção agrícola são: i) redução da área cultivada aumentando a produção com o avanço tecnológico e biotecnológico; ii) melhoria do ambiente; iii) melhoramento genético das espécies. No que diz respeito à melhoria do ambiente, muito ainda pode ser feito, como a utilização da adubação, irrigação, controle de pragas e doenças. A expectativa é de que progressos continuarão a ser conquistados nesta área. Entretanto, em alguns casos, estas melhorias podem resultar em custo adicional para o agricultor, ou em maior aplicação de insumos (fertilizantes, inseticidas, fungicidas) poluindo o meio ambiente.

O interesse pelo controle biotecnológico de insetos-praga tem crescido consideravelmente no mundo, em resposta aos problemas encontrados pelo uso dos agrotóxicos em larga escala na produção agrícola. A biotecnologia é uma área da biociência tecnológica que envolve aplicações práticas dos organismos biológicos, de seus componentes celulares para a manufatura e produtos industriais e para o manejo ambiental. Suas novas ferramentas de manipulação e transferência gênica permitem o

desenvolvimento de plantas e animais modificados com grande diversidade de atributos, gerando grandes desafios nesta era de globalização (Borém, 2004).

O melhoramento genético de plantas é a alternativa ecologicamente mais equilibrada e de menor custo para o agricultor. Ao utilizar uma variedade melhorada o agricultor propicia o aumento da produtividade, aliviando a pressão pela incorporação de novas áreas ao sistema produtivo. O melhoramento genético via biotecnologia é uma estratégia bastante promissora, podendo elevar a produção agrícola mundial, reduzindo as perdas na colheita decorrentes de pragas e doenças e elevando a produtividade das lavouras (Borém *et al.*, 2004). Os benefícios da biotecnologia com o uso de plantas geneticamente modificadas já foram observados pelos agricultores que vêm utilizando essa tecnologia (James, 2004). A introdução de genes específicos que conferem resistência a insetos-praga em variedades geneticamente modificadas reduz a necessidade de pulverizações com os agrotóxicos. O uso dessa tecnologia contribui para menor poluição ambiental e a produção de alimentos a preços mais acessíveis para a melhoria da qualidade de vida (James, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005).

Neste contexto, o estudo de proteínas ativas contra insetos economicamente importantes, como os inibidores de α -amilases, torna-se fundamental, visto que sua introdução em plantas, visando resistência constitui uma importante estratégia na consolidação de problemas ambientais e econômicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais:

O objetivo desta dissertação foi expressar o gene do inibidor 0.53, oriundo de sementes de trigo, em levedura metilotrófica *P. pastoris*, a fim de avaliar sua atividade sobre as α -amilases de insetos-praga que atacam grãos de feijão armazenados.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Sub-clonagem do gene 0.53 em vetor de expressão de *P. pastoris*, pPICZ α A.
- Expressão do inibidor 0.53 na forma ativa, em *P. pastoris*.
- Avaliação da atividade inibitória do 0.53 recombinante, sobre as α -amilases de insetos-praga de grãos armazenados: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*.

- Avaliação da atividade inibitória do 0.53, sobre α -amilase de mamífero, PPA.

1.3 CONTEÚDO DA DISSERTAÇÃO

No Capítulo 2, apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre o feijão, citando sua importância nutricional, econômica e cultural no Brasil e no mundo. Descreve-se a biologia dos principais insetos-praga que atacam grãos de feijões armazenados. Faz-se, também, referência à importância do controle destes insetos, traçando as principais estratégias que são utilizadas atualmente. Além disso, consta uma revisão bibliográfica sobre as proteínas de defesa de plantas e a interação destas com insetos-praga. Faz-se um relato sobre a importância dos inibidores de α -amilase, derivados de vegetais, no controle de bruquídeos, assim como o potencial do gene que codifica o inibidor de α -amilase de trigo 0.53, como estratégia em plantas transgênicas de feijão. Ainda, apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a expressão heteróloga de proteínas em células de levedura metilotrófica, *P. pastoris* com um relato sobre as vantagens da expressão neste sistema comparando-o com outros.

No Capítulo 3, descrevem-se os materiais e a metodologia usados para realização de todos os experimentos propostos, como: a subclonagem do gene do inibidor 0.53 de sementes de trigo no vetor de expressão em *P. pastoris* e avaliação da sua atividade inibitória sobre as α -amilases de insetos-praga de grãos armazenados de feijão: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e sobre, PPA.

No Capítulo 4, descrevem-se os resultados obtidos durante a realização dos experimentos. Com o intuito de estudar o potencial do uso do inibidor de trigo 0.53 sobre a α -amilase de insetos-praga que atacam grãos armazenados de feijão, fez-se testes *in vitro*, onde os resultados mostrados colocam o inibidor heterólogo de trigo 0.53, como inibidor em potencial de α -amilases destes insetos.

No Capítulo 5, faz-se a discussão dos dados obtidos com os experimentos desta dissertação, onde são comparados as vantagens dos sistemas de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* x *Escherichia coli*, bem como a discussão dos dados relativos a avaliação da atividade inibitória do inibidor 0.53 sobre as α -amilases de insetos-praga de grãos armazenados: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase de mamífero, PPA.

No Capítulo 6, apresenta-se a conclusão deste trabalho onde se encontra relatado o que foi possível realizar com base nos resultados obtidos durante a realização dos experimentos de pesquisa.

No Capítulo 7, estão as perspectivas, onde são sugeridas as principais aplicações dos resultados obtidos durante a realização desta dissertação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM HISTÓRICA DO FEIJÃO

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. Eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo, também, cultuados como símbolo da vida. Os antigos romanos usavam extensivamente feijões nas suas festas gastronômicas, utilizando-os até mesmo como pagamento de apostas. Foram encontradas referências aos feijões na Idade do Bronze, na Suíça, e entre os hebraicos, cerca de 1.000 a.C. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que os feijões eram o prato favorito dos robustos guerreiros troianos. A maioria dos historiadores atribui a disseminação dos feijões no mundo em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (EMBRAPA CNPAF, 2005).

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* L. A Gray var. *latifolius* Freeman e *Phaseolus polyanthus* Greenman L. (Debouck, 1993). Entre estas, o feijão comum, *P. vulgaris*, é o mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e também a mais cultivada nos cinco continentes (Vieira *et al.*, 2006).

Atualmente, pesquisas com base em padrões eletroforéticos de faseolina sugerem a existência de três centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como para cultivadas: (i) o mesoamericano, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; (ii) o Sul dos Andes, que abrange desde o Norte do Peru até as províncias do Noroeste da Argentina; (iii) o Norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia e Venezuela até o Norte do Peru. Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (EMBRAPA CNPAF, 2005).

2.2 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO FEIJÃO NO BRASIL E NO MUNDO

A cultura do feijão está distribuída em todos os continentes, sendo o Brasil o principal produtor e consumidor mundial. O feijão é um alimento básico para o brasileiro, chegando a ser um componente obrigatório na dieta diária da população. Consumido em quase todo o

país, é uma das principais fontes protéicas (21%) e energéticas (341 cal/100 g) para a população (Panorama Rural, 2003; Vieira *et al.*, 2006). A maioria das cultivares utilizadas no Brasil apresenta de 20% a 25% de proteína, todavia, existem outros com mais de 30% de proteína, que podem ser utilizadas como genitores em programas de melhoramento, para desenvolver variedades com maior qualidade nutricional. As proteínas do feijão são conhecidas por serem ricas no aminoácido essencial lisina, porém pobre nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, essenciais ao homem. Os cereais são pobres em lisina, mas ricos em aminoácidos sulfurados, o que torna a tradicional dieta brasileira, arroz com feijão, complementar em termos de aminoácidos essenciais (EPAGRI, 2005). O Brasil é o maior consumidor dessa leguminosa, com um consumo *per capita*, em 2003, de cerca de 16 Kg/ano, equivalente a 44 g /dia (Vieira *et al.*, 2006).

O Brasil produz em torno de 3,1 milhões de toneladas em aproximadamente 4 milhões de hectares cultivados (Tabela 2.1). Além da relevância na dieta do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas da maior importância econômico-social, pela área cultivada e pela mão-de-obra que emprega durante o ciclo da cultura. Estima-se que a cultura do feijão utiliza cerca de 7 milhões de homem/dia por ciclo de produção (Vieira *et al.*, 2006). A leguminosa é cultivada no Brasil nos mais variados níveis tecnológicos e sistemas de produção. Os estados brasileiros que contribuem para maior produção são: Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Goiás, que respondem por quase 70% da produção do País (Panorama Rural, 2003). O feijoeiro comum é cultivado ao longo do ano, na maioria dos estados brasileiros, proporcionando constante oferta do produto no mercado, sendo cultivado desde cultura de subsistência em pequenas propriedades, até altamente tecnificadas em cultivos empresariais. A Região Sul ocupa lugar de destaque no cenário nacional, respondendo por 37% da produção, seguida da Região Sudeste com 31%, Região Nordeste com 16%, Região Centro-Oeste com 13% e a Região Norte com 3% (EPAGRI, 2005).

Em 2004, cerca de 86% da produção mundial desta leguminosa ficou restrita a 5 países: Brasil, China, Índia, México e Myanmar. O Brasil contribuiu com 23,6%, o que coloca o país como o primeiro produtor mundial de feijão seguido pela Índia (Tabela 2.1) (EMBRAPA CNPAF, 2005).

Tabela 2.1 Produção de feijão nos principais países produtores no mundo.

Principais Produtores Mundiais

Produção (milhão de t)	1990-92	1996-98	2002-04	Variação 1990/98 (%)	Variação 1998-04 (%)
Mundo	16,25	16,30	19,11	0,3	17,2
Brasil	2,59	2,49	3,14	-3,8	26,0
Índia	3,83	2,99	2,93	-21,9	-1,8
China	1,03	1,48	2,03	43,0	37,1
Mianmar	0,37	0,99	1,63	171,0	64,4
México	1,13	1,19	1,45	5,6	21,7
Estados Unidos	1,34	1,33	1,08	-1,2	-18,8
Total	10,29	10,47	12,26	1,7	17,1

Área Cultivada (milhões ha)	1990-92	1996-98	2002-04	Variação 90/98 (%)	Variação 98-04 (%)
Mundo	25,42	25,09	26,87	-1,3	7,1
Índia	9,41	8,21	8,63	-12,7	5,1
Brasil	5,09	4,00	4,09	-21,3	2,1
México	1,79	1,94	1,98	8,0	0,0
Mianmar	0,57	1,34	1,90	136,6	41,4
China	0,86	1,16	1,30	34,8	12,3
Estados Unidos	0,75	0,73	0,58	-1,9	-20,3
Total	18,46	17,38	18,49	-5,8	6,4

Rendimento Médio (kg/ha)	1990-92	1996-98	2002-04	Variação 90/98 (%)	Variação 98-04 (%)
Mundo	639	650	711	1,6	9,4
Estados Unidos	1.792	1.814	1.832	1,2	1,0
China	1.127	1.277	1.564	13,2	22,5
Mianmar	641	741	860	15,6	16,1
Brasil	509	626	769	23,0	22,9
México	621	615	731	-1,0	18,9
Índia	408	363	337	-11,1	-7,0
Total	557,40	602,30	663,10	8,1	10,1

Fonte: FAO, 2005.

Todavia o Brasil produz mais que a Índia em uma área plantada menor. Outra observação de inegável importância é o fato de o Brasil ter reduzido ou praticamente mantido sua área plantada, porém aumentou sua produção, o que demonstra o relevante papel da pesquisa na obtenção de novas tecnologias que permitam o aumento da produção e da produtividade. Porém esta pesquisa ainda deverá ocorrer com intensidade e incentivo crescente para que o Brasil possa continuar como maior produtor mundial de feijão alcançando os mesmos ou maiores patamares que os países que se colocam a nossa frente em nível de rendimento médio de produtividade.

2.3 INSETOS-PRAGA NA CULTURA E EM GRÃOS ARMAZENADOS

O feijão é alvo de vários insetos praga e doenças causadas por vírus, fungos, bactérias e os danos causados podem ser observados desde a semeadura até a fase pós-colheita. No Brasil, as principais pragas que atacam a cultura do feijão são as vaquinhas (*Diabrotica spp*, *Cerotoma spp* e *Calaspis spp*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), caruncho (*Z. subfasciatus*, *A. obtectus*, *C. maculatus*), ácaro branco (*Polyphagatorronemus latus* Banks), mosca branca (*Bemisia tabaci*). Os bruquídeos são insetos-praga que se alimentam de grãos de feijão armazenados, afetando tanto a quantidade (perda de peso) como a qualidade dos grãos e sementes, pela presença de insetos, ovos, dejetos, orifícios e o poder germinativo das sementes. Fatores como a precariedade das instalações, alta umidade, sementes danificadas e manejo inadequado dos grãos armazenados aliada à pequena disponibilidade de inseticidas registrados para o controle, são os principais fatores responsáveis pelo ataque de pragas (Gallo *et al.*, 2002).

Dos insetos que prejudicam os feijões armazenados, sobressaem dois coleópteros da família Bruchidae popularmente conhecidos como bruquídeos, caruncho, gorgulho ou bicho-do-feijão: *A. obtectus* (Say, 1831) e *Z. subfasciatus* (Bohemann, 1833), que atacam o feijão comum, o feijão de corda e outros grãos de leguminosas (Johnson *et al.*, 2004).

2.3.1 Descrição e biologia de *A. obtectus* (Say, 1831)

O inseto-praga, *A. obtectus* é considerado a principal espécie de caruncho que infesta feijão da América Latina, ocorrendo em regiões de clima temperado e subtropical. Apresenta infestação cruzada, ou seja, pode infestar os grãos no campo ou durante o armazenamento (Gallo *et al.*, 1988). Os adultos possuem de 2 a 4 mm de comprimento e têm coloração parda

escura, com pontuação avermelhada no abdome, pernas e antenas. O ciclo desta praga varia de 30 a 40 dias, dependendo da temperatura, sendo a longevidade média do adulto de 13 dias. Na fase adulta não se alimenta de grãos armazenados (Johnson *et al.*, 1995) (Figura 2.1).

No campo, a fêmea introduz os ovos dentro das vagens com grãos fisiologicamente maduros. Durante o armazenamento coloca-os livremente entre os grãos. Dos ovos emergem pequenas larvas que procuram os grãos para posteriormente penetrar em seu interior. A perfuração de entrada é praticamente impossível de ser observada e através dela podem penetrar uma ou várias larvas (Johnson, 1998).

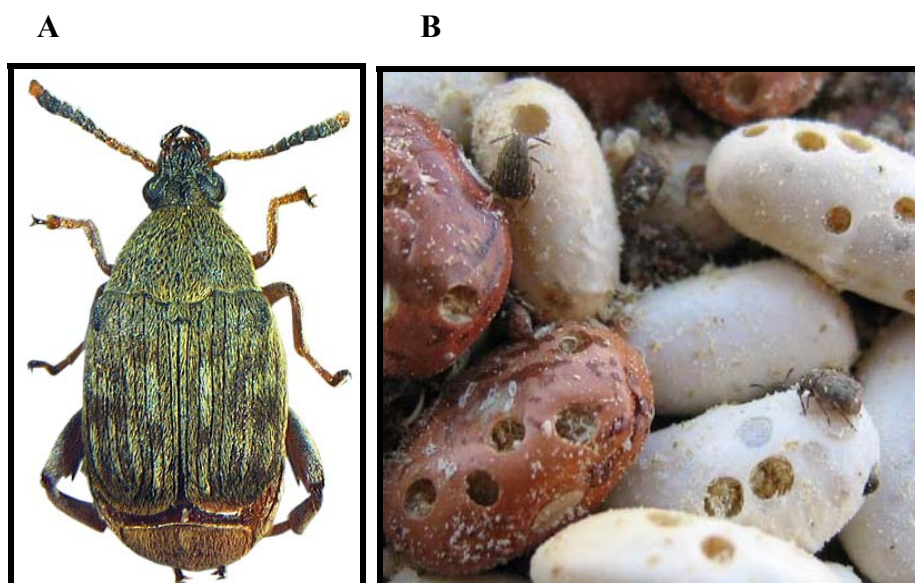


Figura 2.1 (A) Inseto adulto de *A. obtectus*; (B) Grãos de feijão infestados por *A. obtectus*. Fonte: <http://claude.schott.free.fr/Bruchidae/Fiches/Acantobtec.html>

Quando a larva completa seu desenvolvimento, antes de virar pupa, corta a superfície do grão sem danificar a cutícula, formando uma janela característica, facilmente visível nos grãos de cores claras. O adulto empurra a cobertura para sair do grão deixando um orifício de forma circular. Se a infestação ocorre no campo, o adulto é capaz de perfurar as vagens para emergir. Em um mesmo grão podem se desenvolver vários indivíduos. Os grãos danificados podem apresentar múltiplos orifícios. Uma fêmea põe em média 63 ovos ao longo de sua vida que é relativamente curta. Podem existir várias gerações em um período de 1 ano, devido a sua capacidade de colocar rapidamente seus ovos (FAO, 2006).

2.3.2 Descrição e biologia de *Z. subfasciatus* (Bohemam, 1833)

Nas regiões tropicais da América Latina o caruncho-do-feijão, *Z. subfasciatus* é considerado a principal praga do feijão armazenado, sendo também encontrada em regiões de clima temperado e frio (Rossetto, 1966; Decheco *et al.*, 1986). Sua presença tem sido relatada, também, em algumas regiões da África. Além dos grãos de feijão, podem se alimentar de grãos de ervilha, lentilha e soja (FAO, 2006).

Os insetos adultos de *Z. subfasciatus* apresentam cor castanha escura e medem 1,8 a 2,5 mm de comprimento. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam quatro manchas brancas no pronoto, enquanto que os machos possuem cor cinza uniforme. Suas antenas são longas e ultrapassam a metade do corpo (figura 2.2 A) (Southgate 1979).

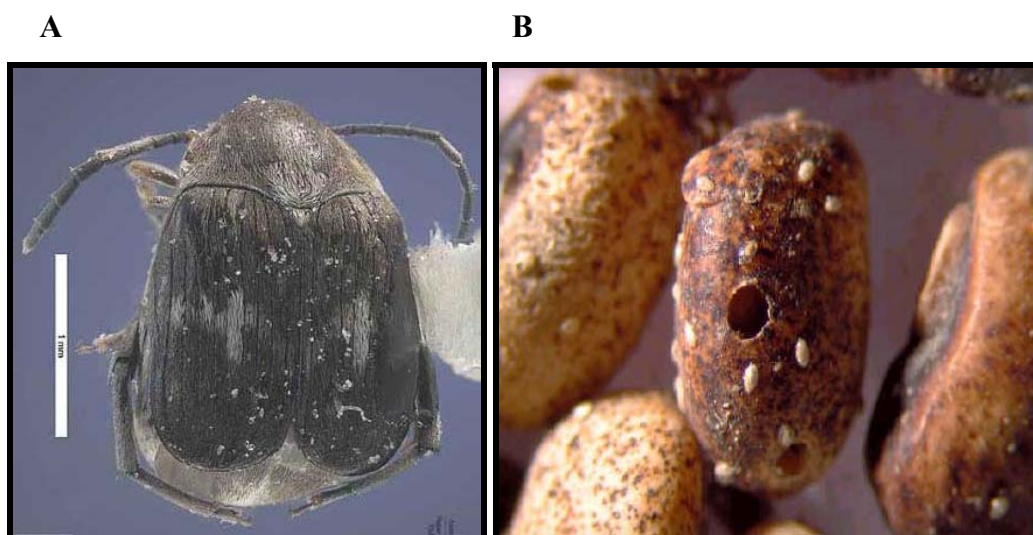


Figura 2.2: (A) Inseto adulto de *Z. subfasciatus*. (B) Grãos de feijão infestados por *Z. subfasciatus*.
Fonte: <http://flyaqis.mov.vic.gov.au/padil/beetles.html> e <http://www.centreinar.org.br/pragas/bruchidae.html>

Os insetos adultos de *Z. subfasciatus* são menores que *A. obtectus*, porém, ambos possuem biologia similar. A diferença entre estas espécies é que a fêmea de *Z. subfasciatus* adere, fortemente, seus ovos aos grãos (Figura 2.2 B). As larvas recém emergidas penetram, no interior dos grãos e passam por 4 estágios larvais antes de virar pupa. Constroem uma galeria no interior dos grãos e deixam coberta somente pelo pericarpo da semente, empurrando-o para sair do grão. Os adultos são de vida curta e vivem em média de 10 a 12 dias, não se alimentado de grãos armazenados nessa fase (Southgate 1979; Credland & Dendy 1992).

2.3.3 Descrição e biologia de *C. maculatus* (Fabr., 1775)

Ataca principalmente o feijão caupi, conhecido também como feijão de corda, ervilha e grão-de-bico (Marangoni, 2002). É provavelmente originário da África. Atualmente se encontra na maioria das regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Considera-se relativamente recente sua aparição na América, existindo relatos de sua presença no Brasil e no México (Gallo *et al.*, 2002).

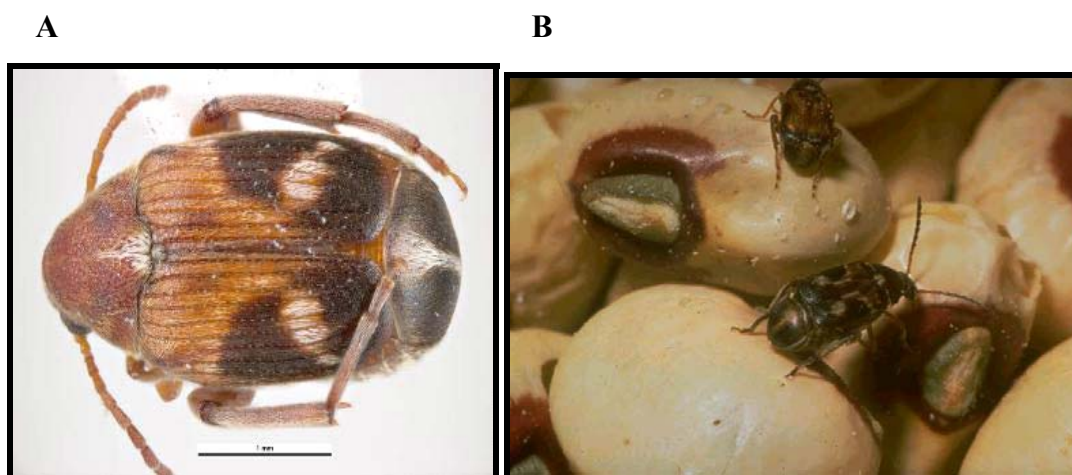


Figura 2.3: (A) Inseto adulto de *C. maculatus*. (B) Grãos de feijão infestados por *C. maculatus*.
Fonte: <http://www.insects.tamu.edu/.../images/b-txt/bimg179.html> e
<http://www.padil.gov.au/browsePestRegions.aspx?menu=...>

São insetos geralmente, de 3 a 4,5 mm de comprimento e formato do corpo oval. Apresenta nos élitros manchas amarronzadas (Figura 2.3 A). A fêmea põe seus ovos nos grãos durante o armazenamento e nas vagens ainda no campo, pois possuem infestação cruzada. As larvas penetram imediatamente dentro dos grãos, onde permanecem até chegar à fase adulta (Figura 2.3 B). Antes de virar pupa, a larva constrói uma galeria no interior da semente deixando-a coberta somente pelo pericarpo de maneira similar ao *A. obtectus*. Os adultos são de vida curta e não se alimentam de grãos. Seu ciclo biológico dura aproximadamente 21 dias podendo variar de acordo com a temperatura (Gallo *et al.*, 2002).

2.3.4 Principais estratégias no controle de bruquídeos

A proteção da cultura do feijão contra danos causados pelo ataque de bruquídeos é de suma importância para a produção agrícola mundial. Segundo a FAO as perdas causadas por

insetos chegam a 14% na produção agrícola mundial e no Brasil pode chegar até 30%. Nas regiões tropicais e subtropicais, o problema é ainda mais grave, pois o clima favorece o desenvolvimento dos insetos (Lawrence & Koundal, 2002). Atualmente, a proteção das colheitas baseia-se quase que exclusivamente no uso de agroquímicos, embora existam alguns casos específicos onde o uso de variedades resistentes e o controle biológico de pragas, têm sido empregados com sucesso (Ferry *et al.*, 2006). O uso excessivo de pesticidas químicos resulta num rápido ganho de resistência a tais compostos, podendo afetar os predadores naturais, favorecendo assim a proliferação das pragas, além de elevar o custo de produção e causar danos para o ambiente e para a saúde humana. Os programas empregados para o controle de pragas compreendem uma combinação de estratégias que incluem o uso de pesticidas, rotação de cultura, de manejo integrado de pragas (MIP) e o uso de variedades resistentes (Lawrence & Koundal, 2002; James, 2004).

As plantas transgênicas, que expressam genes com atividade inseticida vem conquistando e consolidando um significativo espaço na agricultura mundial, pois representam uma nova alternativa para o controle de insetos-praga, além de serem compatíveis com o manejo integrado de pragas (Frizzas *et al.*, 2004; Abdeen *et al.*, 2005).

Atualmente vem se estudando a biossíntese de regulação de compostos químicos das plantas, como por exemplo, as proteínas de defesa vegetais (Ferry *et al.*, 2005). Entre essas proteínas estão incluídas: enzimas, as lectinas e inibidores de enzimas digestivas, como por exemplo, os inibidores de α -amilase e proteinase. Desta forma, o uso de proteínas de defesa vegetal tem sido uma estratégia para obtenção de plantas geneticamente resistentes a insetos-praga como os bruquídeos (Christou *et al.*, 2006).

2.4 PROTEÍNAS DE DEFESA VEGETAL

Existe um grande número de estratégias de defesa natural que são utilizadas pelas plantas quando atacadas por patógenos herbívoros ou quando submetidas a condições ambientais adversas. Estas estratégias conferem as plantas um variado grau de resistência e por muitos anos tem se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados com estas defesas (Bell, 1981). De um modo geral, os mecanismos de defesa das plantas superiores contra uma variedade de agentes bióticos e abióticos podem ser agrupados em duas categorias: constitutivos, se sua ação faz-se dentro do programa de desenvolvimento normal da planta; e induzida quando estão envolvidas diretamente na resposta a alguma agressão ou infecção (Chesin & Zipf, 1990).

Estudos sobre a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados as defesas de plantas vem sendo feitos. Inicialmente, essas substâncias químicas foram consideradas como compostos secundários nas plantas e suas funções não eram bem estabelecidas (Franco *et al.*, 2002). Atualmente, sabe-se que essas proteínas de defesa, são compostos encontrados nos diferentes tecidos vegetais, na forma de componentes constitutivos, fazendo parte do desenvolvimento da planta ou então, sendo sintetizados em resposta ao ataque de pragas e patógenos (Mello & Silva-Filho, 2002).

Existem inúmeras proteínas envolvidas com o mecanismos de defesa de plantas, podendo apresentar ação direta ou indireta contra pragas. Entre estas podemos citar os inibidores de proteinases e os inibidores de α -amilases, bem como as quitinases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), arcelinas, vicilinas, leguminas, lectinas, defensinas, tioninas, proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) (Sales *et al.*, 2000; Carlini & Grossi de Sá, 2002; Ferry *et al.*, 2005). Além da indução destas proteínas de defesa, as plantas ainda podem se defender de outras maneiras como liberação de compostos voláteis que atraem predadores (Birkett *et al.*, 2000), a síntese de metabólitos secundários (Baldwin, 2001; Kliebenstein *et al.*, 2001) e o aumento da densidade de estruturas foliares e caulinares como os tricomas (Fordyce, 2003).

Mesmo com a presença de fatores de defesa tão variados, os bruquídeos são capazes de infestar as sementes de feijão armazenado. Estes fatores estão presentes em alto nível na variedade selvagem, mas quando domesticados, perdem ou reduzem a capacidade de sintetizar esses fatores. Um fato importante é a co-evolução dos insetos e plantas previamente estudadas por Ehrlich & Raven (1964), o qual sugere que o acúmulo e produção de uma toxina produzem um estímulo-resposta no predador, fazendo com que haja uma excreção da toxina pelo mesmo, capacitando-o a alimentar-se do vegetal. Desta maneira, a adaptação da planta é seguida por uma contra-adaptação da praga.

Os inibidores de enzima digestiva de insetos-praga (proteinases e α -amilases) vêm recebendo grande atenção dos pesquisadores, principalmente os inibidores de α -amilases. Por demonstrarem habilidades específicas para inibir α -amilases, são candidatos em potencial para o controle de insetos-praga por meio da obtenção de plantas geneticamente modificadas expressando esses inibidores.

2.5 INIBIDORES DE α -AMILASE

A α -amilase é uma enzima de grande importância para o metabolismo de muitos organismos autotróficos e heterotróficos. α -Amilases são enzimas monoméricas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos (MacGregor *et al.*, 2001). Essas enzimas têm um papel importante no metabolismo de carboidratos em plantas, animais e outros organismos por serem essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido (Franco *et al.*, 1999). Os organismos heterotróficos usam α -amilase primeiramente para digerir amido durante sua alimentação. Sabe-se que para a manutenção do crescimento em altas taxas, as larvas de muitas espécies de insetos precisam se alimentar continuamente, necessitando de enzimas digestivas potentes para o processamento adequado de toda a fonte alimentícia (Purcell *et al.*, 1992).

Os mamíferos e alguns insetos, tais como os bruquídeos *C. maculatus* (Campos *et al.*, 1989), *Z. subfasciatus* (Ishimoto *et al.*, 1996) e *A. obtectus* (Franco, 2000) apresentam diferentes formas de α -amilases e estas se apresentam em abundância no trato digestivo desses animais (Wang *et al.*, 2006). Assim, as α -amilases têm se tornado enzimas alvo para o controle desses insetos-praga (Grossi de Sá & Chrispells, 1997; da Silva *et al.*, 2000; Oliveira-Neto *et al.*, 2002).

Algumas plantas possuem proteínas com capacidade de inibir enzimas hidrolíticas, que atuam no intestino do inseto inibindo a ação das hidrolases e α -amilases. Os inibidores de α -amilase constituem uma importante família destas proteínas e podem ser encontrados em cereais como o trigo (Garcia-Maroto *et al.*, 1991, Feng *et al.*, 1996), cevada (Abe *et al.*, 1993) e centeio (Garcia-Casado *et al.*, 1995) e em leguminosas tais como o feijão comum (Marshall & Lauda, 1975; Ishimoto *et al.*, 1996; Grossi de Sá *et al.*, 1997) e o feijão-de-corda (Melo *et al.*, 1999) assim como em outras famílias de vegetais (Marshall & Lauda, 1975). Estas proteínas, com efeito, inseticida devem ser ingeridas para se tornarem efetivas e o sítio alvo de muita delas é o sistema digestivo do inseto. Sendo assim, os inibidores de α -amilases funcionam como substratos específicos das α -amilases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin & Gaut, 2001). Isto causa uma deficiência de aminoácidos que influencia o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, podendo eventualmente causar a sua morte devido à inibição das proteinases digestivas ou devido à produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma & Bolter, 1997; Pompermayer *et al.*, 2001).

Os inibidores de α -amilases possuem subunidades α e β que sofrem proteólise pós-traducional. Este processo de proteólise é fundamental para que esta molécula protéica adquira atividade inibitória (Suzuki *et al.*, 1994; Pueyo *et al.*, 1994). Isto ocorre normalmente em cotilédones de feijão depois que a proteína foi transportada para os vacúolos (Altabella *et al.*, 1990). A ativação ocorre com a clivagem no sítio carboxil na Asn-77 em *P. coccineus* (Kasahara *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1999).

Os inibidores α -AI presentes em semente de feijão, foram extensamente pesquisados nos últimos anos, destes podemos citar três diferentes isoformas: α -AI1 (Le Berre-Anton, 1997; Hoffman & Donaldson, 1985), α -AI2 (Hoffman & Donaldson, 1985; Suzuki *et al.*, 1994), e α -AI3 (ou α -AIL)(Finardi-Filho *et al.*, 1996). Presente em altas concentrações em sementes de feijão, o α -AI1 inibe α -amilases pancreática e salivar de mamíferos (Bompard-Gilles *et al.*, 1996) e de insetos como *C. maculatus* e *C. chinensis*, mas não inibe α -amilase de *Z. subfasciatus*. Em contrapartida o inibidor α -AI 2 não inibe as três α -amilases mencionadas anteriormente, mas inibe especificamente a α -amilase de *Z. Subfasciatus* (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997).

Segundo Richardson (2001), os inibidores de α -amilase foram classificados de acordo com sua estrutura terciária em seis diferentes classes: tipo lectina, knotina, cereal, kunitz, γ -purpitionina e taumatina. O inibidor de α -amilases estudando durante este projeto foi o inibidor 0.53 tipo cereal, oriundo de sementes de trigo.

2.5.1 Inibidores de α -amilase tipo cereal

O primeiro inibidor de α -amilase foi descrito no trigo em 1933 (Chrzaszcz & Janicki, 1934). O próximo relato, ocorrido somente em 1943, determinou a natureza protéica e solubilidade dos inibidores de α -amilase de trigo, centeio e determinadas variedades de cevada (Kneen e Sandstede, 1943).

Entre os inibidores de α -amilases mais estudados estão os inibidores encontrados em trigo, 0.19, 0.53 e 0.28, nomeados de acordo com sua mobilidade eletroforética (Oda *et al.*, 1997).

Os inibidores protéicos de α -amilases são muito abundantes no trigo e representam uma fração substancial das albuminas e globulinas (Feng *et al.*, 1996). Em sementes de cereal, os inibidores de α -amilases possuem de 120 a 130 aminoácidos, assim como os inibidores de tripsina e fazem parte de uma grande família protéica, baseado na homologia da seqüência de aminoácidos (Strobl *et al.*, 1995). Geralmente estes inibidores possuem um resíduo de 10

cisteínas e cinco pontes dissulfeto (Oda *et al.*, 1997). O inibidor dimérico 0.19 (24kDa) mostrou-se ativo contra várias α -amilase de insetos, incluindo *Tenebrio molitor*, *Sitophilus oryzae* e *Tribolium castaneum* (Feng *et al.*, 1996), *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* (Franco *et al.*, 2001). A família deste inibidor é bastante caracterizada por meio de estudos de análises de cristalografia por raios-X. A relação entre sua estrutura e função é bem conhecida no controle de diabetes, controle nutricional e toxicológico em relação a alimentação (Oda *et al.*, 1997). Os diferentes inibidores de α -amilases encontrados no trigo apresentam diferentes especificidades contra as α -amilases de vários organismos como a α -amilase de pâncreas de porco (PPA), a α -amilase de saliva humana (HSA) e α -amilases de insetos. Estes inibidores estão classificados em três famílias de iso-inibidores, com pesos moleculares aparentes de 60, 24 e 12 kDa (Deponte *et al.*, 1976) e encontram-se codificados em uma cadeia multigênica dispersa em alguns cromossomos do genoma do trigo (Barber *et al.*, 1986, Sanches-Monge *et al.*, 1986, 1989). Pode ser observado por análise filogenética, que os inibidores diméricos de α -amilase, são derivados de um gene ancestral comum (Wang, 2005), com base em suas características, o que pode ser uma explicação para a grande homologia encontrada entre estes. Wang e colaboradores (2006), fizeram a caracterização molecular dos genes dos inibidores diméricos de α -amilase 0.53 e 0.19 e utilizando oligonucleotídeos específicos fizeram a localização destes nos cromossomos 3BS e 3DS, de trigo, especificamente. A análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos mostrou um nível de 95% de identidade de seqüência de aminoácidos, entre 12 diferentes inibidores do trigo (Wang *et al.*, 2006). Os oligonucleotídeos genômicos alelos-específicos, amplificaram inibidores de α -amilases em 15 diferentes acessos de trigo. Estes resultados indicam, que os inibidores 24 kDa diméricos de α -amilases do trigo são codificados por uma família multigênica (Wang, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Já foi estabelecido que existem múltiplas formas da proteína ativa da α -amilase endógena e exógena de trigo, bem como a atividade de inibidores diméricos de α -amilase contra vários organismos (Deponte *et al.*, 1976; Da Silva *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2000).

Franco e colaboradores (2001) purificaram e caracterizaram a especificidade de dois inibidores de sementes de trigo (*T. aestivum*), denominados 0.19 e 0.53. Estes inibidores, quando testados *in vitro*, apresentaram diferentes atividades inibitórias contra PPA (α -amilase Pancreática de Porco) e as α -amilases dos insetos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*. O inibidor 0.19 apresentou atividade contra todas as α -amilases testadas, enquanto que o inibidor 0.53 só apresentou preferencialmente atividade contra as α -amilases dos bruquídeos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, e pouca atividade

contra PPA. Isto caracterizou o inibidor 0.53 como promissor para inibir α -amilases de bruquídeos. Com relação às especificidades, foi a primeira vez que se observou uma diferença funcional (relacionado a PPA) entre os inibidores 0.19 e 0.53. Outro importante resultado dessa pesquisa foi a demonstração da atividade inibitória dos inibidores 0.19 e 0.53 contra α -amilases do *A. obtectus*. Esta foi também a primeira vez que um inibidor de α -amilase apresentou-se ativo contra as α -amilases deste importante inseto-praga de grãos armazenados de feijão. Devido a maior especificidade do inibidor 0.53 sobre as α -amilases dos bruquídeos em relação a PPA, este inibidor apresentou melhor potencial para uso biotecnológico.

Os primeiros relatos de plantas transgênicas utilizando inibidores de α -amilases dizem respeito à Ishimoto & Kitamura (1989) que demonstraram o efeito deste mesmo inibidor em plantas de feijão azuki completamente resistente ao caruncho *C. maculatus*. Chrispeels, (1996), produziu ervilhas transgênicas expressando o gene α -A11 em níveis suficientes para tornar as sementes resistentes aos bruquídeos *C. maculatus*, *C. chinensis* e *B. pisorium*. Morton e colaboradores (2001), mostraram que ervilhas transgênicas expressando o α -AI 2 mostraram-se menos protegidas ao ataque de caruncho que as ervilhas que possuem o α -AI. Recentemente, Pereira e colaboradores (2006), mostraram que o inibidor de α -amilase α -AIPC, isolado de *P. coccineus* e expresso em tabaco foi ativo contra α -amilase de *Hypothenemus hampei*, um inseto-praga que ataca grãos de café. Esses relatos sugerem que a transferência de inibidores de α -amilases para plantas pode ser uma boa estratégia para a obtenção de cultivares resistentes.

A indústria biotecnológica tem procurado desenvolver processos de produção de proteínas e de outros produtos, em larga escala e de forma eficiente, para produzir plantas resistentes a insetos-praga. Para este fim, os microrganismos são “fábricas” de primeira escolha. Recentemente tem-se desenvolvido estudos com *P. pastoris* por esta apresentar um bom rendimento na síntese de proteínas heterólogas. O caráter não patogênico do microrganismo é um factor primordial na eleição da espécie a ser utilizada. Porém, a escolha tem que levar em conta também o gene que se pretende clonar (frequência dos códons utilizados) e a proteína a produzir (processamento proteolítico, glicosilação, massa molecular). São também importantes as características fisiológicas do microrganismo, tais como: taxa de crescimento, fontes de carbono, energia e a capacidade de secretar proteína heteróloga. Visando a produção de proteínas recombinantes em quantidades suficientes para realização dos ensaios propostos, optou-se pela expressão do inibidor 0.53 em células de *P. pastoris*.

2.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *P. pastoris*

Durante os últimos 15 anos a levedura metilotrófica *P. pastoris* tem se tornado um sistema altamente eficaz na produção de várias proteínas heterólogas. Os principais fatores relacionados ao aumento da popularidade deste sistema são: (i) a simplicidade das técnicas necessárias para sua manipulação genética; (ii) a habilidade de *P. pastoris* de produzir proteínas heterólogas em altos níveis; (iii) a capacidade de fazer muitas modificações pós-traducionais; (iv) a viabilidade do sistema de expressão como Kit comercialmente disponível (Hollenberg, 1997).

Leveduras metilotróficas, por definição, são capazes de utilizar metanol como única fonte de carbono. Os altos níveis de expressão de *P. pastoris* estão relacionados ao forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *P. pastoris*. Esse promotor é regulado por metanol, um indutor relativamente barato. Em *P. pastoris* existem dois genes que codificam para a álcool oxidase, *AOX1* e *AOX2*. Embora as proteínas *AOX1* e *AOX2* possuam 97% de identidade de seqüência e atividade enzimática equivalente, mais de 95% da atividade de álcool oxidase é atribuída à *AOX1*. Isso ocorre, pois o promotor *AOX1* é mais forte e os altos níveis de expressão para transcrever genes heterólogos em *P. pastoris* estão relacionados a ele. Após a adição de metanol, transcritos do gene *AOX1* são rapidamente induzidos a altos níveis, perfazendo 5% do RNA poliA⁺ total (Cregg & Madden, 1988). A proteína *AOX1* é superexpressa e chega a 30% das proteínas totais intracelulares. O mecanismo de ativação do gene *AOX1* envolve tanto a indução do seu promotor por metanol quanto a desrepressão pela ausência de outras fontes de carbono (Tschopp *et al.*, 1987).

Na presença de metanol como única fonte de carbono, a via inicia com a oxidação do metanol para formar formaldeído e peróxido de hidrogênio reação catalisada pela enzima *AOX*. A enzima está presente dentro de uma organela chamada peroxissomo junto com a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Cregg, 1999). A *AOX* é codificada por dois genes, *AOX1* e *AOX2*, devido à necessidade de gerar altas concentrações dessa enzima para compensar a baixa afinidade que a mesma tem pelo oxigênio (Cregg *et al.* 1989). A expressão do gene *AOX1* é fortemente controlada transcricionalmente em duas etapas: primeiro, através de um processo de repressão/desrepressão e, em seguida, por um mecanismo de indução, tendo como repressor a glicose e indutor o metanol.

Uma das desvantagens deste sistema de expressão é a proteólise de peptídeos secretados. Entretanto, algumas soluções para este problema têm sido relatadas, como por exemplo, à utilização de linhagens deficientes em proteases (Romanos, 1995).

Várias linhagens proteases deficientes têm se mostrado eficaz na redução da degradação de proteínas heterólogas. As linhagens mais comuns são: SMD1163 (*his4, pep4, prb1*), SMD1165 (*his4, prb1*), SMD1168 (*his4, pep4*). O gene PEP4 é responsável pela expressão da proteinase A, uma importante protease responsável pela ativação de proteases vacuolares, como a carboxipeptidase Y e a proteinase B. Contudo, a viabilidade destas linhagens é comprometida, apresentando um crescimento mais lento e ainda mais difícil de serem transformadas em relação às linhagens selvagens (Cregg, 1993). Linhagens como as KM71 (*his4, aox1:ARG;arg4*), GS115 (*his4*) e SMD1168 (*his4, pep4*) não possuem o gene que codifica histidina desidrogenase (*his4*). Os transformantes são selecionados pela habilidade de crescimento em meio sem histidina.

Existem muitos vetores comerciais que podem ser usados para expressar proteínas em *P. pastoris*. Os vetores de expressão em *P. pastoris* são geralmente do tipo integrativos. Esses vetores possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene *AOX1*, além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (*HIS4*). A primeira geração de vetores de expressão em *P. pastoris*, foram o pPIC9 (Invitrogen), que possui como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* (Torres e Moraes, 2000), e o pHIL-D2. Estes possuem o gene funcional da histidina desidrogenase (*his4*) e resistência a kanamicina. Possuem 9.3 a 9.0 kb respectivamente. Apresentam dificuldades para clonagens *in vitro* (Sears *et al.*, 1998), em virtude do tamanho do vetor e também resultam em transformantes com baixa estabilidade genética (Romanos *et al.*, 1992).

Atualmente os vetores que vêm sendo mais utilizados para expressão em *P. pastoris* são os pPICZ α , que possuem seleção por zeocina e que possuem como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α , além de possuir o promotor *AOX1* e região terminadora de transcrição do gene *AOX1*. Outra grande vantagem é o tamanho desses vetores que variam de 3.3 a 3.6 kb (Vassileva *et al.*, 2001).

A recombinação homóloga para a integração dos plasmídios pode ocorrer no locus *his4* ou no locus *AOX1*. Quando a recombinação ocorre no locus *AOX1* através de um duplo *crossover* entre regiões do vetor e do genoma, e região codificadora *AOX1* é completamente removida (veja-se Figura 2.4). O fenótipo resultante Mut^S (*Methanol utilization slow*) é causado pela perda de atividade de álcool oxidase codificada pelo gene *AOX1*, restando

apenas o *AOX2*. Isto resulta num fenótipo de crescimento lento em meio com metanol. Quando a recombinação homóloga ocorre através de um *crossover* simples, levando à inserção gênica no locus *his4* ou no locus *AOX1*, o fenótipo resultante é *Mut⁺* (*Methanol utilization plus*). Este fenótipo se refere à habilidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono comparável às linhagens selvagens (veja-se Figura 2.5). Algumas proteínas expressam melhor em um tipo de fenótipo do que em outro (*Mut^S* ou *Mut⁺*).

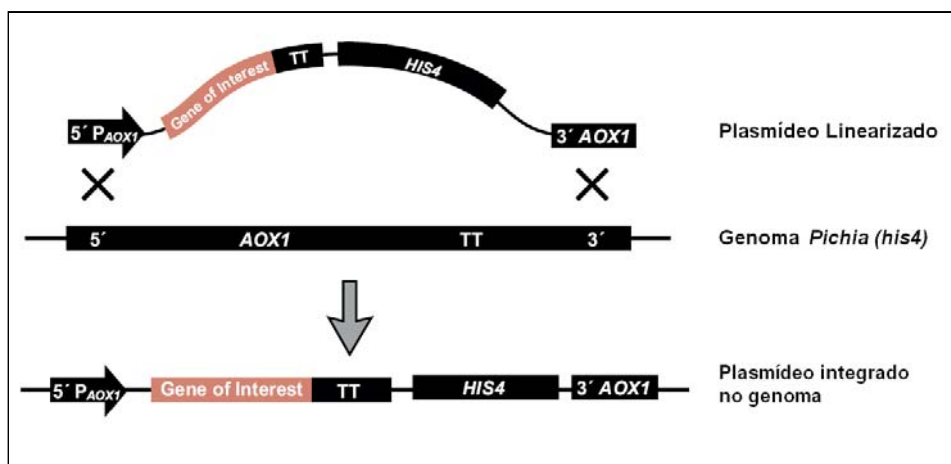


Figura 2.4 Substituição gênica por duplo *crossover* no *AOX1* em *P.pastoris*. A figura acima mostra a substituição gênica no locus *AOX1*. Numa cepa *his4* como a SMD1168, a substituição gênica (inserção ômega) é originada de um duplo *crossover*, do promotor *AOX1* e da região 3'*AOX1*, entre o vetor e do genoma. Isto resulta numa remoção completa da região codificadora do *AOX1* genômico. O fenótipo resultante é *His⁺ Mut^S*. Os transformantes *His⁺* podem ser facilmente localizados pelo seu fenótipo e o *Mut^S* serve como indicador da integração via substituição do locus *AOX1*. O resultado deste tipo de substituição gênica é a perda do locus *AOX1* (*Mut^S*) e o ganho de um cassete de expressão contendo *PAOX1*, o gene de interesse e *HIS4*. (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002)

Em relação com outras leveduras utilizadas para a expressão de genes, como *Sccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* tem a vantagem de não realizar a hiperglicosilação da proteína secretada, fato que poderia tornar a proteína imunogênica em humanos e/ou interferir no enovelamento da proteína tornando-a inata biologicamente (Cregg, 1999). Tanto *S. cerevisiae* quanto *P. pastoris* apresentam padrões de glicosilação do tipo manose N-ligada. Porém, em *S. cerevisiae*, as proteínas costumam apresentar mais de 50 resíduos de manose, caracterizando assim a condição de hiperglicosilação. Em *P. pastoris*, a N-glicosilação se inicia no retículo endoplasmático (ER) com a transferência da unidade de oligossacarídeo lipídeo ligada, $\text{Glc}_3\text{ManGlc}$ (Glc, glicose; GlcNAc, N-acetilglicosamina) para asparagina na seqüência de reconhecimento Asn-X-Ser/Thr. Além disso, esta levedura não é capaz de realizar glicosilações terminais do tipo $\alpha 1,3$ (Cregg, 1999). Há evidências que este tipo de

ligação seja responsável pela hiper-antigenicidade apresentado por algumas proteínas expressas em *S. cerevisiae* (Cregg, 1993).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser feita de forma intracelular ou via secreção. A vantagem da segunda é que *P. pastoris* secreta proteínas nativas em níveis baixos, facilitando, portanto a posterior purificação.

A maior vantagem do sistema de levedura, frente ao bacteriano, é o potencial que as leveduras têm de fazer modificações pós-traducionais, tipicamente associadas com eucariotos superiores, tais como processamento de peptídeo sinal, formação de pontes dissulfeto, adição de lipídeos e glicosilações O- e N- ligadas (Cregg, 1993).

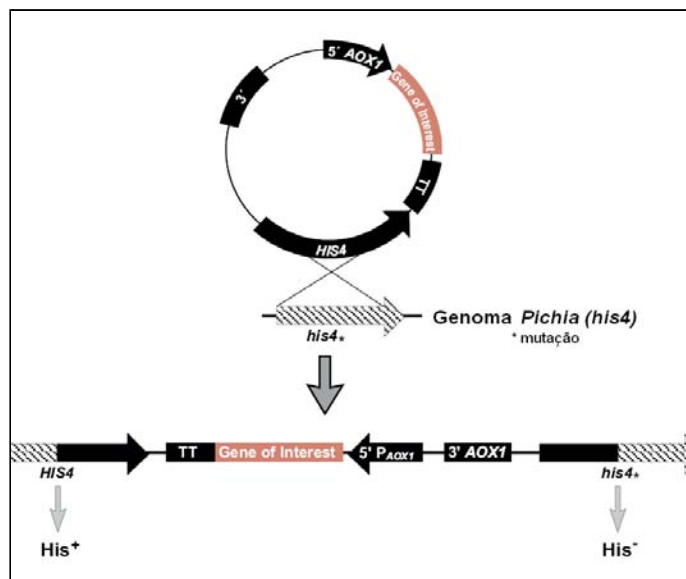


Figura 2.5 Inserção gênica por simples crossover do *HIS4* em *P.pastoris*: A figura acima mostra o resultado da inserção de um plasmídeo entre cópias duplicadas dos genes *HIS4/his4*, uma ainda mutante e outra selvagem. Tanto na cepa SMD1168 (*Mut*⁺) quanto KM71 (*Mut*^S), os eventos de inserção gênica no locus *his4* resultam do simples *crossover* entre o locus *his4* no cromossomo e do gene *HIS4* do vetor. Isto culmina na inserção de uma ou mais cópias do vetor no locus *his4*. Desde que o genoma *AOX1* ou o loci *aox::ARG4* não estejam envolvidos neste evento de recombinação, o fenótipo de cada transformante *His*⁺ será o mesmo fenótipo *Mut* da cepa original. Com a linearização do vetor recombinante pelo sítio de restrição enzimática localizado no gene *HIS4*, *Mut*⁺ ou *Mut*^S recombinantes podem ser convenientemente gerados dependendo da cepa hospedeira utilizada (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho, o inibidor 0.53 foi expresso em células de *P. pastoris*, linhagem GS115. O vetor de expressão utilizado foi o pPICZ α -A da Invitrogen™.

Dentre os elementos constituintes mais importantes deste plasmídeo, destacam-se: o tamanho (3593 pb), o promotor *AOX1* que dirige a transcrição do gene de interesse, o sinal de secreção fator- α que dirige a secreção da proteína expressa para o sobrenadante, codificação de seis histidinas, o gene de seleção por Zeocina e o fragmento 3' *AOX1* de terminação da transcrição (Figura 3.1).

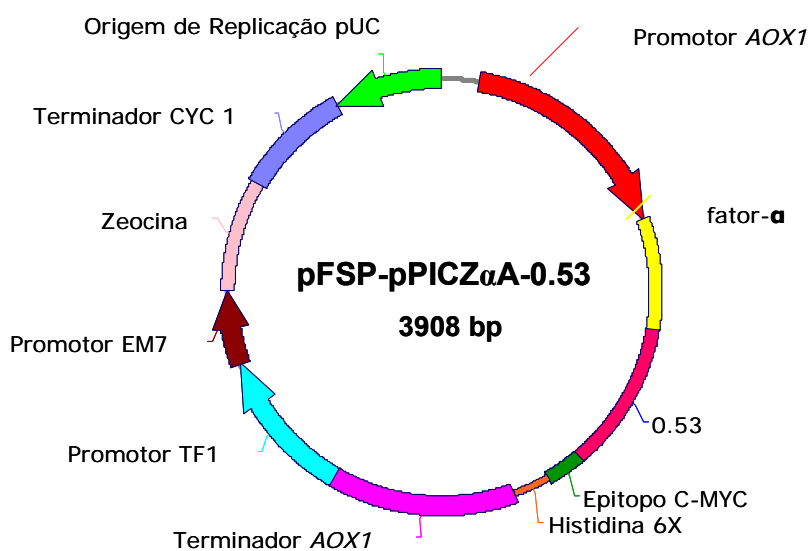


Figura 3.1 Representação esquemática do vetor pFSP-pPICZ α A-0.53, utilizado para a expressão do gene do Inibidor 0.53 de trigo, em *Pichia pastoris*. O gene do inibidor 0.53 foi inserido entre os sítios de *EcoRI* e *XbaI* do múltiplo sítio de clonagem vetor pPICZ α A.

3.2 MATERIAIS

3.2.1 Linhagem bacteriana

Para a realização deste trabalho utilizou-se a seguinte linhagem de *E. coli*:

- ***XL1-Blue***

Utilizou-se esta linhagem basicamente para a amplificação de plasmídeos.

3.2.2 Linhagem de levedura

- *Pichia pastoris* GS115

Utilizou-se esta linhagem de *P. pastoris* para a expressão do inibidor de α -amilase 0.53.

3.2.3 Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos utilizados para a realização deste trabalho foram:

pFSP-pGEMTeasy-0.53 – Utilizou-se para amplificação do 0.53 por PCR, com os oligonucleotídeos 5'ECAA53F CCGAATCCATGTCCGGCCCATGGATGTGCT e 3'XBAA53R GGCTCTAGAGCTTCTGGGTGAGCGGCCAC contendo sítio de *EcoRI* e *XBAI*, respectivamente.

pPICZ α A – Utilizou-se para subclonagem do gene.

pFSP-pPICZ α A-0.53 – Utilizou-se para expressar o inibidor 0.53 em *P. pastoris*.

3.2.4 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da seqüência 5' e 3' do inibidor 0.53. Estes foram sintetizados pela Invitrogen® e dissolvidos em água Milli-Q para concentração estoque de 500 μ M. A tabela 6.1, mostra a seqüência de cada um dos oligonucleotídeos. Estes oligonucleotídeos foram utilizados para a subclonagem e amplificação por PCR do Inibidor 0.53.

```
atgtccggcccatggatgtgctatccggggcaggcctcccaggtgcccgcgctccctggc
M S G P W M C Y P G Q A S Q V P A L P G
tgtcgtccattgctgaagctccagtgcaatggcagccaggtgcccgaggctgtcctaagg
C R P L L K L Q C N G S Q V P E A V L R
gactgctgccagcagctcgccgatatcagtgagtggtgcaggtgcggggccctctacagc
D C C Q Q L A D I S E W C R C G A L Y S
atgttgatagcatgtataaggagcatggcgtgtcggagggacaggcggggacaggcgca
M L D S M Y K E H G V S E G Q A G T G A
ttccaagctgccggagggaggtggtgaagctgacggcggcgagcatcacggcgggtctgc
F P S C R R E V V K L T A A S I T A V C
aggctaccatcgctcgttgatgcgtccggagatggagcgtatgtctgcaaggatgtggcc
R L P I V V D A S G D G A Y V C K D V A
gcctaccagacgcc
A Y P D A
```

Figura 3.2 Seqüência gênica e a tradução do cDNA do inibidor 0.53 com a seqüência destacada referente aos oligonucleotídeos ECAA53F e XBAA53R. Acesso DQ534754 depositada no banco de dados NCBI.

Tabela 3.1 Oligonucleotídeos utilizados

Denominação	Utilização	Seqüência (5' → 3')
5' AOX	PCR	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3' AOX	PCR	GCAAATGGCATTCTGACATCC
5' ECAA53F	Subclonagem/PCR	CCGAATCCATGTCCGGCCCATGGATGTGCT
3' XBAA53R	Subclonagem/PCR	GGCTCTAGAGCTTCTGGGTGAGCGGCCAC

3.2.5 Meios de cultura

3.2.5.1 Meio de cultura para bactérias

Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
pH ajustado para 7,0	

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v)

3.2.5.2 Meios de cultura para leveduras

Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Meio YPDS (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Uma solução contendo glicose e outra contendo extrato de levedura e peptona foi autoclavada a 120°C por 20 minutos. No momento da utilização foram misturados para as concentrações acima relacionadas. Autoclavou-se ágar 2 % (meio sólido) por 20 minutos. Adicionou-se às soluções estoque ao meio, ainda quente, e distribuída em placas.

BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium)

2YP	50%
Fosfato de Potássio, pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

BMMY (Buffered Methanol Complex Medium)

2YP	50%
Fosfato de potássio, pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
L-Arginina	200 mM
Casaminoácidos	2%
EDTA	5 mM
Metanol	0,5% (v/v)

Para preparo dos meios BMGY e BMMY, uma solução de extrato de levedura e peptona de caseína foi autoclavada separadamente e foram adicionados os demais reagentes previamente esterilizados por filtração (YNB, Biotina, EDTA e metanol), ou por autoclavagem (glicerol e tampão fosfato de potássio), adicionando água estéril para completar o volume.

3.2.5.2.1 Soluções estoque para meio de cultura de *P. pastoris***YNB (Yeast Nitrogen Base) - Solução estoque de 10X**

YNB (s/ aminoácidos e s/ sulfato de amônio)	3,4% (p/v)
Sulfato de amônio	10% (p/v)

Esterilizada por filtração. Estocar a 4 °C.

Fosfato de potássio 1 M, pH 6,0

K ₂ HPO ₄	132 mM
KH ₂ PO ₄	686 mM

Esterilizada em autoclave e estocada a temperatura ambiente.

Biotina - Solução estoque 500 X

Biotina	0,02% (p/v)
---------	-------------

Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana microbiológica com poros de 0,22 µm e estocada a 4 °C.

Glicerol – Solução estoque 10X

Glicerol 10% (v/v)
Esta solução foi autoclavada a 120° C por 20 minutos.

Metanol (Merk) 100%

3.2.6 Soluções estoques de inibidores de proteases

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

Dissolvido em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano

Inibidor de serino e tiol proteases como: quimiotripsina, trombina, papaína.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5 M

Dissolvido em água em pH 8-9 estocada a 4°C por até 6 meses

Inibidor de metaloproteases

3.2.7 Soluções e tampões de uso generalizado**Clorofil**

Clorofórmio 24 v

Álcool Isoamílico 1 v

Equilibrado com 0,25v de tampão TE

3.2.8 Soluções para extração de DNA plasmidial**Solução I**

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio 3 M

Ácido Acético 2 M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

RNase A

RNase A 10 mg/ml

Acetato de sódio pH 4,8 50 mM

Fervida em banho-maria por 20 minutos.

3.2.9 Tampões de endonucleases de restrição

T4 DNA Ligase	
Tris-HCl – pH 7.6	10 mM
KCl	50 mM
DTT	1 mM
EDTA	0,1 mM
Glicerol	50%

Tampão de Ligação Rápida 2X – T4 DNA Ligase

Tris- HCl pH 7,8	60 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	20 mM
ATP	2 mM
PEG	10%

Taq DNA polimerase pHT	5 U/μl
-------------------------------	--------

Tampão IB da Taq DNA polimerase 10X – pHT

Tris-HCl (pH 7,6)	660 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
BSA	2 mg/ml

NEB 1

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

NEB 2

Tris-HCl pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

3.2.10 Endonucleases de restrição

<i>EcoRI</i> (Promega)	15 U/μl
<i>XbaI</i> (Invitrogen)	10 U/μl
<i>SacI</i> (Gibco)	10 U/μl

3.2.11 Antibióticos

Solução estoque:

Ampicilina	100 mg/ml
Zeocina	100 mg/ml

Estas soluções foram preparadas em água milli-Q, esterilizadas em filtro Milipore 0,22 µm e estocadas a -20°C.

3.2.12 Soluções para cromatografia

Solução A

Ácido trifluoracético (TFA) 0,1%	
TFA 0,1%	1 ml
q.s.p. 1000 ml de H ₂ O destilada	

Solução B

Acetonitrila	
Acetonitrila	100%
TFA 0,1%	1 ml

3.2.13 Soluções de uso geral

dNTP's	10 mM
BSA	10 X
IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo)	1 M
X-GAL	1 M

A solução de IPTG foi esterilizada utilizando filtro Milipore 0,2 µm e estocada a -20°C.

3.2.14 Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TEB) 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M
pH 8,0	

Solução de Brometo de etídio 20.000X

Brometo de etídio	10 mg/ml
-------------------	----------

Tampão de Corrida para SDS-PAGE

Trizma base	125 mM
Glicina	960 mM
SDS	0,5% (p/v)
pH 8,3	

Tampão de Amostra 2X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	5% (p/v)
Glicerol	25% (v/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0,01% (p/v)

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	15 % (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1% (p/v)

Solução Corante para Gel SDS-PAGE

Metanol	40% (v/v)
Ácido Acético	10% (v/v)
Comassie Brilliant Blue (R-250)	1% (p/v)

Solução Descorante para Gel SDS-PAGE

Metanol	40% (v/v)
Ácido Acético	10% (v/v)

Solução de nitrato com prata

Nitrato de prata	200 mg
Formaldeído	74 µl
q.s.q 100 ml de H ₂ O destilada	

Solução de tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio	20 mg
q.s.q 100 ml de H ₂ O destilada	

Solução reveladora para o coramento com prata

Carbonato de sódio	6 g
Formaldeído	50 µl
Tiosulfato de sódio	2 ml
q.s.q 100 ml de H ₂ O destilada	

3.2.15 Marcadores de massa molecular

3.2.15.1 Marcadores de massa molecular (MM) para proteínas e DNA

- **Marcador de massa molecular – BenchMark Prestained Protein Ladder (Gibco)**

Composto por proteínas com as seguintes massas moleculares:

14 a 200 kDa

- **Marcador 1 kb DNA Ladder – Invitrogen Life Technologies**

Composto por DNA com os seguintes pares de base:

100 a 12.000 pb

3.2.16 **Material biológico**

Insetos – Larvas de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* foram obtidas da coleção existente no LIMPP – Laboratório de Interação Molecular Planta Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Larvas de *C. maculatus* foram obtidas da coleção de insetos do laboratório de bioquímica do curso de pós-graduação da Universidade Católica de Brasília.

3.2.17 **Soluções e tampões para ensaio enzimático**

Enzima PPA

α -Amilase pancreática de porco – Sigma (St. Louis, MO)

Enzima utilizada nos ensaios de detecção enzimática e de inibição

Tampão Succinato pH 4.5

CaCl₂ 200 mM

NaCl 200 mM

Ácido Succínico

Aferir o pH com HCL.

Tampão Tris-HCL pH 7.2 0.1 M

Solução estoque de Iodo

I₂ 0.55%

KI (Iodeto de Potácio) 5%

q.s.p 100 ml

Solução de Trabalho de Iodo

Solução estoque 10 ml

HCL 1 M 50 ml

q.s.p 1000 ml

Solução estoque de amido

Amido 0,25%

H₂O ou tampão

Aquecer lentamente e sob agitação o amido, até que se dissolva completamente, tornando-se uma solução translúcida. Não deixar ferver.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989)

1. Coletavam-se 3,0 ml de células de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (100 µg/ml) durante 16 horas a 37°C, por meio de 2 centrifugações a 5000 rpm em microtubos, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
2. Ressuspendia-se o sedimento em 300µl de solução I com 200µg/ml de RNase A.
3. Adicionavam-se 300µl de solução II. As amostras eram homogeneizadas por inversão dos tubos várias vezes. Em seguida incubava-se no gelo por 10 min.
4. Adicionavam-se 300µl de solução III, e procedia-se à nova homogeneização por inversão dos tubos. As amostras eram então reincubadas no gelo por mais 20 min.
5. Centrifugavam-se as amostras a 12.000 rpm, por 30 min, a 4°C em centrífugas tipo *eppendorf*.
6. Coletava-se o sobrenadante, e extraíam-se as proteínas da fase aquosa com 1 v de clorofil. Repetia-se este processo por duas vezes.
7. À última fase aquosa adicionavam-se 2 v de etanol 100% (v/v) e as amostras eram incubadas a -20°C por pelo menos 1 hora.
8. Centrifugava-se a 12.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C.
9. Adicionavam-se 300µl de etanol 70% (v/v) sem ressuspender o sedimento e procedia-se imediatamente a nova centrifugação a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C.
10. Após secagem o sedimento era ressuspendido em 25µl de água Milli-Q.

3.3.2 Amplificação e subclonagem do inibidor 0.53

3.3.2.1 Amplificação do Inibidor 0.53 por PCR, Clonado no Vetor pFSB-pGEM Teasy-0.53

Para a amplificação do inibidor de α -amilase 0.53, foi utilizada a técnica de PCR nas seguintes condições:

Soluções em volume final de 25µl: (concentrações finais)

- dNTP's 200 nM, oligonucleotídeo ECAA53F 200 nM, oligonucleotídeo XBAA53R 200 nM, Taq DNA polimerase (pht), 2,5 U, Tampão 1 x (pht) e 25ng/µl de DNA plasmidial do vetor.

Programa de PCR (Termociclador Eppendorf):

- 1 - 94°C 00:01:00
- 2 - 94°C 00:30:00
- 3 - 55°C 00:30:00
- 4 - 72°C 00:01:00
- 5 - Volta-se ao número 2 - 30 ciclos
- 6 - 72°C 00:05:00

3.3.3 Análise de DNA em gel de agarose (Laemmli, 1970).

A agarose foi preparada na concentração de 1% em tampão TEB 1 X e continha 0,5µg/ml de brometo de etídeo. As amostras de DNA em tampão de amostra para gel de agarose foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese em tampão TEB 1 X, como descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Para a visualização do DNA incidia-se luz ultra-violeta no gel utilizando-se um transluminador ou sistema de foto documentação.

3.3.4 Digestão do DNA com endonucleases de restrição

As digestões dos plasmídeos com enzimas de restrição eram realizadas conforme instruções dos fabricantes. O tempo de incubação, as concentrações de DNA e enzima variam de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Em geral, foram utilizadas 5-10 unidades de enzima para cada 1 µg de DNA, incubados por 2-4 horas.

3.3.5 Eluição de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente ao fragmento de aproximadamente 400 pb foi cortada do gel e transferida para microtubos. Os fragmentos com aproximadamente 400 pb foram purificados utilizando o kit QIAquick Spin Gel Purification kit (QIAGEN).

3.3.6 Construção do vetor de expressão

3.3.6.1 - Ligação do inibidor 0.53 no pFSP-pPICZαA-0.53

O Vetor pFSP-pPICZαA-0.53 foi previamente digerido com *EcoRI* e *XbaI* para receber o inibidor 0.53. Após ser digerido com *EcoRI* e *XbaI* a 37°C por 2 horas e purificado do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Spin Gel Purification kit (QIAGEN), o fragmento

de aproximadamente 400 pb referente ao inibidor 0.53, foi clonado no vetor pFSP-pPICZ α A-0.53 (Figura 3.2). As concentrações de DNA (vetor: inserção) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente a uma razão molar de 1:3. A reação de ligação foi feita em tampão de ligase 1 X, contendo 10 a 200 U de T4 DNA ligase. Os sistemas continham 20 μ l de volume final e após incubação a 16°C, por 16 a 20 horas, eram usados para transformar células de *P. pastoris* (linhagem GS115) por eletroporação. Após a transformação as células foram plaqueadas em meio YPDS-ágar com Zeocina para selecionar colônias positivas. O DNA plasmidial das colônias positivas foi extraído conforme protocolo de extração plasmidial. Os clones analisados apresentaram fragmentos de aproximadamente 400 pb.

3.3.7 Preparação de DNA para transformação de *P. pastoris*.

Após ter sido confirmada a ligação por digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xba* I, aproximadamente 10 μ g da ligação foi linearizada por digestão com a enzima de restrição *Sac*I. Esta enzima possui sítio único e corta o plasmídeo no gene *AOX1*, permitindo a integração do plasmídeo no *locus* do gene *AOX1* da levedura, após eficiente transformação.

A linearização dos plasmídeos era confirmada por meio de gel de agarose. Ao sistema de digestão acrescentava-se água até o volume 300 μ l, adicionavam-se 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 100%. Este sistema foi incubado no freezer -20° C por 1 hora e subsequentemente centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 10 μ l de água Milli-Q estéril. Após a ligação do fragmento, foi realizada a transformação de células competentes de *Pichia pastoris* (GS-115).

3.3.8 Transformação da levedura *P. pastoris* por eletroporação (adaptado de Cregg *et al.*, 1985)

1. Inoculava-se uma colônia de *P. pastoris* GS115 em 5 ml de meio YPD em um erlenmayer de 125 ml e incubava-se sob agitação durante a noite, a 30°C.
2. Inoculava-se 0,1 a 0,5 ml da cultura acima em 500 ml de meio YPD em um frasco de 2 litros. Incubava-se durante a noite até que a cultura atingisse uma densidade ótica à 600 nm de 1,3-1,5.

3. Centrifugavam-se as células a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 200 ml de água gelada estéril.
4. Repetia-se o passo 3
5. Centrifugavam-se as células como no passo 3, e ressuspendia-se o sedimento em 100 ml de água gelada estéril.
6. Centrifugavam-se as células como no passo 3, e ressuspendia-se o sedimento em 20 ml de sorbitol 1 M gelado estéril.
7. Centrifugavam-se as células como no passo 3, e ressuspendia-se o sedimento em 200 – 400 µl de sorbitol 1 M gelado.
8. Misturavam-se 80 µl de células competentes, com 5 a 10 µg de DNA linearizado (em 5 a 10 µl de água), e adicionavam-se 320 µl de sorbitol 1 M. Transferiam-se as células para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada.
9. Incubava-se a cubeta com as células por 5 minutos, no gelo.
10. Eletroporavam-se as células nas seguintes condições (eletroporador da BioRad): 1500 V; 400 Ω e 25 µF. O tempo de eletroporação foi de aproximadamente 10 ms com um campo de 7500 V/cm.
11. Adicionava-se, imediatamente, 1 ml de sorbitol 1 M gelado a cubeta. Transferia-se o conteúdo para um microtubo estéril.
12. Semeavam-se 100 µl de células em placas de meio YPDS-ágar, com Zeocina.
13. As placas foram mantidas a 30°C, até o aparecimento das colônias.

3.3.9 Expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris*

1. As colônias que mostraram-se positivas no *PCR*, eram inoculadas em 25 ml de meio BMGY em um frasco de 250 ml. Incubava-se a 28-30°C sob agitação intensa (250-300 rpm) até que a cultura atingisse uma densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) de 2 a 6.
2. Coletavam-se as células em tubo Falcon de 50 ml por centrifugação a 1.500-3.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. Ressuspendiam-se as células para uma OD_{600} de 1,0 em 100 ml de meio BMMY para indução da expressão.
3. Transferia-se a cultura para um frasco de 1 litro. Incubava-se a 28-30°C sob agitação intensa.
4. Adicionava-se metanol para uma concentração final de 1% a cada 24 horas para manter a indução.
5. Para o experimento de cinética de indução, a cada tempo (0, 24, 48 e 72 horas), transferiam-se 2 ml da cultura para um microtubo e centrifugava-se na velocidade de

12.000 rpm por 2 a 3 minutos, para sedimentar todas as células. Os sobrenadantes foram precipitados com TCA.

3.3.10 Precipitação de proteínas com TCA

1. Os sobrenadantes da cultura de *P. pastoris* foram transferidos para microtubos. Adicionava-se TCA (Ácido Tricloro Acético) para uma concentração final de 12% e incubava-se no gelo por 30 minutos.
2. Centrifugava-se a 13.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C.
3. Os sobrenadantes eram centrifugados e os sedimentos delicada e, cuidadosamente, lavados com 1 ml de acetona gelada.
4. A acetona foi removida e procedia-se uma segunda lavagem com acetona. A acetona foi então descartada e o precipitado foi deixado em repouso para secar.
5. Os precipitados foram ressuspensos em 20 µl de tampão de amostra 2x de SDS-PAGE e analisados em gel de poliacrilamida.

3.3.11 Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989).

As proteínas do sobrenadante de cultura foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida.

Preparava-se o gel separador a 15% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de persulfato de amônio e 0,2% (v/v) de TEMED. A seguir, vertia-se o gel concentrador a 4% (p/v), tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de persulfato de amônio e 0,2% (v/v) de TEMED. Uma vez vertido o gel concentrador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços. Após a polimerização, o gel foi acoplado no aparato de eletroforese.

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE. Antes da aplicação das amostras procedia-se a fervura em banho-maria a 100 °C por cinco minutos. O marcador de massa molecular utilizado era composto de lisozima (14.3 kDa), β-lactoglobulina (18.4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), albumina sérica bovina (68 kDa), fosforilase b (97.4 kDa) e miosina (200 kDa).

Após a corrida do gel a 25 mA este era imerso em solução corante e incubado durante a noite sob agitação suave. Em seguida procedia-se a imersão em solução descorante, sendo realizadas várias trocas para agilizar o processo.

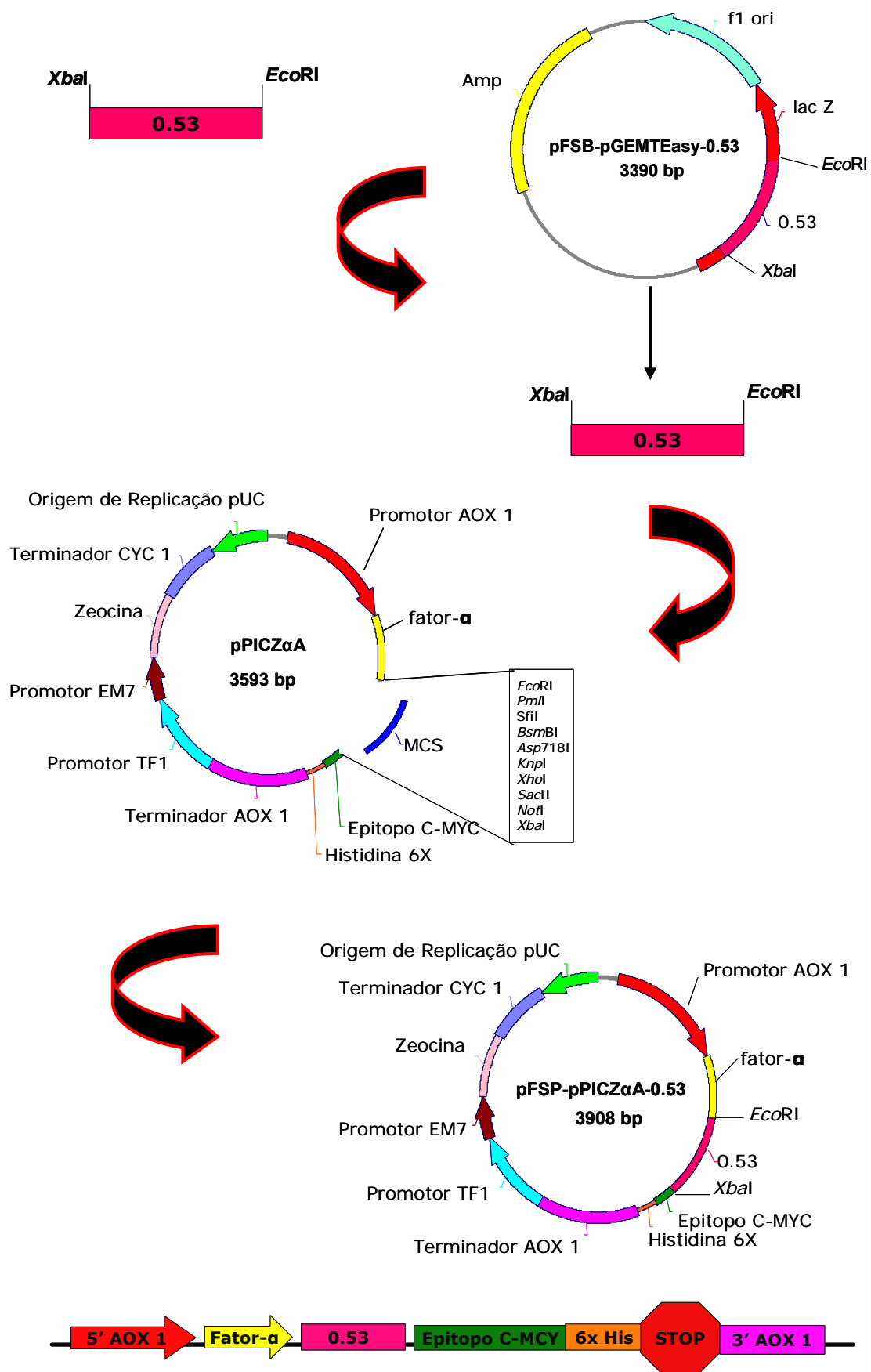


Figura-3.3 Estratégia de clonagem do inibidor 0.53 no vetor de expressão pFSP-pPICZ α A-0.53. O gene para o inibidor 0.53 amplificado por PCR foi clonado no vetor pGEMTeasy. Após clivagem com as enzimas XbaI e EcoRI, a seqüência foi subclonada no vetor pPICZ α A dando origem ao vetor de expressão pFSP-pPICZ α A-0.53.

3.3.12 **Coloração com prata**

Após a corrida o gel de poliacrilamida foi desidratado com etanol 50%, sob leve agitação. Foram realizadas três trocas de 20 minutos, do etanol. Foi adicionado então, Tiosulfato de sódio 20 mg/100 ml de H₂O, sob leve agitação, por um minuto. Foram feitas três lavagens rápidas com H₂O destilada e adicionado solução de nitrato de prata 200 mg + 74 µl de formaldeído em 100 ml de H₂O, por 20 minutos. Foram feitas três lavagens rápidas com H₂O destilada para remover o excedente da solução anterior. Foi adicionado então, a solução reveladora 6 g de carbonato de sódio + 50 µl de formaldeído + 2 ml de tiosulfato de sódio em 100 de H₂O, até que aparecessem as proteínas. Usou-se ácido acético 13 % para parar a reação.

3.3.13 **Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**

A fração correspondente ao inibidor 0.53 foi coletada da coluna de filtração molecular e solubilizada em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% preparado em água Milli-Q ultra pura (solução A). O sobrenadante da expressão foi liofilizado e 1 mg de extrato total de proteínas liofilizadas foram ressuspensas em água Milli-Q, e aplicadas em coluna de fase-reversa semi-preparativa BioRad C18, inicialmente equilibrada com a solução A, com um fluxo de 1,0 ml/min. O inibidor 0.53 foi eluído com 49% de acetonitrila em 0,1% de TFA (solução B), monitorando-se o perfil cromatográfico a 216 nm. As frações protéicas referentes ao inibidor 0.53 foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.3.14 **Quantificação de proteínas**

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.3.15 **Extração das enzimas digestivas de insetos**

As larvas foram coletadas a partir de grãos de feijões infestados. Procediam-se três lavagens de 10 minutos cada, á 10° C, com acetona para delipidar as larvas. Após as lavagens com acetona, foram deixadas ao ar livre para secar. Fez-se um extrato total de enzimas dessas larvas, macerando-as dentro de um microtubo com tampão succínico com 0.02 M de CaCl₂ e 0.02 M de NaCl pH 4.5. Centrifugou-se a velocidade, 13.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e passado para um segundo microtubo para ser novamente

centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi recolhido novamente e passado para um terceiro microtubo e estocado a -20 °C.

3.3.16 Ensaio *in vitro* do inibidor de α -amilase 0.53

A atividade do inibidor 0.53 contra a α -amilase de *Z. subfaciatus*, *A. obtectus* e *C. maculatus*, pode ser detectada pelo método Iodométrico usando amido a 0,25% como substrato. Os ensaios foram feitos em triplicata. Foram utilizados dois controles: o controle da enzima, contendo apenas enzima alvo e tampão e o controle do amido, contendo tampão e amido. Para cada ensaio de atividade inibitória foram usados 6 μ g do inibidor 0.53 purificado. A reação com insetos foi feita em tampão succínico, pH 4.5, PPA em tampão Tris-HCl 0.1M, pH 7,2 e o volume final de 120 μ l. Primeiramente pré incubou-se a enzima alvo com o inibidor 0.53 por 10 minutos, a 37°C, para que o complexo enzima/inibidor pudesse acontecer. A partir deste tempo de pré-incubação a reação foi disparada com amido. O tempo de reação foi de três minutos. As reações foram paradas com adição de 500 μ l de Iodo. A leitura foi feita a absorvância de 590 nm.

A atividade inibitória do inibidor 0.53 foi expressa em percentagem de inibição. Para isto foi definido que uma unidade de atividade da α -amilase correspondia ao decréscimo de 0,001 unidade de absorvância a 590 nm e a unidade de inibição foi definida como a unidade de leitura da enzima que aumenta 0,001 de absorvância a 590 nm.

3.3.17 Ensaio de atividade enzimática de *A. obtectus* em diferentes temperaturas

Para o ensaio de termoestabilidade da enzima de *A. obtecus* foi encubada com o substrato (amido) conforme o item 9.12 em pH 4.5 e submetida a tratamento térmico de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. A inibição da atividade enzimática foi verificada utilizando o espectro fotômetro, descrito anteriormente.

3.3.18 Determinação da atividade inibitória em diferentes pHs

A atividade inibitória do inibidor 0.53 em diferentes pHs foi determinada incubando a enzima e o inibidor em tampão succinato, com 200 mM CaCl₂ e 200 mM NaCl, pH 4,0 e

tampão Tris/HCl 0.1 M pH 7,2. A inibição da atividade enzimática foi verificada utilizando o espectro fotômetro.

4 RESULTADOS

4.1 SUBCLONAGEM DO INIBIDOR 0.53 EM VETOR DE EXPRESSÃO EM *P. pastoris*

Para a subclonagem, a seqüência de nucleotídeos do inibidor 0.53 foi isolada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5'ECAA53R e 3'XBAA53F, a partir do vetor denominado pFSB-pGEMTeasy-a.53, que contém o gene para o inibidor 0.53 nos sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI* (Figura 4.1).

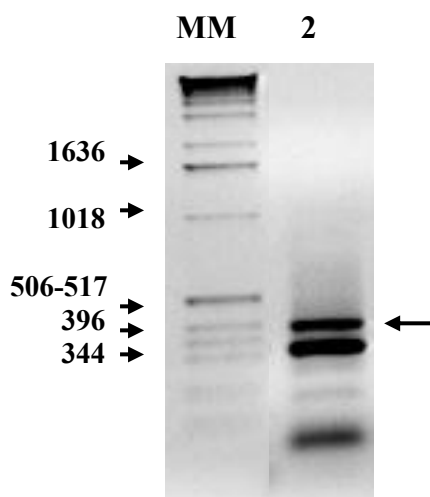


Figura 4.1 Perfil eletroforético do PCR para isolar a seqüência de nucleotídeos do inibidor 0.53 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%. 1 Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder). 2 Gene do Inibidor 0.53. Isolamento obtido com os oligonucleotídeos 5'ECAA53R e 3'XBAA53F, com temperatura de anelamento de 55° C.

A subclonagem do gene do inibidor 0.53 no vetor integrativo pPICZ α A, realizou-se entre os sítios de *XbaI* e *EcoRI* que se localizam entre o promotor 5' e o terminador do gene da álcool oxidase (*AOX1*). As células transformadas de *E. coli* (XL1- Blue) contendo este vetor foram selecionadas com Zeocina. Nos transformantes resistentes a Zeocina fez-se PCR de colônia com os oligonucleotídeos XBAA53F e ECAA53R e AOX1 5' e 3', que amplificou um fragmento de aproximadamente 900 pb, como esperado (dado não mostrado). extraiu-se o DNA plasmidial recombinante e fez-se a digestão com *XbaI* e *EcoRI*, que liberou o gene do inibidor 0.53 com aproximadamente 400 pb (veja-se Figura 4.2).

Denominou-se este vetor de expressão em *P. pastoris* de pFSP-pPICZ α A-0.53.

O vetor de expressão pFSP-pPICZ α A-0.53 foi linearizado com a enzima de restrição *SacI* para a inserção no locus gênico AOX da levedura *P. pastoris* e transformou-se *P. pastoris* pelo procedimento de eletroporação. Após seleção em placa de YPDS contendo Zeocina das colônias positivas, iniciou-se a expressão heteróloga.

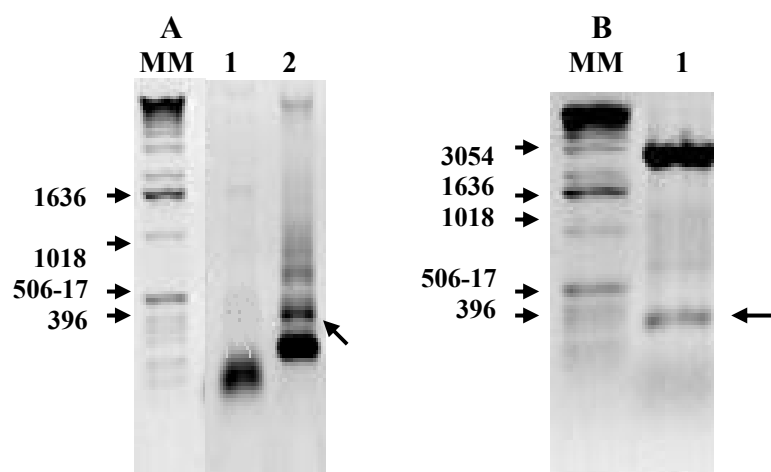


Figura 4.2 **A:** Perfil eletroforético do PCR de colônia para confirmar presença do inibidor 0.53 nas células de *E. coli* transformadas com vetor pPICZ α -A, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%. Amplificação da seqüência de nucleotídeos do inibidor 0.53 utilizando-se os iniciadores XBAA53F e ECAA53R. (MM) Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder). **1:** Controle negativo sem o DNA plasmidial. **2:** Gene do Inibidor 0.53. **B:** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%, da digestão do vetor pPICZ α -A com *EcoRI* e *XbaI* para confirmar inserção do gene no vetor. (MM) Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder). **1:** Gene do Inibidor 0.53.

4.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO INIBIDOR 0.53 EM *P. pastoris*.

Dentre as colônias selecionadas foi escolhido um clone utilizado para o experimento de cinética de indução da proteína recombinante, visando a determinação do melhor tempo de coleta do sobrenadante da cultura de *P. pastoris*.

A colônia escolhida e uma colônia do controle negativo (levedura transformada com o vetor vazio) foram inoculadas em meio BMGY, meio completo com glicerol, e crescidas até a cultura atingir uma $OD_{600} = 2-6$. As células foram coletadas e inoculadas em meio BMMY, meio completo com metanol, para induzir a expressão da proteína recombinante através do promotor *AOX1*. Cerca de 1 ml do sobrenadante da cultura foi coletado nos tempos de indução 0, 24 e 48 e 72 horas. A cada amostra de sobrenadante coletado adicionavam-se os inibidores de protease: PMSF 0.1 M e EDTA 0.5 M. As proteínas do sobrenadante foram concentradas com TCA (Ácido Tricloro Acético) para melhorar a visualização no gel.

Para verificar a presença da proteína recombinante nos diferentes tempos de indução e identificar o melhor ponto da cinética de indução para a coleta dos sobrenadantes, isto é, o tempo com maior expressão do Inibidor 0.53 as amostras coletadas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE) e analisadas após coloração com prata.

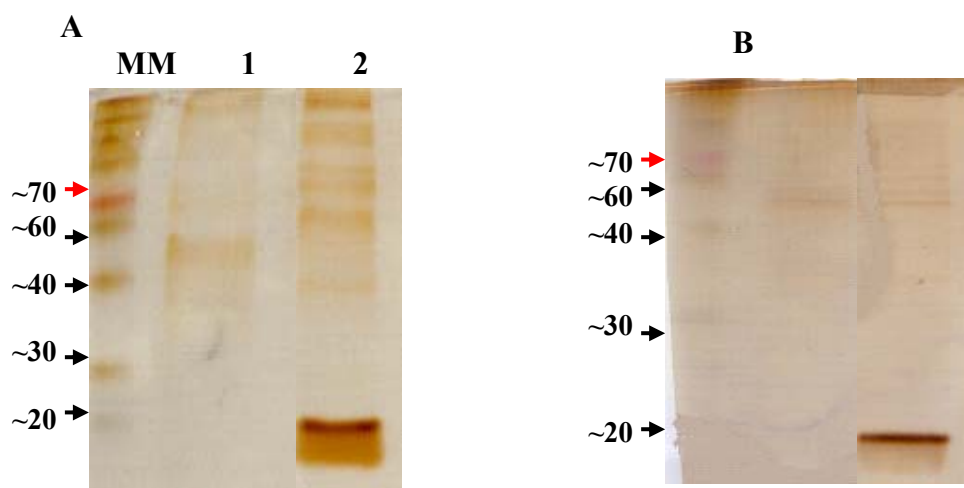


Figura 4.3 Expressão heteróloga do inibidor 0.53 em *Pichia pastoris* e análise em gel SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata. A expressão foi induzida com 1% de metanol a cada 24 horas. **A:** Expressão com 48 horas de indução com metanol 1%. **MM:** Marcador de massa molecular BenchMark Prestained Protein Ladder. **1:** Controle expressando o vetor pPCZ α A. **2:** Colônia expressando o vetor pFSP-pPICZ α A-0.53. **B:** Expressão com 72 horas de indução com metanol 1%. **MM:** Marcador de massa molecular BenchMark Prestained Protein Ladder. **1:** Controle expressando o vetor pPCZ α A. **2:** Colônia expressando o vetor pFSP-pPICZ α A-0.53.

A expressão foi monitorada e induzida com metanol 1% a cada 24 horas. A partir de 48 horas de expressão, já foi possível observar uma quantidade considerável da proteína recombinante do inibidor 0.53, de maneira similar, em 72 horas de expressão, em contraste com o controle negativo, levedura transformada com o vetor pPICZ α -A. Aplicou-se aproximadamente 20 μ g de proteínas totais, secretadas pela levedura no sobrenadante da expressão, em gel SDS-PAGE 15%. Observou-se uma proteína de aproximadamente 18 kDa, sendo ~15 kDa correspondentes ao inibidor 0.53 e ~3 kDa de 6 histidinas fusionadas ao C-terminal. Esta banda corresponde ao esperado para o inibidor 0.53 recombinante, que não aparece no controle (Figura 4.3).

4.2.1 PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR 0.53 POR HPLC.

As proteínas expressas pela *P. pastoris* e a proteína recombinante do inibidor 0.53 que foram secretadas no sobrenadante, foram concentradas na coluna Centricon 30 (Amicon®). Este Centricon separa as proteínas maiores que 30 kDa, como as proteínas endógenas de *P. pastoris*, das proteínas menores que 30 kDa, a proteína recombinante do inibidor 0.53 que possui aproximadamente 18 kDa. Desta maneira, o volume de 100 ml de expressão inicial foi reduzido a, aproximadamente, 15 ml. As amostras foram então submetidas à purificação por HPLC. Para confirmar se a purificação tinha sido realmente bem sucedida, as amostras purificadas foram submetidas a análise em gel SDS-PAGE corado com Prata (dado não mostrado).

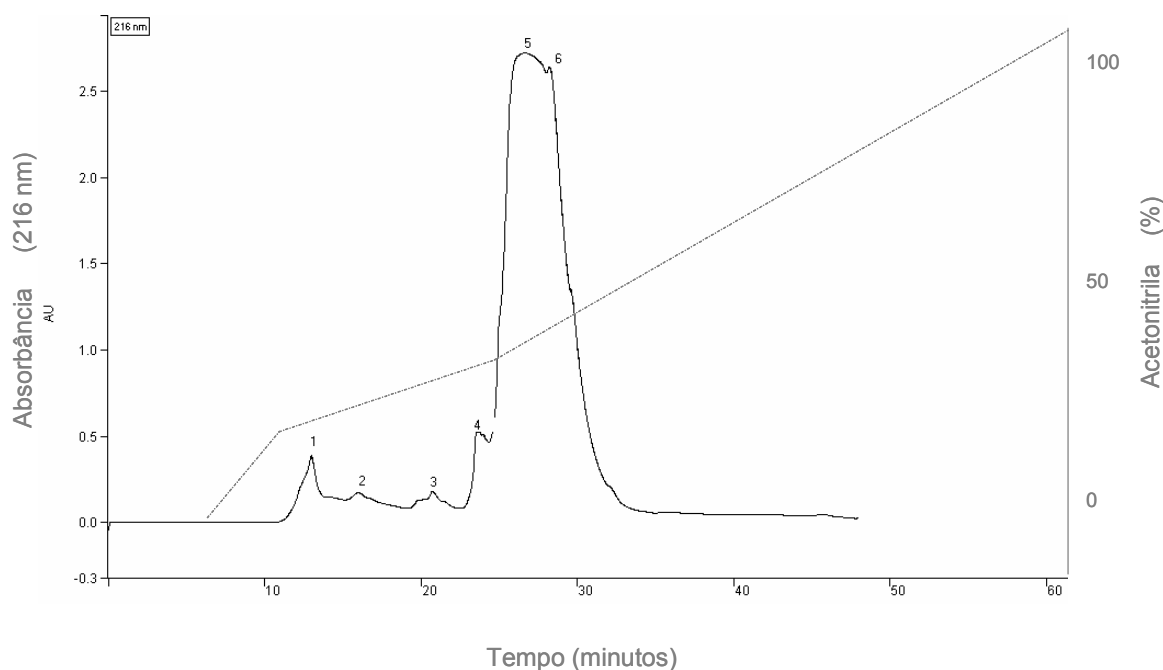


Figura 4.4 (A) Perfil cromatográfico do inibidor 0.53 em coluna líquida de alta pressão (BioRad C18). A fração 5 contendo o inibidor ativo foi eluída em 40,5% de acetonitrila sob fluxo de 1 ml/min.

A proteína recombinante do inibidor 0.53 foi eluída com 40,5% de acetonitrila. O perfil cromatográfico monitorado a 216 nm, revelou 6 frações protéicas. A fração 5 referiu-se ao inibidor 0.53 ativo. Utilizou-se essa fração nos ensaios de atividade enzimática *in vitro* contra a α -amilase dos insetos, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e contra a α -amilase de mamífero, PPA.

4.3 ANÁLISE E COMPARAÇÃO DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DO INIBIDOR 0.53.

Fez-se um alinhamento de sequência de aminoácidos do inibidor 0.53 DQ534754, com outros 3 inibidores de α -amilases de trigo existentes no banco de dados NCBI database, pelos seguintes acessos: 0.53 P01084, 0.19 CAI84642.1, 0.28 P01083. O programa utilizado foi o CLUSTAL W.

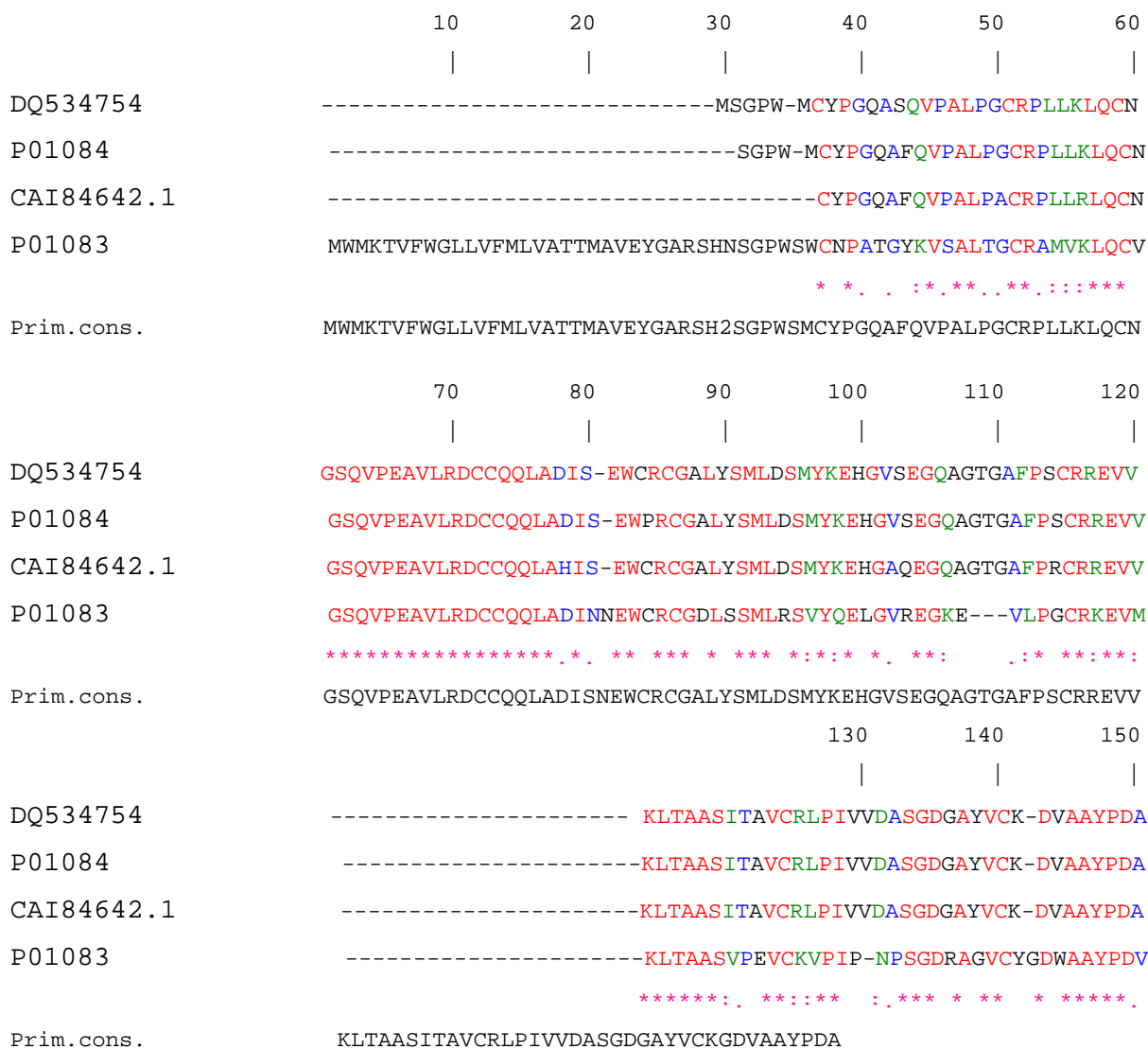


Figura 4.5 Alinhamento de seqüências de aminoácidos do inibidor do trigo 0.53 com outros inibidores α -amilases de trigo, obtidas do NCBI database: 1 0.53 DQ534754, 2 0.53 P01084, 3 0.19 CAI84642.1, 4 0.28 P01083. (*) representa identidade. (:) representa alta similaridade, (.) representa baixa similaridade.

Este alinhamento apresentou 44,6% de identidade de seqüências e resíduos de aminoácidos. A seqüência de aminoácidos do inibidor 0.53 apresentou identidade com várias seqüências protéicas de inibidores tipo Cereal. A seqüência que teve mais identidade com o

inibidor 0.53 foi um a outra seqüência do 0.53 que também estava depositada no banco de dados. Estas seqüências tiveram total homologia.

4.4 ENSAIO *IN VITRO* DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE α -AMILASES

O objetivo destes ensaios foi a avaliação da atividade inibitória *in vitro* do 0.53 recombinante, sobre as α -amilases de insetos-praga que atacam grãos armazenados de feijão: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e PPA.

Realizou-se então, ensaios iodométricos para avaliar a estabilidade da atividade enzimática de *A. obtectus* com variação pH e temperatura. Pode ser observado que as condições de pH entre 5.0 e 6.0 (Figura 4.7) e temperatura de 55°C (Figura 4.7), foram ideais para a complexação da α -amilase de *A. obtectus* com o substrato utilizado (amido).

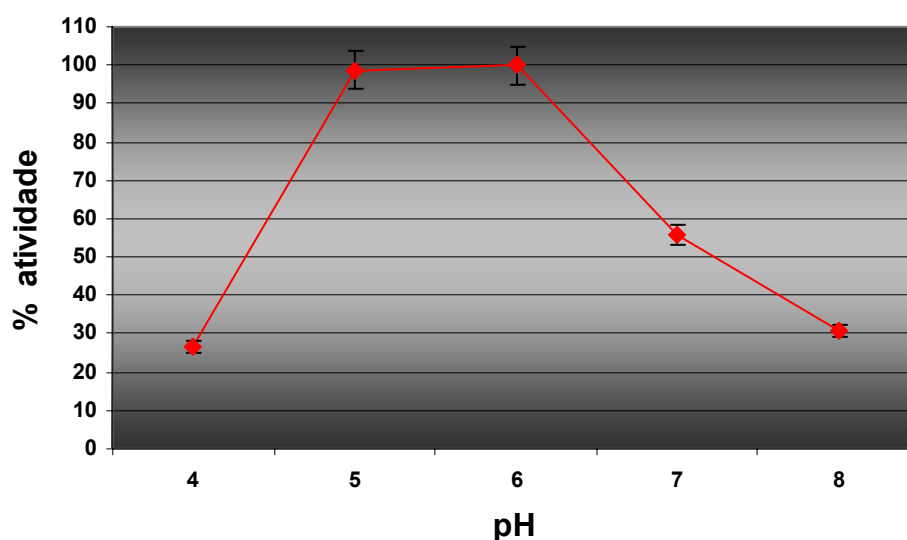


Figura 4.6 Determinação das melhores condições da atividade enzimática da α -amilase de *A. obtectus* em diferentes pH . Ensaio realizado com extrato total de larvas. A enzima foi encubada com amido 0.25% em tampão succínico com 0.02 M de CaCl_2 e 0.02 M de NaCl, pH 4, 5 e 6 e em tampão Tris-HCl 0.1 M pH 7 e 8 a 37°C.

Observou-se que a 60° C a α -amilase perde a atividade, provavelmente porque esta enzima não resiste a níveis elevados de temperatura. (Figura 4.7). Estes ensaios foram realizados como objeto de estudo podendo ser utilizados, posteriormente, como base em análises de comparação com outras curvas de outros insetos já descritas na literatura.

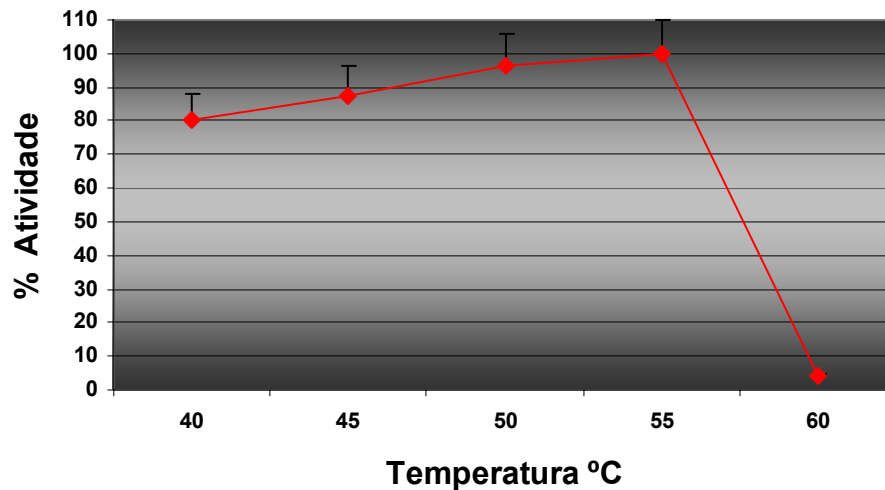


Figura 4.7 Efeitos da temperatura na atividade amilolítica de *A. obtectus*. Ensaio realizado com extrato total de larvas em diferentes temperaturas, utilizando amido 0.25% em tampão succínico com 0.02 M de CaCl₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4.5 a 37° C.

Com base nestes resultados iniciaram-se os ensaios de atividade inibitória com a proteína recombinante do inibidor 0.53 complexado com as α -amilases dos diferentes insetos em pH. 4.5 e 7.2, onde observou-se um resultado muito interessante. Em pH 4.5, o inibidor 0.53 recombinante em concentração de 6 μ g/ μ l, mostrou-se fortemente ativo principalmente sobre as α -amilases dos diferentes insetos testados, não apresentando atividade inibitória sobre PPA, (Figura 4.8).

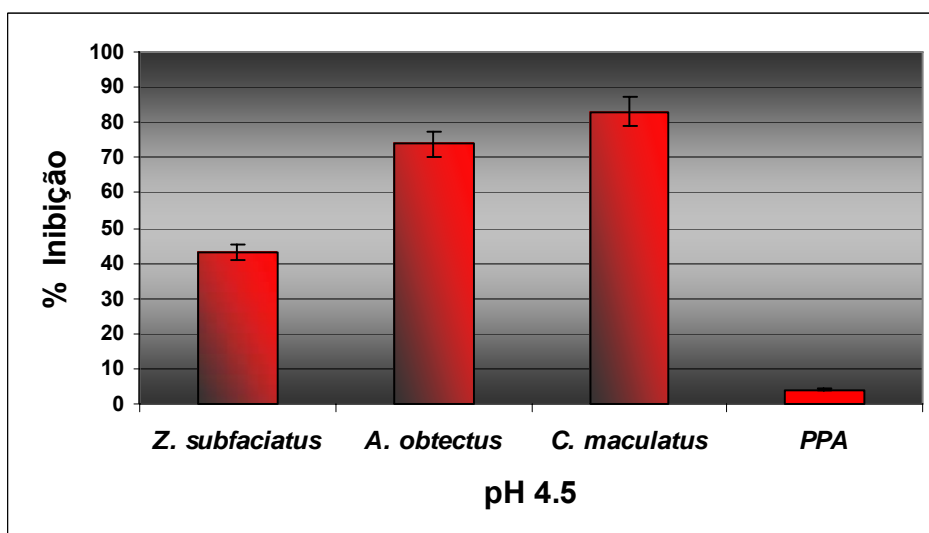


Figura 4.8 Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 (6 μ g/ μ l) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão succínico com 0.02 M de CaCl₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4.5 em temperatura de 37°C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga.

Entretanto, em pH 7.2, o inibidor recombinante em concentração de 6 μ g/ μ l, mostrou-se inativo para todas as α -amilases dos diferentes insetos, porém inibiu fortemente PPA (Figura 4.9).

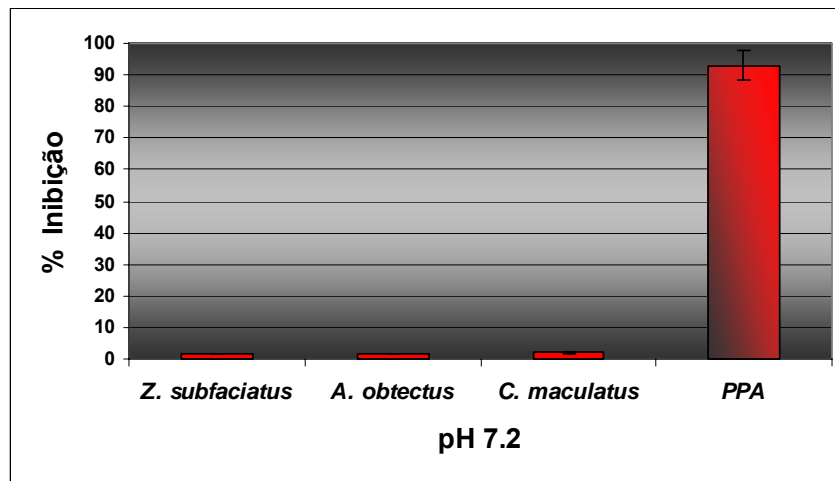


Figura 4.9 Inibição *in vitro* das α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e α -amilase Pancreática de Porco (PPA), pela proteína recombinante do inibidor 0.53 (6 μ g/ μ l) expressa em levedura metilotrófica *P. pastoris*, em tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2 e temperatura de 37°C. Ensaio realizado com extrato total de larvas dos diferentes insetos-praga.

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO INIBIDOR 0.53 EM *P. pastoris*

Geralmente inibidores do tipo cereal possuem 10 cisteínas e fazem cinco pontes de sulfeto (Oda *et al.*, 1997). O inibidor 0.53 em especial, faz 5 pontes dissulfeto e possui 2 sítios de glicosilação, o que torna inviável a expressão em *E. coli*.

Visando a produção de proteínas recombinantes em quantidades suficientes para realização dos ensaios propostos, optou-se pela expressão do Inibidor 0.53 em células de *P. pastoris*. Desta maneira, o gene que codifica o Inibidor 0.53 foi transferido para o vetor pPICZ α -A, para expressão na levedura metilotrófica *P. pastoris*. Este vetor possui o fator- α de secreção onde as proteínas heterólogas expressadas nesse sistema foram secretadas no meio de cultura na forma solúvel, facilitando assim o processo de purificação. Este sistema promove um dobramento tridimensional correto, proporcionando assim a expressão deste inibidor na forma ativa.

Os níveis de expressão alcançados para o Inibidor 0.53 recombinante em *P. pastoris* variaram entre 0,006 e 0,01 mg/l. As expressões realizadas em fermentadores apresentam tipicamente níveis muito mais altos de expressão em relação a frascos de cultura, devido a otimização das condições de temperatura, pH, fonte de carbono, aeração, entre outros fatores (Cereghino *et al.*, 2002). Já os níveis máximos relatados para expressão em frascos de cultura são de aproximadamente 1 g/l para a aqualisina I de *Thermus aquaticus* (Oledzka *et al.*, 2003), 0,9 g/l para tioredoxina de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Digilio *et al.*, 2003) e 0,9 g/l para somatotrofina de porco, (Ouyang *et al.*, 2003).

Atualmente, o método de expressão de leveduras em frascos é o mais utilizado pelos laboratórios, devido sua simplicidade e baixo custo de materiais, quando comparado com a expressão em fermentador. Diferentes frascos já são comercializados, apresentando-se novos modelos que promovem maiores níveis de oxigenação a cultura, conseqüentemente maior quantidade de expressão.

Diversos fatores influenciam drasticamente a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, entre eles: o número de cópias do cassete de expressão integradas no genoma; o local da integração do cassete no cromossomo; regiões 5'- e 3'- não traduzidas (UTRs) do mRNA; contexto do códon de iniciação da transcrição (AUG); composição A + T do cDNA, natureza do sinal de secreção; atividade proteolítica endógena; condições de crescimento e meio de cultura. Além das características da própria proteína recombinante, como

solubilidade, tamanho, presença de modificações pós-traducionais, complexidade estrutural, entre outros (Sreerikshna *et al.*, 1997).

Os níveis de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* variam de acordo com o tipo de proteína, o vetor utilizado e a forma de expressão. Levando-se em conta todos estes aspectos encontram-se relatos na literatura de extremos de expressão de proteínas secretadas, como no caso do fragmento C da toxina do tétano, que apresentou um rendimento de 12 g/L (Clare *et al.*, 1991) e em contraste a Interleucina-17 humana para a qual obteve-se apenas 0,35 mg/L (Murphy *et al.*, 1998). De maneira geral, os níveis de expressão observados variam entre 10 e 500 mg/L de cultura quando se utiliza fermentadores.

Diante das dificuldades encontradas durante a expressão foram testadas diferentes concentrações de metanol para tentar melhorar o rendimento da expressão. Por análise da intensidade da banda correspondente ao inibidor 0.53 em gel SDS-PAGE 15%, pode-se chegar a conclusão de que, a melhor condição para obtenção do inibidor 0.53 foi com 48 horas de expressão e indução com 1% de metanol, a cada 24 horas.

Após identificar qual o melhor tempo de indução, foi feita uma indução em grande escala (100 ml) para a purificação do Inibidor 0.53 recombinante. A expressão dos clones foi feita segundo o item 3.3.9 de Métodos, culturas cresceram a 30°C, sob agitação vigorosa, por 24 horas. Após o crescimento, os sobrenadantes foram separados dos sedimentos por centrifugação e a eles foram adicionados os inibidores de proteases. Observou-se em gel SDS-PAGE, que o aumento da intensidade da banda não ocorreu de maneira significativa em função do tempo de expressão entre 48 e 72 horas. Isto pode ter sido um indicador de que a proteína recombinante poderia estar sendo degradada pelas proteases endógenas secretadas pela levedura, pois, em 96 horas de expressão, não foi mais possível observar este perfil. Em consequência desse fato foi necessário o uso de inibidores de proteases durante a expressão.

Em pH 6,0, que é o pH do meio BMMY utilizado na expressão, os menores níveis de degradação foram obtidos com a adição de EDTA (um inibidor de metalo-proteases), PMSF (Inibidor de serino e tiol proteases), Pepstatina A (inibidor de proteases ácidas) e Aprotinina (Inibidor de serino proteases) ao sobrenadante. Existem poucas informações disponíveis a respeito das proteases produzidas pela levedura *P. pastoris*. Shi e colaboradores (2003), em um trabalho de otimização da expressão de scFvs em *P. pastoris*, examinaram a atividade de proteases no sobrenadante de cultura induzida com metanol e em lisados celulares e observaram a atividade de vários tipos de proteases, como aspárticas, serino, cisteíno e metalo-proteases.

5.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE PELO INIBIDOR 0.53

Neste trabalho foram realizados estudos de interação molecular, a partir de ensaios *in vitro*, com as α -amilases de *A. obtectus*, *Z. subfasciatus*, *C. maculatus*, α -amilase de mamífero PPA e o inibidor 0.53. Para isso foram feitas análises cinéticas e termodinâmicas de interação das α -amilases de *A. obtectus* em diferentes temperaturas e pH. Esta foi a primeira vez que se realizou análises em diferentes pH e temperaturas para as α -amilases de *A. obtectus*. Obteve-se o ótimo de atividade da α -amilase deste inseto-praga em pH entre 5.0 e 6.0 e temperatura de 55°C. A partir de 60° C esta enzima perde totalmente sua atividade provavelmente por desnaturação, não suportando temperaturas elevadas. Em ensaios enzimáticos usando α -amilases de *Z. subfasciatus* purificada, Pelegrini e colaboradores (2006) fizeram uma curva de termoestabilidade onde foi observado o ótimo de atividade amilolítica entre 20° e 30° C. Esta enzima, assim como a de *A. obtectus*, manteve sua estabilidade até 60° C.

O pH ótimo de atividade das α -amilases de *Z. subfasciatus* segundo Pelegrini e colaboradores (2006), está entre 6.0 e 7.0. Desta forma, com base nesses dados comparatórios, podemos afirmar que existe diferenças particulares entre a atividade das α -amilases *A. obtectus* e *Z. subfasciatus*. Com base nestes resultados, iniciou-se os ensaios de atividade inibitória com proteína recombinante do inibidor 0.53 e as α -amilases dos diferentes insetos. Inicialmente, não se observou atividade inibitória da proteína recombinante sobre as α -amilases nestas mesmas condições. Depois de muitas repetições, chegou-se a conclusão de que as condições ideais de pH e temperatura de atividade das α -amilases de *A. obtectus* não eram as condições ideais para a ligação do complexo α -amilase/inibidor recombinante. Desta forma partimos para ensaios em diferentes pH e temperatura constante de 37°C. Para estes ensaios foi utilizado um extrato protéico total de larvas, PPA comercial e o inibidor 0.53 purificado em concentração de 6 μ g/ μ l.

Devido a baixa expressão da proteína recombinante em *P. pastoris*, não pode ser realizado ensaios em todos os pH e temperaturas necessários para a comprovação das condições ideais de complexação α -amilase/inibidor recombinante. Então foram escolhidos duas condições de pH para realização dos ensaios *in vitro*, em tampão succínico 0.02 M, 0.02 M CaCl₂ e 0.02 M de NaCl, pH 4.5, baseado no pH do intestino dos insetos testados e em tampão Tris-HCL 0.1 M pH 7.2.

Em pH 4.5, o inibidor 0.53 recombinante apresentou atividade inibitória principalmente sobre as α -amilases dos insetos *A. obtectus*, 74%, *Z. subfasciatus*, 43%, *C. maculatus*, 83%, não apresentando atividade para PPA. Em estudos de atividade inibitória

com o inibidor 0.53 purificado de sementes de trigo, Franco e colaboradores (2000), obtiveram aproximadamente 100% de atividade inibitória sobre as larvas dos bruquídeos, *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, e de aproximadamente 40% para PPA, em tampão fosfato 0.1 M, 20 mM de NaCl e 0.1 mM de CaCl₂, pH 5,5.

Em pH 7.2, o inibidor 0.53 apresentou-se forte inibição sobre PPA, inibindo em 93% esta enzima, não demonstrando atividade sobre as α -amilases dos insetos alvo. Isto reforça os resultados obtidos neste trabalho, sugerindo que, para a formação de complexos α -amilase/inibidor, de insetos distintos, existe um pH, temperatura ideal para a ocorrência deste processo de complexação, resultando no aumento ou diminuição do percentual atividade inibitória mais precisamente.

Com relação as especificidades do inibidor recombinante 0.53, foi a primeira vez que se realizou testes *in vitro* com um inibidor recombinante de trigo ativo contra as α -amilases dos insetos-praga: *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, que infestam grãos de feijão armazenados.

Peter K. Nielsen *et al.*, (2004), fez estudos mutacionais, biofísicos e estruturais no inibidor de α -amilase/subtilisin de cevada, que demonstraram que forças eletrostáticas são dependentes do pH. A falta do efeito de força iônica na formação do complexo enzima/inibidor sugere um papel secundário para a força eletrostática de longo alcance, considerando que interações eletrostáticas fortes, de alcance limitado, são importantes.

Kenji Takase (1994), em um estudo de mutagene de sítio direto, demonstrou a grande importância do sítio catalítico na interação de α -amilase com o inibidor de α -amilase de trigo 0.53. Este inibidor mostrou-se ativo sobre a α -amilase de *Bacillus subtilis* e α -amilase de saliva humana em tampão acetato de sódio 0.1 M com 2 mM de CaCl₂, pH 6.0. Usando-se mutagenese de sítio direto, foi focalizado o sítio de ligação desse inibidor com a α -amilase de *B. subtilis*. Uma única mutação, substituindo o grupo carboxil de Glu ou Asp, do sítio catalítico da α -amilase de amido, resultou no decréscimo substancial, da habilidade de ligação deste inibidor. Este resultado mostrou que o sítio catalítico dos mutantes não compete pelo sítio ativo do inibidor, sugerindo que estes resíduos são essenciais para esta ligação, sendo este inibidor extremamente específico. Devido às diferenças de especificidades do inibidor recombinante 0.53 em diferentes condições de pH é necessário o desenvolvimento de estudos complementares para a elucidação completa do mecanismo de reação deste inibidor.

6 CONCLUSÃO

- 1) Com este trabalho, foi possível estabelecer as condições ideais de expressão do inibidor 0.53, na levedura metilotrófica *P. pastoris*.
- 2) A purificação do inibidor 0.53 por HPLC, mostrou-se eficiente para pequenas quantidades, sendo que, para uma purificação em larga escala as condições deverão ser devidamente ajustadas.
- 3) A partir dos dados obtidos nesta tese, podemos ter a certeza de que o inibidor 0.53 recombinante foi expresso na sua forma ativa, pois mostrou atividade em pH 4.5 principalmente sobre os insetos-praga: *A. obtectus*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Entretanto, em pH 7.2, o inibidor recombinante foi ativo somente sobre PPA.

7 PERSPECTIVAS

Os parâmetros de expressão podem ser melhorados, a fim de obter-se uma produção mais elevada, apesar dos resultados terem sido satisfatórios em frascos. Entre os fatores a serem mais bem estabelecidos estão: o meio de cultura e a oxigenação. Uma alternativa para melhorar o rendimento seria a fermentação em bioreatores. Uma vez os parâmetros estabelecidos para fermentação em bioreatores, outras proteínas também poderão ser expressas com sucesso, neste sistema. A fermentação em bioreatores permite o aumento da quantidade de proteína produzida, substancialmente, em menor tempo.

Vencidas as etapas de otimização de produtividade e purificação, poderão ser feitas análises nutricionais e histoquímicas em mamíferos. Estes testes permitirão esclarecer a concentração/quantidade do inibidor 0.53, tolerada pelo organismo de mamífero e o nível de toxicidade atribuído ao inibidor.

Além disso, existe um projeto de transformação de plantas, via biobalística e *Agrobacterium*, em andamento dentro do nosso grupo de pesquisa, liderado pela Dra. Fátima Grossi, no Laboratório de Interação Molecular Planta Praga - LIMPP. Plantas de feijão estão sendo transformadas, com vetores de expressão heteróloga direcionados para plantas, paralelamente a este trabalho, com vários inibidores de α -amilase, inclusive o 0.53. Estes experimentos de transformação visam à produção de plantas biologicamente resistentes a insetos-praga que atacam grãos armazenados.

REFERÊNCIAS

ABDEEN A, VIRGOS A, OLIVELLA E, VILLANUEVA J, AVILES X, GABARRA R AND PRAT S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitor. **Plant Mol Biol** 57: 189-202, 2005.

ABE, J.I., SIDENIUS, U., SVENDSON, B. Arginine is essential for the amylase inhibitory activity of the amylase/subtilisin onhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**. V. 293, p. 151-155, 1993.

ABERCOMBIE, M.; HICKMAN, C.J. & JOHNSON, M.L. Dicionario de biologia. Barcelona, **Editorial Labor**, 243p, 1970.

ATABELLA, T. AND CHRISPPEELS, M.J. Tobacco plants transformed whith the bean α -amylase inhibitor gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. **Plant Physiol**. 93, 805-810, 1990.

BALDWIN, I.T. An Ecologically Motivated Analysis of Plant-Herbivore Interactions in Native Tobacco. **Plant Physiol**, Vol. 127, pp. 1449-1458, 2001.

BARBER, D., SANCHES-MONGE, R., GARCÍA-OLMEDO, F., SALCEDO, G., MÉNDEZ, E. Evolutionary implications of sequential homologies among membres of the trypsin/alpha-amylase inhibitor family (CM-proteins) in wheat and barley. **Biochimica et Biophysica Acta** 873, 147-151, 1986.

BARDWELL JAMES C.A. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. **Mol.Microbiol**. 14: 199-205, 1994.

BIRKETT, M.A., CAMPBELL, C.A.M., CHAMBERLAIN, K., GUERRIERI, E., HICK, A.J., MARTIN, J.L., MATTHES, M., NAPIER, J.A., PETTERSSON, J., PICKETT J.A., POPPY G.M., POW, E.M., PYE, B.J., SMART, L.E., WADHAMS, G.H., LESTER J. WADHAMS, L.J., and WOODCOCK, C.M. New roles for *cis*-jasnone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1; 97(16): 9329–9334, 2000.

BOMPARD-GILLES, ROUSSEAU, C.P., ROUGÉ, P., PAYAN, F. Substrate mimicry in the active center of a mammalian alpha-amylase:structural analysis of an enzyme-inhibitor complex, **Structure** 4 1441-1452, 1996.

BORÉM, A. Biotecnologia e Meio Ambiente. Editora: **Folha de Viçosa**. 425 p, 2004.

BORÉM, A., SANTOS, R.F. Biotecnologia Simplificada. Editora: **Suprema Gráfica e Editora**. 306 p, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254, 1976.

CAMPOS, F.A.P., XAVIER-FILHO, J., SILVA C.P. & ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amilases from midguts of larvae of the bruchide beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comp. Biochem. Physiol.** B 92, 51-57, 1989.

CARBONNELL, S. A. M. A Cultura do Feijão no Brasil: Tendências do Melhoramento. In Feijão Irrigado, Estratégias Básicas de Manejo. Fanceli, A. L.; Dourado Neto, D. (Editora). **Piracicaba**, p.40-47, 1999.

CARDONA, C.; KORNEGAY, J.; POSSO, C.E.; MORALES, F.; RAMIREZ, H. Comparative values of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. **Entomological Exp. Application**, 56, p. 197-206, 1990.

CARLINI, C.R. & GROSSI DE SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40 (11) : 1515-1539, 2002.

CARVALHO, R.P.L.; ROSSETTO, C.J. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera, Bruchidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.13, p.105-117, 1968.

CEREGHINO G, CEREGHINO J, ILGEN C, CREGG J. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology** 13(4):329-32, 2002.

CEREGHINO, J E CREGG, J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews** 24: 45-66, 2000.

CHAUDHURI T.K, HORII K, YODA T, ARAI M, NAGATA S, TERADA T.P, UCHIYAMA H, IKURA T, TSUMOTO K, KATAOKA H, MATSUSHIMA M, KUWAJIMA K, KUMAGAI I. Effect of the extra N-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 285:1179-1194, 1999.

CHESIN, M., ZIPF, A.E. Alarm systems in higherplants. *The Botanical Review*, v.56, p.193-235, 1990.

CHRISPEELS, M.J. Plant physiology has become plant biology, a cross-disciplinary science. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1-2, 1996.

CHRISPEELS, M.J., GROSSI DE SÁ, M.F. E HIGGINS, T.J.V. Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**. 8: 257-263, 1998.

CHRISPEELS, M.J., RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes and role in plant defense. **Plant Cell** 3, p. 1-19, 1991.

CHRISTOU, P., CAPELL, T., KOHLI, A. GATEHOUSE, J & GATEHOUSE A.M.R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Plant Science**. (11) 302-308, 2006.

CHRZASZCZ, T., JANICKI, J. The inactivation of animal amylase by plant paralyzers and the presence of inactivating substances in solutions of animal amylase. **Biochemistry**, v. 28, p. 296-304, 1934.

CLARE J, RAYMENT F, BALLANTINE S, SREEKRISHNA K, ROMANOS M. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnology** 9(5):455-6, 1991.

COSTA, N.M.B., BORÉM A., ROSA, C.O.B. Alimentos Transgênicos - Saúde e Segurança. Editora: **Folha de Viçosa**. 250 p, 2005.

CREDLAND, P. F. & J. DENDY. Intraspecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. **Entomologia Experimentalis Applicata** 65: 39-47, 1992.

CREGG J, VEDVICK T, RASCHKE W. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology** 11: 905-910, 1993.

CREGG J.M, MADDEN K.R: Development of the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. **Dev. Ind Microbiol**, 29:33-41, 1988.

CREGG J.M., CEREGHINO L, SHI J, HIGGINS D.R: Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biothec**. 16:23-52, 2000.

CREGG, J.M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Expression in *Pichia pastoris*. **Ed. Academic press**. 157-191, 1999.

DA SILVA, M.C.M.; GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPELLS, M.J.; TOGAWA, R.C.; NESHICH, G. Analysis of structural physico-chemical and steric parameters that could define the specificity of binding between different α -amylases and their inhibitors, *Protein Engineering*, 2000.

DAN JOHNSON, CLARENCE AND ROMERO, JESÚS. A review of evolution of oviposition guilds in the Bruchidae (Coleoptera). **Rev. Bras. entomol.** vol.48, no.3, p.401-408. ISSN 0085-5626, 2004.

DEBOUCK, D. SYSTEMATICS AND MORPHOLOGY. IN: SCHOONHOVEN, A. VAN & VOYSEST, O. (EDS). Common beans – Research for crop improvement. **Cali, CAB International, CIAT**, p. 55-18, 1993.

DECHECO, A.; MONCADA, B.; ORTIZ, M. Desarrollo de *Zabrotes subfasciatus* sobre seis variedades de frijol en Lima. **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v.26, p.77-79, 1986.

DEPONTE, R., PARLAMENTI, R., PETRUCCI, V., SILANO, V., TOMASI, M. Albumin alpha-amylase inhibitor families from wheat flour. **Cereal Chemistry** 53, 805-820, 1976.

DIGILIO F, MORRA R, PEDONE E, BARTOLUCCI S, ROSSI M. High-level expression of Alicyclobacillus acidocaldarius thioredoxin in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification** 30(2):179-84, 2003.

EMBRAPA-CNPAP. Origem e História do Feijão. Goiânia-GO. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>>. Acesso em agosto de 2006.

EPAGRI.- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA. **A Cultura do Feijoeiro em santa Catarina**. Florianópolis, 285 p, 1992.

FABER K.N, HARDER W, AB G, VEENHUIS M. Review: Methylotrophic yeast as factories for the production of foreign proteins. **Yeast** 11: 1331-1344. 1995.

FENG, G.H., RICHARDSON, M., CHEN, M.S., KRAMER, K.J., MORGAN, T.D., REECK, G.R. α -amylase inhibitors from wheat: aminoacids sequences and patterns of inhibition of insects and human α -amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 26, n. 5, p. 419-426, 1996.

FERREIRA, A.M. Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. - Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. **Garcia de Orta**, Lisboa, v.8, n.3, p.559-581, 1960.

FERRI, M.G.; MENEZES, N.L. & MONTEIRO-SCANAVACCA, W.R. **Glossário ilustrado de botânica**. São Paulo, Livraria Nobel, 197p, 1978.

FERRY, N, EDWARDS, M.G., GATEHOUSE, J., CAPELL, T., CHRISTOU & GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**. 15:13-19, 2005.

FINARDI-FILHO, E. MIRKOV, M.J. CHRISPEELS, A putative precursor protein in the evolution of the bean alpha-amylase inhibitor. **Phytochemistry** 43 57-62, 1996.

FONT QUER, P. Diccionario de botânica. Barcelona, editorial Labor, 1243p, 1975.

FORDYCE, J.A. Aggregative feeding of pipevine swallowtail larvae enhances hostplant suitability. **Oecologia**. 135:250–257, 2003.

FRANCO, O. L. **Potencial dos Inibidores de α -amilases e de proteinases no Controle de Insetos Praga de Plantas Economicamente Importantes**. 83 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., MELO, F.R., GROSSI DE SA, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase: Structure, function and potential for crop protection. **European journal of biochemistry**, v.269, p. 349-412, 2002.

FRANCO, OL., RIGDEN, D.J., MELO, F.R., BLOCH, C. JR., SILVA, C.P. E GROSSI DE SÁ, M.F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **Eur. J. Biochem.**, 267: 2166-73, 2000.

FRIZZAS, M.R, CUNHA, U.S, MACEDO, L.P.M. Transgenic plants resistant to insect. **R. bras. Agrociencia**, v. 10, n. 1, p. 13-18, jan-mar, 2004.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 649p, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p. 2002.

GARCIA-CASADO, G., ARMENTIA, A. SANCHEZ-MONGE, R., SANCHEZ-MONGE, L.M., LOPEZ-OTIN, C. SALCEDO, G. A major baker's asthma from rye flour is considerably more active than barley counterpart. **FEBS-letters**, 364, p. 36-40, 1995.

GARCIA-MAROTO, F., CARBONERO, P., GARCIA-OLMEDO, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* WMAI-1, a wheat monomeric inhibitors of insect α -amylase. *Plant Molecular Biology*. V. 17, p. 1005-1011, 1991.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, n. 52, p. 165-175, 1998.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER D.; HILDER, V.A. Potential of Plant-derived Genes in the Genetic Manipulation of Crops for Insect Resistance. In: *Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, **CAB International**, 7, p. 155-181, 1992.

GAVILANES, M.L. **Notas complementares ao livro texto da disciplina: histologia e anatomia vegetal**. Lavras, DBI, UFLA, 51p, 1995.

GEPTS, P. & DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. van & VOYSEST, O. (EDS.). *Common beans – Research for crop improvement*. **Cali, CAB International, CIAT**, p.7-53, 1993.

GONZÁLEZ, J. REYES, F. SALAS, C. SANTIAGO, M. CODRIANSKY, Y. COLIHEUQUE, N. AND SILVA, H. *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. **Biol Res** 39: 221-228, 2006.

GROSSI DE SÁ, M.F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*, **Planta**, p. 203, 295-303, 1997.

HILDER, V.A.; BOLTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. **Crop Protection**, 18: 177-191, 1999.

HOFFMAN, L.M., DONALDSON, D.D. Characterization of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome, *EMBO J.* 4 883-889, 1985.

HOLLENBERG C & GELLISSEN G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current Opinion in Biotechnology** 8(5): 554-560, 1997.

HOWE, R.W.; CURRIE, J.E. Some laboratory observation on the rates of development, mortality and oviposition of several species of bruchidae breeding in stored pulses. **Bulletin of Entomological Research**, London, v.55, n.3, p.437-477, 1964.

ISHIMOTO, M., KITAMURA, K. Growth inhibitory effects of an alpha-amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**, 24, p. 281-286, 1989.

ISHIMOTO, M., SATO, T., CRISPEELS, M.J., KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomol. Exp. Appl.** v. 79, p. 281-286, 1996.

JAMES C. Global status of commercialized transgenic crops ISAAA briefs No. 32: preview. **ISAAA**, Ithaca, NY, 2004.

JOHNSON ET AND DOWD. Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites. **J Agri Food Chem** 52 (16): 5135-5138, PF, 2004.

JOHNSON, C. D. & D. H. SIEMENS. 1995. Bruchid guilds, host preferences, and new host records from Latin America and Texas for the genus *Stator* (Coleoptera: Bruchidae). **Coleopterists Bulletin** 49(2): 133-142, 1995.

JOHNSON, C. D. New host records, distribution and notes on the behavior of some seed beetles (Coleoptera: Bruchidae). **Coleopterists Bulletin** 52(2): 147-149, 1998.

JONGSMA, M.A., BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal Insect Physiology**, v. 43, p. 885-895, 1997.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, 131: 1-11, 1998.

KASAHARA, K., HAYASHI, K., ARAKAWA, T., PHILO, J.S., WEN, J., HARA, S., YAMAGUCHI, H. Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic alpha-amylase of an alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. **J. Biochem.** 120, 177-183, 1996.

KLIEBENSTEIN, D.J., KROYMANN, J., BROWN, P., FIGUTH, A., PEDERSEN, D., GERSHENZON, J and THOMAS MITCHELL-OLDS. Genetic Control of Natural Variation in *Arabidopsis* Glucosinolate Accumulation. **Plant Physiol.** 126(2): 811–825, 2001.

KNEEN, E., SANDSTED, R.M. An amylase inhibitor from certain cereals. *Journal of the American Chemical Society*, v. 68, p. 1247-1252, 1943.

KONAREV, A.V. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite co-evolution. *Euphytica* 92, 89-94, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant inhibitors in control of phytophagous insects. *Electr. Jour. Biotech.*, 5 (1):93-109, 2002.

LE BERRE-ANTONON, V., NAHOUM, V., PAYAN, F., ROUGÉ, P. Molecular basis for the specific binding of different amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the specific amylase. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 38, p. 657-665, 2000.

LI Z.J, XIONG F, LIN Q.S, D'ANJOU M, DAUGULIS A.J, YANG D.S.C, HEW C.L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif.* 21: 438-445, 2001.

LIOTI, L.; BOLLINI, R. Identification a new arcelin variant in wild bean seeds. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative*, v.32, p.28, 1989.

LOIOLA, T. A. **Principais Problemas da Cultura do Feijão no estado do Paraná.** In Feijão Irrigado, Estratégias Básicas de Manejo. Fanceli, A. L.; Dourado Neto, D. (Editora). Piracicaba, p.40-47, 1999.

LUEKING A, HOLZ C, GOTTHOL C, LEHRACH H, CAHILL D. A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.* 20: 372-378, 2000.

MACGREGOR, E.A., JANECEK, S, SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1546, 1-20, 2001.

MAKRIDES S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60:512ff, 1996.

MARANGONI, S. **Copaíba contra o caruncho.** Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo, v.71, p. 10-12, 2002.

MARSHALL, J.J., LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 8030-8037, 1975.

MARSTON F.A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** 240: 1-12, 1986.

MELLO, M.O, SILVA-FILHO, M. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defence mechanisms. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 14 (2), p.71-81, 2002.

MELO, F.R., SALES, M.P., SILVA, L.S., FRANCO, O.L., BLOCH, JR.C., ARY, M.B. α -amylase from cowpea seeds. **Proteins and Peptide Letters**, v. 6, n. 6, p. 387-392,1999.

MORTON, R.L., SCHROEDER, H.E., BATEMAN, K.S., CHRISPPEELS, M.J. ARMSTRONG, E., HIGGINS, T.J.V. Bean alpha-amylase inhibitor 1 transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorium*) under field conditions. **Proceedings Natural Academy Science USA** 97(8): 3820-3825, 2001.

MURPHY, K.P., JR., GAGNE, P., PAZMANY, C. AND MOODY, M.D. Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. **Protein Expression and Purification** 12: 208-214, 1998.

ODA, Y. T. MATSUNAGA, K. FUKUIAMA, T. MIYAZAKI, T. MORIMOTO, Tertiary and quaternary structures of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution, **Biochemistry** 36 (44) 13503-13511, 1997.

OLEDZKA G, DABROWSKI S, KUR J. High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification** 29(2):223-9, 2003.

OLIVEIRA, A.C., FERREIRA, D.F., RAMALHO, M.A.P. **Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas**. Editora: Editora Univ. Fed. Lavras. 322 p, 2005.

OLIVEIRA, A.M.; PACOVA, B.E.; SUDO, S.; ROCHA, A.C.M.; BARCELLOS, D.F. Incidência de *Zabrotes subfasciatus* Boheman, 1833 e *Acanthoscelides obtectus* Say 1831 em diversos cultivares de feijão armazenado (Col. Bruchidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.8, n.1, p.47-55, 1979.

OLIVEIRA-NETO, O.B., BATISTA, J.A.N., RIGDEN, D.J., FRANCO, O.L., FRAGOSO, R.R., MONTEIRO, A.C.S., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: curculionidae). **Bioscience Biotechnology Biochemistry** (68). 1-8, 2002.

ORIANI, M.A. DE G.; LARA, F.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Resistência de genótipos de feijoeiro a *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera:Bruchidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.25, n.2, p.213-216,1996.

OSBORN, T.C.; BLAKE, T.; GEPTS, P.; BLISS, F.A. Bean arcelin, 2: genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.71, n.6, p.847-855,1986.

OUYANG J, WANG J, DENG R, LONG Q, WANG X. High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris* . **Protein Expression and Purification** 32(1):28-34, 2003.

PEREIRA, A.R., BATISTA, J.A.N., DA SILVA MARIA, C. M., OLIVEIRA-NETO, O.B., FIGUEIRA E.L.Z., VALENCIA, A.J., GROSSI-DE-SA, M.F. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009–2016, 2006.

POMPERMAYER, P., LOPEZ, A.R., TERRA, W.R., PARRA, J.R., FALCO, M.C., SILVA, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 99, p. 79-85, 2001.

PUEYO, J.J., MORGAN, T.D., AMEENUDDIN, N., LIANG, C., REECK, G.R., CHRISPEELS, M.J. AND KRAMER, K. J. Entomol. Exp. Appl. 75, 237, 1994.

PURCELL. J.P., GREENPLATE, J.T. SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry Molecular Biology**. V.22, n.1, p. 41-47, 1992.

QUINTELA, E. D.; NEVES, B. P. DAS; QUINDERÉ, M. A. W.; ROBERTS, D. W. **Principales plagas del caupi en el Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 35), 1991.

REGO, A.F.M.; VEIGA, A.F.S.L.; RODRIGUES, Z.A.; OLIVEIRA, M.L. DE; REIS, O.V. Efeito da incidência de *Zabrotes subfasciatus* Bohemann, 1833 (Coleoptera, Bruchidae) sobre genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.15, p.53-69, Suplemento, 1986.

REVISTA PANORAMA RURAL, Feijão Cultura Pouco Conhecida, pag.24 e 25. Edição fevereiro 2003. Disponível em: <<http://www.panrural.com.br>>. Acesso em julho de 2006.

RICHARDSON, M. Seed storage protein: the enzyme inhibitors, In: **Methods in Plant Biochemistry**, New York: Acad. Press, v. 5 p. 295-305, 1991.

ROMANOS M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology** 6: 527-533, 1995.

ROMANOS, M.A, SCORER C. A, CLARE J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast** 8: 423-488, 1992.

ROSSETTO, C.J. **Sugestões para armazenamento de grãos no Brasil**. O Agrônomo, Campinas, v.18, p.38-51, 1966.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, n. 28, p. 425- 449, 1991.

RYAN, C.A., GREEN, T.R. Proteinase inhibitors in natural plant protection. **Recent Adv. Phytochem**, 8: 123-140, 1973.

RYAN, C.A., PEARCE, G. Systemin: a polypeptide signal for plant defence genes. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 14 1-17, 1998.

SALES, M.P., GERHARDT, I.R. GROSSI-DE-SÁ, M.F. XAVIER-FILHO, J. Do legumes storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiol.** 124, 515-522, 2000.

SANCHES-MONGE, R., BARBER, D., MENDEZ, E., GARCÍA-OLMEDO, F., SALCEDO, G. Gene encoding alpha-amylase inhibitors are located in the short arms of chromosomes 3B, 3D and 6D of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and applied Genetics** 72, 108-113, 1986.

SANCHES-MONGE, R., GÓMEZ, L., GARCÍA-OLMEDO, F., SALCEDO, G. New dimeric inhibitor of heterologous alpha-amylase encoded by a duplicated gene in the short arm of chromosome 3B of wheat (*Triticum aestivum* L.). **European Journal of Biochemistry** 183, 37-40, 1989.

SARI, L. T.; RIBEIRO-COSTA, C. S. & P. R. V. S. PEREIRA. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabacea), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia** 47: (4) 621-624, 2003

SCHOONHOVEN, A. VAN; CARDONA, C. Insects and other bean pests in Latin America. In: Schwartz, H.F.; Galvez, G.E. (Eds.). Bean production problems: disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. **Cali: CIAT**, p.363-412, 1980.

SCHOONHOVEN, A. VAN; CARDONA, C. Low levels of resistance to the Mexican bean weevil in dry bean. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.76, n.4, p.567-569, 1982.

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

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Manejo Integrado de pragas e Doenças do Feijoeiro**. São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, v. 3 p.90 (Manual Técnico, Série especial), 2000.

SHADE, R.E., SCHROEDER, H.E., PUEYO, J.J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Bio/Technology** 12, p. 793-6, 1994.

SHI X, KARKUT T, CHAMANKHAH M, ALTING-MEES M, HEMMINGSEN S, HEGEDUS D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification** 28: 321-330, 2003.

SILVA, S.P., TERRA, W.R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI-DE-SÁ, M.F., LOPES, A.R. & PONTES, E.G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) with emphasis on alpha-amylase and oligosaccharidases. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 29, 355-366, 1999.

SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. **Annual Review of Entomology** 24(1):449-473, 1979.

SREEKRISHNA K, BRANKAMP R, KROPP K, BLANKENSHIP D, TSAY J, SMITH P, WIERSCHKE J, SUBRAMANIAM A, BIRKENBERGER L. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**. 190(1):55-62, 1997.

STROBL, S., MUHLHAHN, P., BERNSTEIN, R., WILTSCHECK, R., MASKOS, K., WUNDERLICH, M., HUBER, R., GLOCKSHUBER, R., HOLAK, T.A. Determination of the three-dimensional structure of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from ragi seeds by NMR spectroscopy, **Biochemistry** 34 (26) 8281-8293, 1995.

SUZUKI, K., ISHIMOTO, M., KITAMURA, K. cDNA sequence and deduced primary structure of an alpha-amylase inhibitor from a bruchid-resistant wild common bean. **Biochim. Biophys. Acta** 1206, 298-291, 1994.

TAKANO K, TSUCHIMORI K, YAMAGATA Y, YUTANI K. Effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme. **Eur. J. Biochem.** 266: 675-682, 1999.

THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2005. Agricultural trade and poverty Can trade work for the poor? FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/a0050e/a0050e00.htm>> Acesso em agosto de 2006.

TIFFIN, P., GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor *Wip 1* in *Zea* and related genera. **Molecular Biology Evolution**, v. 18, p. 2092-2101, 2001.

TORRES F E MORAES L. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biociência & Desenvolvimento** 12:20-22; 2000.

TSCHOPP J.F, BRUST P.F, CREGG J.M, STILMAN C.A, GINGERAS T.R. Expression of Lac Z gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acid Res.** 15:3859-3876, 1987.

VASSILEVA A, CHUGH D.A, SWAMINATHAN S, KHANNA N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **J. Biotechnol.** 88: 21-35, 2001.

VIEIRA, C. TRAZILBO J.P.J, BORÉM A. **Feijão**. 2ª Edição, Editora UFV, 600p, 2006.

VIEIRA, L.M. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. v.1 1976. Editada pela Epagri em 2005. Florianópolis, SC. Disponível em: <http://www.icepa.com.br/Publicacoes/sintese_2005/fejao_2005.pdf>. Acesso em agosto de 2006.

WANDERLEY, V.S.; OLIVEIRA, J.V. Influência do número de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. na biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Boh., 1833) (Coleoptera, Bruchidae). **Caderno Ômega**, Recife, n.4, p.167-182, 1992.

WANG, J.R., WEI, Y.M., YAN, Z.H., ZHENG, Y.L. Detection of single nucleotide polymorphisms in 24 kDa dimeric α -amylase inhibitors from cultivated wheat and its diploid putative progenitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 309– 320, 2005.

WANG, J.R., WIE, Y.M., YAN, Z.H., ZHENG, Y>L. Detection of single nucleotide polymorphisms in the 24 kDa dimeric alpha-amylase inhibitors from cultivated wheat and its diploid putative progenitors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1723, 309-320, 2006.

WHITE C.E, KEMPI N.M, KOMIVES E.A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris* . **Structure** 2: 1003-1005, 1994.

YOKOYAMA, L.P. EMBRAPA-CNPAP. Cultivo do Feijoeiro Comum. Goiânia-GO. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/prag_graos_arm.htm>. Acesso em agosto de 2006.

YOUNG, N.M., THIBAUT, P., WATSON, D.C., CRISPEELS, M.J. Post-tranlation processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Febbs-letters**, v. 446, p. 203-206, 1999.