

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Cayro de Macêdo Mendes

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA TRIPSINA DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

João Pessoa

2016

Cayro de Macêdo Mendes

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA TRIPSINA DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

João Pessoa

M538p Mendes, Cayro de Macêdo.
Purificação e caracterização físico-química da tripsina do peixe-zebra (*Danio rerio*) / Cayro de Macêdo Mendes.- João Pessoa, 2016.
39f. : il.
Orientador: Ian Porto Gurgel do Amaral
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Serino-proteases. 3. Enzima termoestável. 4. Organismos aquáticos.

UFPB/BC

CDU: 60(043.2)

Cayro de Macêdo Mendes

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA TRIPSINA DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel(a) em Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrea Farias Almeida - UFPB

Jucilene Pereira de Sousa- UFPB

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral - UFPB
(orientador)

RESUMO

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases ou peptidases, correspondem a uma grande parte das enzimas comercializadas no mundo. Estas, por sua vez, possuem diversas aplicações nos diferentes setores da indústria. Uma vez que se pretende empregar estas moléculas em alguns destes processos, é necessário compreender suas características físico-químicas para um melhor aproveitamento delas. Neste trabalho foi feita purificação e a caracterização da tripsina do peixe-zebra e foi observado que não houve diferenças significativas na atividade da tripsina dos peixes entre os grupos saciedade, jejum e realimentação. Também foi visto um aumento da atividade enzimática de acordo com o aumento da temperatura até atingir 50°C, que correspondeu a sua temperatura ótima e que manteve-se estável por 60min em temperaturas de 25 a 50°C, o que demonstra uma termoestabilidade considerável. A tripsina do peixe-zebra teve maior atividade em pH 7,0 no tampão citrato-fosfato e pH 7,5 no tampão Tris-HCl e mostrou uma alta afinidade pelo substrato específico BApNA, com K_m de 0,15mM e $V_{max} = 0,009U$. Dentre os íons testados, o mercúrio foi o único íon capaz de inibir a tripsina do peixe-zebra. Íons de sódio, cálcio, alumínio e cádmio não foram capazes de modular a atividade da tripsina do peixe-zebra. Nenhuma alteração da atividade foi observada tanto para tripsina do peixe-zebra purificada quanto para tripsina do porco nas diferentes concentrações de cloreto de cálcio quando incubadas em temperatura ambiente. O cálcio conferiu maior estabilidade térmica à tripsina do peixe-zebra, que manteve cerca de 90% de sua atividade a 55°C por uma hora e a 60°C sua atividade caiu para 20%. Por outro lado, a tripsina do porco mostrou maior dependência do cálcio. Na ausência de cálcio, a tripsina do porco perdeu 70% de sua atividade após uma hora de incubação a 60°C. Enquanto que na presença do cálcio, a tripsina do porco manteve 70% de sua atividade a 60°C. Durante o experimento de autólise, a tripsina suína também demonstrou uma maior dependência ao cálcio. Foi observado que o sítio de ligação ao cálcio das tripsinas do peixe e do porco são totalmente conservados, bem como o sítio catalítico, o sítio de reconhecimento do substrato e os cinco primeiros resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal. Porém, foram observadas mudanças nos resíduos nas posições que correspondem aos sítios de autólise na tripsina do peixe-zebra. Levando em consideração estes parâmetros, a tripsina do peixe-zebra possui potencial tecnológico e comercial para ser empregada em processos industriais.

Palavras-chave: Serino-proteases, enzima termoestável, organismos aquáticos

ABSTRACT

Proteolytic enzymes represent a major part of the enzymes marketed worldwide. These, in turn, have many applications in different industry sectors. Given the potential to employ these molecules in any of these processes, it is necessary to understand its physical and chemical characteristics for a better use of these enzymes. In this work, purification and characterization of zebrafish trypsin were performed and it was observed that there were no significant differences in fish trypsin activity among satiety, fasting and refeeding groups. It was also seen an increase in enzyme activity with increasing temperature up to 50°C corresponding to its optimal temperature and remained stable for 60min at temperatures from 25 to 50°C, which shows a considerable thermostability. The trypsin of zebrafish had higher activity at pH 7.0 in citrate-phosphate buffer and in pH 7.5 in Tris-HCl buffer and showed a high affinity for the specific substrate BApNA with K_m and V_{max} of 0.15mM and 0,009U, respectively. Among the tested chloride ions, mercury was the only one able to inhibit zebrafish trypsin. Sodium, calcium, aluminum and cadmium chloride ions were unable to modulate the zebrafish trypsin activity. No change in activity was observed for both zebrafish and porcine trypsins at different concentrations of calcium chloride. Calcium at 10mM increased the thermal stability of zebrafish trypsin, which maintained about 90% of its activity at 55°C for one hour and at 60°C its activity dropped to 20%. On the other hand, porcine trypsin showed greater dependence on calcium. In the absence of calcium, porcine trypsin lost 70% of activity after one-hour incubation at 60°C. In the presence of calcium, porcine trypsin retained 70% of its initial activity at 60°C. During the autolysis experiment, the porcine trypsin displayed a higher dependence for calcium compared to the zebrafish trypsin. It was observed that the calcium-binding sites of the fish and porcine trypsins are fully conserved, as the catalytic site, the recognition site of the substrate and the first five amino acid residues of the N-terminus. However, changes were observed at the residues at positions that correspond to autolysis sites in zebrafish trypsin. Taking into account these parameters, zebrafish trypsin has technological and commercial potential to be used in industrial processes.

Keywords: Serine proteases , thermostable enzyme, aquatic organisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da tripsina do salmão sobreposta com a tripsina bovina	13
Figura 2 – Mecanismo de ação da tripsina	14
Figura 3 – Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	16
Figura 4 – Temperatura da água versus dias do experimento. Após aclimação, os animais (n=18 para cada tanque) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação	23
Figura 5 – Biometria dos grupos saciedade, jejum e realimentação. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação	24
Figura 6 – Efeito do status alimentar na atividade da tripsina do peixe-zebra. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação	24
Figura 7 – Cromatograma da fração 60–90% após cromatografia de afinidade em resina de benzamidina-sephadex	26
Figura 8 – Atividade da tripsina em função da temperatura de reação	27
Figura 9 – Estabilidade da tripsina em função da temperatura de pré-incubação	28
Figura 10 – Atividade da tripsina do peixe-zebra em função do pH no meio de reação	29
Figura 11 – Efeito de íons na atividade da tripsina do peixe-zebra (A – NaCl, B – CaCl ₂ , C – HgCl ₂ , D – AlCl ₃ , e E – CdCl ₂	30
Figura 12 – Atividade da tripsina do peixe-zebra em função da concentração de substrato .	31
Figura 13 – Efeito do cálcio na atividade enzimática da tripsina a 25°C	32
Figura 14 – Efeito da temperatura na estabilidade da tripsina do peixe-zebra (A) e do porco (B) na ausência de cálcio e na presença de 10mM de CaCl ₂ (C e D).....	33
Figura 15 – Efeito do cálcio na autólise da tripsina do peixe zebra e do porco incubadas a 37°C na ausência (A) e na presença do cálcio (B).....	34
Figura 16 – Alinhamento da sequência primária da tripsina do peixe-zebra (Q561Z7) e do porco (C5IWV5).....	36
Figura 17 – Modelagem e sobreposição da estrutura tridimensional da tripsina do peixe e do porco	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de tripsinas baixadas dos principais bancos de dados	21
Tabela 2 - Purificação da tripsina do peixe-zebra por precipitação com etanol seguida de cromatografia de afinidade.....	25
Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre as tripsinas da Tilápia-do-Nilo (Q6R671), do peixe-zebra (Q561Z7), bovina (Q29463), suína (C5I WV5), do Salmão do Atlântico (P35031) e da Carpa Comum (G3XL84)	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA – N- α -Benzoil-L-Arginina p-Nitroanilida

BSA – Albumina do Soro Bovino

DMSO – Di-Metil-Sulfoxido

LABOrA – Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos

Tris-HCl – Hidrocloridrato de 2-Amino-2-(Hidroximetil)-1,3-Propanodiol

LISTA DE SÍMBOLOS

K_m Constante de Michaelis e Menten

pH (-log [H⁺])

V_0 Velocidade inicial da reação

V_{max} Velocidade máxima

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVOS GERAIS	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 ASPECTOS TEÓRICOS.....	12
3.1 ENZIMAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O MERCADO.....	12
3.2 TRIPSINA DE PEIXES: ESTRUTURA, MECANISMO DE AÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	12
3.3 APLICAÇÕES DA TRIPSINA.....	15
3.4 PEIXE-ZEBRA	16
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 CRIAÇÃO E EUTANÁSIA DOS PEIXES	18
4.2 EFEITO DE STATUS NUTRICIONAL.....	18
4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS	18
4.4 PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA.....	19
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA	20
4.6 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL.....	21
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 EFEITO DO STATUS NUTRICIONAL NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS	23
5.2 PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DO PEIXE-ZEBRA	25
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA	26
5.4 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL.....	34
6 CONCLUSÃO.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases ou peptidases, correspondem a uma grande parte das enzimas comercializadas no mundo. Estas, por sua vez, possuem diversas aplicações nos diferentes setores da indústria, tais como na produção de ração animal, produção de detergentes, processamento de couros, química fina, processamento de medicamentos, dentre outros. As enzimas proteolíticas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana e uma das vantagens de seu uso nos processos industriais deve-se à especificidade das reações por elas catalisadas, diminuindo o consumo de energia e matéria-prima.

Proteases provenientes das vísceras de peixes demonstram características interessantes que poderiam ser empregadas na indústria como uma fonte alternativa e sustentável. Por esta razão, tem sido observado um interesse na caracterização de proteases de peixes de interesse comercial. Dentre as enzimas de interesse, destaca-se a tripsina, uma protease alcalina que pertence à família das serino-proteases.

O peixe-zebra (*Danio rerio*), também conhecido como paulistinha é um peixe muito conhecido pelos aquaristas, e ganhou espaço na comunidade científica como animal modelo em diversas linhas de pesquisa. Este modelo também pode ser empregado no estudo e obtenção de biomoléculas, dentre as quais as proteases. Desta forma, este projeto é justificado pela busca de enzimas com características atraentes para o comércio e para indústria como maior estabilidade quanto a temperatura e pH da reação, a partir de tecidos de animais aquáticos. O projeto também tem é justificado pela necessidade do melhor conhecimento dos parâmetros físicos e químicos que influenciam a atividade da tripsina do peixe-zebra.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Purificar e caracterizar a tripsina do peixe-zebra, além de comparar a sequência primária de tripsinas de mamíferos e peixes ósseos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de atividade enzimática da tripsina nas vísceras do peixe-zebra em diferentes status nutricionais (saciedade, jejum e re-alimentação);
- Purificar a tripsina do peixe-zebra;
- Caracterizar a enzima purificada quanto ao seu pH e temperatura ótimos;
- Investigar a inibição da atividade enzimática por metais pesados como alumínio, cádmio e mercúrio
- Investigar o efeito do íon cálcio na estabilidade térmica da tripsina do peixe-zebra e comparar com a tripsina suína (modelo de tripsina de mamíferos);
- Modelar a estrutura tridimensional da tripsina do peixe-zebra baseado na estrutura da tripsinas suína; e
- Investigar a existência de sítios de ligação para o íon cálcio na estrutura primária da tripsina do peixe-zebra.

3 ASPECTOS TEÓRICOS

3.1 ENZIMAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O MERCADO

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases, consistem em catalisadores biológicos que atuam clivando ligações peptídicas através da reação de hidrólise (TURK, 2006). O avanço tecnológico e a crescente demanda por novos produtos levaram à procura por técnicas cada vez mais eficazes para aumentar a produção. O processamento através de métodos enzimáticos demonstra ser uma alternativa eficaz no aumento da produção, devido à sua especificidade da reação catalisada, da velocidade com que se obtém o produto sem a geração de produtos secundários (como acontece em processos envolvendo síntese química) e diminuição de gastos com matéria prima e energia (BOUGATEF, 2013a).

As proteases correspondem a cerca de 60% das enzimas mais requisitadas pelo mercado e podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, sendo que as enzimas de origem microbiana são as mais usadas pelas suas características e facilidade de obtenção quando comparada a outras fontes (BANIK; PRAKASH, 2004; DE CASTRO et al., 2015).

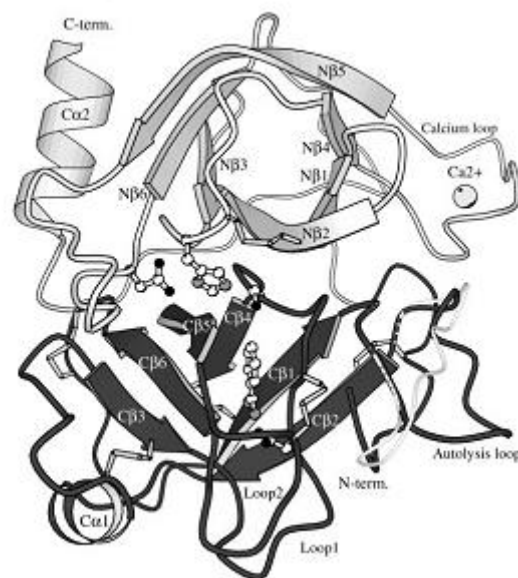
Enzimas obtidas através de peixe e outros organismos aquáticos demonstram ser uma alternativa para o mercado de enzimas. Subprodutos da pesca e da aquicultura, tem sido descartados de maneira inapropriada no ambiente, gerando impactos para este (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008). Estes subprodutos, principalmente enzimas de peixes, consistem em uma rica fonte de enzimas proteolíticas, podendo ser empregadas em processos industriais a um baixo custo, caso sejam manejadas corretamente. Das enzimas obtidas através das vísceras de peixes destacam-se as proteases ácidas e proteases alcalinas, que podem ser empregadas na produção de detergentes, processamento de couros, alimentos e medicamentos, extração de corantes e aromatizantes, química fina, dentre outros (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.2 TRIPSINA DE PEIXES: ESTRUTURA, MECANISMO DE AÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Dentre as proteases alcalinas se destaca a tripsina (3. 4. 21. 4), uma serina-endopeptidase de 22 a 28 Kda que atua na digestão de proteínas de dieta, clivando nas regiões C-terminais de ligações peptídicas que contenham resíduos de arginina e lisina no interior da cadeia peptídica (SILA et al., 2012). A tripsina consiste em uma estrutura formada por duas

alfa-hélices e dois barrís-beta, seis fitas cada um (Figura 1), nos quais se encontram a tríade catalítica (His, Asp e Ser), sítio de reconhecimento do substrato (Asp, Gly e Gly), um sítio de ligação com o íon cálcio (Glu, Asn, Val, Glu e Glu) e sítios de autólise, compostos por arginina e lisina (regiões onde a tripsina atua) espalhadas em sua estrutura. Nos animais superiores, a tripsina, juntamente com outras enzimas como a quimiotripsina, a elastase, a colagenase são produzidas pelas células acinares localizada no pâncreas em suas formas inativas. Além de atuar hidrolisando as proteínas da dieta, a tripsina atua ativando as outras enzimas, inclusive seu zimogênio, o tripsinogênio (AS; WALSH; NEURATH, 1964).

Figura 1 - Estrutura da tripsina do salmão sobreposta com a tripsina bovina

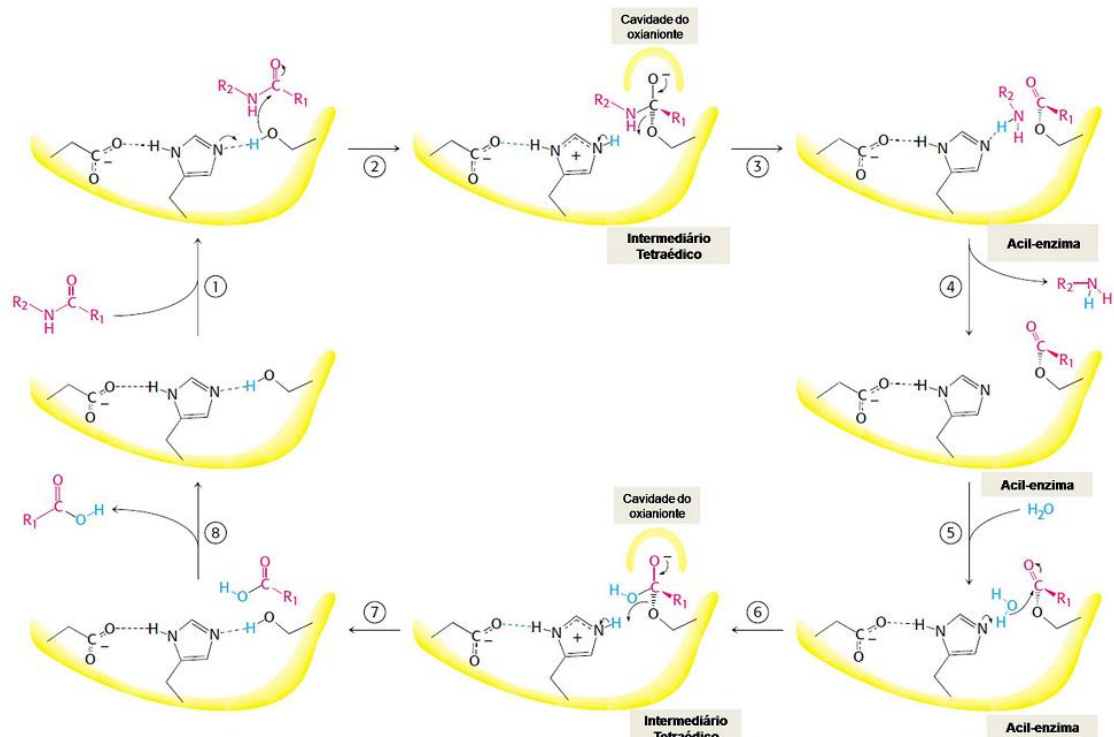


Legenda:(C-term) porção carboxiterminal; (Cβ) β-folha do domínio C; (Cα) α-hélice do domínio C; (Nβ) β-folha do domínio N. Fonte: (LEIROS; WILLASSEN; SMALÅS, 2000).

O mecanismo de ação da tripsina (Figura 2) ocorre através das seguintes etapas: o acoplamento (1) do sítio ativo da enzima ao substrato através de um ataque nucleofílico promovido pelo resíduo de serina (2) ao grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Este ataque nucleofílico irá instabilizar o oxigênio do grupo carbonila, ganhando uma carga negativa por um curto período que é estabilizada pelo hidrogênio do bolsão oxiânionte. Isto levará ao colapso do intermediário tetraédrico (3) e a formação do complexo acil-enzima. O grupo amino irá se dissociar da cadeia (4), formando o primeiro produto da hidrólise e a água entrará no sítio ativo (5) para promover um ataque nucleofílico (6) promovendo a formação

de um novo complexo acil-enzima (7) para dissociação do grupo carboxil, o segundo produto da hidrólise (HEDSTROM, 2002).

Figura 2 – Mecanismo de ação da tripsina



Fonte: BERG et al., 2008

A estrutura e características físico-químicas da tripsina de animais terrestres tais como ovelha, cão, porco e rato (INSERM et al., 1988; PINSKY; LAFORGE; SCHEELE, 1985; TI; ST; DU, 1969) foram elucidadas durante as últimas décadas. A estrutura da tripsina bovina caracterizada em 1964 é até hoje utilizada como enzima-modelo para estudo da tripsina de outros mamíferos (AS; WALSH; NEURATH, 1964).

Em 1970, foi observado que a formação do complexo entre a tripsina e o íon cálcio aumentava a estabilidade da estrutura da tripsina e, por sua vez, aumentava o tempo de atividade enzimática (SIPOS; MERKEL, 1970). A tripsina de mamíferos é bem caracterizada quanto a estrutura e propriedades físico-químicas, porém ainda há muitos questionamentos a serem respondidos quanto a tripsina de outros organismos, tais como a tripsina de peixes. Em alguns trabalhos foi observado que a tripsina de peixe não tem a sua atividade alterada na presença do cálcio, como foi visto na tripsina do *Barbus callensis* (SILA et al., 2012). Em

outros trabalhos, no entanto, observa-se um pequeno aumento de sua atividade, como é o caso da tripsina da *Sardinella aurita* (KHALED et al., 2011).

Tem sido realizadas caracterizações de tripsinas purificadas de diversos peixes de importância comercial para a indústria pesqueira e aquicultura, tais como a Tilápia-do-Nilo (BEZERRA et al., 2005), Pirarucu (FREITAS et al., 2012a), Tambaqui (MARCUSCHI et al., 2010), e peixes de águas frias como o Salmão, (KANNO et al., 2010) Carpa (COHEN; GERTLER; BIRK, 1981), e a Anchova japonesa (AHSAN; WATABE, 2001). Tripsinas de peixe geralmente atuam e possuem maior estabilidade em uma faixa alcalina de pH, tornando-se inativas em faixas de pH ácido. Como exemplos temos a tripsina do peixe basilisco (*Salarias basilisca*), que possui atividade nas faixas entre 8,0 e 11,0 com pH ótimo em 9,5 (KTARI et al., 2012a). A tripsina de algumas espécies de peixe de águas frias possuem atividade em temperaturas mais baixas, tais como a tripsina do peixe antártico *Paranotothenia magellanica*, que possui atividade a 5°C (GENICOT; FELLER; GERDAY, 1988). Alguns processos, principalmente na indústria de alimentos necessitam ser mantidos em baixas temperaturas (CANO-LOPEZ; SIMPSON; HAARD, 1987; SILA et al., 2012). Nestes processos, é necessário o uso de enzimas com alta atividade mesmo em baixa temperatura. Por outro lado, os peixes tropicais possuem tripsinas com atividade ótima em temperaturas consideradas elevadas para proteases. Por exemplo, a tripsinas do Pirarucu apresenta atividade ótima a 65°C (FREITAS et al., 2012b).

3.3 APLICAÇÕES DA TRIPSINA

Dentre os processos enzimáticos envolvendo a tripsina de peixes que podem ser incluídos no mercado temos a inclusão da tripsina na formulação do detergente e outros produtos de limpeza (BANIK; PRAKASH, 2004), removendo manchas. Foi realizado um experimento onde foi avaliada a atividade da tripsina purificada do peixe basilisco (*Salarias basilisca*) associada a detergentes comerciais, mantendo quase 100% de sua atividade na faixa de temperatura entre 30-40°C (KTARI et al., 2012a). A extração de carotenoproteínas de casca de camarão como foi feito com a tripsina do bacalhau do atlântico (CANO-LOPEZ; SIMPSON; HAARD, 1987) e a do *Barbus callensis* (SILA et al., 2012) também é uma aplicação de grande importância, pois substitui o uso de solventes orgânicos. A tripsina também pode ser empregada na indústria farmacêutica e biomédica, degradando proteínas virais ou bacterianas, como foi o caso da tripsina do Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*)

que demonstrou eficiência contra o Herpesvírus tipo 1 e o vírus da influenza (GUDMUNDSDÓTTIR; HILMARSSON; STEFANSSON, 2013).

3.4 PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) descrito pela primeira vez por Francis Hamilton em 1822, é um peixe tropical teleósteo de água doce da família dos ciprinídeos proveniente da região da Ásia central, que habita os alagados e rios de Bangladesh, Nepal, Paquistão e Índia (ENGESZER et al., 2007). Quanto à sua anatomia, o peixe-zebra possui um corpo alongado que pode chegar até 5cm de comprimento na fase adulta (Figura 3), sendo que o corpo dos machos é mais esguio e as fêmeas apresentam um volume característico na região abdominal. O nome *Danio* vem do Bengali “*dhani*” que significa “dos campos de arroz” (SPENCE et al., 2008). No Brasil é conhecido popularmente como paulistinha devido aos padrões de listras que lembram as cores da bandeira do estado de São Paulo. Este peixe é muito comercializado para fins ornamentais, devido a facilidade de criação e rápida reprodução em cativeiro. Em relação aos aspectos reprodutivos, os peixes-zebra costumam acasalar no início da manhã, quando o macho nada em paralelo à fêmea, que libera vários óvulos. Em seguida, o macho libera sêmen sobre ovos e após 36 horas de desenvolvimento, as larvas eclodem, atingindo a maturidade sexual por volta dos 6 meses (SPENCE et al., 2008).

Figura 3 - Peixe-zebra(*Danio rerio*)



Fonte: aquariopeixes.com.br

Outra característica marcante desta espécie é a transparência dos embriões durante o desenvolvimento, levando a comunidade científica a adotá-lo como animal modelo (EPSTEIN; EPSTEIN, 2005). O peixe-zebra é um modelo experimental bem consolidado em diversas áreas, como na compreensão de doenças genéticas (LIESCHKE; CURRIE, 2007), metabólicas (SCHLEGEL; GUT, 2015) e estudos de toxicologia (THELLMANN et al., 2015). Atualmente existe um banco de dados exclusivo do peixe-zebra (ZFIN) onde pode-se encontrar informações genéticas relacionadas ao peixe. Outra possível aplicação deste modelo experimental na ciência seria no campo da enzimologia.

4 METODOLOGIA

4.1 CRIAÇÃO E EUTANÁSIA DOS PEIXES

O modelo experimental do projeto foi utilizado o peixe-zebra (*Danio rerio*). Exemplares foram obtidos em uma loja de aquarismo em João Pessoa e acondicionados em tanques de 20 litros no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquático (LABOrA) com circulação de água, temperatura entre 25 e 28 °C, pH entre 6,7 e 7,8, e salinidade entre 0,2 e 0,5 g/L, assegurando seu bem-estar. A eutanásia dos peixes foi realizada por imersão em água do sistema contendo triclaína numa concentração três vezes maior daquela necessária para causar perda dos reflexos de natação, confirmada através da parada dos movimentos operculares. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA) e está registrado sob o protocolo 05/06.

4.2 EFEITO DE STATUS NUTRICIONAL

Os peixes foram divididos em dois tanques os quais foram submetido a um período de uma semana de alimentação *ad libitum* (período de aclimatação denominado período de saciedade), uma semana de jejum (denominado período de jejum) e duas horas de realimentação (denominado período de realimentação). Durante todo o experimento a temperatura e pH foram monitorados. Ao final de cada período, doze peixes (seis de cada tanque) foram fotografados, eutanasiados e a biometria foi realizada com auxílio do software ImageJ. As vísceras foram extraídas e homogeneizadas manualmente em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 em uma proporção de 1g de tecido para 40mL do tampão, com o auxílio de um pistilo. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 10min (centrífuga HERMLE, modelo Z326K). Após a centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para avaliar o efeito do status nutricional na atividade enzimática da tripsina.

4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Os ensaios foram realizados em triplicata em placas de fundo chato de 96 poços. Foram realizados ensaios de atividade enzimática com o extrato bruto de tecidos extraídos tanto de machos como de fêmeas. Foi escolhido o extrato bruto obtido das vísceras dos

machos para a realização das etapas posteriores, visto que o nível de atividade enzimática de machos e fêmeas são semelhantes (resultados não mostrados). Para a determinação de atividade de tripsina, o extrato (30 µl) foi adicionado aos poços seguido de 30µl do substrato α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 8mM dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e 140 µL do tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. A leitura da absorbância a 405nm foi realizada em diferentes tempos em um leitor de microplacas (Mindray 96-A). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o incremento de 0,001 de absorbância por minuto.

O método colorimétrico de (SEDMAK; GROSSBERG, 1977) foi utilizado para determinação da concentração de proteínas nas soluções, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Assim como no ensaio de atividade enzimática, foi utilizada uma microplaca de 96 poços, na qual foram pipetados em cada poço, em triplicata, 150 µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,0, 50 µL do reagente colorimétrico Comassie Blue e 50 µL da amostra. Após incubar a placa durante 5 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em um leitor de microplacas (Mindray 96-A) no comprimento de onda de 620nm.

4.4 PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA

Para a purificação de tripsina, etanol foi adicionado ao extrato bruto refrigerado e sob agitação até ser obtida uma concentração final de 30% (v/v) de etanol, quando o sistema foi mantido em repouso por 24h a 4°C. À solução de enzima (68 mL) foi adicionado etanol (20,4 mL), e esta solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, e chamado fração 0-30%. Ao sobrenadante foi adicionado etanol até a concentração de 60% e a mesma metodologia utilizada para obter a fração 0-30% foi repetida para obter a fração 30-60% e 60-90%. A fração 60-90% demonstrou uma alta atividade específica e foi usada na cromatografia de afinidade. Foi usada uma seringa como coluna em um fluxo de 1 mL/min, com coleta de 1 mL para cada fração em tubos de microcentrífuga. A resina benzamidina-sephadex foi utilizada como fase estacionária e Tris-HCl 0,1M pH 8,0 como fase móvel na cromatografia. Após aplicação da fração 60-90%, a coluna foi lavada com o tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. As proteína adsorvidas à resina foram eluídas da coluna com o tampão KCl-HCl 0,5M pH 2,0. As frações coletadas que continham KCl-HCl foram tamponadas com 0,5ml de Tris-HCl 0,1M pH 8,0. A eluição de proteínas foi seguida por espectrofotometria a 280nm e a atividade da tripsina foi medida como descrita no item 4.3. Após a construção do cromatograma, as frações

com atividade enzimática foram reunidas em um “pool”, e este foi utilizado para os experimentos de caracterização.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA

A tripsina foi caracterizada quanto à sua temperatura ótima, estabilidade térmica, pH ótimo, cinética enzimática e efeito de íons de metais pesados na sua atividade. Para determinar a temperatura ótima da tripsina, a atividade enzimática foi realizada em faixas de temperatura entre 25 e 70°C, com incremento de 5°C para cada ponto experimental. Para determinar a estabilidade térmica da enzima, a tripsina purificada foi pré-incubada a temperaturas entre 25 e 60°C por 15, 30, 45 e 60min. Após este tempo a temperatura da reação foi reduzida para 25°C por 10 minutos e a atividade enzimática foi realizada e mensurada a atividade residual da enzima (comparação com a atividade da enzima pré-incubada a 25°C).

Nos experimentos de pH ótimo, a atividade enzimática foi avaliada em faixas de pH de 5,5 a 10,0. Foram utilizados os tampões citrato-fosfato (pH de 5,5 a 7), Tris-HCl (pH de 7,0 a 9,0), e glicina-NaOH (pH de 8,5 a 10,0). A cinética enzimática foi avaliada utilizando diferentes concentrações do BApNA (de 0,01mM a 5mM). A curva de cinética enzimática foi modelada com auxílio do software Origin Pro 8.0 para determinar o V_{max} e K_m da enzima.

Amostras da enzima (15 μ L) foram aplicadas em uma placa de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados à solução de enzima 15 μ L de NaCl, $CaCl_2$, $AlCl_3$, $HgCl_2$ ou $CdCl_2$ em concentrações de 0,001mM a 10mM que foi incubada durante 15 minutos e em seguida adicionados 30 μ L de BApNA e 140 μ L do tampão Tris-HCl para determinação da atividade residual (atividade comparada à reação com a adição de tampão sem íons).

Nos experimentos com o cloreto de cálcio, foi usada a tripsina purificada do peixe-zebra, assim como também foi usada como padrão uma concentração de 500 μ g/mL da tripsina suína (Sigma) diluída em 0,1M Tris-HCl pH 8,0. Ambas enzimas foram testadas na presença e na ausência de $CaCl_2$. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Um branco de reação (substrato na presença de tampão) foi utilizado como um controle negativo da presença de enzima.

Para o ensaio de autólise, 1 mL da tripsina suína e do peixe foi incubado separadamente a 37°C por 144h, na presença e na ausência de 10 mM $CaCl_2$, e alíquotas de 30 μ L foram coletadas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144h para ensaio

de atividade enzimática como descrito anteriormente, após incubação das alíquotas em temperatura ambiente por 10min.

4.6 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

As bases de dados NCBI e Ensembl foram consultadas para a obtenção da sequência primária do tripsinogênio do porco (00000017942.2) e do peixe-zebra (00000077661.6). Os resíduos de aminoácidos correspondentes ao peptídeo-sinal, sítio catalítico, sítio de reconhecimento do cálcio, sítios de ligação de cálcio e loop de autólise foram identificados a partir de dados da literatura (Marcuschi, 2010) e de análise da estrutura primária na base de dados Prosite. A estrutura tridimensional da tripsina suína foi obtida da base de dados RCSB PDB (1S81). A estrutura tridimensional da tripsina do peixe-zebra foi modelada e sobreposta com a tripsina do porco com auxílio do software Swiss-PdbViewer.4.1.0. Também foi realizada a busca, identificação de sítios e alinhamento de sequências de aminoácidos pertencentes a outras espécies, incluindo a tripsina bovina e de outros peixes teleósteos obtidos através do Uniprot (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências de tripsinas baixadas dos principais bancos de dados

Espécie	NCBI	Uniprot
Peixe-zebra <i>(Danio rerio)</i>	-	Q8AV83
Porco <i>(Sus scrofa)</i>	P00761.1	-
Touro <i>(Bos taurus)</i>	-	Q29463
Tilápia-do-Nilo <i>(Oreochromis niloticus)</i>	-	Q6R671
Carpa comum <i>(Cyprinus carpio)</i>	-	G3XL84
Salmão do Atlântico <i>(Salmo salar)</i>		P35031

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados para determinar o tipo de distribuição (normal ou diferente de normal) utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 0,05. Em todos os casos, os dados analisados seguiram uma distribuição normal. A diferença entre as médias de cada ponto experimental foram analisadas com o teste ANOVA. Após o teste de ANOVA o teste post-hoc de Tukey foi utilizado para analisar grupos com média estatisticamente diferentes. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa IBM SPSS Statistics 20 com nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DO STATUS NUTRICIONAL NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS

Para assegurar as condições do experimento, a temperatura foi aferida durante o experimento. Constatou-se que não houve mudanças significantes na temperatura durante o experimento (Figura 4). A biometria dos animais foi um outro fator analisado dentre os grupos (Figura 5), não tendo sido observadas diferenças significativas na biometria dos peixes entre os grupos saciedade, jejum e realimentação. Estes resultados permitiriam separar o efeito do status alimentar nas atividades enzimáticas, excluindo a possibilidade da temperatura ou biometria serem fatores importantes. No entanto, também não foram observadas diferenças significativas na atividade da tripsina (Figura 6) nos diferentes grupos de status alimentar (saciedade, jejum e realimentação). É possível, no entanto, notar que houve uma tendência de diminuição da atividade de tripsina após 7 dias de jejum (Figura 6).

Figura 4 - Temperatura da água versus dias do experimento. Após aclimatação, os animais (n=18 para cada tanque) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA (p=0,04).

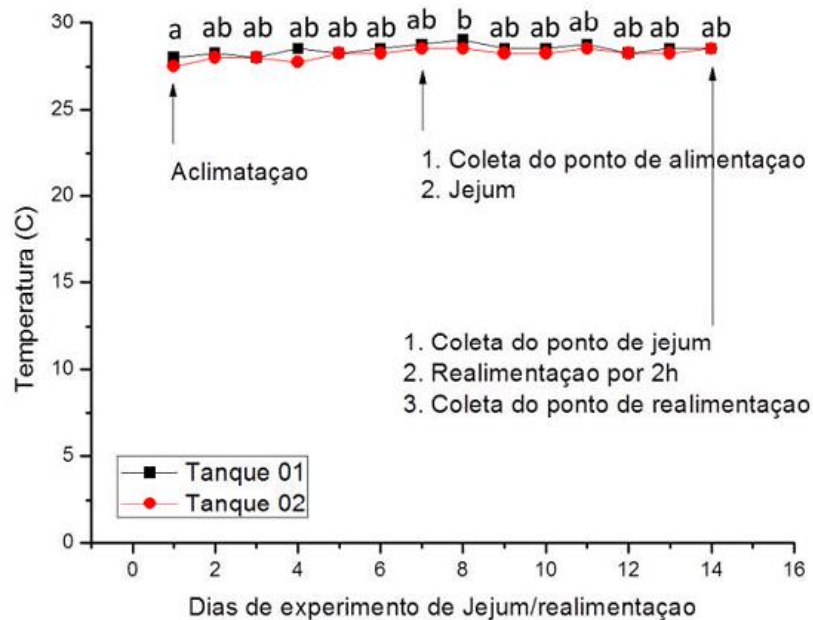


Figura 5 - Biometria dos grupos saciedade, jejum e realimentação. Após aclimatação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58).

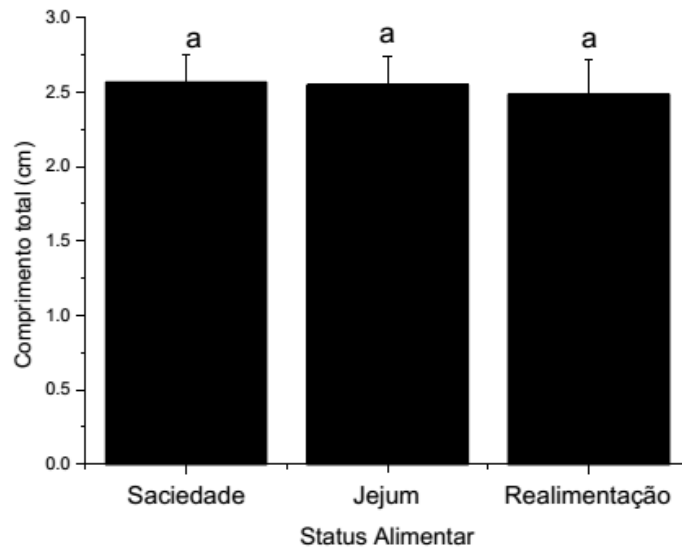
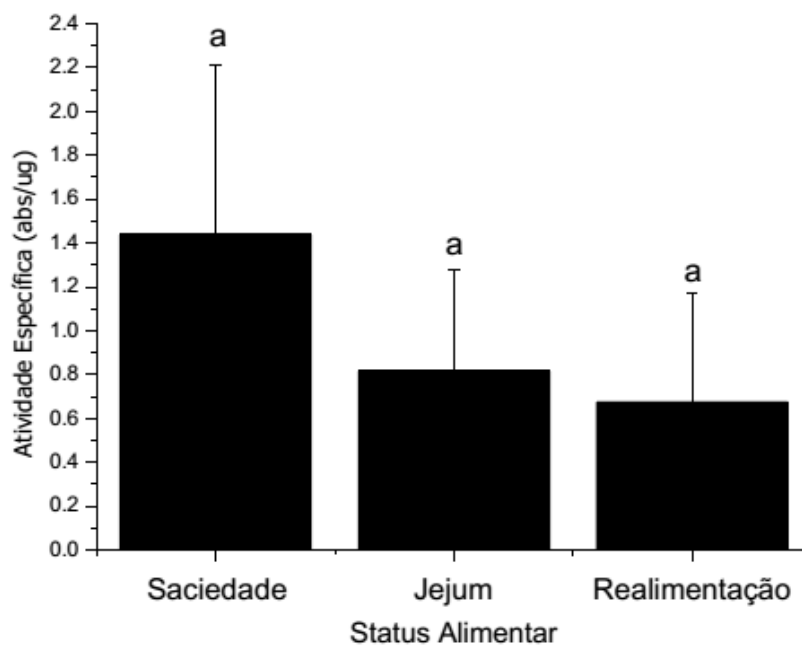


Figura 6 - Efeito do status alimentar na atividade da tripsina do peixe-zebra. Após aclimatação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,211).



5.2 PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DO PEIXE-ZEBRA

A precipitação com etanol foi capaz de purificar a enzima cerca de 37 vezes (fração 60-90%), apresentando melhor grau de purificação após precipitação com etanol (Tabela 2).

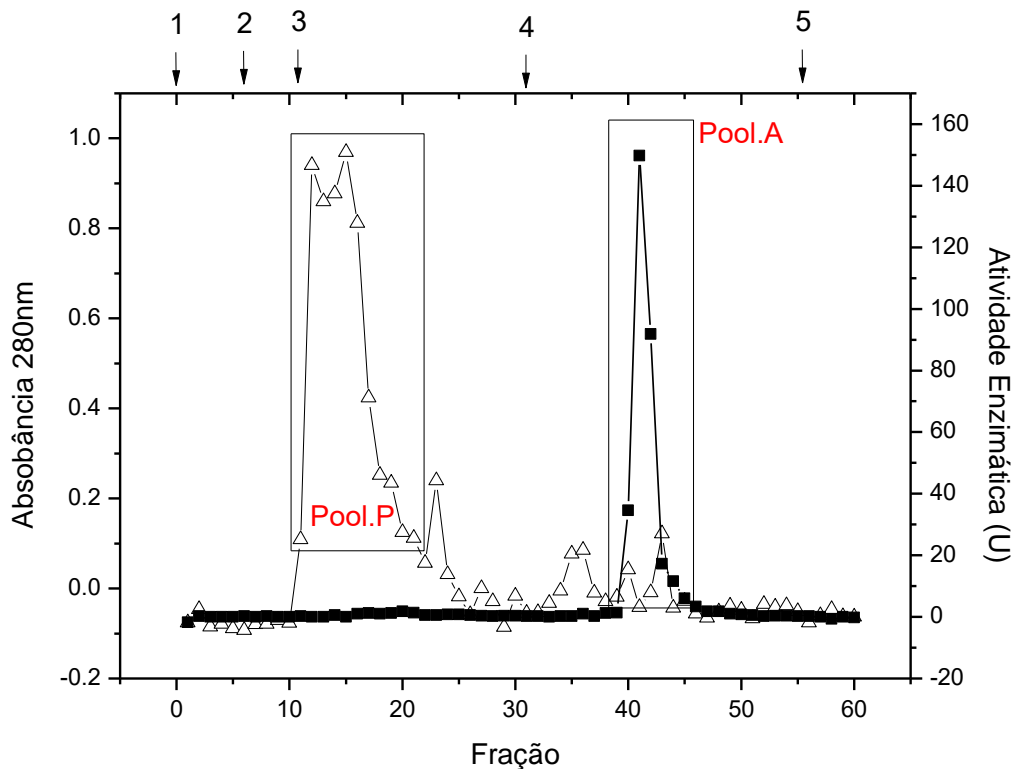
Tabela 2 - Purificação da tripsina do peixe-zebra por precipitação com etanol seguida de cromatografia de afinidade.

Frações	Proteína Calculada (mg/ml)	Atividade(U/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (Vezes)	Volume (mL)	Atividade Total (U)	Rendimento (%)
EB	0,512	1,200	0,117	1,0	68	81,60	100,000
0-30%	0,058	0,100	0,086	0,7	15	1,50	1,838
30-60%	0,098	0,267	0,136	1,2	15	4,01	4,908
60-90%	0,326	3,493	0,535	4,6	15	52,40	64,210
SF	0,027	0,007	0,013	0,1	412	2,88	3,534
Pool a	0,036	0,135	3,750	32,0	37	5,00	6,121
Pool p	0,598	0,003	0,005	0,0	30	0,09	0,110

Legenda: EB: Extrato Bruto; Pool a: Pool do pico que apresentou atividade frente ao BApNA; Pool p: Pool do que apresentou alta concentração de proteínas com baixa atividade; e SF: Sobrenadante Final

A fração 60-90% após a cromatografia de afinidade obteve uma atividade específica de 3,75 U/mg de proteína com um rendimento de 6,1%. No cromatograma foram observados dois picos: o primeiro pico (Pool p), que foi observado após a lavagem da enzima com tampão 0,1M Tris-HCl pH 8,0, possui alta concentração de proteínas, porém uma baixa atividade enzimática, enquanto o segundo pico (Pool a), observado após a eluição da tripsina da coluna com o tampão 0,5M KCl-HCl pH 2,0, mostra uma baixa concentração de proteínas, mas uma alta atividade enzimática (Figura 7).

Figura 7 – Cromatograma da fração 60-90% após cromatografia de afinidade em resina de benzamidina-sephadex. A linha preta indica o perfil de eluição de proteínas da coluna, enquanto que a linha azul indica o nível da atividade enzimática em cada fração.



Legenda: Pool a: Pool do pico que apresentou atividade frente ao BApNA; Pool p: Pool do que apresentou alta concentração de proteínas com baixa atividade.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPSINA

Foi observado um aumento da atividade enzimática de acordo com o aumento da temperatura até atingir 50°C, que correspondeu a sua temperatura ótima, seguida do decréscimo da atividade ao atingir temperaturas superiores como mostra a Figura 8. A enzima perdeu completamente sua atividade em temperaturas acima de 65°C. A determinação da temperatura ótima é um importante por determinar a temperatura na qual a enzima terá alta atividade. Outros autores reportam resultados semelhantes de temperatura ótima para a tripsina (BEZERRA; BEZERRA; JR, 2001; FREITAS et al., 2012b; MARCUSCHI et al., 2010). A determinação da estabilidade térmica é outro experimento de importância para a aplicação da tripsina em ensaios e processos bioquímicos. Neste experimento a enzima é pré-incubada em temperaturas teste e a atividade residual da tripsina é calculada, revelando qual a

faixa de temperatura na qual a enzima atua sem perda significativa da sua atividade e em qual faixa a enzima começa a desnaturar. A tripsina do peixe-zebra mostrou um comportamento bastante interessante: foi estável por 60min em temperaturas de 25 a 50°C, o que demonstra uma termoestabilidade considerável para uma protease (Figura 9). A incubação em temperaturas superiores a 50°C, no entanto, causou uma perda rápida da atividade enzimática. Este comportamento de desnaturação é um fenômeno conhecido e esperado de catalisadores de origem proteica. Por exemplo, a tripsina purificada da *Salaria basilisca* mostrou alta atividade enzimática em faixas de temperaturas entre 30 e 70°C com temperatura ótima de 60°C, mantendo 100% de sua estabilidade durante 60 minutos a temperaturas abaixo de 40 °C (BOUGATEF, 2013b; KTARI et al., 2012b). Já a tripsina purificada do Pirarucu (*Arapaima gigas*) mostrou estabilidade em faixas de temperatura entre 25 ° e 55°C perdendo apenas 10% de sua atividade a 60°C e apresentou atividade máxima na temperatura de 65°C (FREITAS et al., 2012).

Figura 8 - Atividade da tripsina em função da temperatura de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA ($p=0,04$).

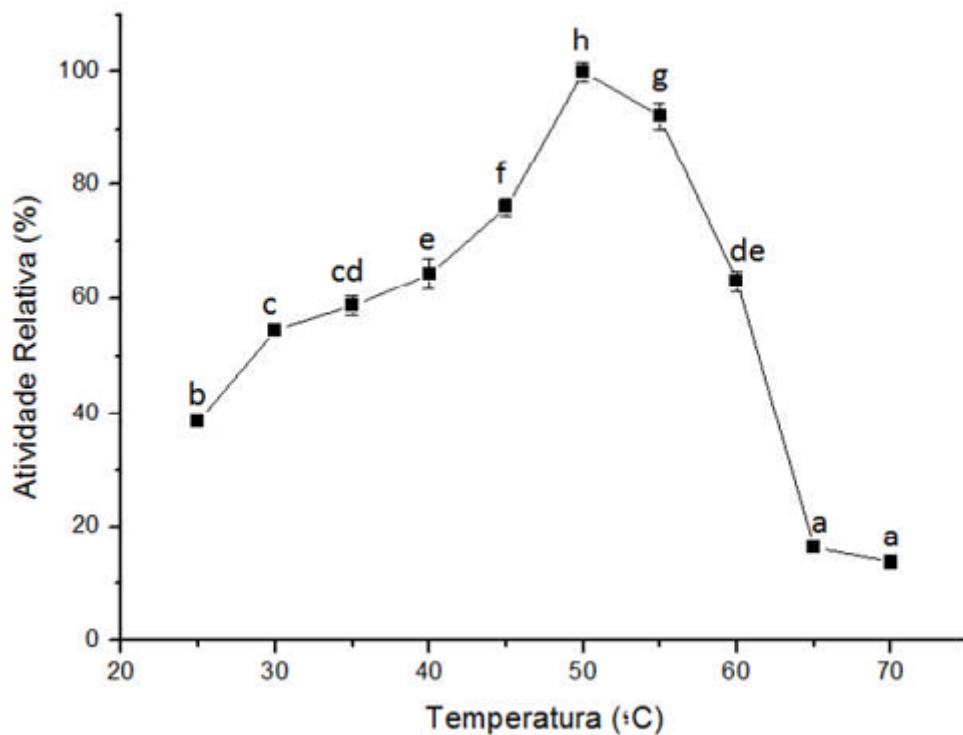
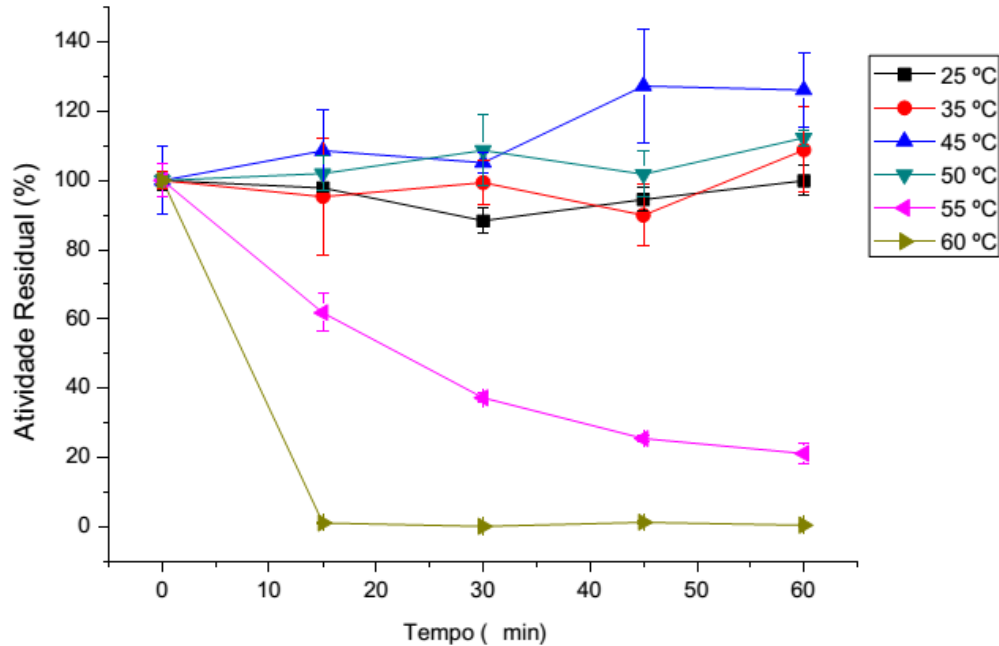
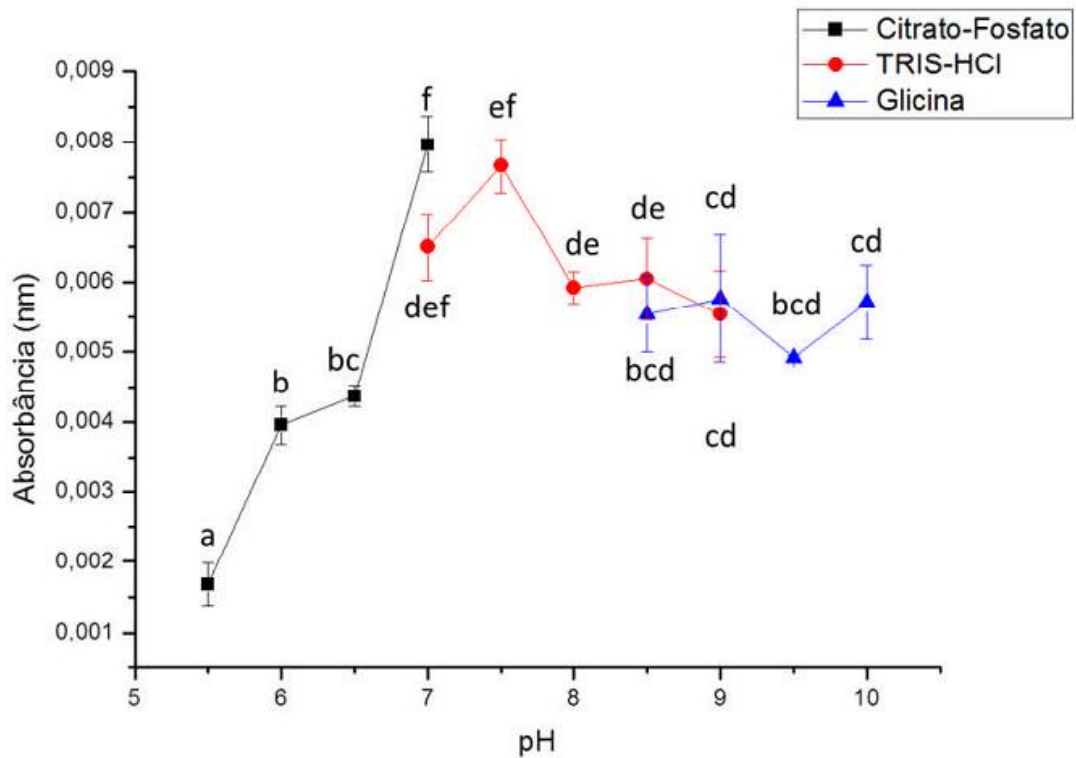


Figura 9 - Estabilidade da tripsina em função da temperatura de pré-incubação.



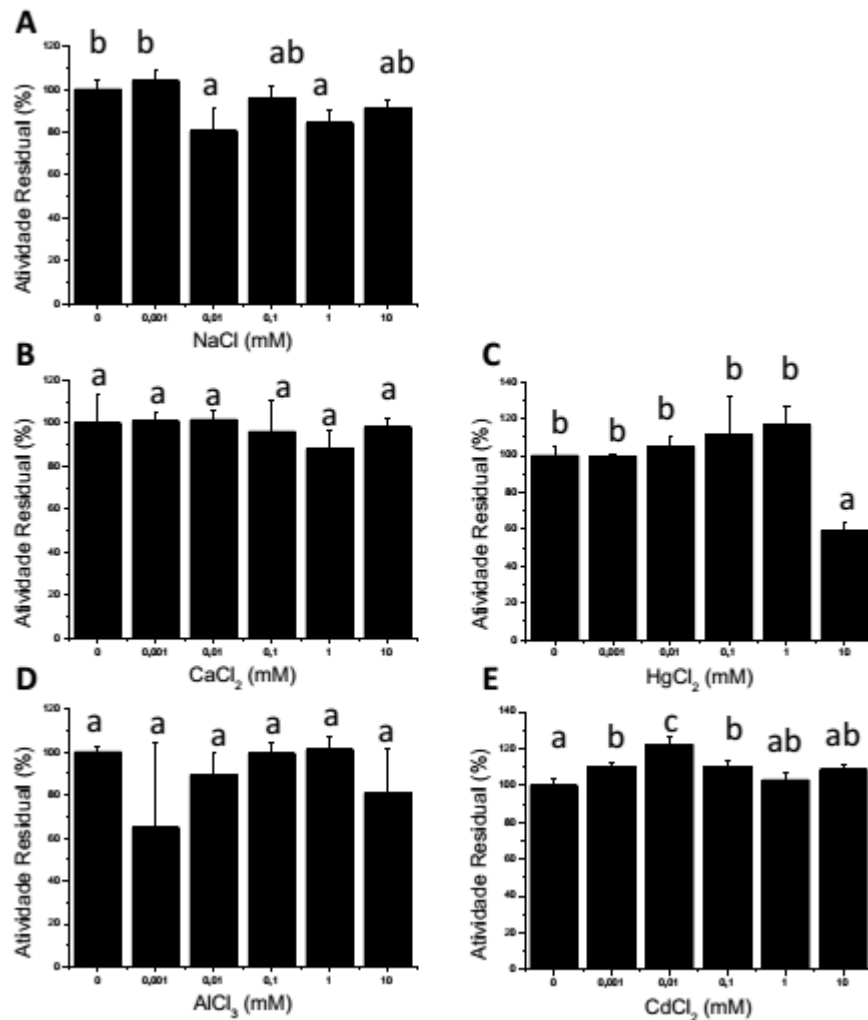
A tripsina do peixe-zebra teve maior atividade em pH 7,0 no tampão citrato-fosfato e pH 7,5 no tampão Tris-HCl (Figura 10). A atividade em pH 8-10, no entanto foi bastante considerável. Esta tripsina mostrou um comportamento esperado ao perder sua atividade em pH abaixo de 6,0 (Figura 10). Como revisado por Bougateg (2013), tripsinas são capazes de atuar em uma ampla faixa de pH alcalino, sendo algumas tripsinas ativas em uma faixa estreita de pH. Por exemplo, a tripsina purificada do tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentou alta atividade em pH na faixa entre 8,0 e 9,5, com maior atividade no pH 9,0 (MARCUSCHI et al., 2010). A tripsina do peixe-zebra, apesar de ter mostrado pH ótimo entre 7 e 7,5, mostrou alta atividade em pH entre 8 e 10. Este é um importante parâmetro de reação enzimática e um determinante da aplicação de enzimas na indústria. Um exemplo é o uso de enzimas proteolíticas em preparações de sabão em pó. Para este uso as enzimas precisam ter estabilidade térmica (para lavagens a temperaturas maiores do que 30°C) e alta atividade em pH alcalino (condição criada pelos componentes presentes no sabão em pó).

Figura 10 - Atividade da tripsina do peixe-zebra em função do pH no meio de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey ($p < 0,001$).



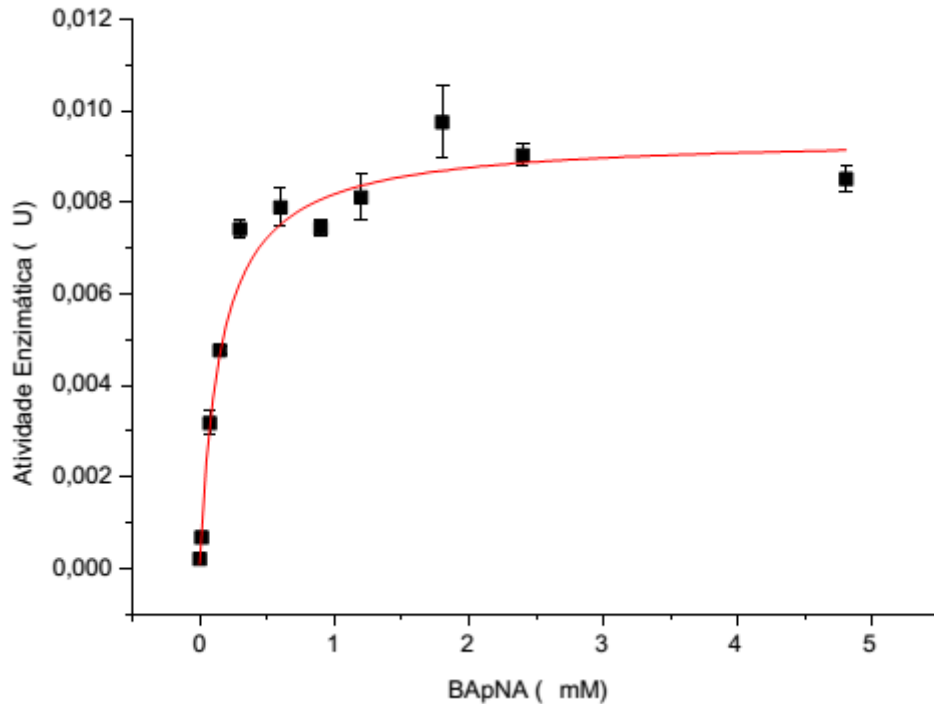
O mercúrio foi o único íon capaz de inibir a tripsina do peixe-zebra (Figura 11). Íons de sódio (controle), cálcio, alumínio e cádmio não foram capazes de modular a atividade da tripsina do peixe-zebra. A independência da atividade da tripsina de peixes frente ao íon cálcio é um fenômeno recorrente e contrário ao que é observado para tripsinas de mamíferos. Desta forma, a tripsina do peixe-zebra, por ter sua sequência do gene conhecida, pode ser um bom modelo para investigar o efeito do íon cálcio na atividade de tripsinas de peixe. Por outro lado, era esperado que a tripsina fosse susceptível aos íons de metais pesados como o cádmio ou outros íons como o alumínio, um forte inibidor de tripsina de outros peixes como a tilápia-do-Nilo (BEZERRA et al., 2005).

Figura 11 - Efeito de íons na atividade da tripsina do peixe-zebra (A - NaCl, B - CaCl₂, C - HgCl₂, D - AlCl₃, e E - CdCl₂). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey.



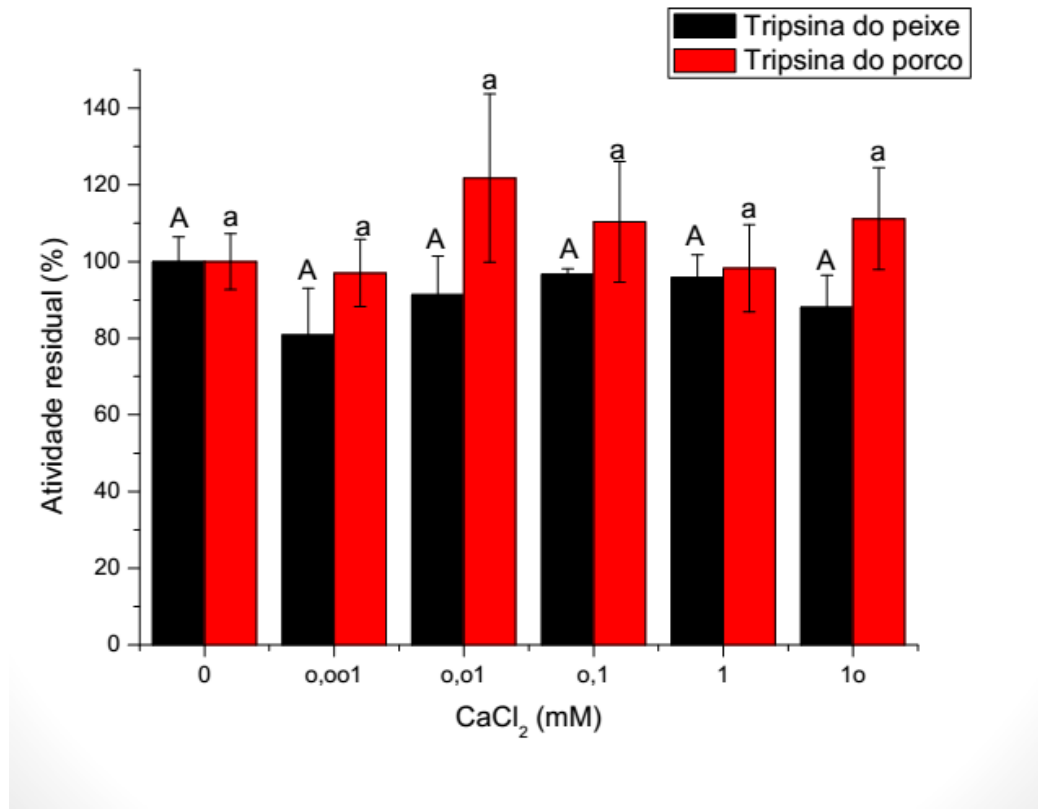
A tripsina do peixe-zebra mostrou uma alta afinidade pelo substrato específico BApNA (Figura 12), com K_m de 0,15mM. Este resultado corrobora o resultado da cromatografia de afinidade, na qual a tripsina do peixe-zebra foi eluída da coluna apenas com lavagem excessiva com tampão em pH 2,0. Em comparação com tripsina de outros peixes, a tripsina do peixe-zebra mostrou um K_m cerca de cinco vezes menor do que a da tripsina da Tilápia-do-Nilo (BEZERRA et al., 2005) e cerca de quatro vezes menor do que a da tripsina do pirarucu (FREITAS et al., 2012), ambos peixes tropicais de água doce, o que demonstra uma maior afinidade da tripsina do peixe-zebra pelo substrato sintético BApNA.

Figura 12 - Atividade da tripsina do peixe-zebra em função da concentração de substrato. A linha vermelha mostra a modelagem dos pontos experimentais segundo a equação de Michaelis-Mentem ($V_{\max} = 0,009U$, $K_m = 0,15mM$, $r^2 = 0,98$).



No ensaio de atividade na presença do cálcio em temperatura ambiente, nenhuma alteração da atividade foi observada tanto para tripsina do peixe-zebra purificada quanto para tripsina do porco nas diferentes concentrações de cloreto de cálcio (Figura 13). Este resultado corrobora resultados anteriores de tripsinas de peixes (FREITAS et al., 2012b; MARCUSCHI et al., 2010). Observou-se no ensaio de estabilidade térmica que o cálcio conferiu maior estabilidade térmica à tripsina do peixe-zebra, que manteve cerca de 90% de sua atividade a 55°C por uma hora e a 60°C sua atividade caiu para 20% (Figura 14). Por outro lado, a tripsina do porco mostrou maior dependência do cálcio. Na ausência de cálcio, a tripsina do porco perdeu 70% de sua atividade após uma hora de incubação. Enquanto que na presença do cálcio, a tripsina do porco manteve 70% de sua atividade a 60°C.

Figura 13 - Efeito do cálcio na atividade enzimática da tripsina a 25°C. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey.



Durante o experimento de autólise foi bem evidenciado a dependência da tripsina do porco pelo cálcio. Na ausência do cálcio, a tripsina suína perdeu cerca de 50% de sua atividade após 24h de incubação a 37°C, mantendo apenas 20% da atividade residual após 144 horas de incubação (Figura 15). Já na presença do cálcio foi observado que a tripsina do porco demonstrou maior resistência à autólise se comparado ao ensaio sem cálcio, mantendo cerca de 60% da sua atividade residual após 144 horas de incubação. A tripsina do peixe-zebra, por outro lado, manteve mais de 80% de sua atividade residual tanto na ausência quanto na presença de cálcio, podendo concluir que a tripsina do peixe-zebra é resistente à autólise, independente da presença de cálcio. Os experimentos com espectros de UV para complexos cálcio-tripsina demonstraram uma mudança conformacional do complexo tripsina-cálcio para uma estrutura mais compacta (SIPOS; MERKEL, 1970). Sipos e Merkel também sugeriram que a tripsina passa por duas transições distintas: a primeira consiste na formação do complexo cálcio-tripsina, que por sua vez hidrolisa componentes contaminantes inativos, garantindo proteção contra estes; a segunda transição está relacionada com a correlação entre o complexo cálcio-tripsina com o aumento da estabilidade térmica, o que promove maior

eficiência na reação enzimática. Estas observações explicam de forma clara o que foi observado experimentalmente neste projeto (maior estabilidade térmica na presença de cálcio). Marcuschi demonstrou em um estudo com a tripsina do Tambaqui que esta manteve-se ativa em temperaturas acima de 60°C na presença de 10mM de CaCl₂ (MARCUSCHI et al., 2010). Apesar destes achados, são escassos os trabalhos na literatura que exploram as diferenças de dependência da tripsina por cálcio entre tripsinas de diferentes fontes. Por exemplo, neste trabalho foi evidenciado que a tripsina do peixe-zebra, apesar de demonstrar melhora na estabilidade térmica na presença de cálcio, esta dependência foi consideravelmente menor quando comparada com a tripsina suína, o que provavelmente também afetou a estabilidade da tripsina frente à autólise.

Figura 14 – Efeito da temperatura na estabilidade da tripsina do peixe-zebra (A) e do porco (B) na ausência de calcio e na presença de 10mM de CaCl₂ (C e D). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey.

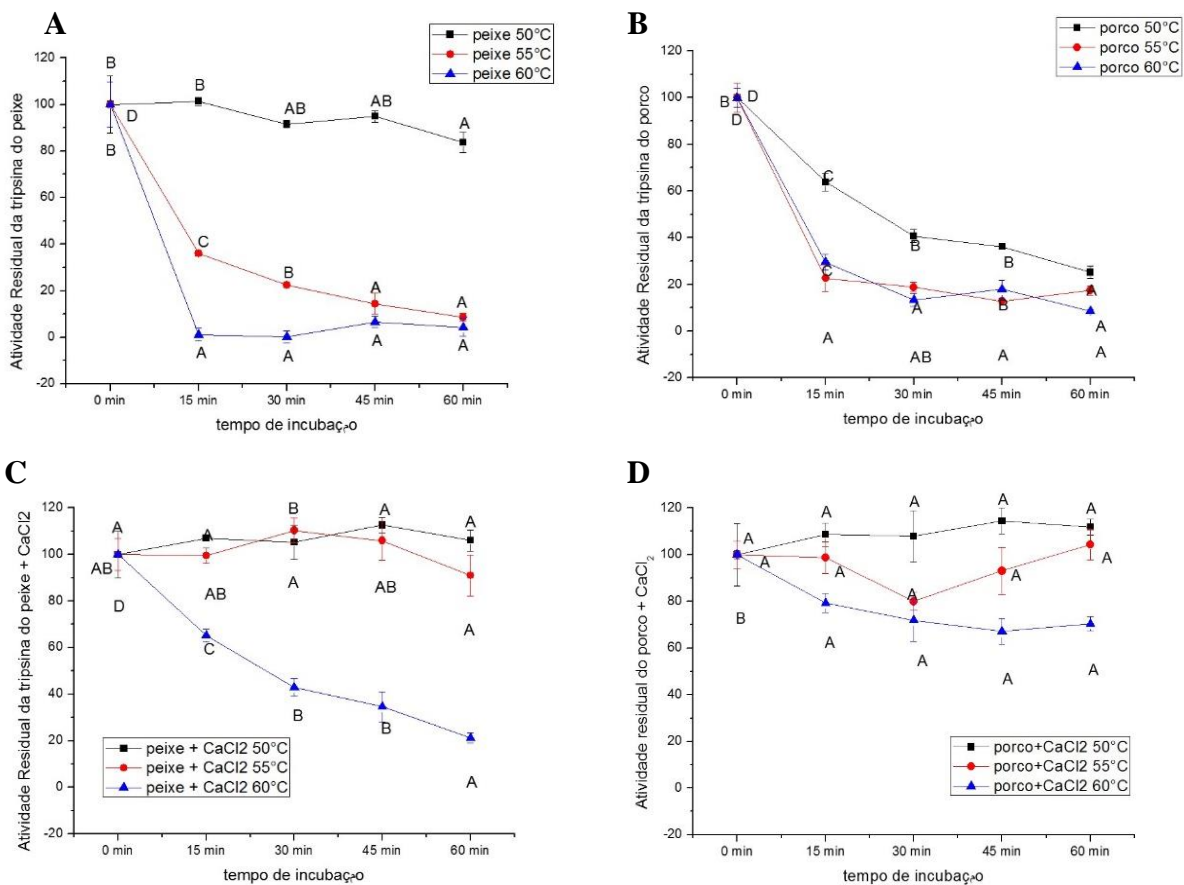
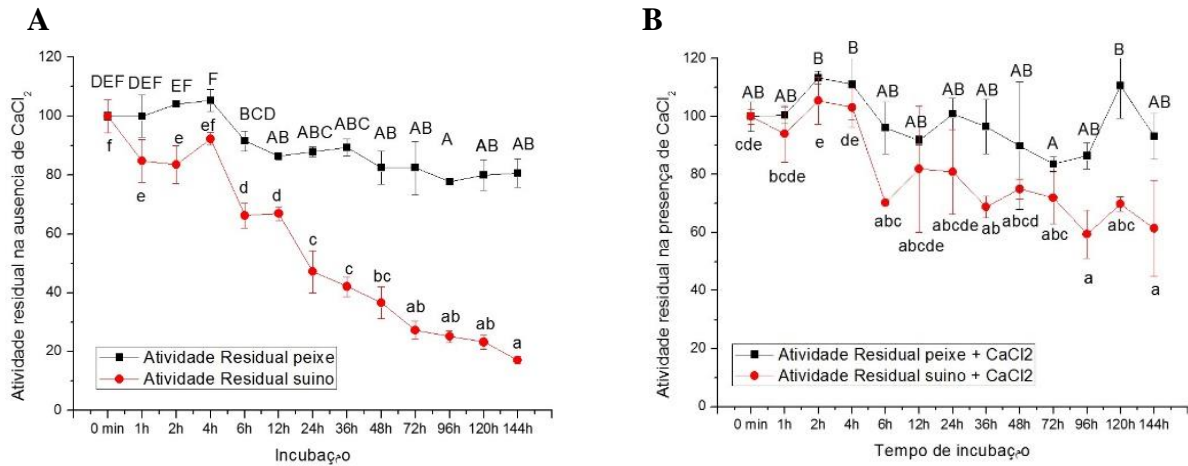


Figura 15 – Efeito do cálcio na autólise da tripsina do peixe zebra e do porco incubadas a 37°C na ausência (A) e na presença do cálcio (B). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey.



5.4 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Após a obtenção das sequências de aminoácidos, estas foram submetidas ao alinhamento ClustalW. Foi observado que a sequência da tripsina do peixe-zebra e a do porco possuem semelhança de cerca de 73,3%. A sequência da tripsina bovina (*Bos taurus*) e de outras espécies de peixes tais como a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a Carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) também foram alinhadas através de alinhamento múltiplo. A porcentagem de identidade entre estas tripsinas está descrita na Tabela 3. Foi observado que o sítio de ligação ao cálcio (Glu-Asn-Val-Glu-Glu) das tripsinas do peixe e do porco são totalmente conservados, bem como o sítio catalítico (His-Asp-Ser), o sítio de reconhecimento do substrato (Asp-Gly-Gly) e os 5 primeiros resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal (Ile-Val-Gly-Gly-Tyr). No alinhamento múltiplo também foi observada a conservação destes sítios (Figura 16). Foram observadas mudanças nos resíduos nas posições que correspondem aos sítios de autólise na tripsina do peixe-zebra (Figura 16). Pode ser observado nos quadrados em vermelho na Figura 18 na região onde há um resíduo de arginina na tripsina do porco, observamos um triptofano na tripsina do peixe-zebra. Ademais, enquanto foram observados resíduos K149 e K163 na

tripsina suína, foram observados os resíduos de serina e asparagina, nas respectivas posições. Na Figura 17 pode-se observar a sobreposição das estruturas tridimensionais da tripsina do porco (vermelho) e a do peixe (azul). Uma investigação mais detalhada acerca dos sítios de ligação ao cálcio na estrutura primária da tripsina do peixe-zebra comparada com a tripsina suína mostra que os resíduos nesta porção da enzima são totalmente conservados, isto demonstra que a termoestabilidade da enzima não está diretamente relacionada com mudanças em resíduos aminoácidos no seu sítio de ligação com o cálcio, mas com mudanças em outra região da enzima, afetando a conformação tridimensional da enzima.

Sítios de autólise em moléculas de tripsina representam porções da proteína que possuem resíduos de arginina ou lisina na região carboxi-terminal, possibilitando a ação de clivagem por outras tripsinas. Os principais resíduos que compõem sítios de autólise na tripsina em mamíferos são R117, K61, K154, K188 e K145, sendo R117 um dos principais sítios de autólise em mamíferos (Sipos e Merkel, 1970). Tripsinas de peixes, por sua vez, possuem um resíduo de triptofano na posição 117 (Y117) resultando em uma enzima mais resistente à autólise.

Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre as tripsinas da Tilápia-do-Nilo (Q6R671), do peixe-zebra (Q561Z7), bovina (Q29463), suína (C5I WV5), do Salmão do Atlântico (P35031) e da Carpa Comum (G3XL84).

	tr Q6R671 ...	tr Q561Z7 Q...	sp Q29463 ...	tr C5I WV5 C...	sp P35031 T...	tr G3XL84 G...
tr Q6R671 Q6R671_ORENI		78.543%	70.732%	72.358%	65.041%	65.854%
tr Q561Z7 Q561Z7_DANRE	78.543%		67.206%	72.874%	63.158%	64.777%
sp Q29463 TRY2_BOVIN N...	70.732%	67.206%		78.455%	62.195%	62.195%
tr C5I WV5 C5I WV5_PIG	72.358%	72.874%	78.455%		63.821%	65.041%
sp P35031 TRY1_SALSA	65.041%	63.158%	62.195%	63.821%		78.926%
tr G3XL84 G3XL84_CYPCA	65.854%	64.777%	62.195%	65.041%	78.926%	

Figura 16 - Alinhamento da sequência primária da tripsina do peixe-zebra (Q561Z7) e do porco (C51WV5). Os sítios das enzimas estão evidenciados com cores diferentes.

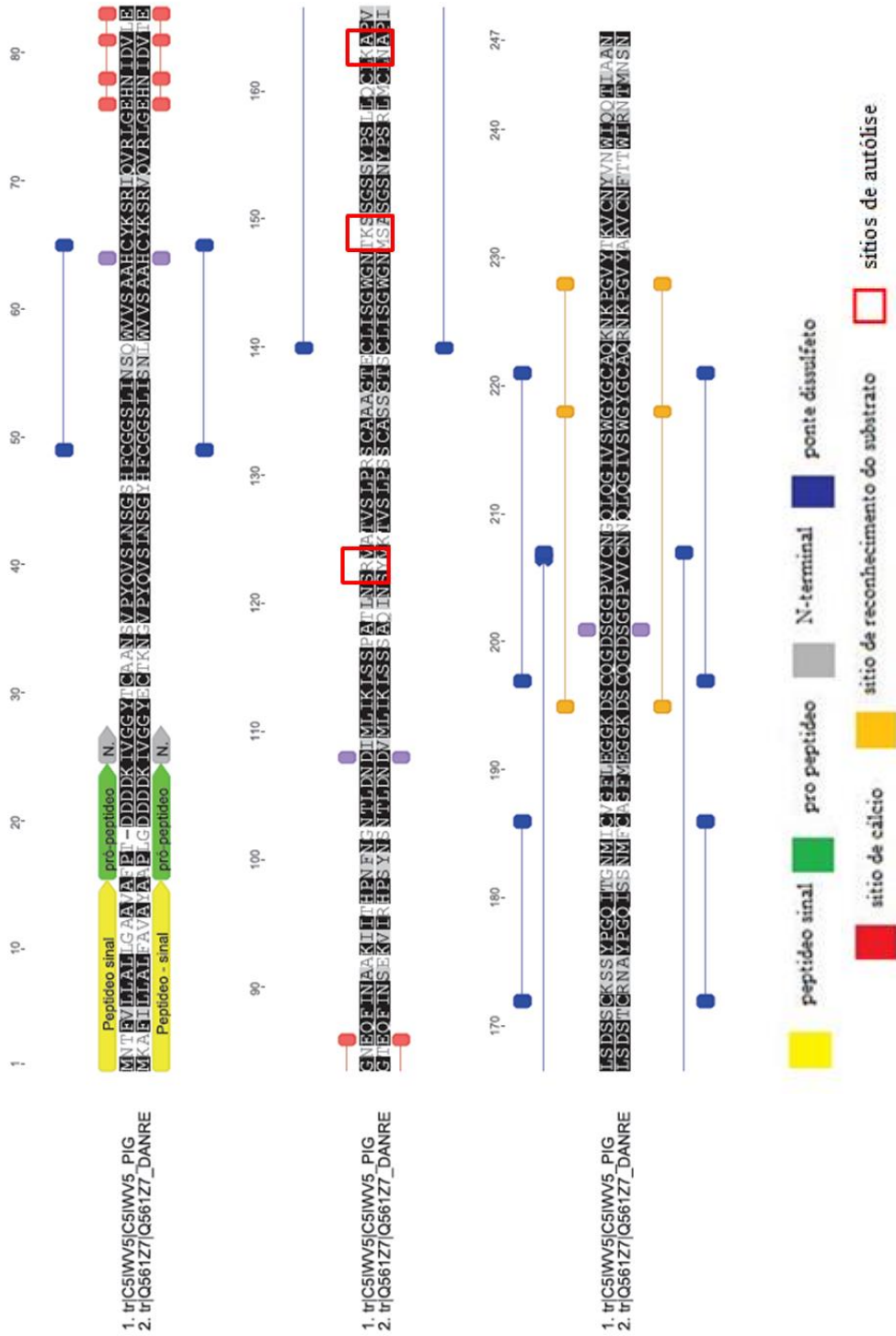
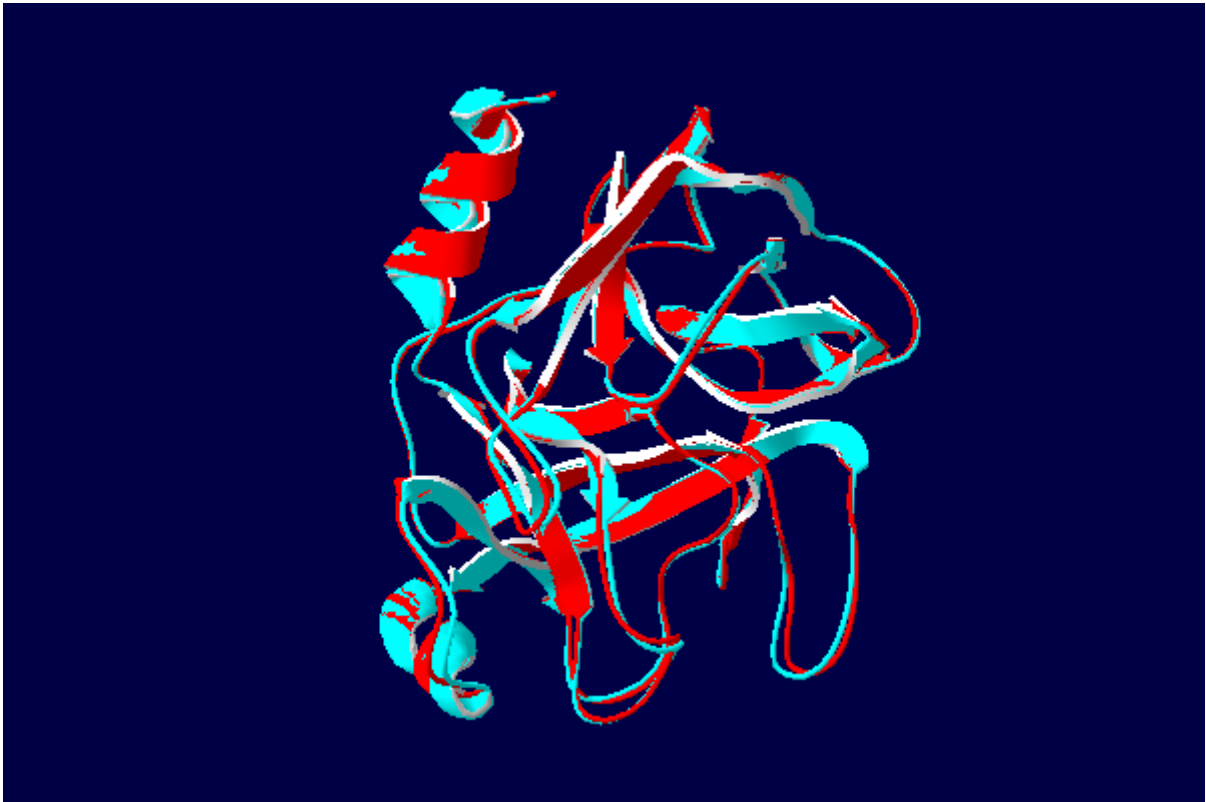


Figura 17: Modelagem e sobreposição da estrutura tridimensional da tripsina do peixe e do porco



6 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que o nível da atividade específica da tripsina não é afetado pelo status nutricional utilizando o protocolo empregado. A tripsina do peixe-zebra foi purificada cerca de trinta e duas vezes em relação ao extrato bruto e mostrou características físico-químicas interessantes como alta estabilidade térmica, pH ótimo na faixa alcalina, e resistência a metais como alumínio e cádmio. Foi visto também que a tripsina do peixe-zebra apresenta uma maior termoestabilidade dependente da presença de cálcio e alta resistência a autólise independente da presença de cálcio, mostrando menor dependência do cálcio quando comparada com a tripsina suína. Os sítios catalítico, de ligação ao substrato e de ligação ao cálcio apresentam-se conservados em tripsinas de peixe-zebra e de porco, porém são observadas mudanças em resíduos no sítio de autólise do peixe-zebra que podem ser responsáveis pela resistência á autólise da tripsina do peixe-zebra quando comparada à tripsina de mamíferos. Com base no que foi abordado a tripsina do peixe-zebra possui potencial tecnológico e comercial para ser empregadas em processos industriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHSAN, M. N.; WATABE, S. Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of japanese anchovy, *engraulis japonicus*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 49–58, 2001.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; KASSAVETI, A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 726–745, 2008.
- AS, C.; WALSH, B. Y. K. A.; NEURATH, H. striking similarity. n. 1958, p. 884–889, 1964.
- BANIK, R. M.; PRAKASH, M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological Research**, v. 159, n. 2, p. 135–140, 2004.
- BEZERRA, R. D. S.; BEZERRA, L.; JR, D. C. Proteases no trato digestivo de. **Ecologia**, 2001.
- BEZERRA, R. S. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829–1834, 2005.
- BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257–265, 2013a.
- BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257–265, 2013b.
- CANO-LOPEZ, A.; SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from atlantic cod. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 503–506, 1987.
- COHEN, T.; GERTLER, A.; BIRK, Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Physiology**, v. 69, n. 3, p. 639–646, 1981.
- DE CASTRO, R. J. S. et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199–207, 2015.
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.
- EPSTEIN, F. H.; EPSTEIN, J. A. A perspective on the value of aquatic models in biomedical research. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 230, n. 1, p. 1–7, 2005.
- FREITAS, A. C. V et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596–1602, 2012a.
- FREITAS, A. C. V et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596–1602, 2012b.
- GENICOT, S.; FELLER, G.; GERDAY, C. Trypsin From Antarctic Fish (*Paranotothenia megellanica* Forster) as Compared With Trout (*Salmo gairdneri*) Trypsin. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 90, n. 3, p. 601–9, 1988.
- GUDMUNDSDÓTTIR, Á.; HILMARSSON, H.; STEFANSSON, B. Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine. v. 2013, 2013.
- GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.
- HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity Serine Protease Mechanism and

- Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002.
- INSERM, U. et al. Patrick Gendry and Jean-Francois Launay. v. 955, p. 243–249, 1988.
- KANNO, G. et al. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 637–645, 2010.
- KHALED, H. BEN et al. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 123–133, 2011.
- KTARI, N. et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 467–474, 2012a.
- KTARI, N. et al. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 467–474, 2012b.
- LEIROS, H. K. S.; WILLASSEN, N. P.; SMALÅS, A. O. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins: Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 4, p. 1039–1049, 2000.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353–367, 2007.
- MARCUSCHI, M. et al. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 3, p. 667–673, 2010.
- PINSKY, S. D.; LAFORGE, K. S.; SCHEELE, G. Differential Regulation of Trypsinogen. v. 5, n. 10, p. 2669–2676, 1985.
- SCHLEGEL, A.; GUT, P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 12, p. 2249–2260, 2015.
- SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 544–552, 1977.
- SILA, A. et al. Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1287–1295, 2012.
- SIPOS, T.; MERKEL, J. R. An Effect of Calcium Ions on the Activity, Heat Stability, and Structure. **Biochemistry**, v. 9, n. 14, p. 2766–2775, 1970.
- SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.
- THELLMANN, P. et al. Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 21, p. 16405–16, 2015.
- TI, P.; ST, S. E. T.; DU, Q. N. T. E. R. M. I. N. A. L. E. Sheep trypsinogen has been prepared from sheep pancreas in an apparently. v. 75, 1969.
- TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006.