



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAR E CARACTERIZAR A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
NO INSETO *T. castaneum*.**

Maceió
2019

JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAR E CARACTERIZAR A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
NO INSETO *T. castaneum*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como parte do requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Orientador: Pr. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Co - orientador: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

N244i Nascimento, Josiel Santos do.

Identificar e caracterizar a enzima conversora de angiotensina no inseto *T. castaneum* / Josiel Santos do Nascimento. – 2019.

59 f. : il. color.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Coorientadora: Mariana da Silva Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 59-74.

1. Enzimas. 2. Angiotensina. 3. Inibidores enzimáticos. 4. *Tribolium castaneum*. 5. Serino proteases. I. Título.

CDU: 615.285

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas coisas maravilhosas em minha vida e, por sempre ter estendido as mãos nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, pela sua sabedoria e força de caráter, de quem desde a minha tenra infância tem ensinado – me a ser uma pessoa melhor todos dias

Ao professor Luciano Grillo por ter me dado a oportunidade de despertar para pesquisa, por seus conselhos, orientação, paciência e puxões de orelhas nos momentos oportunos, sempre visando o melhor caminho para gente seguir.

Ao professor Hugo por sua disponibilidade de tempo e coorientação

Aos doutores Elizabete e Humberto de quem obtive ajuda na compilação deste trabalho

Obrigado ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos – LBFI pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho e, também aos meus amigos novos e de longa jornada, que fazem parte deste ambiente de realização de sonhos e conhecimento.

Obrigado ao Laboratório de Metabolismo e Proteômica – LAMP, por também ter disponibilizado ferramentas no desenvolvimento deste trabalho e, pelo acolhimento das pessoas maravilhosas que compõem o seu quadro de trabalho.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Morfologia básica dos besouros Coleópteros 15
- Figura 2** - Estágio de desenvolvimento do *T. castaneum*: ovo, larva, pupa e adulto 17
- Figura 3**- Esquema clássico do sistema renina angiotensina aldosterona intravascular 19
- Figura 4**– Representação da visão atual da cascata do sistema renina angiotensina. As vias metabólicas representadas mostra a produção dos principais produtos e a relação entre as elas. 22
- Figura 5** – Notação para sítios de clivagem de proteases. 28
- Figura 6** – Cromatograma obtido de filtração em gel do extrato bruto do inseto *T. castaneum*. 34
- Figura 7** – Cromatograma obtido por HPLC para os produtos gerados via hidrólise de Ang I após a incubação com extrato proteico bruto e frações obtidas por filtração em gel. 34
- Figura 8** - Cromatografia obtido através de HPLC mostrando os produtos formados pela hidrólise de Ang II com extrato proteico do inseto *T. castaneum*. 37
- Figura 9** - Cromatograma obtido por HPLC para os produtos gerados via hidrólise de Ang I por extrato proteico bruto do inseto *T. castaneum* e inibidores. 38
- Figura 10** - Cromatograma obtido por HPLC para os produtos gerados via hidrólise de Ang I por extrato proteico bruto do inseto *T. castaneum* e inibidores. 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Carboxipeptidase tipo A
APA - Aminopeptidase tipo A
APN - Aminopeptidase tipo N
APD - Aminopeptidase tipo D
AT – Receptor de angiotensina
BmSP36 - gene que codifica uma serina prótese em *B. mori*
CAGE – Enzima Geradora de Ang II Sensível a Quimostatina
CYP – Citocromo P
DAG - 1,2 Diacilglicerol
DPPi – Dipeptidio peptidase
DTT - Ditioneitol
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra – Acético
ECA – Enzima conversora de angiotensina
HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina
IL – β – Interleucina beta
IP3 – 1,4,5 – Trifosfato de inositol
IRAP – Aminopeptidase Regulado por Insulina
IL – β – Interleucina beta
JH - Homônimo juvenis
MMPs – Matrix Metaloproteinases
NEP – Neprilisina ou Neutral Endopeptidase
P1 – Resíduo de aminoácido na posição 1
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PLC - Fosfolipase C
PCP - Prolil carboxipeptidase
PKC – Proteína cinase C
PMSF – Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil
POP – Prolil Oligopeptidase

PPRs – Receptores de reconhecimento padrão

PRCP – Prolilcarboxiendopeptidase

RAPG – Receptores Acoplado a Proteína G

SRA – Sistema Renina Angiotensina

TFA – Ácido Trifluoracético

TGF- β – do inglês *Transforming Growth Factor Beta*

THOP – Thimete Oligopeptidase

RESUMO

Os coleópteros popularmente conhecidos como besouros, constituem uma ordem de insetos bastante diversificada e com espécies ocupando todos os nichos ecológicos. A maioria desses insetos alimenta-se de tecidos vegetais e por esta razão consistem de relevantes pragas de grãos e derivados de produtos agrícolas, no ato do armazenamento. Neste contexto temos o *Tribolium castaneum* que é uma importante praga de armazenamento. As quimotripsina - similar do tipo serino proteases é uma relevante classe de enzimas proteolíticas presentes em vários sistemas biológicos dos vertebrados e invertebrados. Em insetos esta família de enzima é um componente chave em diversas vias metabólicas incluindo digestão, defesa e desenvolvimento. Quimase e elastase – 2 são quimotripsina – similar que pertencem a classe das serino proteases e são responsáveis por diversos processos fisiopatológicos em mamíferos, estas enzimas convertem Ang I em Ang II, formando assim, um peptídeo regulador da pressão sanguínea e homeostase de eletrólitos em mamíferos. Este estudo tem como objetivo identificar e caracterizar uma enzima processadora de angiotensina no inseto *T. castaneum*. O fracionamento do extrato proteico em gel filtração (S – 100 sephacril) produziu três frações (fração 13, 14 e 15) com atividade de conversão de angiotensina, convertendo Ang I em Ang II. O gel em SDS – PAGE a 10 % revelou duas bandas semi – purificadas na fração 13 e 15. A fração 15 e o extrato bruto também demonstrou capacidade de produzir Ang (1 – 7) via Ang I revelando supostamente a presença de endopeptidase como neprilisina e timote oligopeptidase na fisiologia do inseto. No ensaio de inibição no extrato bruto a enzima não foi inibida por captopril um inibidor específico da ECA e nem por EDTA indicando que a enzima não é uma ECA clássica. No entanto, demonstrou sensibilidade inibitória ao PMSF, caracterizando a enzima como uma serino protease do tipo quimase ou elastase 2 presente em mamíferos, pela atividade processadora de angiotensina *in vitro* e pelo perfil de inibição.

Palavras chaves: *Tribolium castaneum*, caracterização, serino proteases

ABSTRACT

Coleoptera, which are popularly known as beetles, constitute a reasonably diverse insect order with species occupying all the ecological niches. Most insects feed on plant tissues and for this reason, consist of important grain pests and derivatives of agricultural products in the act of storage. In this context, we have the *Tribolium castaneum*, which is an important pest of storage. Chymotrypsin-like serine proteases are a relevant class of proteolytic enzymes present in various biological systems, vertebrates, and invertebrates. In insects, this enzyme family is a crucial component in different metabolic pathways including digestion, defense, and development. Chymase and elastase - 2 are chymotrypsin-like belong to the class of serine proteases and are responsible for several pathophysiological processes in mammals, these enzymes convert Ang I to Ang II, thereby forming a blood pressure regulating peptide and electrolyte homeostasis in mammals. This study aims to identify and characterize an angiotensin-converting enzyme in *T. castaneum*. Fractionation of the protein extract in gel filtration (S - 100 sephacril) produced three fractions (fractions 13, 14 and 15) with angiotensin converting activity, converting Ang I to Ang II. The 10% SDS-PAGE gel revealed two semi-purified bands in fractions 13 and 15. Fraction 15 and the crude extract also demonstrated the ability to produce Ang (1 - 7) via Ang I, allegedly revealing the presence of endopeptidase as neprilysin and timete oligopeptidase in the physiology of the insect. In the inhibition assay in the crude extract the enzyme was not inhibited by either ACE-specific inhibitor captopril or by EDTA indicating that the enzyme is not a classical ACE. However, it demonstrated an inhibitory sensitivity to PMSF, characterizing the enzyme as a serine protease of the chemosis or elastase 2 type present in mammals, by the angiotensin-converting activity in vitro and by the inhibition profile.

Keywords: *Tribolium castaneum*, characterization, serine proteases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Insetos como Modelo experimental	12
2.2 Ordem Coleóptera	14
2.3 O inseto: <i>Tribolium castaneum</i>	16
2.4 Sistema Renina – Angiotensina (SRA)	18
2.6 Quimotripsina - similar: Quimase e Elastase 2	24
2.7 Serino proteases de insetos	26
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Insetos	32
4.2 Preparo do extrato bruto	32
4.3 Determinação da concentração de proteínas	32
4.4 Ensaio enzimático de atividade conversora de angiotensina	32
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	33
4.6 Purificação Protéica	33
4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	33
4.8 Ensaio Enzimático de Inibição	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A necessidade crescente de gêneros para abastecer a demanda mundial de alimentos, visando o aumento populacional, requer que os grãos ou sementes colhidas nas lavouras sejam preservados com o mínimo de perdas até o consumidor final. Dentre os agentes responsáveis pelas perdas da qualidade e quantidade dos grãos e sementes armazenadas no pós – colheita, destaca – se a presença de insetos pragas (LORINE et al, 2015).

A ordem Coleoptera possui um vasto número de espécies dentro do reino animal, com cerca de 400. 000 indivíduos descritos, e adaptou – se a todos os nichos ecológicos dentro do ecossistema (ENGEL, 2005; HUNT et al, 2007; CHAPMAN, 2009). Os coleópteros são popularmente conhecidos como besouros e, em sua maioria, são fitófagos. Já que alimentam – se exclusivamente de tecido vegetal e, em vista disso, são bastante conhecidos como pragas de culturas, causando grande danos financeiros aos produtores (RAFAEL et al., 2012). Além disso, cerca de mais de 500 insetos da ordem Coleoptera são referidos como pragas de produto armazenados, em diversas partes do mundo. Destacado– se o *Tribolium castaneum* que é descrito como uma importante praga de armazenamento.

O *T. castaneum* (Coleóptero: Tenebrionidae) conhecido como besouro vermelho da farinha é identificado como o inseto mais destrutivo de grãos e seus derivados alimentícios, em instalações de armazenamento, conhecido no mundo (DOWDY, 1999; TILLEY et al, 2007). Medindo de 3 a 4 mm de comprimento; o corpo e achatado e possui duas cavidades transversais presente na cabeça (ELIAS et al, 2008), sendo considerado como praga secundária de produtos armazenados, principalmente cereais (FARONI e SOUZA, 2006). Além do mais, o genoma *T. castaneum* do já foi sequenciado e depositado em banco de dados o que facilita o seu uso como organismo modelo em estudos de desenvolvimentos de insetos, evolução, genômica comparativa e ciência de pragas (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008).

A evolução de meios de controle biorracionalis (meios de controle baseados na biologia dos insetos) está em obter um melhor entendimento do sistema fisiológicos dos insetos, já que determinadas vias enzimáticas são importantes para a sobrevivência dos mesmos (SILVA et al, 2012). Estudos bioquímicos tem evidenciados enzimas importante na digestão, defesa e desenvolvimento dos insetos,

tornado – as o foco para pesquisas de futuros alvos de controle biológicos. Uma das técnicas usadas para o controle de pragas atualmente, baseiam – se na inibição seletiva de enzimas envolvidas no processo digestivos dos insetos, ocasionando efeitos danosos no crescimento das larvas, por evitarem a digestão e absorção de nutrientes e, posteriormente morte (ALARCÓN et al., 2002). É conhecido que as plantas desenvolveram mecanismo de defesa contra insetos - pragas baseado na inibição de proteases (HICKS et al., 1997; VALUEVA e MOSOLOV, 2004).

Serino próteses são uma classe de enzimas distribuídas em diversos organismos, com papel crítico em vários processos bioquímicos e fisiológicos (JOANITTI et al., 2006). A família das quimotripsina - similar do tipo serino proteases é conhecida por hidrolisar ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano (SIMPSON e HAARD et al, 2013). Em insetos as enzimas do grupo das quimotripsina - similar pertencente as serino proteases regulam diversas vias essenciais que inclui desenvolvimentos, defesa e digestão (LAW et al., 1977; NEURATH, 1984; SRINIVASAN et al., 2006; BARILLAS-MURY, 2007; KANOST e GORMAN, 2008; CERENIUS et al., 2010; JIANG et al., 2010), demonstrando a importância das serinos proteases na sobrevivência dos insetos. A quimase e elastase 2 são quimotripsina - similar que pertence a classes das serino proteases presentes em maior concentração em tecidos inflamatórios de mamíferos (HEUTINCK et al, 2010; SANTOS et al, 2003). São quimase e elastase 2, assim como a enzima conversora de angiotensina (ECA) são capazes de produzir Ang II a partir de Ang I e, portanto, estas enzimas são uma relevante resposta de serino proteases na formação de Ang II independente da ECA na vasculatura arterial humana (RICHARD et al, 2001;). Em mamíferos Ang II através da ação dos receptores AT 1 e AT 2, pode regular diversos processos biológicos no ambiente celular (HURT et al, 2015).

Com o propósito de poder originar novas técnicas de controle com foco em mecanismos inibitórios de enzimas importantes para o desenvolvimento desse inseto, o objetivo deste trabalho é identificar purificar e caracterizar a enzima processadora de angiotensina no inseto *T. castaneum*, e com isso, fornecer mais informação sobre a biologia e fisiologia deste inseto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Insetos como Modelo experimental

Os insetos representam um dos grupos mais importantes do reino animal, seja pelo aspecto econômico, ou sob o aspecto médico (LEHANE, 1991). A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso dos artrópodes e compreende cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidos. É a classe que obteve maior sucesso evolutivo dentre as espécies eucarióticas. Um dos fatores que contribuíram para este sucesso foi o fato de manterem um ciclo de vida altamente especializado, onde adultos e larvas se desenvolvem, em sua grande maioria, com hábitos alimentares diferentes. Outro fator favorável para o sucesso adaptativo do grupo foi, sem dúvida, a presença de asas, que possibilitou a conquista dos mais diversos ambientes. Esta característica lhes permitiu uma maior eficiência na busca do alimento e defesa contra agressões, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977). Além disso, muitas espécies de insetos se reproduzem facilmente e apresentam um ciclo de vida curto, que pode ser acompanhado em todas as fases, possibilitando um bom modelo para o desenvolvimento de ensaios experimentais. Os insetos têm outra vantagem para estudos científicos em relação aos demais grupos, são pequenos e apresentam órgãos que podem ser facilmente manipulados. Eles também apresentam menor resistência a intervenções cirúrgicas, devido ao fato de não necessitarem sofrer incubação para irrigação com oxigênio; possuem um sistema nervoso menos complexo, dentre outras características. Os insetos constituem um grupo de escolha para diversos tipos de estudos dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

Pesquisas utilizando insetos como modelo forneceu evidências que podem ser aplicadas nos vertebrados. A compressão dos efeitos biológicos dos hormônios esteroides teve princípio com a descrição da ação da ecdisona, um hormônio esteroide de insetos, que estimulava a síntese *de novo* de RNA no núcleo das células (KARLSON, 1963). Estudos realizados em *Drosophila melanogaster* levaram ao estabelecimento de conceitos básicos de citogenética e biologia do desenvolvimento, como a demonstração da localização dos genes nos cromossomas (MURRAY; HUNT, 1993) e a descoberta dos genes “Homeobox”, responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais (AKAM, 1989).

Recentemente, com as contribuições de estudos envolvendo sequenciamentos e clonagem foi possível determinar a estrutura genética de receptores em invertebrados. A descoberta de receptores é de grande relevância na compreensão de mecanismos farmacológicos. Nos insetos, um grupo relevante de neurotransmissores e receptores de neuro – hormônios foram descobertos. Esses receptores são aminas biogênicas acopladas a proteína G (GPCRs), que são componente chave em muitas vias de sinalização ao longo do reino animal. Entretanto, estudos de natureza farmacológica são necessários para uma classificação prática dos mesmos (VLEUGELS et al., 2014).

Hormônios juvenis (JH) nos insetos são moléculas que regulam os mecanismos químicos relacionados aos processos fisiológicos no desenvolvimento pós-embrionário e reprodução no inseto adulto. Os estudos de receptores específicos nos insetos deram origem a análogos moleculares do JH, que tem como alvo o sistema endócrino do inseto e, que são utilizados para finalizar o ciclo de vida do inseto, mas sem efeito toxicológico em vertebrados (HAMOMMOCK et al, 2016).

Recentemente, alguns cientistas têm utilizado insetos como modelo hospedeiros para estudos de microrganismos patogênicos humanos em vez de mamíferos (TAN, 2002; KAVANAGH e REEVES, 2004; MYLONAKIS e ABALLAY, 2005). O sistema imune inato conservado dos insetos e mamíferos reconhece invasores externos, por mecanismos biológicos semelhantes e, usar cascatas de sinalização correspondente para ativar as principais respostas (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997; HOFFMANN et al., 1999; MEDZHITOV, 2001; HEINE e LIEN, 2003). A ativação do sistema imune nos insetos e mamíferos ocorre pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos distintos (PAMPs), que são substâncias microbianas essenciais conservadas, como lipopolissacarídeos de bactérias gram – negativas, peptidoglicano e ácidos teicóicos de bactérias gram – positivas, mananos de levedura, 1,3 – glucanos de fungos e CpG não metilado de bactérias (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997). Os sistemas imunes dos insetos e mamíferos dispõem de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) que identificam PAMPs e estabelece uma defesa imune adequada. Em algumas situações, os PPRs de mamíferos e insetos mostram semelhanças moleculares e funcionais (KHUSH & LEMAITRE, 2000; KIMBRELL e BEUTLER, 2001).

Em 1995, o primeiro homólogo da enzima conversora de angiotensina (ECA) de mamíferos foi caracterizado na mosca – das – frutas, *Drosophila melanogaster*. Logo, a enzima identificada mostrou 45 % de identidade de sequência com a enzima conversora de angiotensina testicular (ECA_t) humana e, desde então, tem sido empregada com êxito como modelo para estudar as ligações fundamentais de inibidores de ECA humana (CORNELL et al. 1995; TATEI et al. 1995).

2.2 Ordem Coleóptera

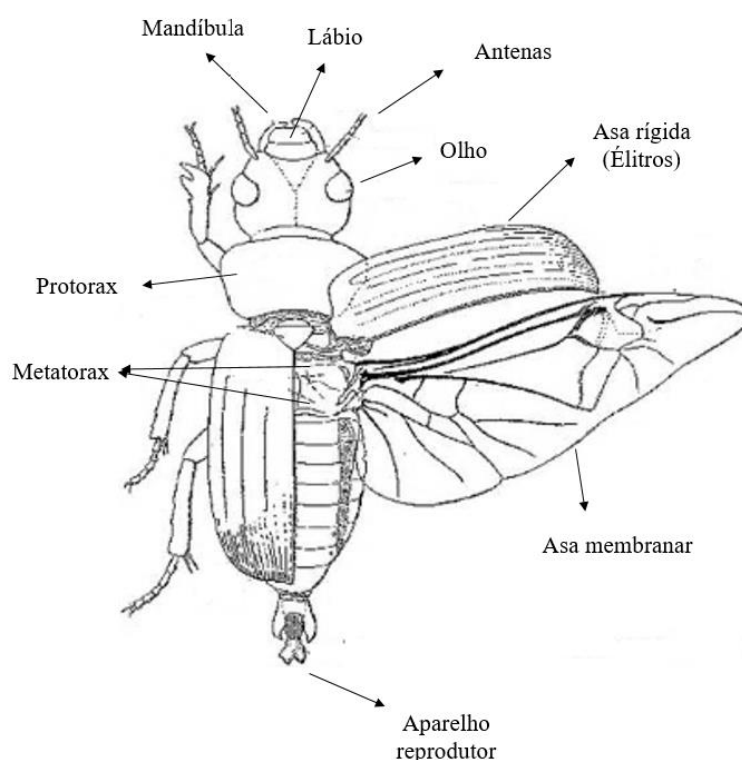
A ordem Coleóptera é a ordem metazoária mais diversificada em espécie conhecida no planeta. Com cerca de 400.000 espécies descobertas, os besouros representam por volta de 30% de todas as espécies animais descritos (GRIMALDI e ENGEL, 2005; HUNT et al, 2007; CHAPMAN, 2009). Devido essa grande variedade de indivíduos, os coleópteros mostram uma variedade de formas de vidas e comportamentos adaptados, habitando em todo os ambientes inclusive o marinho (FOOTIT e ADLER, 2009). Diferenciam-se das demais ordem pela presença das asas anteriores endurecidas, os élitros (Figura – 1). Estes, geralmente servem como capsula de proteção a um segundo par de asas membranosas, que se encontra sob os élitros, e são fundamentais para o voo. São em sua maioria insetos filófagos, que se alimenta quase unicamente de tecidos vegetal e, por isso, causam muitos danos ao setor agroeconômico (RAFAEL et al., 2012).

Além do ataque dos tecidos vegetativos pelos coleópteros, esses besouros podem ser vetores de microrganismos causadores de doenças. O *Rhynchophorus palmarum* é a principal praga que acomete a cultura do coco. Tanto as larvas quanto os insetos adultos alimentam-se de tecidos vegetais, fazem galerias no meristema apical da planta. Além disso, este coleóptero também é vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal da doença do anel vermelho, fatal para as palmáceas infectadas (NEGRISOLI-JÚNIOR et al., 2011). O coleóptero *Diabrotica speciosa* além de causar estragos pelo seu hábito alimentar, são também vetor de vírus e bactérias que acomete doenças em várias plantas (BOFF e GANDIN, 1992; OLIVEIRA et al., 1994; WALSH, 2003)

As perdas importantes na qualidade e quantidade de grãos por influência de pragas ocorrem, principalmente, nos produtos armazenados. Estima - se que 15% das perdas de grãos armazenados ocorrem por presença de insetos pragas (PIMENTEL et al, 2011). Dentre as principais pragas que infesta grãos, o gorgulho de farinha do

gênero *Palorus* ataca trigo, milho, óleo, farinha, arroz e vários produtos armazenados, propiciando grandes prejuízos em países em desenvolvimento (ZHANG et al., 1998; YANG et al., 2013a; DOUMBIA et al, 2014). Além disso, as fezes e urina desse inseto contaminam os produtos (YANG et al., 2013b; ATHANASSIOU et al., 2014), o que pode acarretar risco a saúde humana (ATHANASSIOU et al., 2014; WANG et al., 2014; VARADÍNOVA et al., 2015).

Figura 1 - Morfologia básica dos besouros Coleópteros



Fonte: adaptada de - <https://447409391434632225.weebly.com/biological-and-evolutionary-attributes-of-carrion-beetles.html> - acesso 23 de dezembro de 2018.

Uma praga importante que infesta grãos armazenados, o gorgulho *Sitophilus zeamais* causam perdas significativas a produção de commodities agrícolas, acarretando danos, sobretudo nas sementes de milho, arroz e trigo (GALLO et al, 2002). Araújo (2008) e colaboradores evidenciaram o difícil controle dessa praga, que relataram mudanças em enzimas metabólicas que favoreciam mecanismos de resistência a inseticidas comerciais.

A ordem coleóptera apresenta insetos com diferentes morfologia, tamanho, comportamentos, habitat e nichos alimentares. No entanto, a maioria destes insetos são fitófagos, dando a eles uma grande importância no segmento do agronegócio. Neste contexto temos o *Tribolium castaneum*, é uma relevante praga de produtos armazenados.

2.3 O inseto: *Tribolium castaneum*

O *Tribolium castaneum* é uma importante praga que ataca grãos armazenados, farinha, madeira em putrefação, produtos oriundos de cereais, entre outros, causando grandes perdas substanciais anualmente ao seguimento do setor de agronegócio (BROWN et al., 2009; PARK et al., 2008). Por isso, é considerado uma das pragas de grãos armazenados mais devastadora (CHEN et al., 2015).

Este besouro tem sido largamente estudado devido ao seu pequeno tempo de geração, facilidade de manejo, distribuição global e sua posição filogenética importante (DENELL, 2008; ZOU et al., 2007). Além disso, o *T. castaneum* foi o primeiro besouro em que o genoma foi totalmente sequenciado (RICHARDS et al., 2008).

O *T. castaneum* é popularmente conhecido como besouro vermelho da farinha e pertence a ordem Coleóptera e família Tenebrionidae. Os besouros adultos possuem coloração castanho avermelhadas. O inseto também é classificado como praga secundária, pois necessita que os grãos já estejam danificados, fragmentados ou perfurados por pragas primarias. A família Tenebrionidae possuem cerca de 1.700 gêneros e 1.800 espécies, destas, cerca de 100 espécies causam danos a produtos alimentícios armazenados e muitos destes indivíduos são pragas secundarias (LORINI et al, 2015).

A infestação por este inseto é evidenciada por um forte cheiro desagradável, marcante, de quinonas que são expelidas por glândulas de defesas (odoríficas), localizadas na região abdominal e torácica do inseto. As quinonas são substancias toxicas e pungentes (ATHIÉ e DE PAULA, 2002).

O ciclo de vida deste inseto é completo e, passa por várias mudanças metamorfosicas (holometábolo), com intervalo aproximado de 21 dias, com temperatura ótima de 35°C e umidade relativa de 75% (FARONI e SOUSA, 2006). A oviposição ocorre 2 ou 3 vezes durante o dia, sob sacarias, fendas ou alimentos, num

total de 400 a 500 ovos (VIEBRANTZ, 2014). Estes são pequenos medindo cerca de 0.3 a 0.6 mm de comprimento, de coloração branca recobertos por uma película viscosa e, com um período de incubação de 7 dias (BERNARDO QUÍMICA, 2006).

As larvas *T. castaneum* são cilíndricas, de cor branco – amareladas, medindo 7 mm, além de possuir mandíbulas pouco resistente e uma bifurcação no último segmento abdominal. As larvas passam por 6 a 8 instares antes de atingir a fase de pupa. O estágio de pupa deste inseto dura cerca de 7 dias (Figura 2). (GALLO et al, 2002). Já o inseto na fase adulta do *T. castaneum*, exibe uma coloração marrom – avermelhada, medem cerca de 3 – 4 mm, possuem corpo achatado e duas depressões transversais na região da cabeça (Figura 2) (ELIAS et al, 2008).

Figura 2 - Estágio de desenvolvimento do *T. castaneum*: ovo, larva, pupa e adulto.



Fonte: <https://www.grainscanada.gc.ca> – Acesso em 02 de dezembro 2018.

Esta espécie ataca de preferência grãos moídos e, adaptou-se bem a ambientes e alimentos excessivamente secos. Isto deve-se a uma estrutura morfológica altamente desenvolvida - os Túbulos de Malpighi - que é um sistema criptonefrial inserido no reto e que permitem reabsorção quase completa da água. Esta adaptação dos Túbulos de Malpighi possibilita uma ótima osmorregulação e sua alta resistências aos inseticidas convencionais. Experimentos evidenciaram a presença de genes duplicados em *T. castaneum*, principalmente, genes da subfamília CYP450, CYP6 e CYP9, e esta duplicação tem correlação com a resistência à inseticidas em dípteros (DABORN et al, 2005).

Além disso, os genes CYP6Z8 e juvenil hormônio esterase (CCEjhe1F) são responsáveis pela desintoxicação de piretróides e organofosforados no *Aedes aegypti* (POUPARDIN et al., 2008). A superexpressão de genes da subfamília do CYP6BQ9 e de outros CYPs esta relacionados à resistência deltametrina em *T. castaneum* (KALSI & PALLI, 2015).

As enzimas da classe das esterases (EC 3.1.1.1.) também são as principais isoenzimas envolvidas em mecanismo implícito de resistência a argonofosforado, carbamatos e piretróides; no *T. castaneum*, assim como na maioria dos insetos (HAUBRUGE et al., 2002; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2014).

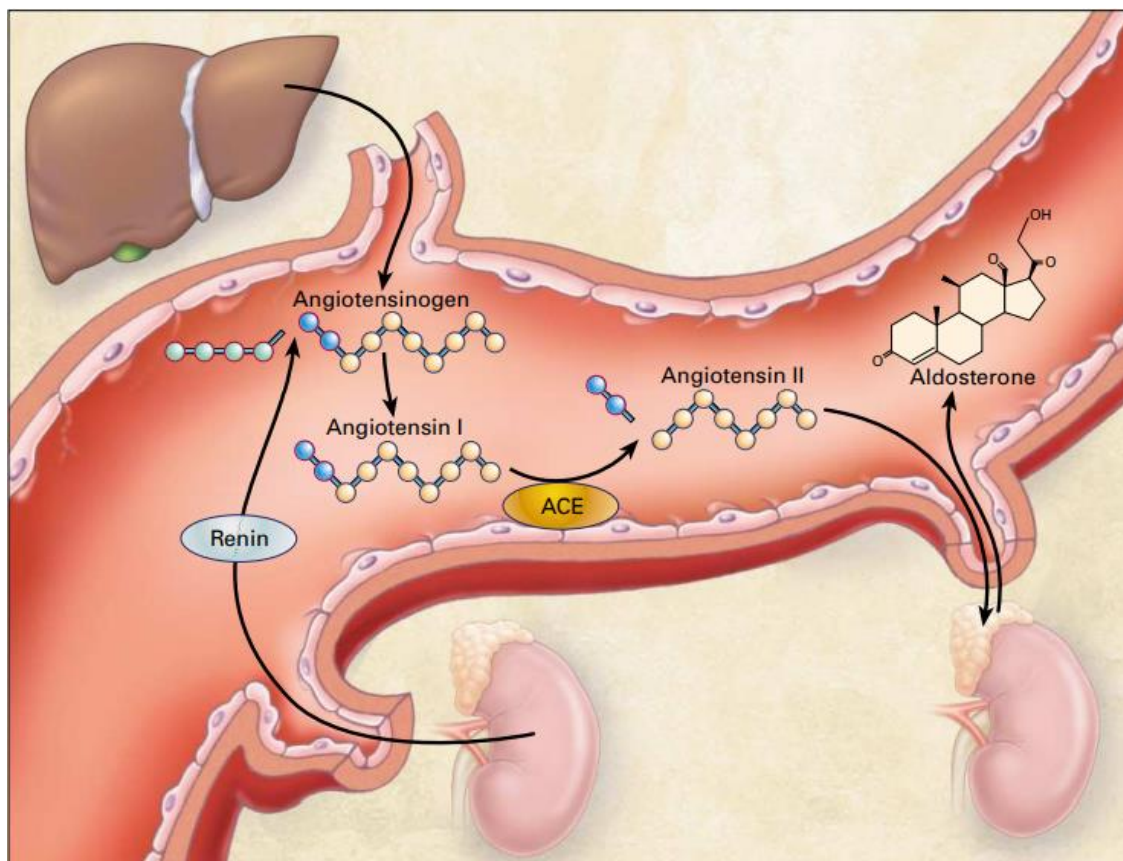
2.4 Sistema Renina – Angiotensina (SRA)

O sistema renina angiotensina (SRA) não é unicamente um sistema endócrino, mas também um sistema parácrino e intácrino (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008). Em mamíferos, o SRA intravascular é um componente indispensável no controle da homeostasia da pressão sanguínea e balanço hidrossalino. O SRA tecidual ou local está envolvido em fatores fisiológicos e processos patológicos, como crescimento celular, remodelação tecidual e evolução inflamatória (NGUYEN e CONTREPAS, 2008). Em um SRA clássico, a renina circulante de origem renal cliva o angiotensinogênio circulante de origem hepático, formando o decapeptídeo inativo, angiotensina I (Ang I) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) no plasma. A seguir, a ECA remove o dipeptídeo carboxterminal de Ang I, formando octapeptídeo Angiotensina II (Ang II) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Figura 3), o principal hormônio do SRA, que apresenta uma forte atividade vasoconstritora (GUANG et al., 2012). Ang II estimula a produção de aldosterona. A formação de aldosterona também é estimulada por potássio, corticotropina, catecolaminas e aldosterona (WEBER, 2001). Alguns tecidos possuem enzimas não - renina, como a tonina e catapsina G que podem clivar o angiotensinogênio em Ang I ou diretamente em Ang II (LAURENCE et al, 2010).

O angiotensinogênio é uma glicoproteína com uma cadeia polipeptídica formada por 452 aminoácidos e, sintetizada inicialmente na forma de pré – angiotensinogênio. A produção de angiotensinogênio é estimulada pela inflamação, insulina, estrogênio, glicocorticoides, hormônio tireoideano e Ang II. No decorrer do período de gestação a concentração de angiotensinogênio aumenta consideravelmente devido a uma maior quantidade de estrogênios circulante (BEM-

ARI e GARRISON, 1988). Já a renina é uma aspartil – protease sintetizada na forma de pré – pró – enzima de 406 resíduos de aminoácidos, que posteriormente é processada em pró – renina, uma forma madura, porém inativa, nas células justaglomerulares renais (GALEN et al, 1984).

Figura 3 – Esquema clássico do sistema renina angiotensina aldosterona intravascular.



Fonte - Modificado de Weber (2001)

A seguir, a pró – renina é clivada em renina ativa de 340 aminoácidos (SCHWEDA et al, 2007). A secreção de renina é ativada por mecanismo derivado da estimulação barorreceptor da arteríola aferente glomerular, ação dos nervos simpáticos e mudanças na concentração de NaCl detectada pela macula densa (HARISSO – BERNARD, 2009). Além controle sistêmico, experimentos evidenciam para uma regulação local dos processos envolvidos na liberação de renina. Na superfície vascular, os importantes componentes reguladores são as endotelinas, o óxido nítrico e as prostaglandinas (BOOR e FLOEGE, 2011; PHANISH et al, 2010)

Os efeitos biológicos de Ang II ocorrem por interação com receptores específicos na superfície celular. Os receptores de Ang II no sistema cardiovascular são divididos em dois principais subtipos: receptor tipo I (AT 1) e receptor 2 (AT 2).

Os receptores tipo 1 e tipo 2 (AT 1 e AT 2) são integrante da família de receptores acoplado à proteína G com sete regiões membranas. Os efeitos biológicos conhecidos da Ang II são mediados, principalmente por ação do receptor AT I (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008). E isto está em conformidade com sua relevância funcional, o gene do receptor AT 1 possuem um polimorfismo (A1166C), relacionado a hipertensão, vasoconstrição das artérias coronárias, rigidez da aorta e miocardiopatia hipertrófica. Já as funções do receptor AT 2 constituem em ações antiproliferativas, pro – apoptóticas e vasodilatadores (BRUNTON, 2010). O receptor AT II compartilha 34% de homologia de sequência de aminoácidos com o receptor AT I (GRADY, 1991). O receptor AT 2 é costumeiramente expresso durante o desenvolvimento fetal, diminuindo após o nascimento, no entanto, permanece em diversos órgãos incluindo coração, rins e vasculatura, onde, ativam diversos efeitos fisiológicos relevantes (CAREY & PADIA, 2013).

A ligação de Ang II com o receptor AT 1 dispara várias vias de sinalização moduladas pela proteínas G (RAPG) que estimula fofoslipase C (PLC), a fofoslipase C catalisa a formação de segundos mensageiros intracelulares importantes, o 1, 2 diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 – trifosfato de inotisol (IP3) (BERRIDGE, 1987). Por sua vez o IP3 liga – se a receptores específicos no retículo endoplasmático e libera cálcio intracelular e, conseqüentemente ativa proteínas contrateis na célula (ROGERS e LOKUTA, 1994). Já o DAG ativa a proteína cinase C (PKC) (RASMUSSEN et al, 1987).

A sinalização intracelular via receptor AT 2 não está totalmente elucidada e parece envolver mediadores químicos por via dependente e independente da proteína G (BERRY et al, 2001; HANSEN et al, 2000). Essa estimulação do receptor leva ao acréscimo da atividade de proteínas fosfatase e desforilação de proteínas. A regulação da via óxido nítrico e sistema GMPc, ativação da fofoslipase A2, liberação de ácido araquidônico e liberação de cerâmidas (HORIUCHI et al, 1999).

A formação de Ang II, através de outras enzimas, que não a ECA, tem sido descrita na comunidade científica como vias alternativas para formação de Ang II (Figura 4). Diversos trabalhos têm mostrados que essas vias alternativas seriam mais relevantes na formação de Ang II, a nível local, isto é, seriam mais importantes onde a Ang II mostra ações fisiopatológicas (RESENDE & MILL, 2002). Ang II pode ser formada por enzimas como quimase, catapsina G, enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina (CAGE) (GIBBONS, et al.,1994), Alastase II (PAULA et al., 1998).

Estudos *in vitro* evidenciam que 40% da Ang I é convertida em Ang II por vias independentes da ECA, e que, apenas com uso de inibidores da ECA não é suficiente para a total inibição do SRA, como estratégia terapêutica (PETRIE et al, 2001; HOLLENBERG et al., 1998).

Já está bem definido que Ang II é o principal efector final do SRA, mas atualmente foram descobertas outras angiotensinas com atividades biológicas importante no SRA. A Ang II pode ser clivado a peptídeos menores por ação de aminopeptidases. A aminopeptidase A converte Ang II em Ang III (Ang 2 – 8) pela clivagem de um resíduo de ácido aspártico na região N – terminal de Ang II (AHMAD e WARD, 1990; HEALY e SONG, 1999; KUGLER, 1982; SONG e HEALY, 1999; WOLF, 2005). Além disso, a ação complementar de Aminopeptidase N cliva Ang III formado outro peptídeo vasoativo Ang IV (3 – 8), esta enzima tem preferência por metabolizar resíduos básicos de argininas N – terminais de Ang III (KUGLER, 1982; PALMIERI et al, 1989) e, que interagem com a célula através da ação de receptores AT 1 e AT 2 (com efeito mais fraco). Entretanto, Ang IV pode ser gerado diretamente a parti Ang II pela atuação de Aminopeptidase D (CAT e TOUYZ, 2011). Ang IV transmite atividade biológica por influência de receptor de aminopeptidase regulada por insulina (IRAP) que libera NO (ALBISTON et al, 2001; KRAMAR et al, 1998). A aminopeptidase D está largamente distribuídas no rins, córtex e células da medula (ALBISTON et al 2011).

Os efeitos fisiológicos de Ang III são semelhantes aos de Ang II, embora menos potente. Vários estudos demostram que Ang III promove vasoconstrição e promove liberação de aldosterona (PADIA et al., 2008). Foi observado que pacientes voluntários quando tratados com Ang III ocorria um amento na pressão arterial, estimulação na produção de angina vasopressina e sensação de sede. Além disso, este peptídeo também estimula a expressão de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (WRIGHT et al, 2003; HARDING et al, 1992). Ang IV tem a capacidade de melhora o fluxo sanguíneo renal, provoca vasodilatação e tem capacidade cardioprotetora (Yang et al., 2010). Renal, provoca vasodilatação e tem capacidade cardioprotetora (Yang et al., 2010). Assim como, foi observado efeitos benéficos em modelos animais com comprometimento cognitivo (WISNIEWSKI et al, 1993; ALBISTON et al, 2004) e crises epiléptica (STRAGIER et al, 2006; TCHEKALAROVA et al, 2004). O mecanismo pelo qual Ang IV se liga ao receptor regulado por insulina (IRAP) e os seus efeitos fisiológicos permanece desconhecido (CAT e TOUYZ, 2011).

melhora o metabolismo por diminuir a resistência à insulina (GIANI et al, 2009; SANTOS et al, 2010).

A Angiotensina (1 – 9) pode ser gerada através de Ang I pela ação de ECA 2, que também acredita – se ter efeitos benéficos em patologias cardíacas (DONOGUE et al, 2000). Dados recentes indicam que Ang (1 – 9) preservam o coração e vasos sanguíneos de remodelação cardiovascular adversa em modelo animais de hipertensão ou insuficiência cardíaca (OCARANZA et al, 2006, 2010). Além disso, Ang (1 – 9) também promove a liberação de óxido nítrico (NO) e ácido araquidônico no endotélio, acarretando no aumento dos efeitos da bradicinina e, conseqüentemente, melhora a atividade vascular (JACKMAN et al, 2002). Os efeitos biológicos da Ang (1 – 9) são mediados via receptores AT 2 (OCARANZA et al, 2014; CHAN et al, 2013; FLORES – MUÑOS et al, 2011).

Mais recentemente, Ang (1 – 12) um novo peptídeo derivado do angiotensinogênio foi isolado de células intestinais de ratos (NAGATA et al, 2006). Esse peptídeo serve como substrato alternativo para produção de Ang I. Ang (1 – 12) tem efeito vasoconstritor por mecanismo dependente de quimase e ECA. Os efeitos fisiopatológicos vasculares de Ang (1 – 12) ainda são desconhecidos (BUJAK-GIZYCKA et al, 2010; CAT e TOUYZ, 2011)

Uma homóloga da ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), foi clonada e caracterizada por dois grupos de pesquisa autônomos, no ano 2000 (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). Mais recentemente, vários estudos indicaram que a ECA 2 regula negativamente a atividade do RAS pelo metabolismo da Ang II para a Ang (1 – 7), que se liga a receptores Mas, um receptor específico agregado à proteína G para Ang (1 – 7) e, contrabalança os efeitos cardiovascular da Ang II pela ação opostas a mediadas pelos receptores AT 1 (KUBA, et al., 2010). Desde então, ECA 2 e o eixo ECA 2/ Ang (1 – 7) / Mas são um importante ponto de interesse em estudos do SRA (FYHRQUIST E SAIJONMAA, 2008). A ECA 2 é uma glicoproteína integral membranar do tipo I, que contém 805 aminoácidos codificado a partir do exons 18 e compartilha 42 % de sequência idêntica às ECAs (TURNER e HOOPER, 2002). Além disso, a enzima é um componente da família M 2 de metaloprotease, mas com um único domínio catalítico que inclui um sítio de ligação ao zinco (HOOPER e TURNER, 2003). Essa enzima aparece em maior quantidade no endotélio vascular das coronárias e renais, no coração, na superfície da aorta e região do hipotálamo (SANTOS e FERREIRA, 2002).

Enzima conversora de angiotensina é uma glicoproteína monomérica, importante, no sistema renina – angiotensina responsável pela regulação da homeostase da pressão sanguínea e eletrólitos, encontrada na superfície de vários tecidos em mamíferos (CORNELL et al, 1995). A ECA possui uma molécula de zinco no seu centro catalítico essencial para atividade catalítica, que remove o dipeptídio C – terminal dos seus substratos peptídicos (CUSHMAN e CHEUNG 1971; DAS e SOFFER, 1975). A enzima processa angiotensina I para forma angiotensina II, um potente vasoconstritor, retirando o dipeptídio His – Leu C – terminal e, inativa as propriedades vasodilatadora de um segundo peptídeo, a bradicinina (SKEGGS et al, 1954; ZAMAN et al, 2002; ACHARYA et al, 2003; GONZALEZ-VILLALOBOS et al, 2013).

Em mamíferos existem duas isoforma de ECA, a somática (ECAs) e a (ECA_t). A ECAs é expressar em diversos tecidos, incluindo o endotélio vascular, a borda em escova do intestino, as células epiteliais dos tubos proximais do rim, na superfície de células endoteliais pulmonares, células cerebrais gliais, epitélio do trato genital masculino, e as células de Leydig (BALYASNIKOVA et al., 2002; HOOPER e TURNER, 2003; PARKIN e TURNER, 2004). É também largamente distribuída de forma solúvel nos fluidos corporais, evidenciado a importância dessa enzima em vários mecanismos biológicos (DEGUCHI et al, 2007). Já a tECA, é expressa unicamente no desenvolvimento das espermatídes e espermatozoide maduro, consequentemente, possui um papel importante na reprodução (CALDWELL et al, 1976; LANGFORD et al, 1993; SIBONY et al, 1993, 1994; FUCHS et al, 2005). As duas isoenzimas são ectoproteínas ligada a membrana plasmática por um único polipeptídio transmembranar hidrofóbico perto do C – terminal (MURRAY e FITZGERALD, 2007).

2.6 Quimotripsina - similar: Quimase e Elastase 2

Quimases são membros da família das serino - proteases com extensa atividade proteolítica. Esta família é caracterizada por apresentar um resíduo de serina no sítio ativo (HEUTINCK et al, 2010). Essas enzimas são proteases monoméricas e tem especificidade para substrato de quimotripsina - similar, criva preferencialmente depois de resíduos de aminoácidos aromáticos.

De acordo com estrutura e especificidades de substrato, foram identificadas 18 quimases em várias espécies, divididas em dois subgrupos: as α quimases e as β

quimases (CHANDRASEKHARAN et al, 1996). Atualmente, só foi identificada α - quimases em humanos, macacos, babuínos e cães. Contudo, em roedores várias quimases estão presente só que a maioria é β - quimase (WU et al, 2005).

Além disso, quimase são expressadas inicialmente nas células dos mastócitos, fibroblastos, células vasculares endoteliais e granulócitos. Essas enzimas são liberadas no meio extracelular em respostas a mediadores químicos inflamatórios, dano tecidual e estresse celular (URATA et al, 1989; URATA et al, 1990). Quimase é processada como uma molécula inativa (pro – quimase) nas células mastocitárias, no lugar em que permanecem armazenadas. A ativação da enzima se dar pela remoção do resíduo de dipeptídio (Gly – Glu) na região N – terminal pela dipeptidil peptidase (DPPI) (WOLTERS et al, 2001).

Diversos estudos apontam que a quimase está envolvida em diversos fenômenos fisiopatológicos em pacientes cardíacos. A atividade da quimase é substancialmente maior em relação com a atividade da ECA no tecido cardíaco humano. Experimentos demonstra que a enzima é responsável pela produção de cerca de (80 – 90%) da Ang II presente nos tecidos e células cardíacas, proveniente de seres humanos e animais que foram submetidos a estudos experimentais. Demonstrou – se que quimase cardíaca humana pode produzir Ang II utilizando Ang I ou usando Ang (1 – 12) como substrato em concentrações mais expressivas em comparação com ECA (AHMAD et al, 2011; AHMAD et al, 2013; AHMAD et al, 2016; BUTTS et al, 2017; FROOGH et al, 2017; KINOSHITA et al, 1991; BALCELLS et al 1997; URATA, 2007). No tecido cardíaco a Ang II, produzida principalmente pela quimase, pode ser responsável pela remodelação cardíaca e desenvolvimento da doença. As várias ações biológicas da quimase incluem up – regulação da degradação de proteínas da matriz extracelular (metabolismo direto da fibronectina, digestão autofágica de procolágeno e vitronectina), degradação de apolipoproteínas, ativação da matriz metaloproteinases (MMPs), TGF – β 1, Interleucina β 1 (IL – β 1), alta produção de endotelina – 1 e atuação metabolismo lipídico (DELL'ITALIA et al, 2018). A matriz metaloproteinase (MMP) – 9 é ativada clivando o domínio específico do sítio catalítico pela ação da quimase. O acréscimo no tamanho do infarto e fibrose do ventrículo esquerdo está intimamente associado a presença de MMP – 9 no tecido cardíaco, em modelo experimental (KELLY et al, 2007). Quimase também induz o iniciador do fator de crescimento transformador β (TGF – β) em sua conformação ativa, contribuindo assim para reposta vascular à lesão. Tanto o TGF – β quanto o

MMP – 9 estão comprometidos na inflamação tecidual e na fibrose, com consequente lesão orgânica (TAKAI e MIYAZAKI, 2005).

A Elastase -2 é uma quimotripsina - similar membro família A2, uma serino protease, que é descrita como uma via alternativa na geração de Ang II. ELA - 2 é capaz de gerar Ang II a partir de Ang I, semelhante à reação catalisada pela ECA de mamíferos. No entanto, a ELA – 2 também pode produzir Ang II diretamente do angiotensinogênio (SANTOS et al, 2003). A relevância dessa via alternativa viável para a produção de Ang II foi exposta nas artérias do coração, carótida e mesentéricas de ratos com pressão arterial normal e facilmente hipertensos (BECARI et al, 2011). Além disso, a elastase - 2 é uma enzima chave na desregulação independente da ECA do SRA no infarto do miocárdio e, provavelmente, em outras patologias cardíacas (BECARI et al, 2017).

As propriedades enzimáticas da elastase - 2 de ratos mostra diferenças entre esta protease e a ECA em diversos sentidos, no entanto, apresenta semelhança com a enzima sensível a quimostatina da artéria renal purificada de cão (OKAMURA et al., 1990) e quimase presente no coração humano (ARAKAWA, 1996). Além disso, a elastase 2 da mesma maneira que a ECA não destrói o produto Ang II (Paula et al., 1998).

A elastase – 2 amplamente distribuída em vários órgãos, como pulmão, pâncreas, fígado, vasos sanguíneos (artérias mesentéricas e carótida) coração e rim de roedores (SANTOS et al, 2003; BECARI et al, 2005, 2011; WHALSH e WICOX, 1970) e, também no córtex pré-frontal de ratos (KUNNUTTILA et al, 2004).

A importância da via alternativa à ECA, possivelmente quimase e elastase – 2, geradora de Ang II no tecido vascular indicam ter importante função de formar Ang II na vigência da inibição da ECA.

2.7 Serino proteases de insetos

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas. As exopeptidases quebram um resíduo de aminoácido terminal na posição final da proteína; em relação as endopeptidases elas clivam ligações entre resíduos de aminoácidos internos. Os grupos químicos participantes destas reações no sítio catalíticos são utilizados para classificar as proteases. Em serino proteases, o grupo hidroxila na cadeia lateral de um resíduo de serino comporta - se como um nucléófilo na reação que hidrolisam uma ligação peptídica, enquanto que as cisteína proteases o grupo sulfidril de uma cadeia lateral de cisteína é que executa essa função. Em

metaloprotease e aspártico proteases, a reação ocorre com a interação entre uma molécula de água e um íon metálico ou grupo aspártico no sítio ativo, respectivamente. No entanto, as proteases podem possuir o mesmo mecanismo catalítico, mas não ter a mesma sequência de aminoácidos, como resultado de evolução convergente (HOOPE, 2002; RAWLINGS et al, 2010).

Uma protease quebra uma ligação peptídica, chamada ligação cindível, entre dois resíduos de aminoácidos nomeados como P1 e P10. Os resíduos na posição amino terminal da ligação de cisão são numeradas na posição C para N, enquanto que os resíduos no lado carboxterminal da ligação de cisão são numerados N para C (figura 5) (SCHECHTER e BERGER, 1967).

Muitas serino proteases em insetos pertence à família S1 (família quimotripsina) que compreende as subfamílias S1A a S1F, que é filogeneticamente distinta, mas estruturalmente correlacionadas (RAWLINGS et al., 2008). A maior subfamília é S1A, que atuam essencialmente no meio extracelular, onde elas executam diversas funções. A subfamília S1A engloba enzimas como quimotripsina, tripsina, elastase e diversas peptidases da matriz. As estruturas de peptidases S1A foram determinadas a partir de várias peptidases de mamíferos e são caracterizadas pela dobra quimotripsinica de dois β – barris com sítio ativo composto pelos resíduos da tríade catalítica Ser, His e Asp (KRAUT, 1977; PAGE e DI CERA, 2008). A estrutura do sítio ativo é preservada por uma ampla rede de ligações de hidrogênio e a estrutura geral é mantida por ligações dissulfeto entre resíduos de cisteínas altamente conservados (HEDSTROM, 2002).

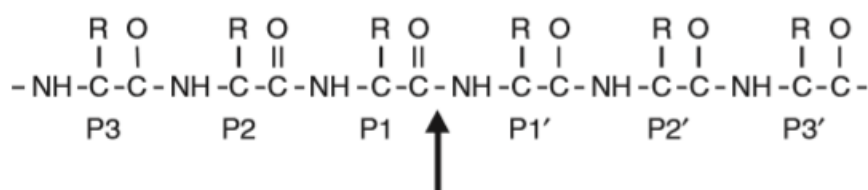
A determinação da estrutura química de uma quimotripsina presente na formiga – de – fogo, *Solenopsis invicta*, comprovou que a dobra total de S1A também se emprega nas serino proteases de insetos (HEDSTROM, 2002).

As serino proteases de diversas espécies possuem mecanismo catalítico semelhante entre si: quando o substrato peptídico liga –se ao centro catalítico ocorre um ataque nucleofílico da Ser195 sobre a carbonila da ligação peptídica a ser clivada, formando um intermediário tetraédrico ligado à enzima por interação covalente, que recebe um próton proveniente do nitrogênio 3 da His157, sendo degradado em um intermediário acil – enzima e produzindo um novo local N – terminal do substrato, que é liberada e trocada por uma molécula de água. Essa His157 forma ligação de hidrogênio com o Asp102 e tem seu pKa aumentado (que passa de aproximadamente

7 da histidina livre para maior que 12), convertendo – se uma base nucleofílica forte. A água passa a atuar como nucléofilo da reação e ataca o carboxilato ainda ligado a Ser195, liberando uma nova região C -terminal formada, reconstituindo a enzima (VOE e VOET, 2004).

As especificidades de clivagem divergem largamente entre as diversas proteases S1A. As proteases do tipo quimotripsina clivam ligações pépticas, principalmente, após resíduos hidrofóbicos grandes, proteases semelhantes a tripsina após resíduos com carga positivas e enzimas do tipo elastase após pequenos resíduos hidrofóbicos na posição P1. A especificidade do substrato é definida pelas características físicas da cavidade de ligação do substrato S1 presente ao lado do local catalítico (PERONA e CRAIK, 1995).

Figura 5 – Notação para sítios de clivagem de proteases. A seta indica a ligação péptica cindível entre os resíduos de aminoácidos P1 e P1'.



Fonte – Shechter e Berger (1967)

Embora as proteases S1A tenham sido amplamente pesquisadas em modelos mamíferos, muitas características funcionais ainda precisam ser estudadas em insetos. Com o advento do sequenciamento do genoma e transcriptoma de diversas espécies de insetos, incluindo *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Plutella xylostella* e *Manduca sexta*, forneceu compreensão sobre a diversidade dessa família de proteases (BRACKNEY et al., 2010; CAO et al., 2015; ROSS et al., 2003; ZOU et al., 2006).

As serino proteases de insetos atuam em várias funções fisiológicas que são essenciais no crescimento e desenvolvimento. Além da sua função bem descrita na digestão, evidências bioquímicas e genéticas indicam que ativação de serino proteases na hemolinfa de artrópode influenciam na muda e metamorfose, atuam como reguladores intrínsecos da resposta imune inata, incluindo a encapsulação melanótica, a expressão de peptídeos antimicrobianos e modulação de função hemocitária (LAW et al., 1977; NEURATH, 1984; SRINIVASAN et al., 2006;

BARILLAS-MURY, 2007; KANOST e GORMAN, 2008; CERENIUS et al., 2010; JIANG et al., 2010).

A vitelina e algumas proteínas armazenadas em grânulos de vitelo nos ovos de insetos são degradadas por proteases para liberar aminoácidos que serão empregadas no desenvolvimento embrionário (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). Serino proteases que digerem vitelina foram isoladas de amostras de ovos de *Bombix mori* (INDRASITH et al., 1988), e seu DNA foi clonado (IKEDA et al., 1991). Esta protease cliva após resíduo de Arg ou Lys e, é um membro da família S1 (quimotripsina – like) de serino protease. É produzida nos ovários como uma proteína inativa e é ativada durante a embriogênese. Uma segunda serino protease da família S1 cliva especificamente proteínas da gema de 30 KDa presente nos ovos de *B. mori*. Esta protease, que é produzida no final da embriogênese, tem especificidade do tipo elastase, degradando resíduos de aminoácidos de cadeias laterais curtas (MAKI e YAMASHITA, 1997, 2001). Uma serino carboxipeptidase é sintetizada no corpo gorduroso de um mosquito, *Aedes aegypti*, conduzida através da hemolinfa e captadas pelo oócitos. Esta protease é formada como um zimogênio e acionada no interior dos ovos no decorrer da embriogênese (CHO et al., 1991; KANOST e CLEM, 2012).

O sistema de cascata proteolíticas evoluíram no sistema imunológico inato de insetos (KANOST et al, 2012; CERENIUS et al, 2010). Serino proteases que possui um ou mais domínio grampo na região N – terminal funcionam em vias extracelulares na regulação de algumas repostas imune em insetos (JIANG et al, 2000). Domínio grampos foram nomeados em razão do diagrama padrão de ligação dissulfeto no domínio N – terminal da enzima da pro – coagulação do caranguejo – ferradura que se parecia com grampo de papel (MUTA et al, 1990). As serino proteases que contém domínios em grampos foram inicialmente identificadas como enzimas envolvidas na via de sinalização indispensável no desenvolvimento de estrutural dorsal – ventral em *D. melanogaster* (MORISATO e ANDERSON, 1995; ANDERSON, 1998). Elas consistem de um domínio serino protease do tipo quimotripsina - similar, e um ou dois domínios em grampos na região N – terminal. O domínio serino protease é responsável pela amplificação do sinal pela clivagem e ativação em cascata – abaixo. O domínio de grampo, normalmente possui de 35 a 55 resíduos de aminoácidos, é interligado por três ligações dissulfetos estritamente conservados (JIANG e KANOST, 2000).

Entre os 204 genes com homologia da família S1 da serino proteases no genoma *D. melanogaster*, 24 são proteases de domínio em grampo, em que a maioria das atividades biológicas são desconhecidas (ROSS et al, 2003). Outras serino proteases de domínios em grampos foram descobertos em diversos genomas de insetos que incluem 18 na abelha *Apis mellifera* (ZOU et al, 2006), 31 genes em *T. castaneum* (ZOU et al, 2007), 55 genes em *A. gambiae* e 71 genes *A. aegypti* (WATERHOUSE et al., 2007). Entre os Lepidópteros, o genoma de *B. mori* contém 15 proteases de domínio em grampos (TANAKA et al., 2008), enquanto mais de 20 proteases de domínios em grampos foram encontradas expressas no corpo gorduroso e hemolinfa de *M. sexta* (JIANG et al., 2005; ZOU et al., 2008).

O controle ineficaz e o aumento da resistência dos insetos ao uso de inseticidas têm estimulados os pesquisadores a buscar formas alternativas de combate a pragas, com melhores resultados e sem danos ao meio ambiente. O estudo da biologia dos insetos, principalmente, análise do perfil de proteínas e enzima importantes para o desenvolvimento e reprodução dos insetos, tem ajudado a encontrar novos alvos biológicos de controle (SILVA et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a enzima conversora de angiotensina no inseto *T. castaneum*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a atividade enzimática de extratos de *T. castaneum* envolvida na conversão de Angiotensina I no inseto *T. castaneum*.
- Isolar a enzima conversora de angiotensina no inseto *T. castaneum*;
- Avaliar a formação de Ang (1 – 7) a partir de Ang 2;
- Testar o perfil de atividade frente a inibidores específicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Insetos

Os insetos *Tribolium castaneum* utilizados neste trabalho foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal de Alagoas. Os insetos faziam parte de uma colônia mantida à 30°C com umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h. Nos experimentos foram testados insetos no estágio adulto de desenvolvimento.

4.2 Preparo do extrato bruto

Aproximadamente 500 insetos foram triturados e os tecidos homogeneizados em tampão 2 ml de Tris – HCl 50 mM, pH 8,0. Em seguida, foi submetido a centrifugação (15.000 g 15 min a 4 ° C) e o sobrenadante, agora chamado de Extrato Bruto coletado, foi utilizado para realizar a atividade enzimática e a continuidade dos experimentos laboratoriais. A concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (1976).

4.3 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão (0. 01 - 0.6 mg/mL). Para isso foram tomadas 10 µL das amostras, adicionados 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente o meio reacional foram encubado por 5 mim, e medindo a absorbância a 595 nm. As unidades correspondente são (mg/mL) de proteína.

4.4 Ensaio enzimático de atividade conversora de angiotensina

A atividade conversora de angiotensina no extrato proteico do inseto *T. castaneum* foi testada utilizando como substrato o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). A reação consistirá de 30 µL de solução de Ang I (1 mM), 130 µL de tampão Tris – HCl (50 mM), pH 8,0 e 10 µL de extrato proteico por 4 horas à temperatura ambiente. Padrões de referência de Ang I e Ang II serão usados, onde cada tubo de reação irá conter 30 µL de solução do peptídeo (1mM), 140 µL de solução tampão Tris - HCl (50 mM), pH 8,0. As reações foram paradas com 40 µL de uma solução 5% de ácido trifluoracético. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o ensaio em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa. Os peptídeos foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com àqueles dos respectivos peptídeos cognatos sintéticos.

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os produtos de hidrólise foram detectados através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa usando um equipamento Shimadzu SCL-6B junto a uma coluna C-18 (0.45x15cm). As fases móveis usadas foram soluções de acetonitrila a 5% e 60% (solução A e solução B, respectivamente). Ambas com 0,1% TFA. A eluição ocorreram com um gradiente de acetonitrila de 90% de solução A 10% de solução B até 50% de solução A + 50% de solução B, o que dá um gradiente de aproximadamente 10% até 32% de acetonitrila, percorridos em 25 minutos em 0.1% de TFA, num fluxo de 1 mL/min, monitorado pela absorbância em 215 nm.

4.6 Purificação Protéica

Para isolar e purificar a enzima, 150µL de homogenato foram diluídos em 4850 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. O volume total da amostra (5 mL) será injetado em um cromatógrafo líquido do tipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA pure M1da GE, usando uma coluna de gel filtração (S – 100 sephacryl) de 50mL eluída com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, fluxo de 0.5mL/min, 150 µL de amostra aplicada diretamente à coluna, 2mL de solução coletada em cada fração cromatográfica e monitoramento em tempo real das proteínas eluídas através de espectrofotômetro acoplado ao Akta a 280 nm.

4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A Eletroforese foi desenvolvida de acordo com Laemmli (1970) usando o Sistema Mini-Protean 3 Eletroforese (Bio-Rad). As bandas proteicas foram coradas com Comassie Blue G-250.

4.8 Ensaio Enzimático de Inibição

O ensaio de inibição da enzima do inseto *T. castaneum* consistiu em 30µL de extrato proteico, 20µL de Ang I 1mM, 106µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e 20 µL de inibidores preparados em tubos separados. Os inibidores testados foram o captopril 10 µM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, 2 – mercapto etanol, 1 mM, DTT 1 mM. O tubo controle continha 30µL de extrato bruto, 20µL de Ang I 1mM e 126µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. As reações duraram 2 horas a 25°C e foram encerradas com 40µL de uma solução 5% de TFA

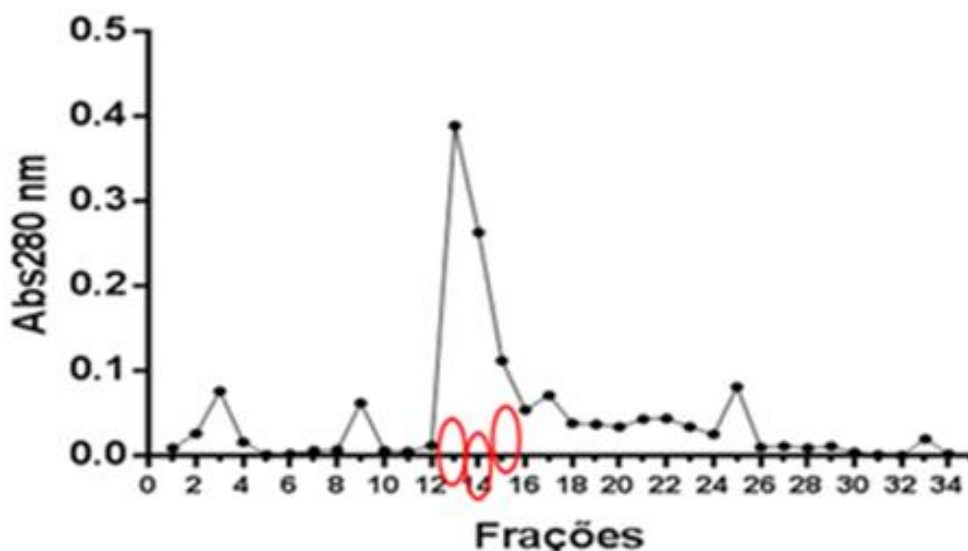
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema escolhido para o fracionamento do extrato bruto do inseto *T. castaneum* foi a gel filtração, com coluna cromatográfica S – 100 sephacril, vinculado ao cromatógrafo FPLC Akta-M1. Foram aplicados a coluna cromatográfica 150 µL de mistura proteica e o fluxo da corrida cromatográfica foram mantidas a 0,05ml/min e, frações de 2 ml foram coletadas individualmente e estocadas em geladeiras a 4°C para posteriormente serem analisadas. A figura – 6 (A), abaixo, ilustra o perfil cromatográfico obtido nesta etapa de purificação. A atividade processadora foi verificada nas frações 13, 14 e 15, correspondente ao pico mais acentuado no cromatograma.

Leimeire e colaboradores (2007) purificaram parcialmente duas isoformas de ECA de insetos presentes no intestino da larva *Spodoptera littoralis*. Por meio de uma coluna de troca iônica e gel filtração, respectivamente. Utilizando semelhantes técnicas de isolamento, Marcous e colaboradores (2003) purificaram dos testículos de *Locusta migratória* uma ECA de inseto com massa molecular aproximada de 80 KDa por meio de cromatografia de troca iônica e gel filtração.

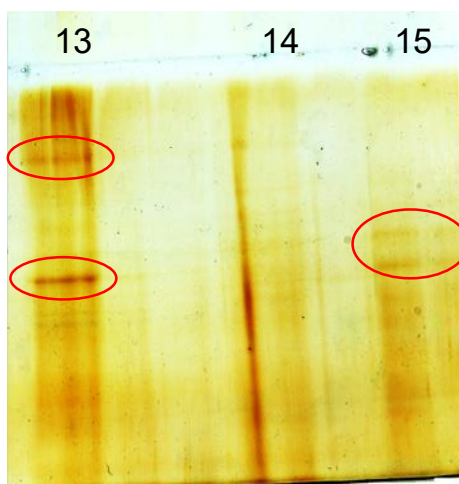
Diferentes dos mamíferos, os insetos possuem circulação aberta e não contém todos os componentes, exceto a homóloga da eca, do sistema SRA, que é responsável pelo controle dos vasos sanguíneos e aumento da pressão arterial em mamíferos (FOURNIER et al., 2012). A ECA de insetos são enzimas semelhante a ECA_t de mamíferos (HARRISON e ACHARYA, 2014; HENS et al, 2002). São expressas em diversos tecidos e atua na formação de peptídeos para muitas funções fisiológicas no desenvolvimento dos insetos (ISAAC et al., 2007), como na contração do musculo intestinal e cardíaco (CORNEILL et al., 1995; TATEI et al., 1995), sinapse nervosa (ISAAC et al., 1998, 2009), nos processos digestório (LEMEIRE et al., 2008; RIVIERE et al., 2004), na reprodução (EKBOTE et al., 1999; ISAAC et al., 1999; SCHOOFS et al., 1998; VANDINGENEN et al., 2002, 2001) e reações imunológicas (AGUILAR et al., 2005; MACOURS et al., 2003).

Figura 6 – Cromatograma obtido de filtração em gel do extrato bruto do inseto *T. castaneum*. Os 150 μ L de amostra foram aplicados a uma coluna (sepharose S – 100 sephacril com volume 50mL de resina) previamente equilibrada com tampão Tris - HCl 50mM, pH 8.0, em Ekta – pure com fluxo de 0.05mL/min a 25°C monitorado a 280 nm. Figura 6 – (B) - Análise das amostras em gel de poliácridamida a 10% de frações coletadas proveniente da cromatografia de gel filtração. Os círculos vermelhos identificam no cromatograma as frações com atividade conversora.



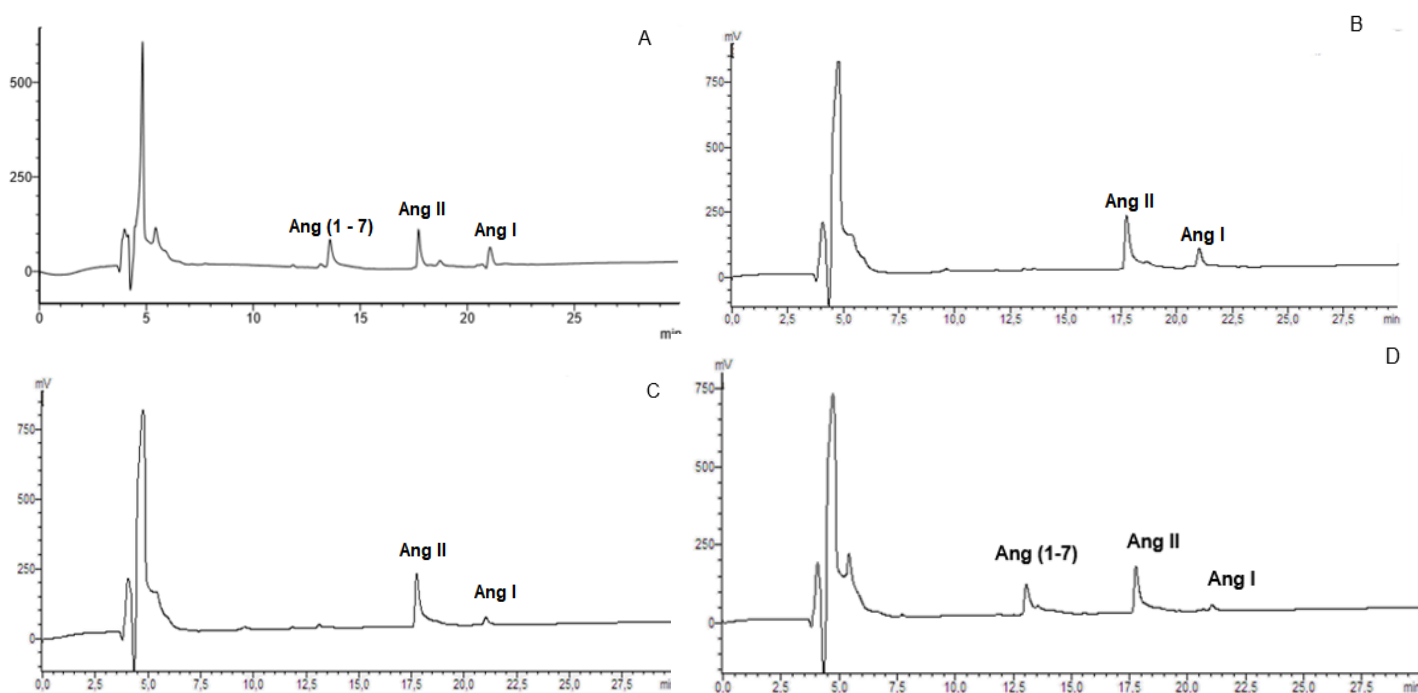
Em seguida, 20 μ L das respectivas frações ativas foram aplicadas em gel de poliácridamida a 10% em condições não - redutoras a 90 V, para verificar a composição proteica de cada uma das frações obtidas, (Figura 7). Após a coloração pela prata para visualização das bandas, pode – se observar duas bandas bem separadas na canaleta referente a fração 13 e, duas bandas muito próximas na canaleta referente a fração 15 com massas moleculares aproximadas.

Figura 7 – Análise das amostras em gel de poliácridamida a 10% de frações coletadas proveniente da cromatografia de gel filtração. Os círculos vermelhos identificam no cromatograma as frações com atividade conversora.



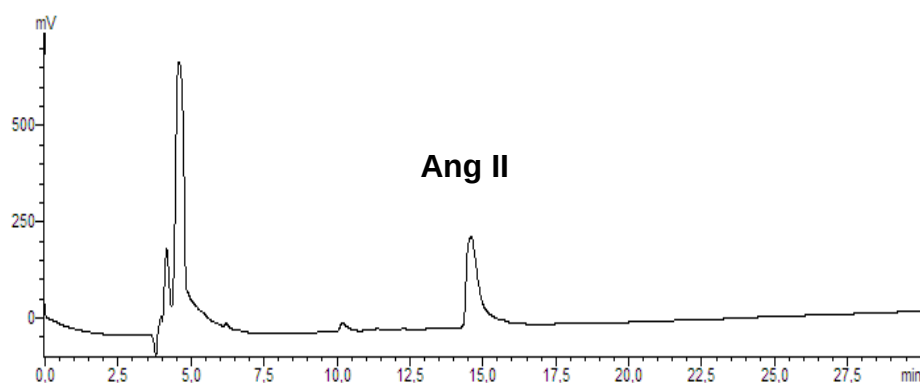
As frações representativas de cada pico de eluição foram avaliadas quanto à atividade processadora de Ang II utilizando – se como substrato a Ang I. O extrato proteico e a fração 15 coletada demonstrou capacidade de formar Angiotensina (1 – 7) a partir de Ang I, (Figura 8 A e D), respectivamente. A Ang (1 – 7) poder ser gerada pela clivagem de Ang I pela ação de endopeptidases ou Ang II por ação de carboxipeptidases. Foi utilizado Ang II como substrato para demonstrar se a formação de Ang (1 -7) era proveniente de Ang II.

Figura 8 - Cromatograma obtido por HPLC para os produtos gerados via hidrólise de Ang I após a incubação com extrato proteico bruto e frações obtidas por filtração em gel. A reação ocorreu com 40 µg de proteínas, 10µL de Ang II solução 1mM, 140 µL de tampão Tris - HCl 50mM, pH 8.0. A reação foi incubada por um período de 2h a 25°C. A reação foi interrompida com 40 µL de uma solução de ácido trifluoracético 5% (TFA). A eluição foi feita usando um gradiente de acetonitrila 10–32% com 0.1% TFA em uma coluna de HPLC fase reversa (C18, 0.45 × 15cm) com absorbância a 215 nm; e os produtos foram identificados com padrões. (A) extrato bruto, (B) fração 13 e (C) fração 14, (D) fração 15 e, os produtos foram identificados com padrões.



A Figura (9) demonstra que não houve formação de Ang (1 – 7) quando Ang II é o substrato no ensaio, mostrando que Ang (1 – 7) é formado via hidrólise de Ang I no extrato proteico do inseto. O peptídeo Ang (1 -7) pode ser formado diretamente através de Ang I pela ação de enzimas como neprilisina (NEP) (CAMPBELL et al, 1998), Timete oligopeptidase (TOP) (CAMPBELL et al, 1994) e Prolil oligopeptidase (POP) (WELCHES et al, 1991).

Figura 9 - Cromatografia obtida através HPLC mostrando os produtos formados pela hidrólise de Ang II com extrato proteico bruto do inseto *T. castaneum*. A reação ocorreu com 40 µg de proteínas, 10 µL de Ang II solução 1mM, 140 µL de tampão Tris - HCl 50mM, pH 8.0. A reação foi incubada por um período de 2h a 25°C. A reação foi interrompida com 40 µL de uma solução de ácido trifluoroacético 5% (TFA). A eluição foi feita usando um gradiente de acetonitrila 10–32% com 0.1% TFA em uma coluna de HPLC fase reversa (C18, 0.45 × 15cm) com absorbância a 215 nm; e os produtos foram identificados com padrões.



Diversos estudos têm descrito atividade da POP em vários insetos. A POP participa da diferenciação de discos imaginários e síntese de DNA em *Sarcophaga peregrina* (mosca da carne) (OHTSUKI et al., 1994; OHTSUKI et al., 1997; OHTSUKI et al., 1997). Em um estudo de proteômica, Zhang e colaboradores (2014) identificaram a enzima prolil oligopeptidase nos fluidos de muda do bicho da seda *B. moris*. Posteriormente, Fu e colaboradores (2018) clonaram e caracterizaram dois genes que codificam duas isoformas de POP em *B. mori*. O grupo demonstrou que a enzima pode ter um papel importante na ecdise (muda) dos insetos.

A neprilisina, além do papel em algumas doenças, é também importante no desenvolvimento e reprodução de mamíferos (CARPENTIER et al, 2004). A NEP de inseto é responsável pela clivagem de peptídeos que regulam os mecanismos essenciais para o acasalamento e reprodução em *D. melanogaster* e *T. castaneum* (JIANG et al. 2013). Além disso, tanto em *Locusta migratória* quanto em *Leucophaea maderae*, foi identificado a hidrólise de taquicininas pela neprilisina nos cérebros destes insetos (ISAAC e NÄSSEL 2003). As taquicininas são uma família formada de peptídeos com diversas estruturas e funções, existentes no sistema nervoso, trato digestório e vários outros tecidos de uma grande variedade de organismos vertebrados e invertebrados (SANTOS, 2003).

As enzimas são classificadas de acordo com a natureza bioquímica do mecanismo de ação que as mesmas possuem. E um dos métodos aceitos para identificar o mecanismo enzimático de uma enzima é através de experimentos com

inibidores conhecidos. Para verificarmos se a conversão de angiotensina no inseto *T. castaneum* ocorria devido ação de uma ECA de insetos, o extrato bruto do inseto foi incubado com vários inibidores conhecidos.

Na caracterização da enzima processadora de angiotensina no extrato proteico do inseto foram utilizados cinco diferentes inibidores (Figura 9): captopril inibidor específico da ECA, PMSF inibidor de serino protease, EDTA inibidor de metaloproteases, DTT inibidor cisteína protease, 2 - mercapto etanol inibidor de tiol protease.

A enzima processadora de Ang I presente neste estudo não mostrou sensibilidade inibitória pelo captopril (Figura 9 C), demonstrando que a enzima não é uma ECA, já que não foi inibida pelo captopril um inibidor clássico da mesma (CUSHMAN e ONDETTI, 1991; CAMARGO et al., 2012). Essa hipótese é fortalecida pelo teste com EDTA (Figura 9 D), em razão que o mesmo também não inibiu a formação de Ang II a partir de Ang I. É conhecido que a ECA possui uma molécula de zinco no sítio catalítico essencial na clivagem dos substratos da enzima (CUSHMAN e CHEUNG 1971; DAS e SOFFER, 1975). Mas o EDTA (Figura 9D) reduziu a formação de Ang (1 -7) confirmando a suspeita da existência de endopeptidases do tipo neprilisina e timete oligopeptidase presente no extrato do inseto. Essas enzimas são integrante da família das metaloproteinases (ICIMOTO et al, 2017; MEYER et al, 2009).

A figura 9 B mostra que a enzima presente no extrato bruto mostrou sensibilidade inibitória ao PMSF. A inibição de enzimas por efeito do PMSF lhe confere a característica de serino protease. O mecanismo catalítico que caracteriza essas enzimas é a presença de um resíduo de serino, que corresponde a uma tríade catalítica (serina, histidina e ácido aspártico). Essas enzimas estão envolvidas em diversos processos biológicos e correspondem a cerca de 95% das atividades de proteinases em insetos (CHOUGULE et al., 2008; HEDSTROM, 2002). Enzimas proteolíticas realizam papéis indispensáveis no desenvolvimento, crescimento e função reprodutora no ciclo de vida dos insetos (TERRA e FERREIRA, 1994).

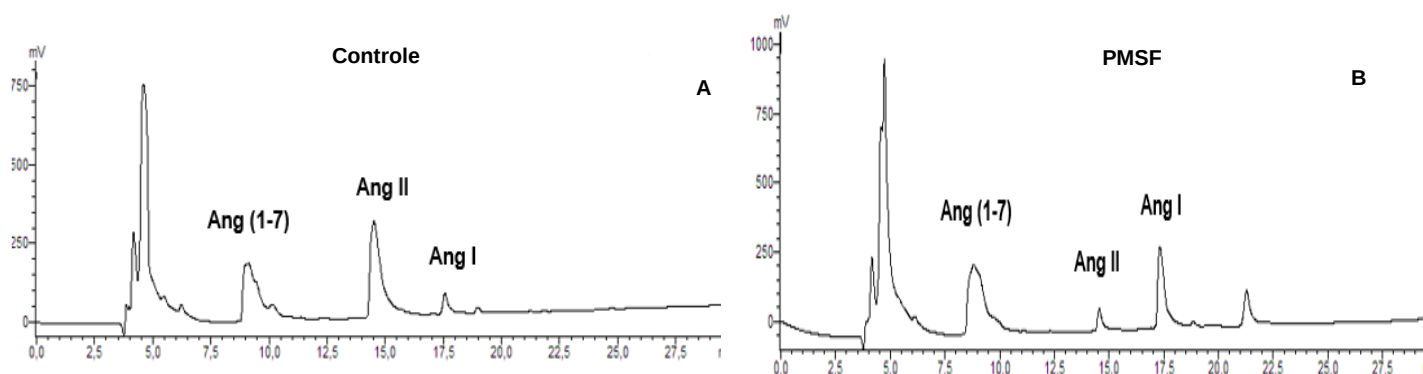
Um enorme número de genes que codificam quimotripsina - similar foram descobertos no genoma dos principais insetos da família lepidópteros (ZHOU et al., 2016). Khajuria e colaboradores (2009), estudando genes, presentes no intestino da larva *Ostrinia nubilalis* identificaram 52 genes relacionados a resistência à inseticidas neste inseto, dos quais, 18 destes genes codificam proteases da família da

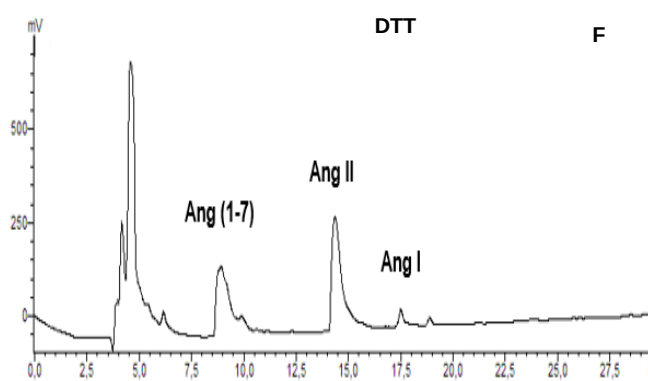
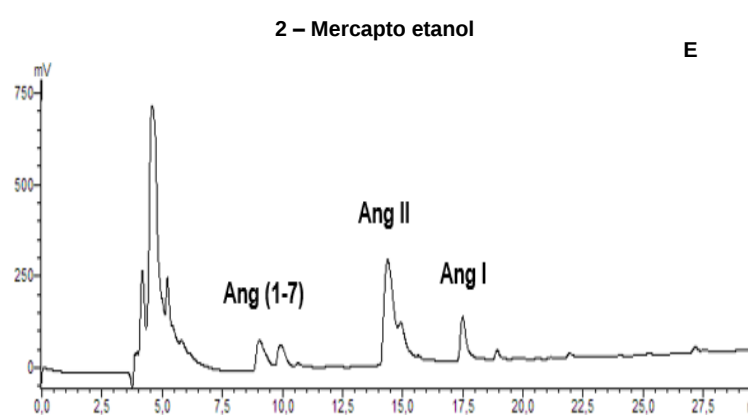
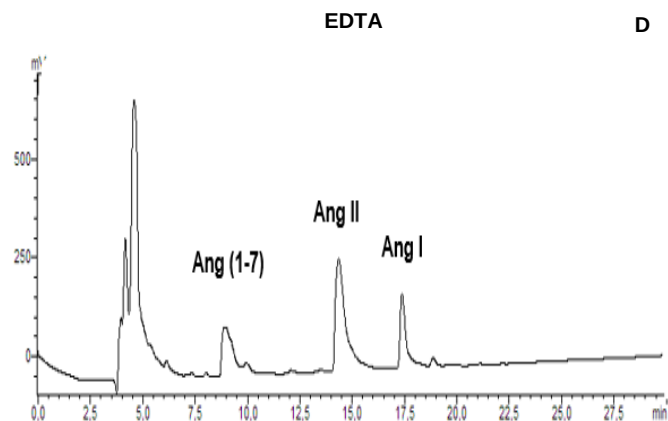
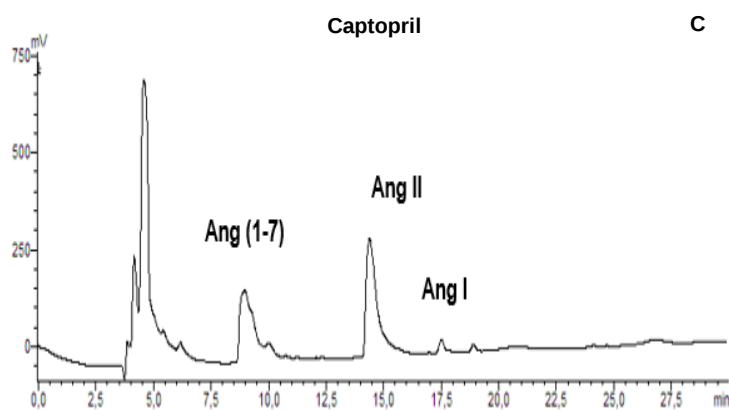
quimotripsina - similar, demonstrando que algumas enzimas presentes na fisiologia dos insetos também estão relacionadas ao mecanismo de resistência a inseticidas, principalmente as enzimas da família das serino proteases.

Liu e colaboradores (2016) clonaram e caracterizaram o gene *BmSP36* proveniente de células intestinais do bicho – da seda *B. mori*. O *BmSP36* possui a tríade catalítica Asp, His e Ser presente nas serino proteases. O estudo demonstrou um aumento na expressão do gene *BmSP36* quando ocorria um acréscimo na concentração do hormônio juvenil (JH) na hemolinfa do inseto, sugerindo que a expressão do gene *BmSP36* em bicho – da – seda pode ser afetado pela concentração do JH. O JH é um importante hormônio de insetos responsável regulação de vias relacionadas ao desenvolvimento, reprodução e metamorfose em larvas de insetos (JINDRA et al., 2013; HIRUMA e KANEKO, 2013).

Além disso, Broehan e colaboradores (2010) estudaram uma família de genes codificadores de quimotripsina - similar peptidases no genoma de inseto *T. castaneum*, descobriram 14 genes que codificam peptidases com especificidade para a família S1 visto comumente em enzimas quimotripsina – similar.

Figura 9 – Cromatograma obtido por HPLC para os produtos gerados via hidrólise de Ang I por extrato proteico bruto do inseto *T. castaneum* e inibidores. A mistura de reação envolveu 40 µg proteínas, 30 µL de solução de Ang I 1mM, 140 µL de tampão Tris - HCl 50mM, pH 8.0. A reação foi incubada por um período de 2h a 25°C. As reações foram interrompidas com 40 µL de uma solução de ácido trifluoracético 5% (TFA). A eluição foi feita usando um gradiente de acetonitrila 10–32% com 0.1% TFA em um coluna de HPLC fase reversa (C18, 0.45 × 15cm) com absorbância a 215 nm; e os produtos foram identificados com padrões. (A) reação sem inibidor, (B) reação com PMSF 1mM, (C) reação com captopril 20µM, (D) reação com EDTA 1 mM, (E) reação com 2 – mercapto etanol 1mM, (F) reação com DTT 1mM.





A quimase e elastase 2 são quimotripsina - similar, enzimas da família das serino proteases que convertem Ang I em Ang II em mamíferos (URATA et al, 1990; SANTOS et al, 2003; BECARI et al, 2005, 2011). No entanto, em insetos até o momento não há relatos do isolamento destas enzimas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi purificado parcialmente por gel filtração (S – 100 sephacril) a enzima processadora de angiotensina presente no inseto *T. castaneum*, que se apresentou com duas bandas (SDS –PAGE) bem separadas na fração 13 e aproximadas na fração 15.

A enzima processadora de angiotensina presente no extrato bruto do inseto *T. castaneum* não pode ser ECA pois não é inibida por captopril e, sim por PMSF caracterizando a enzima na classe das serino proteases, possivelmente, uma homóloga da quimase ou elastase 2, presente em mamíferos. Já que, ela também hidrolisa Ang I em Ang II, semelhante aos mamíferos.

O outro produto presente em grande concentração foi Ang (1 – 7) que de acordo com os resultados é derivado da Ang I, levando a conclusão de que há enzimas na fisiologia do inseto semelhante Timete oligopeptidase e neprilisina presente em mamíferos. Este resultado é corroborado pelo ensaio de inibição com EDTA, já que há uma diminuição na formação de Ang (1 - 7) reforçando mais esta hipótese, pois as enzimas acima citadas pertence a família das metaloproteinases.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R., JEDLICKA, A.E., MINTZ, M., MAHAIRAKI, V., SCOTT, A.L., DIMOPOULOS, G. Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 35, 709–719, 2005.
- ALARCÓN, F. J. et al. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 265-274, 2002.
- ALBISTON, A., L., MCDOWALL, S., G., MATSACOS, D., SIM, P., CLUNE, E., MUSTAFA, T., LEE, J., MENDELSON, N, FAO, SIMPSON, R., J., CONNOLLY, L., M., CHAI, S., Y.. Evidence that the angiotensin IV(AT4) receptor is the enzyme insulin regulated aminopeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**. ;276:48623–48626, 2000.
- ALBISTON, A., L., PEDERSON, E., S., BURNS, P., PURCELL, B., WRIGHT, J., W., HARDING, J., W., MENDELSON, F., A., WEISINGER, R., S, CHAI, S., Y.. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. **Behav Brain Res**; 154:239–243, 2004.
- ACHARYA, K., R., STURROCK, E., D., RIORDAN, J., F., EHLERS, M., R., W. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nat Rev Drug Discov** 2:891–902, 2003.
- AHMAD, A., WARD, P., E.. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. **J Pharmacol Exp Ther.** 252:643–650, 1990.
- AHMAD S, SIMMONS T, VARAGIC J, et al. Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. **PLoS One** ;6(12): 28501, 2011.
- AHMAD, S., WEI, C., C., TALLAJ, J., et al. Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts. **J Am Soc Hypertens** .7(2):128-36, 2013
- AHMAD, S., VARAGIC, J., VONCANNON, J., L., et al. Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1-12) metabolizing enzyme. **Biochem Biophys Res Commun.** 478(2):559-64, 2016.
- ALBISTON, A., L., YEATMAN, H., R., PHAM, V., FULLER, S., J., DIWAKARLA S., FERNANDO, R., N., CHAI, S., Y. Distinct distribution of glut4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. **regul pept**; 166:83–89, 2011.
- AKAM, M. Hox and Hom: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. **Cell.** v.57, 1989, p.347-354.
- ATHANASSIOU, C.G., KAVALLIERATOS, N.G., THRONE, J.E., NAKAS, C.T., 2014. Competition among species of stored-product psocids (Psocoptera) in stored grain. **PLoS One**, 2867, 9 – 10, 2014.

ATHIÉ, I.; DE PAULA, C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. São Paulo: Varela, 2002. p. 28-34.

BARAILAS – MURY, C.. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. **Trends Parasitol.** 23, 297 – 299, 2007.

BALYASNIKOVA, I.V., KARRAN, E.H., ALBRECHT II, R.F., DANILOV, S.M. Epitopespecific antibody induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. **Biochemical Journal** 2002;362 (3):585-95.

BALCELLS, E., MENG, Q., C., JOHNSON, W., H., Jr., et al. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. **Am J Physiol**, 273(4 Pt 2):H1769-74, 1997.

BEM-ARI, E.T., GARRISON, J.C. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. **Am. J.Physiol**; 255:E70-79, 1988.

BERNARDO QUÍMICA. **Manual de identificação de pragas de produtos armazenados**. 3 Ed. São Vicente, 2006.

BECARI, C., SIVIERI, D.O., SANTOS, C.F., MOYSÉS, M.K., OLIVEIRA, E.B., AND SALGADO, M.C.O. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 46: 498–504, 2005.

BECARI, C., TEIXEIRA, F.R., OLIVEIRA, E., B., SALGADO, M., C., O. Angiotensin-converting enzyme inhibition augments the expression of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301: H565-570, 2011.

BECARI, C., SILVA, M., A., B., DURAND, M., T., PRADO, C., M., OLIVEIRA, E., B., RIBEIRO, M., S, SALGADO, H., C., SALGADO, M., C., O et al. Elastase-2, an angiotensin II-generating enzyme, contributes to increased angiotensin II in resistance arteries of mice with myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 174(10):1104–1115, 2017.

BERRY. C., TOUYZ, R., DOMINICZAK, A., F., WEBB RC, JOHNS DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology and interactions with ceramide. **Am J Physiol.** ;281:H2332–65, 2001.

BERRIDGE, M., J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messenger. **Annu Ver Biochem** ;56:159-83, 1987.

BOFF, M.I.C.; GANDIN, C.L.G. Principais pragas na cultura da melancia e seu controle. *Agropecuário Catarinense*, Florianópolis, v.5, p.39-41, 1992.

BOTOS, I., MEYER, E., NGUYEN, M., SWANSON, S.M., KOOMEN, J.M., RUSSELL, D.H., MEYER, E.F.. The structure of an insect chymotrypsin. **J. Mol. Biol.** 298, 895 – 901, 2000.

BOOR, P. e FLOEGE, J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 38(7), 441 – 50, 2011.

BUJAK-GIZYCKA, B., OLSZANECKI, R., SUSKI, M., MADEJ, J., STACHOWICZ, A., KORBUT, R. Angiotensinogen metabolism in rat aorta: robust formation of proangiotensin-12. **Journal of Physiology and Pharmacology.** 61:679-82, 2010.

BUTTS, B., GOEDEL, L., A., GEORGE, D., J., et al. Increased Inflammation in Pericardial Fluid Persists 48 Hours After Cardiac Surgery. **Circulation.** 136(23):2284-86, 2017.

BRACKNEY, D., E., ISOE, J., TH, W., C., B., ZAMORA, J., FOY, B., D., MIESFELD, R., L., OLSON, K.E.. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.** 56, 736-744, 2010.

BROEHAN, G., ARAKANE, Y., BEEMAN, R., W., KRAMER, K., J., MUTHURKRISHNAN, S., MERZENDORFER, H.. Chymotrypsin - like peptidases from *Tribolium castaneum*: a role in molting revealed by interference. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** 40, 274 – 183, 2010.

BROWN, S.J., SHIPPY, T.D., MILLER, S., BOLOGNESI, R., BEEMAN, R.W., LORENZEN, M.D., BUCHER, G., WIMMER, E.A., KLINGLER, M. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. **Cold Spring Harb. Protoc.** 2009 (pdb.emo126), 2009.

BRUNTON, L., L., PARKER, K., L., BLUMENTHAL, D., K., BUXTON, I., L., O. **Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica** – Porto Alegre: AMGH, 2010.

CAMARGO, A.C.M., IANZER, D., GUERREIRO, J.R., SERRANO, S.M.T. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon* 2012; 59:516-523.

CAREY, R., M., & PADIA, S., H. Role of angiotensin AT (2) receptors in natriuresis: Intrarenal mechanisms and therapeutic potential. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 40 (8), 527 – 534, 2013.

CARPENTIER M., GUILLEMETTE C., BAILEY J. L., BOILEAU G., JEANNOTTE L., et al.. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. **Mol. Cell. Biol.** 24: 4428–4437, 2004.

CALDWELL, P., R., B., SEEGAL, B., C. HSU, K., C., DAS, M., SOFFER, R., L.. Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. **Science** 191: 1050–1051, 1976.

CAO, X., HE, Y., HU, Y., ZHANG, X., WANG, Y., ZOU, Z., CHEN, Y., BLISSARD, G.W., KANOST, M.R., JIANG, H.. Sequence conservation, phylogenetic

relationships, and expression profiles of nondigestive serine proteases and serine protease homologs in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 62, 51-63, 2015.

CAT, A., N., D., TOUYZ, R., M.. A new look at the renin – angiotensin system - focusing on the vascular system (Review). 32, 2141 – 2150, 2011.

CERENIUS, L., KAWABATA, S., LEE, B., L., NONAKA, M., SODERHALL, K.. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 575 – 583, 2010.

CHAPMAN A., D. Number of Living Species in Australia and the World. Report for the Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia. September; 2009.

CHANDRASEKHARAN, U., M., SANKER, S., GLYNIAS, M., J., KARNIK, S., S., HUSAIN, A.. Angiotensin II – forming activity in a reconstructed ancestral chymase. *Science (New York, N. Y.)*, v. 271, n 5248, 502 – 5, 1996.

CHA, S., A., PARK, B., M., GAO, S., KIM, S., H.. Stimulation of ANP by angiotensin-(1-9) via the angiotensin type 2 receptor. *Life Sci.* 93:934–940, 2013.

CHO, W.L., DEITSCH, K.W., RAIKHEL, A.S.. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10821–10824, 1991.

CHEN, Z., SCHLIPALIUS, D., OPIT, G., SUBRAMANYAM, B., PHILLIPS, T.W., 2015. Diagnostic molecular markers for phosphine resistance in U.S. populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. **PLoS One** 10, e0121343, 2015.

CORNELL, M., J., WILLIAMS T., A., LAMANGO N., S., COATES D., CORVOL P., SOUBRIER F., HOHEISEL, J., LERACH, H, ISAAC, R., E. Cloning and expression. Of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. **J Biol Chem** 270, 13613– 13619, 1995.

CORVOL, P., MICHAUD, A., SOUBRIER, F. e WILLIAMS, T. A. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. **J. Hypertens Suppl.** 13, S3–10 (1995).

CROWSON R., A. The biology of the Coleoptera. London: Academic Press; 1981

CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H., S., Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20:1637–1648, 1971.

CUSHMAN, D.W., ONDETTI, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension** 1991; 17:589-592.

DABORN, P. J; YEN, J. L.; BOGWITZ, M. R. et al. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*. v. 297, p. 2253–2256, 2002.

DAS, M., SOFFER, R., L. Pulmonary angiotensin-converting enzyme structural and catalytic properties. **J Biol Chem** 250:6762–6768, 1975.

DEGUCHI, E et al, Dipeptidase-inactivated tACE action in vivo: selective inhibition of sperm-zona pellucida binding in the mouse. **Biol. Reprod.** 2007, v 77, p 794–802.

DELL'ITALIA LJ, COLLAWN JF, FERRARIO CM. Multifunctional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. **Circ Res.** 122(2):319-36. 2018.

DOUMBIA, M., DOUAN, B.G., KWADJO, K.E., KRA, D.K., MARTEL, V., DAGNOGO, M. Effectiveness of diatomaceous earth for control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* and *Palorus subdepressus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Stored Prod. Res.** 57, 1 – 5, 2014.

DONOGHUE, M, HSIEH, F., BARONAS. E, GODBOUT, K., GOSSELIN, M., STAGLIANO, N., DONOVAN, M., WOOLF, B., ROBISON, K., JEYASEELAN, R., BREITBART, R.E., ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research.** 87:E1-9, 2000.

Dowdy, A., K.. Mortality of red four beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) exposed to high temperature and diatomaceous earth combinations. **J. Stored Prod. Res.** 35: 175–182, 1999.

ELIAS, M.C.; LORINI, I.; OLIVEIRA, M.; MORÁS, A.; SCHIAVON, R.A. Pragas e microorganismos no armazenamento de grãos e derivados. In: ELIAS, Moacir Cardoso. Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos. Ed. Santa Cruz. Pelotas, 2008.

EKBOTE, U., COATES, D., ISAAC, R., E.. A mosquito (*Anopheles stephensi*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. **FEBS Lett.** 455, 219–222, 1999.

FOURNIER, D., LUFT, F.C., BADER, M., GANTEN, D., ANDRADE-NAVARRO, M., A... Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. **J. Mol. Med. (Berl)** 90, 495–508, 2012.

FARONI, L. R. D` & SOUSA, A. H; **Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados.** Minas Gerais: Viçosa, 2006, p 379 – 380.

FERRARIO, C.M., CHAPPELL, M.C. What is new in the renin-angiotensin system? Novel angiotensin peptides. **Cell Mol Life Sci** ; 61:2720-2727, 2004.

FLORES-MUÑOZ, M., SMITH, N., J., HAGGERTY, C., MILLIGAN, G., NICKLIN, S., A. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. **J Physiol.** 589:939–951, 2011.

FROOGH, G., PINTO, J., T., L., E., Y., et al. Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physion.* 312(2):H223 – H31, 2017.

FOOTTIT, R., G., ADLER, P., H. Insect biodiversity: science and society. Chichester: John Wiley & Sons; 2009

FYHRQUIST, F. SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med** 2008; 264:224-36.

FUCHS, S., FRENZEL, K., HUBERT, C., LYNG, R., MULLER, L., MICHAUD, A., XIAO, H., D., ADAM, S., J., W., CAPECCHI, M., R., CORVOL, P., SHUR, B., D., BERNSTEIN, K., E.. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. **Nat Med** 11:1140–2, 2005.

FU, P., SUN, W., LAI, J., SHEN, Y., H., ZHANG, Z.. Identification of two isoforms of Pop in the domestic silkworm, *Bombyx mori*: Cloning, characterization and expression analysis. *GENE.* 667, 101 – 111, 2018.

GALEN, F., X., DEVAUX, C., HOUOT, A., M., MENARD, J., CORVOL, et al. Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidences for a renin precursor. **J Clin Invest.** 73(4):1144 – 55, 1984.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S. et al. Entomologia agrícola. **Piracicaba, SP: FEALQ**, 920 p, 2002.

GONZALEZ-VILLALOBOS, R., A., SHEN, X., Z., BERNSTEIN, E., A. , JANJULIA, T., TAYLOR, B. , GIANI, J., F. , BLACKWELL, W-L., B. , SHAH, K., H. , SHI, P., D., FUCHS, S., BERNSTEIN, K., E.. Rediscovering ACE: novel insights into the many roles of the angiotensin-converting enzyme. **J Mol Med (Berl).** 91:1143– 1154, 2013.

GRADY, E. F. Expression of AT 2 receptors in the developing rat fetus. **J Clin Invest**, 88,821 – 33, 1991.

GIBBONS, G.H., DZAU, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. **N Engl J Med.** 19: 1431-38, 1994.

GIANI, J. F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E262–E271, 2009.

GRILLO, L. A. M. **Metabolismo de lipídeos no intestino do inseto *Rhodnius prolixus***. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

GRIMALDI, D., ENGEL, M., S. Evolution of the insects. **Cambridge: Cambridge University Press**; 2005.

GUANG, C., PHILLIPS, R.D., JIANG, B., MILANI, F. Three key proteases-angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin-within and beyond the renin-angiotensin system (Review). **Archives of Cardiovascular Disease** **2012**; 105:373-385.

HARDING, J., W., JANSEEN, L., L., HANESWORTH, J., M., ROBERTS, K., PAGE, T., A., WRIGHT, J., W. Release of angiotensin in paraventricular nucleus in response to physiological and chemical stimuli. **Am J Physiol** ; 262:F17 – 23, 1192.

HAMOMMOCK, B. D, et al. Effects of juvenile hormone (JH) analog insecticides on larval development and JH esterase activity in two spodopterans. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v128, 2016 P. 30-36.

HANSEN, J.,L., SERVANT, G., BARANSKI, T., J., FUJITA, T., IIRI, T., SHEIKH, S.,P.. Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G (i) activation. **Circ Res**;87:753–9, 2000.

HARRISON, C., ACHARYA, K. R.. ACE for all – a molecular perspective. *J. Cell Commun. Signal.* 8, 195–210, 2014.

HAUBRUGUE, E., AMICHOT, M., CUANY, A, BERGUE, J. B, ARNAUD, L., Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion – specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32, 1181 – 1190, 2002.

HARRISON – BERNARD, L., M. The renal renin - angiotensin system. **Adv Physiol Educ.** 33(4), 270 – 4, 2009.

MEYER, H., PANZ, M., ZMOJDZIAN, M., JAGLA, K., PAULULAT, A.. Neprilysin 4, a novel endopeptidase from *Drosophila melanogaster*, displays distinct substrate specificities and exceptional solubility states. **The Journal of Experimental Biology.** 212, 3673 – 3683, 2009.

HICKS, D.; DUNCAN, M. J; JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, Oct. 1997.

HIRUMA, K. AND KANEKO, Y..Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. **Current Topics in Developmental Biology**, 103, 73–100, 2013.

HEDSTROM, L.. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.** 102, 4501 – 4524, 2002

HENS, K., VANDINGENEN, A., MACOURS, N., BAGGERMAN, G., KARAOGLANOVIC, A.C., SCHOOF, L., DE, L.A., HUYBRECHTS, R. . Characterization of four substrates emphasizes kinetic similarity between insect and human C-domain angiotensin-converting enzyme. **Eur. J. Biochem.** 269, 3522–3530, 2002.

HEALY, D., P., SONG, L.. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part I: spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. 33:740–745, 1999.

HEINE H & LIEN E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. **Int Arch Allergy Immunol** 130: 180–192, 2003.

HOFFMANN J.A., KAFATOS F.C., JANEWAY C.A. & EZEKOWITZ RAB
Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 284: 1313–1317, 1999.

HOLLENBERG, N.K., FISHER, N.D., PRICE, D.A. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. **Hypertension**. 32: 387–92, 1998.

HOOPER, N.M., TURNER, A.J. An ACE structure. **Nature Structural Biology**. 10:155-7, 2003.

HOOPER, N., M.. Proteases: A primer. In: Hooper, N., M., (Ed.) Essays in Biochemistry: Proteases in Biology and Medicine. London: Portland Press, pp 1 – 8, 2002.

HORIUCHI, M., AKISHITA. M., DZAU. V., J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. **Hypertension**, 33: 613-621, 1999.

HUNT, T., BERGSTEN, J., LEVKANICOVA, Z. , PAPADOPOULOU, A. , JOHN O., S. , WILD, R et al. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. **Science**; 318(5858):1913– 1916. 2007.

HURT, R., C., GARRETT, J., C., KEIFER, O., P., JR., LINARES, A., COULING., L., SPETH, R., C., RESSLER, K., J., MARVAR, P., J.. Angiotensin type 1a receptors on corticotropin-releasing factor neurons contribute to the expression of conditioned fear. **Genes Brain Behav** 14 (7):526–533, 2015.

HEUTINCK, K., M., BERGE, I., J., M., TEN., HACK. C., E., HAMANN, J., ROWSHANI, A., T.. Serine protease of the human immune system in health and disease. **Molecular immunology**, v. 47, 11 – 12, p 1943 – 55, 2010.

ICIMOTO, M., Y., FERREIRA, J., C., YOKOMIZO, C., H., BIM, L., V., MAREM, A., GILIO, J., M., OLIVEIRA, V., NATES, I., L.. Redox modulation of thimet oligopeptidase activity by hydrogen peroxide. **FESB Open Bio**. 7, 1037 – 1050, 2017.

ISAAC, R., SCHOOF, L., WILLIAMS, T.A., VEELAERT, D., SAJID, M., CORVOL, P., COATES, D.. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. **Biochem. J.** 330 (Pt 1), 61–65, 1998.

ISAAC, R., E., EKBOTE, U., COATES, D., SHIRRAS, A.D. Insect angiotensin-converting enzyme. A processing enzyme with broad substrate specificity and a role in reproduction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 897, 342–347, 1999.

ISAAC, R.E., LAMANGO, N.S., EKBOTE, U., TAYLOR, C.A., HURST, D., WEAVER, R.J., CARHAN, A., BURNHAM, S., SHIRRAS, A.D. . Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. **Peptides** 28, 153–162, 2007.

ISAAC, R.E., BLAND, N., D., SHIRRAS, A.D. Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect neuropeptides. **Gen. Comp. Endocrinol.** 162, 8–17, 2009.

ISAAC R. e., NASSEL D. R. Identification and localization of a neprilysin-like activity that degrades tachykinin-related peptides in the brain of the cockroach, *leucophaea maderae*, and locust, *locusta migratoria*. **j. comp. neurol.** 457: 57–66, 2003.

INDRASITH, L, S., SASAKI, T., YAMASHITA, O.. A unique protease responsible for selective degradation of yolk protein in *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cleavage profile. *J. Biol. Chem.* 263, 1045 – 1051, 1988.

IKEDA, M., YAGINUMA, T., KOBAYASHI, M., YAMASHITA, O.. cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm *Bombox mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99, 405 – 411, 1991.

JINDRA, M., PALLI, S.R. RIDDIFORD, L., M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. **Annual Review of Entomology**, 58, 181–204, 2013.

JIANG H., LKHAGVA A., DAUBNEROVA I., CHAE H. S., SIMO L., et al Natalisin, a tachykinin-like signaling system, regulates sexual activity and fecundity in insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110: E3526–E3534, 2013,

JIANG, H., VILCINSKAS, A., KANOST, M., R.. Immunity in Lepidoptera insects. In: Soderhall, K. (Ed.), *Invertebrate Immunity*. Landes Bioscience, 2010.

JACKMAN, H., L., MASSAD, M., G., SEKOSAN, M., TAN, F., BROVKOVYCH, V., MARCIC, B., M., ERDÖS, E., G.. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. **Hypertension**. 39:976–981, 2002

KANOST, M., R. e CLEM, R., J.. Insect Proteases. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. 346 – 364, 2012.

KARLSON, P. New concepts on the mode of action of hormones. **Perspectives in Biology and Medicine**. v.6, 1963, p.203-214.

KAVANAGH K e REEVES E,P; Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev** 28: 101–112, 2004.

KANOST, M., R., GORMAN, M., G.. Phenoloxidase in insect immunity. In: Beckage, N(Ed.), *Insect Immunology*. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, pp, 69 – 96, 2008.

KELLY, D., COCKERILL, G., NG, L., L., THOMPSON, M., KHAN, S., SAMANI, N., J., SQUIRE, I., B.. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *European heart journal*. 28(6):711-718, 2007

KHAJURIA, C., ZHU, Y., C., CHEN, M., BUSCHMAN, L., L., HIGGINS, R., A., YAO, J., CRESPO, A., L., B., SIEGFRIED, B., D., MUTHKRISHNAN, S., ZHU, K., Y.. Expressed sequence tags from larval gut of the european corn borer (*ostrinia nubilalis*): exploring candidate genes potentially involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity and resistance. **BMC Genomics**. 10 ,286, 2009.

KITTANA, N.. Angiotensin – converting enzyme 2 –Angiotensin 1 – 7/1 – 9 system: novel promising targets for heart failure treatment (Review). **Wiley Online Library**. 32:14 – 25, 2018

KRAMAR, E., A., KRISHNAN, R., HARDING, J., W., WRIGHT, J., W. Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow. **Regul Pept**; 74:185–192, 1998.

KIMBRELL DA & BEUTLER B. The evolution of genetics and innate immunity. **Nat Rev Genet** 2: 256–267, 2001.

KINOSHITA, A., URATA, H., BUMPUS, F., M., HUSAIN, A.. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. **J Biol Chem**. 266(29):19192-7, 1991,

KUBA, K., IMAI, Y., OHTO-NAKANISHI, T., PENNINGER, J.M. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. **Pharmacology and Therapeutics**. 28:119-28, 2010.

KUGLER, P. Aminopeptidase A is angiotensinase A. II. Biochemical studies on aminopeptidase A and M in rat kidney homogenate. **Histochemistry**.74:247–261, 1982.

KNUUTTILA, J., E., A., TÖRÖNEN, P., CASTRÉN, E. Effects of antidepressant drug imipramine on gene expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem Res* 29(6):1235–1244. 2004.

KUKALOVA-PECK, J., BEUTEL R., G. Is the Carboniferous† *Adiphebia lacoana* really the “oldest beetle”? Critical reassessment and description of a new Permian beetle family. *European Journal of Entomology*. 109(4):633–645, 2012.

KALSI, M., PALLI, S., R., Transcription factors, CncC and Maf, regulate expression of CYP6BQ genes responsible for deltamethrin resistance in *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem. Mol. Biol**. 65, 47 – 56, 2015.

KHUSH RS & LEMAITRE B. Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. **Trends Genet** 16: 442–449, 2000.

KRAUT, J.. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. **Annu. Rev. Biochem**. 46, 331 – 358, 1977.

LAW, J., H., DUNN, P.E., KRAMER, K.J. Insect proteases and peptidases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 45, 389 – 425, 1977.

LANGFORD, K., G., ZHOU, Y., RUSSELL, L., D., WILCOX, J., N., BERNSTEIN, K., E., Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. **Biol Reprod.** 48:1210–1218, 1993.

LIU, H., W., Y., TANG, X., GUO, P., WANG, ZHOU, Q., X., ZHAO, P.. A midgut-specific serine protease, bmsp36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *bombyx mori*. *Sci Insect.* 24(5), 753 – 767, 2016.

LORINE, I; KRZYZANOWSKI, C; FRANÇA – NETO, J. B; HENNING, A. A; HENNING, F. A; Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas. **Embrapa Brasilia, D.F**, 2015.

LEHANE, M. J. Biology of blood-sucking insects. **Harper Collin Academic.** 1991, p.77-85

LEMEIRE, E., VANHOLME, B., VAN, L.T., VAN, C.J., SMAGGHE, G., 2008. Angiotensin converting enzyme in *Spodoptera littoralis*: molecular characterization, expression and activity profile during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 166–175, 2008.

MACOURS, N., HENS, K., FRANCIS, C., DE LOOF, A., HUYBRECHTS, R.. Molecular evidence for the expression of angiotensin converting enzyme in hemocytes of *Locusta migratoria*: stimulation by bacterial lipopolysaccharide challenge. **J. Insect Physiol.** 49, 739–746, 2003.

MAKI, N e YAMASHITA, O.. Purification and characterization of a protease degrading 30 – kDa yolk proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 721 – 728, 1997.

MAKI, N e YAMASHITA.. The 30K protease A responsible for 30 – kDa yolk protein degradation of the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA structure, developmental change and regulation by feeding. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 407 – 413, 2001.

MARANHÃO Z.G. **Entomologia Geral 2ª edição**, São Paulo, Nobel, 1977.

MEDZHITOV R & JANEWAY CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol** 9: 4–9, 1997.

MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol** 1: 135–145, 2001.

MYLONAKIS, E. & ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host–pathogen interactions. **Infect Immun** 73: 3833–3841, 2005.

MURRAY, A.; HUNT, T. **The cell cycle**. Ed. Oxford University, Oress, New York, 1993.

MURRAY, B., A., FITZGERALD, R., J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. **Curr Pharm Des.** 13:773—91, 2007.

NEURATH, H. . Evolution of proteolytic enzymes. **Science** 224, 350 – 357, 1984.

NGUYEN, G. CONTREPAS, A. Physiology and pharmacology of the (pro) renin receptor. **Current Opinion in pharmacology** 2008;8:127-32.

NEGRISOLI-JÚNIOR, A. S.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C. R. B.; SANTOS, N. L., GUZZO, E. C. **Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 6p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 116).

OCARANZA, M., P., GODOY, I., JALIL, J., E., VARAS, M., COLLEANTES, P., PINTO, M., et al, Enalapril atenuantes downregulation of angiotensin – converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. **Hypertension.** 48: 572 – 8, 2006.

OCARANZA, M., P., LAVANDEIRO, S., JALIL, M., E., MOYA, J., PINTO, M., NOVOA, U., et al, Angiotensin – (1 – 9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **J Hypertens.** 28: 1054 – 64, 2010.

OCARANZA, M., P., MOYA, J., BARRIENTOS, V., ALZAMORA, R., HEVIA, D., MORALES, C., PINTO, M., ESCUDERO, N., GARCÍA, L. NOVOA, U., AYALA, P., DÍAZ-ARAYA, G., GODOY, I., CHIONG, M., LAVANDERO, S., JALIL, J., E., MICHEA, L.. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. **J Hypertens.** 32:771–783, 2014.

OLIVEIRA, C.R.B.; MARINHO, V.L.A.; ASTOLFI, F.S.; AZEVEDO, M.; CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W. Purification, serology and some properties of the purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v.19, n.3, p.455-462, 1994.

OKAMURA, T., OKUNISHI, H., AYAJIKI, K., TODA, N. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery: role of two different angiotensin IIgeneranting enzymes. **J Cardiovasc Pharmacol.** (15):353-359, 1990.

OHTSUKI, S., HOMMA, K., KURATA, S., KOMANO, H., NATORI, S. A prolyl endopeptidase of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): its purification and suggestion for its participation in the differentiation of the imaginal discs. **J Biochem** 115: 449-453, 1994.

OHTSUKI, S, HOMMA, K, KURATA, S., NATORI, S. Molecular cloning of cDNA for *Sarcophaga* prolyl endopeptidase and characterization of the recombinant enzyme produced by an *E. coli* expression system. **Insect Biochem Mol Biol** 27: 337-343. 1997.

OHTUSKI, S., HOMMA, K., KURATA, S., NATORI, S. Nuclear localization and involvement in DNA synthesis of Sarcophaga prolyl endopeptidase. **J Biochem** 121: 1176-1181, 1997.

PAULA, C.A., SOUSA, M.V., SALGADO, C.O.M., OLIVEIRA, E.B. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. ,1388:227-238. 1998.

PAGE, M.. J e DI CERA, E.. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell Mol. Life Sci.** 65, 1220 – 1236, 2008.

PALMIERI, F., E., BAUSBACK, H., H., WARD, P., E. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:173–180.

PARKIN, E.T., TURNER, A.J., HOOPER, N.M. Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. **Protein and Peptide Letter** ;11:423-32, 2004.

PARK, Y., AIKINS, J., WANG, L.J., BEEMAN, R.W., OPPERT, B., LORD, J.C., BROWN, S.J., LORENZEN, M.D., RICHARDS, S., WEINSTOCK, G.M., GIBBS, R.a. Analysis of transcriptome data in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 38, 380–386, 2008.

PETRIE, M.C., PADMANABHAN, N., MCDONALD, J.E., HILLIER, C., CONNELL, J.M.C. M., C., MURRAY, J.J.V. Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**; 37:1056-61, 2001.

PERONA, J.J e CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Sci.** 4, 337 – 360, 1995.

PIMENTEL, M., A., G., VIEIRA, V., A., MENDES, S., M., COSTA, R., V., ALBERNAZ, W., M., Recomendações de boas práticas de armazenamento de milho em espiga para agricultura familiar. 161, **Embrapa – Minas Gerais, MG**, 2011.

PHANISH, M., K., WINN, S., K., DOCKRELL, M., E. Connective tissue growth factor – (CTGF, CCN2) – a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. **Nephrol.** 114(3), 82 – 92, 2010.

POUPARDIN, R., REYNAUD, S., STROND, CLARE, RANSON, HILARY, VONTAS, J., DAVID, J., P.. Cross – induction of detoxification genes by environmental

xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540 – 551, 2008.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. São Paulo: Holos editora, 2012. 810p.

RAIKHEL, A., S e DHADIALLA, T., S.. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217 – 251, 1992.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J.,. Families of serine peptidases. **Methods Enzymol.** 244, 19 – 61, 1994.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., KOK, C.Y., KONG, J., BARRETT, A.J., MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.** 36, D320 - D325, 2008.

RAWLINGS, N., D., BARRET, A., J., BATEMAN, A.. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227 - D233, 2010.

RESENDE, M., M. & MILL, J., G. Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. **Arq Bras Cardiol.** 78, 425 – 31, 2002.

RIVIERE, G., MICHAUD, A., DELOFFRE, L., VANDENBULCKE, F., LEVOYE, A., BRETON, C., CORVOL, P., SALZET, M., VIEAU, D. Characterization of the first non-insect invertebrate functional angiotensin-converting enzyme (ACE): leech TtACE resembles the N-domain of mammalian ACE. **Biochem. J.** 382, 565–573, 2004.

RICE, G., I., THOMAS, D., A., GRANT, P., J., TURNER, A., J. , HOOPER, N., M.. Evaluation of angiotensin converting Enzyme (ACE) ,its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem J** 383: 45–51, 2004

RIORDAN, J.F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. **Genome Biology** 4:225, 2003.

RICHARDS, S., GIBBS, R.A., WEINSTOCK, G.M., BROWN, S.J., DENELL, R., BEEMAN, R.W., BUCHER, G., FRIEDRICH, M., GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.P., KLINGLER, M., LORENZEN, M., ROTH, S., SCHRÖDER, R., TAUTZ, D., ZDOBNOV, E.M., MUZNY, D., WEINSTOCK, G.M., ATTAWAY, T., BELL, S., BUHAY, C.J., CHANDRABOSE, M.N., CHAVEZ, D., CLERK-BLANKENBURG, K.P., CREE, A., DAO, M., DAVIS, C., CHACKO, J., DINH, H., DUGAN-ROCHA, S., FOWLER, G., GARNER, T.T., GARNES, J., GNIRKE, A., HAWES, A., HERNANDEZ, J., HINES, S., HOLDER, M., HUME, J., JHANGIANI, S.N., JOSHI, V., KHAN, Z.M., JACKSON, L., KOVAR, C., KOWIS, A., LEE, S., LEWIS, L.R., MARGOLIS, J., MORGAN, M., NAZARETH, L.V., NGUYEN, N., OKWUONU, G., PARKER, D., RUIZ, S.-J., SANTIBANEZ, J., SAVARD, J., SCHERER, S.E., SCHNEIDER, B., SODERGREN, E., TAUTZ, D., VATTAIL, S., VILLASANA, D., WHITE, C.S., WRIGHT, R., PARK, Y., LORD, J., OPPERT, B., LORENZEN, M., WANG, L., SAVARD, J., TAUTZ, D., WEINSTOCK, G., LIU, Y., WORLEY, K., ELSIK, C.G., REESE, J.T., ELHAIK, E., LANDAN, G., GRAUR, D., ARENSBURGER, P., ATKINSON, P., BEIDLER, J., DEMUTH, J.P., DRURY, D.W., DU, Y.-Z., FUJIWARA,

H., LORENZEN, M., MASELLI, V., OSANAI, M., PARK, Y., ROBERTSON, H.M., TU, Z., WANG, J., WANG, S., SONG, H., ZHANG, L., SODERGREN, E., WERNER, D., STANKE, M., MORGENSTERN, B., SOLOVYEV, V., KOSAREV, P., BROWN, G., CHEN, H.-C., ERMOLAEVA, O., HLAVINA, W., KAPUSTIN, Y., KIRYUTIN, B., KITTS, P., MAGLOTT, D., PRUITT, K., SAPOJNIKOV, V., SOUVOROV, A., MACKEY, A.J., WATERHOUSE, R.M., WYDER, S., ZDOBNOV, E.M., WYDER, S., KRIVENTSEVA, E.V., KADOWAKI, T., BORK, P., ARANDA, M., BAO, R., BEERMANN, A., BERNIS, N., BOLOGNESI, R., BONNETON, F., BOPP, D., BUCHER, G., BUTTS, T., CHAUMOT, A., DENELL, R.E., FERRIER, D.E.K., GORDON, C.M., JINDRA, M., KLINGLER, M., LAN, Q., LATTORFF, H.M.G., LAUDET, V., VON LEVETSOW, C., LIU, Z., LUTZ, R., LYNCH, J.A., DA FONSECA, R.N., POSNIEN, N., REUTER, R., ROTH, S., SAVARD, J., SCHINKO, J.B., SCHMITT, C., SCHOPPMEIER, M., SCHRÖDER, R., SHIPPY, T.D., SIMONNET, F., MARQUES-SOUZA, H., TAUTZ, D., TOMOYASU, Y., TRAUNER, J., VAN DER ZEE, M., VERVOORT, M., WITTKOPP, N., WIMMER, E.A., YANG, X., JONES, A.K., SATTELLE, D.B., EBERT, P.R., NELSON, D., SCOTT, J.G., MUTHUKRISHNAN, S., KRAMER, K.J., ARAKANE, Y., ZHU, Q., HOGENKAMP, D., DIXIT, R., JIANG, H., ZOU, Z., MARSHALL, J., ELPIDINA, E., VINOKUROV, K., OPPERT, C., ZOU, Z., EVANS, J., LU, Z., ZHAO, P., SUMATHIPALA, N., ALTINCICEK, B., VILCINSKAS, A., WILLIAMS, M., HULTMARK, D., HETRU, C., JIANG, H., GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.P., HAUSER, F., CAZZAMALI, G., WILLIAMSON, M., PARK, Y., LI, B., TANAKA, Y., PREDEL, R., NEUPERT, S., SCHACHTNER, J., VERLEYEN, P., RAIBLE, F., BORK, P., FRIEDRICH, M., WALDEN, K.K.O., ROBERTSON, H.M., ANGELI, S., FORÊT, S., SCHUETZ, S., MALESZKA, R., LORENZEN, M., TOMOYASU, Y., MILLER, S.C., GROSSMANN, D., BUCHER, G. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature** 452, 949–955. 2008.

RASMUSSEN, H., TAKUWA, Y., PARK, S., Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. **FASEB J** ;1:177-8, 1987.

ROGERS, T., B., LOKUTA, A., J. .Angiotensin II signal transduction pathway in the cardiovascular system. **Trends Cardiovasc Med**; 4:110-6, 1994.

ROKS, A., J., VAN, GEEL, P., P., PINTO, Y.,M., et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. **Hypertension**. 34:296–301, 1999.

ROSS, J., JIANG, H., KANOST, M.R., WANG, Y.. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. **Gene** 304, 117-131, 2003.

SCHOOFS, L., VEELAERT, D., DE, L.A., HUYBRECHTS, R., ISAAC, E., Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. **Brain Res**. 785, 215–227, 1998.

SAAVEDRA – RODRIGUES, K., STRONDE, C., FLORES, A., E., GARCIA – LUNA, S., REYES – SOLIS, G., RANSON, H., HEMINGWAY, J., BLACK IV, W., C. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. **Insect Mol. Biol.** 23, 199 – 215, 2014.

STRAGIER B, CLINCKERS R, MEURS A, DE BUNDEL D, SARRE S, EBINGER G, MICHOTTE Y, SMOLDERS I. Involvement of the somatostatin-2 receptor in the anticonvulsant effect of angiotensin IV against pilocarpine-induced limbic seizures in rats. **J Neurochem**. 98:1100–1113, 2006.

SANTOS, C.F., CAPRIO, M.A.V., OLIVEIRA, E.B., SALGADO, M.C.O., SCHIPPERS, D.N., MUNZENMAIER, D., H., ET, A., L.. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. 285: H775-783, 2003.

SANTOS, R., A., CAMPAGNOLE-SANTOS, M., J., ANDRADE, S., P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**; 91:45–62, 2000.

SANTOS, D., S. **Desenvolvimento de uma plataforma analítica para análise qualitativa e quantitativa de peptídeos de cérebros de abelha *Apis mellífera***. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual Paulista – Unesp. Rio Claro, 2013.

SANTOS, R., A., FERREIRA, A., J.. Angiotensin – (1 – 7) and the renin – angiotensin system. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 16:122 – 8, 2007.

SANTOS, S. H. et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1–7). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 30, 953–961, 2010.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. **Digestão em insetos**. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; SILVA-NETO, M. A. C.; VAZ-JUNIOR, I. S.(Eds.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro: INCT-EM, 2012. 582p.

SIMPSON, B., K., HAARD, H., F., Cold-adapted enzymes from fish. In: Knorr D., editor. *Food Biotechnology*. Marcel Dekker; Quebec, QC, Canada. pp. 495–528, 2013.

SKEGGS, L., T., MARSH, W., H, KAHN, J., R., SHUMWAY, N., P. The existence of two forms of hypertensin. **J Exp Med** 100:275–282, 1954.

SCHWEDA, F., FRIIS, U., WAGNER C., SKOTT, O., KURTZ, A. Renin release. **Physiology (Bethesda)**. 22: 310 – 9, 2007.

SONG, L., HEALY, D., P. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. **Hypertension**. 33:746–752, 1999.

SIBONY, M., GASC, J., SOUBRIER, F., ALHENC-GELAS, F., CORVOL, P.. Gene expression. And tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. **Hypertension** 21:827–835, 1993.

SIBONY, M., SEGRETAİN, D., GASC, J. Angiotensin-converting enzyme in murine testis : step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. **Biol Reprod** 50:1015–1026, 1994.

SCHECHTER, I e BERGER, A.. On the size of the active site in protease. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157 – 162, 1967.

SRINIVASAN, A., GIRI, A.P., GUPTA, V.S.. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 11, 132 - 154, 2006.

TAN M., W. Cross-species infections and their analysis. **Annu Rev Microbiol** 56: 539–565, 2002.

TAKAI, S., MIYAZAKI, M.. Inhibition of Transforming Growth Factor-betaActivation is a Novel Effect of Chymase Inactivation. **Letters in Drug Design & Discovery.** 2(1):19-22, 2005.

TATEI, K., CAI, H, IP YT, LEV te INE, M. Race: a Drosophila homologue of the angiotensin-converting enzyme. **Mech Dev** 51:157–168, 1995.

TCHEKALAROVA, J., SOTIRIOU, E., ANGELATOU, F. Down-regulation of dopamine D1 and D2 receptors in the basal ganglia of PTZ kindling model of epilepsy: effects of angiotensin IV. **Brain Res.** 1024:159–166, 2004.

TILLEY, D., R., CASADA, M., E., ARTHUR, F., H. Heat treatment for disinfestation of empty grain storage bins. **J. Stored Prod. Res.** 43(3): 221–228, 2007.

TIPNIS, S.R., HOOPER, N.M., HYDE, R., KARRAN, E., CHRISTIE, G., TURNER, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry.** 275:33238-43, 2000.

TURNER, A., J., HOOPER, N., M.. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.** 23:177—83, 2002.

URATA, H., HEALY, B., STEWART, R., W, et al. Angiotensin II receptors in normal and failing human hearts. **J Clin Endocrinol Metab.** 69(1):54-66, 1989.

URATA, H., KINOSHITA, A., MISONO, K., S., et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **J Biol Chem,** 265(36):22348-57, 1990.

URATA, H.. Chymase and matrix metalloproteinase. **Hypertens Res.** 30(1):3-4, 2007.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow),** v. 69, n. 1, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VARADÍNOV, A, Z., WANG, Y.J., KUCEROV, A, Z., STEJSKAL, V., OPIT, G., CAO, Y., LI, F.J., LI, Z.H. COI barcode based species-specific primers for identification of five species of stored-product pests from genus cryptolestes (coleoptera: laemophloeidae). **Bull. Entomol. Res.** 105, 202 – 209, 2015.

VANDINGENEN, A., HENS, K., MACOURS, N., ZHU, W., JANSSEN, I., BREUER, M., DE, L.A., HUYBRECHTS, R. Captopril, a specific inhibitor of angiotensin converting enzyme, enhances both trypsin and vitellogenin titers in the grey fleshfly *Neobellieria bullata*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 47, 161–167, 2001.

VANDINGENEN, A., HENS, K., MACOURS, N., SCHOOF, L., DE, L.A., HUYBRECHTS, R.. Presence of angiotensin converting enzyme (ACE) interactive factors in ovaries of the grey fleshfly *Neobellieria bullata*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 132, 27–35, 2002.

VLEUGELS, R.; LENAERTS, C.; VANDEN BROECK, J.; VERLINDEN, H. Signalling properties and pharmacology of a 5-HT₇ -type serotonin receptor from *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**. v.23, 2014, p.230-243.

VIANA, P. F. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. 6p. (Embrapa, Circular Técnica, 141).

VIEBRANTZ, P. C; **Armazenagem de grãos de milho infestados com *sitophilus zeamais* e *tribolium castaneum* em sistema hermético e convencional**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2014.

VOET, D., VOET, J., G., J.. **Biochemistry**, 3 ed. John Wiley, New York.

WALSH, G.C. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South America pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental Entomology, Lanham**, v.32, n.2, p.276-285, 2003

WALSH, K., A., e WILCOX, P., E.. **Methods Enzymol.** 19, 31-34, 1970.

WISNIEWSKI, K., BORAWSKA, M., CAR, H. The effect of angiotensin II and its fragments on post-alcohol impairment of learning and memory. **Pol J Pharmacol.** 45:23–29, 1993.

WRINGHT, J., W., TAMURA – MYERS, E., WILSON, W., I et al. Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. **Am J Physiol.** 284:R275 – R733, 2003.

WANG, Y.J., LI, Z.H., ZHANG, S.F., VARADÍNOVA, Z., JIANG, F., KU, CEROVA, Z., STEJSKAL, V., OPIT, G., CAO, Y., LI, F.J. DNA barcoding of five common stored-product pest species of genus *Cryptolestes* (Coleoptera: Laemophloeidae). **Bull. Entomol. Res.** 104, 671 – 678, 2014.

WOLF, G.. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. **Antioxid Redox Signal.** 7:1337–1345, 2005.

WOLTERS, P., J., PHAM, C., T., N., MUILENBURG, D., J., et al. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. **J Bio Chem.** 276(21):18551-56, 2001.

WU, Q., KUO, H., C., DENG, G., G.. Serine proteases and cardiac function. **Biochimica et biophysica acta.** 1751, n 1, p 82 – 94, 2005.

YANG, Q., ZHAO, S., KUCEROVA, Z., OPIT, G., CAO, Y., STEJSKAL, V., LI, Z.H.. Rapid molecular diagnosis of the stored-product psocid *Liposcelis corrodens* (Psocodea: liposcelididae): species-specific PCR primers of 16S rDNA and COI. **J. Stored Prod. Res.** 54, 1e7, 2013a.

YANG, Q., ZHAO, S., KUCEROV, A, Z., STEJSKAL, V., OPIT, G., QIN, M., CAO, Y., LI, F., LI, Z.H.. Validation of the 16S rDNA and COI DNA barcoding technique for rapid molecular identification of stored product psocids (Insecta: psocodea: Liposcelididae). **J. Econ. Entomol.** 106, 419e425. 2013b.

ZAMAN, M., A., OPARIL, S., CALHOUN, D., A. Drugs targeting the reninangiotensin-aldosterone system. **Nat Rev Drug Discov** 1:621–636, 2002. doi:10.1038/nrd873

ZANG, S.F., LIU, Y.P., WU, Z.Q.. Beetles Associated with Stored Products in China. **China Agriculture Science and Technology Press**, Beijing, China, pp. 370e420, 1998.

ZHANG, J, LU, A, KONG, L, ZHANG, Q AND LING, E. Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis. **J Biol Chem** 289: 35891-35906, 2014.

ZOU, Z., LOPEZ, D., L., KANOST, M., R., EVANS, J., D., JIANG, H.. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. **Insect Mol. Biol.** 15, 603-614, 2006.

