

SABRINA VARGAS MARTINI

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
AQUAPORINA EM TÚBULOS DE MALPIGHI
DE *Rhodnius prolixus* PELA
5-HIDROXITRIPTAMINA.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Instituto De Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal Do Rio De Janeiro
2006



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
AQUAPORINA EM TÚBULOS DE MALPIGHI
DE *Rhodnius prolixus* PELA
5-HIDROXITRIPTAMINA.

SABRINA VARGAS MARTINI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA), INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

ORIENTADOR: MARCELO MARCOS MORALES
RIO DE JANEIRO
Março/2006

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA AQUAPORINA EM TÚBULOS DE MALPIGHI DE *Rhodnius prolixus* PELA 5-HIDROXITRIPTAMINA.

SABRINA VARGAS MARTINI

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)

Aprovada por:

Prof. Marcelo Einicker Lamas

Prof.(a) Suzete Bressan Nascimento

Prof.(a) Tania Maria Ortiga Carvalho

Prof. Ednildo de Alcantara Machado
(Revisor)

Prof. Marcelo Marcos Morales
(orientador)

Rio de Janeiro
Março/2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Martini, Sabrina Vargas

Modulação da expressão da aquaporina em túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* pela 5-hidroxitriptamina / Sabrina Vargas Martini. Rio de Janeiro UFRJ; IBCCF; 2006

xv: 89 f

Orientador: Marcelo Marcos Morales.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / ICCBF / Programa de Ciências Biológicas (Biofísica), 2006

1. *Rhodnius prolixus* 2. Transporte nos túbulos de Malpighi 3. 5-hidroxitriptamina 4. Aquaporinas I. Morales, Marcelo Marcos II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho II. Título

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Financiador de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A vida não é certa
Nada aqui é certo
O que é certo mesmo, é que temos que viver
Cada momento
Cada segundo
Amado, sorrindo, chorando, emocionando,
pensando, agindo,
querendo, conseguindo
É só assim
É possível chegar àquele momento do dia
Em que a gente diz: "Graças à Deus deu tudo
certo"

Luis Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

A Deus que esta sempre comigo me dando forças para vencer.

Aos meus pais, por tudo o que eu sou e também por tudo que ainda serei; por todo o amor, carinho e compreensão.

Aos meus irmãos, por todo o amor e carinho, por todos os sorrisos compartilhados e por serem meus amigos para vida toda.

A minha avó Normélia, por todo amor, carinho e saudade...

Às minhas queridas amigas pela amizade cheia de amor e carinho, pelas conversas e por vocês estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor e paciência.

Ao meu orientador, Marcelo, pela sabedoria e pelo esforço para me tornar uma aluna sempre melhor.

Aos companheiros do laboratório pelos momentos de aprendizado, e de descontração que tornaram a execução deste trabalho bem mais prazerosa. E principalmente pela PACIÊNCIA comigo este tempo todo.

A todos os amigos, familiares, colegas... que fizeram e fazem parte da minha vida, que direta e indiretamente me ajudaram a crescer e a construir meu caráter.

RESUMO

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA AQUAPORINA EM TÚBULOS DE MALPIGHI DE *Rhodnius prolixus* PELA 5-HIDROXITRIPTAMINA.

Sabrina Vargas Martini

Orientador: Marcelo Marcos Morales

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina é um neurohormônio que, no inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, estimula a secreção de fluido dos túbulos de Malpighi (TMs), controlando sua diurese. O objetivo do presente estudo foi detectar e estudar o canal de água, aquaporina, nos TMs de *Rhodnius prolixus*, e sua possível regulação pela 5-HT. Utilizando primers degenerados, correspondentes a seqüência de aminoácido NPA (Asn-Pro-Ala), conservada em todos os membros da família MIP, identificamos um produto de PCR de 365pb, o qual foi confirmado pela análise de Southern blotting e pelo sequenciamento. O ensaio de proteção contra RNase e RT-PCR demonstraram um aumento da expressão mRNA do canal de água presente nos TMs de *Rhodnius prolixus* (Rp-MIP) em animais alimentados quando comparados ao grupo de animais submetido ao jejum, controle. O western blotting utilizando os anticorpos anti-MIP26 ou anti-AQP-1 demonstrou também o aumento da expressão da proteína do Rp-Mip em animais alimentados. In vitro, os TMs dos animais do grupo controle foram tratados e divididos em: controle, tratado com 5-HT 10^{-6} mol/l, tratado com AMPc 10^{-4} mol/l e tratado com ambos 5-HT e AMPc por seis horas. Os grupos 5-HT e AMPc tiveram um aumento da expressão do mRNA do Rp-MIP, porém a estimulação com ambos 5-HT e AMPc simultaneamente não foi capaz de aumentar os níveis da expressão do RNAm de forma adicional. Nossos resultados demonstraram que a expressão do RNAm do Rp-MIP está aumentada nos animais alimentados, provavelmente por ação da 5-HT via AMPc. Sugerindo que a regulação hormonal da expressão das aquaporinas é conservada tanto nos insetos quanto nos mamíferos.

ABSTRACT

Rhodnius prolixus MALPIGHIAN TUBULE'S AQUAPORIN EXPRESSION IS MODULATED BY 5-HYDROXYTRYPTAMINE

Sabrina Vargas Martini

Orientador: Marcelo Marcos Morales

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

5-hydroxytryptamine or serotonin is a neurohormone in the hematophagous insect *Rhodnius prolixus* that stimulated the fluid secretion in Malpighian tubules (MTs), controlling its diuresis. The proposal of this present study was to detect and study an aquaporin-like water channel, in the MTs of the *Rhodnius prolixus*, its possible regulation by 5-HT. Employing degenerate primers, corresponding to the conserved amino acid sequence NPA (Asn-Pro-Ala) in all members of MIP family, we identify a 365-base pair PCR product, which product was confirmed by Southern blotting analysis and sequencing. RNase protection assay and semi-quantitative RT-PCR showed in fed animals an increase of the *Rhodnius prolixus* MTs water channel mRNA expression (Rp-MIP). The western blotting using anti-MIP26 or anti-AQP-1 antibodies also showed in fed animals an increased in Rp-MIP protein expression. In vitro, the MTs of animals control group were treated and divided in: control, treated with 5-HT at 10^{-6} mol/l, treated with cyclic AMP at 10^{-4} mol/l, and treated with both 5-HT and cyclic AMP, for six hours. The groups 5-HT and cAMP increased Rp-MIP mRNA expression, but this stimulation was not additive when the MTs were treated with both cAMP and 5-HT simultaneously. Our results showed that Rp-MIP mRNA expression is increased in the fed animals probably by action of the 5-HT via cAMP. Suggesting that the hormonal regulation of the expression of the aquaporins is conserved in the insect as in the mammals.

ÍNDICE

Ficha catalográfica.....	iv
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Índice.....	x
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabela.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
I – INTRODUÇÃO	
I.1– <i>Rhodnius prolixus</i>	9
I.2– Aspectos anatomo-funcionais dos Túbulos de Malpighi.....	12
I.2.1– Transporte no segmento superior ou distal.....	14
I.2.2– Transporte no segmento inferior ou proximal.....	16
I.3– 5-Hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina.....	18
I.4– Canais de Água (Aquaporinas).....	23
II – OBJETIVO	30
III – MATERIAIS E MÉTODOS	
III.1– Colônia do <i>Rhodnius prolixus</i>	33
III.2 – Dissecção.....	33
III.3 – Grupos experimentais.....	34
III.4 – Extração de RNA-total	35
III.5– Transcrição Reversa (RT).....	35

III.6– Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
III.7 – Sequenciamento.....	38
III.8 – Southern blotting.....	39
III.9 – Western blotting.....	40
III.10 – Ensaio de proteção contra RNase (RPA).....	41
III.11– Densitometria.....	42
III.12 – Análise estatística.....	43
IV – RESULTADOS	
IV.1- Detecção do produto de PCR usando primers degenerados.....	45
IV.2- Detecção da concentração ideal de RNA-total de Túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> utilizado para realizar o RT-PCR.....	45
IV.3- Determinação do número ideal de ciclos de PCR a ser utilizado para a amplificação do RNAm do RP-MIP.....	48
IV.4- Análise da expressão do RNA mensageiro dos túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> submetidos a diferentes tratamentos.....	48
IV.5- Análise da expressão da proteína do RP-MIP através da técnica de Western blotting.....	51
V – DISCUSSÃO	55
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
V – ANEXO	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Eventos celulares associados com a ação do ADH na permeabilidade à água da célula principal do ducto coletor	4
Figura 2 – Esquema representativo do sistema gastrointestinal do <i>Rhodnius prolixus</i>	8
Figura 3 – Esquema representativo da via de ativação da 5-HT.....	10
Figura 4 – <i>Rhodnius prolixus</i>	11
Figura 5 – Modelo representativo das células dos diferentes segmentos dos túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	14
Figura 6 – Modelo esquemático do segmento distal dos túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	17
Figura 7 – Modelo esquemático do segmento proximal dos túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	19
Figura 8 – Modelo representativo da AQP1.....	27
Figura 9 – Modelo esquemático do RP-MIP.....	29
Figura 10 – Esquema representativo dos grupos experimentais.....	35
Figura 11 – Detecção da aquaporina em TMs de <i>Rhodnius prolixus</i>	45
Figura 12 – Seqüência de RP-MIP publicada por Echevarria & cols, 2001.....	46
Figura 13 – Curva de Concentração.....	48
Figura 14 – Curva de ciclos.....	49
Figura 15 – Detecção da expressão do RNAm da aquaporina pelo RPA em túbulos de Malpighi isolados de <i>Rhodnius prolixus</i>	51

Figura 16 – Produtos de RT-PCR para análise da expressão do RNAm do Rp-MIP isolado dos TMs de <i>Rhodnius prolixus</i>	52
Figura 17 – Análise da expressão da proteína do RP-MIP pela técnica de Western blotting nos grupos controle e alimentado.....	53

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 – Distribuição das aquaporinas e aquagliceroproteínas em diferentes órgãos dos mamífero.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC = trifosfato de adenosina cíclico

cDNA = DNA complementar

DEPC = dietilpirocarbonato

dNTPs = deoxinucleotídeo trifosfato

DTT = ditioneitol

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

MIP = proteína intrínseca maior

NaCl = cloreto de Sódio

NPA= aspargina-prolina-alanina

NPV= aspargina-prolina-valina

pb = pares de base

pCMBs = para-cloromercuribenzenosulfonado

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

RPA = Ensaio de Proteção contra RNase

RP-MIP = canal de água dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*

RT-PCR = Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

SDS= dodecilsulfato de sódio

TAE = Tris Acetato de EDTA

TBE = Tris Borato de EDTA

TMs = Túbulos de Malpighi

5-HT = 5-hidroxitriptamina ou serotonina

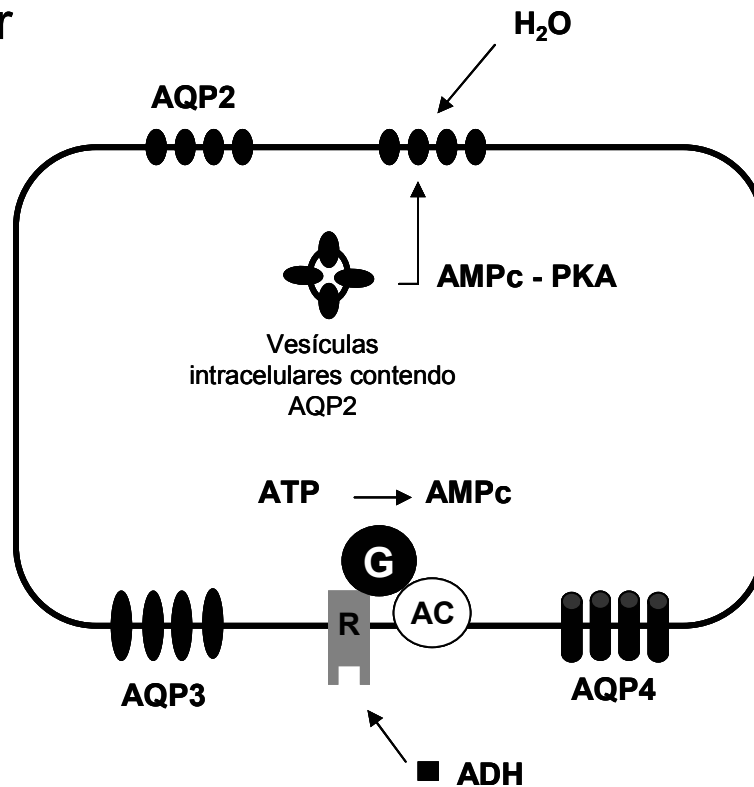
I- Introdução:

A água é o principal componente dos organismos vivos, sendo a substância mais abundante na célula. A água está difundida em todas as porções da célula banhando várias estruturas e organelas celulares, é o meio no qual íons e outras moléculas estão dissolvidos (Alberts & cols, 2004). Por outro lado, a distribuição da água nos compartimentos intracelulares e extracelulares é de fundamental importância para a manutenção da homeostase do organismo, e esse equilíbrio entre os volumes desses compartimentos é mantido pelo movimento da água que pode ocorrer tanto via transcelular (transporte através das membranas celulares) quanto paracelular (transporte através de aberturas nas barreiras juncionais entre as células). O transporte de água é um processo passivo, que depende do gradiente osmótico formado por solutos iônicos e não iônicos (Nishimura & Fan, 2003). Em geral, a força osmótica possibilita a passagem de água através da membrana plasmática via canais seletivos chamados de aquaporina (AQP) que são responsáveis pelo rápido fluxo de água através das membranas celulares (Agre & cols, 1993; Borgnia & cols, 1999). Sendo as membranas celulares pouco permeáveis à água e solutos, os transportadores localizados nas membranas plasmáticas além de selecionar, controlam a entrada e a saída de água e solutos na célula, nas mais diferentes situações fisiológicas as quais os organismos são submetidos (Nishimura & Fan, 2003).

O primeiro canal de água foi identificado em eritrócitos de humanos e chamados, depois de um consenso internacional, de aquaporina 1 (AQP1) (Denker & cols, 1988, Preston e Agre, 1991). Atualmente é sabido que as aquaporinas são altamente distribuídas em diferentes espécies e diferentes homólogos tem sido

identificado em vários tecidos (Borgnia & cols, 1999). Hormônios tais como aldosterona, estrogênio, testosterona, vasopressina ou hormônio anti-diurético (ADH) e outros podem modular de forma seletiva e geralmente rápida, a expressão de várias aquaporinas que estão presentes em diferentes tecidos (Nielsen & Agre, 1995; Gu & cols, 2003; Hasler & cols, 2003; Jablonski & cols, 2003). Um exemplo clássico é a estimulação da expressão da aquaporina-2 (AQP2), nas células principais do ducto coletor renal pelo ADH. Este processo acontece nos mamíferos quando a osmolaridade plasmática é alta ou quando há queda expressiva do volume do fluido extracelular ou da pressão sanguínea. Esses sinais são captados por receptores (osmorreceptores ou barorreceptores) que conduzem estes estímulos para as células secretoras de ADH no hipotálamo. Do hipotálamo, este hormônio é transportado para a hipófise posterior, de onde é secretado para a circulação. Após sua liberação o ADH liga-se ao receptor localizado na membrana basolateral das células do ducto coletor. Esse receptor está acoplado a proteína G que quando estimulada, ativa a adenilciclase, provocando o aumento dos níveis intracelulares de AMPc. A elevação do AMPc intracelular ativa a proteínaquinase A (PKA). A PKA fosforila a AQP2 no sítio de fosforilação para a PKA (serina-256) este sinal leva a translocação e inserção de vesículas intracelulares contendo canais de água pré-formados na membrana luminal das células principais do ducto coletor, tornando a membrana luminal permeável à água. Assim, a água entra na célula por esses canais sensíveis a ADH, AQP2, localizados na membrana luminal e, sai da célula por canais insensíveis ao ADH, aquaporina 3 e 4, existentes na membrana basolateral, completando o transporte transepitelial da água. Este processo resulta na reabsorção de água do fluido luminal para o capilar peritubular, restabelecendo a osmolaridade plasmática do

Luz tubular



Espaço peritubular

Figura 1: Eventos celulares associados com a ação do ADH na permeabilidade à água da célula principal do ducto coletor. O ADH liga-se ao receptor (R) localizado na membrana basolateral e, através da proteína G (G), ativa a adenil ciclase (AC), produzindo AMP cíclico (AMPc) que ativa proteínaquinase A (PKA). Esse evento resulta na inserção de canais de aquaporina 2 (AQP2) na membrana luminal da célula, elevando sua permeabilidade. Outras aquaporinas não sensíveis ao ADH estão presentes na membrana basolateral (AQP3 e AQP4).

organismo (Nielsen & Agre, 1995, Katsura & cols, 1997) (Figura 1).

Homólogos da aquaporina também foram identificados em insetos: a AQP_{cic} encontrada no trato digestivo de *Cicadella viridis* (Beuron & cols, 1995; Le Cahérec & cols, 1996), AqpBF1 na mosca búfalo *Haematobia irritans exigua* (Elvin & cols, 1999) e em *Drosophila melanogaster* a aquaporina foi identificada no cérebro e nos túbulos de Malpighi (Dow & cols, 1995).

Os túbulos de Malpighi (TMs) são os órgãos de excreção dos insetos responsáveis pela regulação de água e solutos e desempenham papel análogo ao dos rins dos vertebrados (Phillips, 1981). O transporte de água, que pode ocorrer tanto pelas vias paracelulares quanto pelas transcelulares, tem sido proposto para explicar o movimento da água através dos epitélios, inclusive nos túbulos de Malpighi do inseto hematófago *Rhodnius prolixus* (Whittembury & cols, 1986; Hernández & cols, 2001). Alguns estudos demonstraram que a permeabilidade à água da membrana basolateral dos TMs de *Rhodnius prolixus*, que sabidamente é estimulada pela 5-hidroxitriptamina (5-HT), pode ser inibida parcialmente pelo paracloromercuribenzenosulfonado (pCMBS), um conhecido inibidor de aquaporina 1 em mamíferos. Estes trabalhos sugerem que a aquaporina pode estar desenvolvendo papel importante no transporte de água neste epitélio (Whittembury & cols, 1999; Echevarria & cols, 2001; Gutiérrez & cols, 2004).

Mais objetivamente, a presença da aquaporina em TMs de *Rhodnius prolixus* foi confirmada pelos estudos de Echevarria & cols (2001) utilizando RT-PCR e expressão em oócitos de *Xenopus laevis*, e esta foi clonada e denominada RP-MIP.

A expressão da aquaporina e, portanto, a sua função nos TMs de *Rhodnius prolixus* também é de importância na transmissão do protozoário *Tripanosoma cruzi*,

causador da Doença de Chagas. O *Tripanosoma cruzi* é transmitido para o hospedeiro final por insetos pertencentes à subfamília Triatominae, na qual o *Rhodnius prolixus* e o *Triatoma infestans* são os principais vetores (Fistein and Chowdhury, 1969; Dias & cols, 1997).

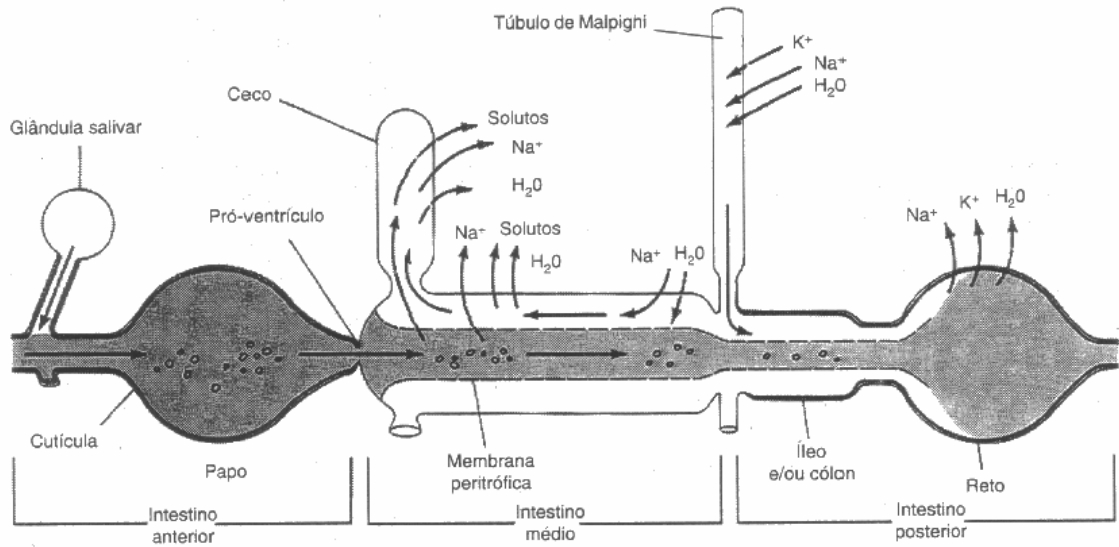
A transmissão do *Tripanosoma cruzi* ao hospedeiro mamífero ocorre após a alimentação do inseto quando este ingere um grande volume de sangue que leva a estimulação da secreção dos TMs. Esse estímulo é o responsável pelo aumento do volume de fezes no reto do inseto que estimula a defecação que é responsável também pela excreção dos parasitas (Fistein & Chowdhury, 1969; Kollien & Schaub, 1998).

Vale lembrar que em média a composição do sangue dos mamíferos é uma mistura de aproximadamente 55% (de volume) de plasma e 45% de células. As células dos mamíferos possuem uma quantidade rica de potássio no citoplasma, enquanto que o plasma tem uma alta concentração de cloreto de sódio. Quando o *Rhodnius prolixus* se alimenta de sangue de mamífero, ele ingere um fluido contendo células sangüíneas suspensas em plasma rico em sódio, que é hiposmótico (320 mOsm) quando comparado com a sua hemolinfa (370 mOsm). Portanto, o inseto é submetido a uma brusca variação de osmolaridade de seu meio interno. O ajuste da homeostase hidrossalina, portanto, requer que o animal utilize mecanismos eficientes para controlar sua osmolaridade, sem a qual sua sobrevivência estaria ameaçada (Maddrell, 1991). O responsável pela correção destas alterações osmolares no inseto são túbulos de Malpighi. Com esse propósito, o inseto rapidamente excreta fluido hiposmótico em relação a hemolinfa com grande massa de sódio (Maddrell, 1991).

O *Rhodnius prolixus* possui quatro MTs que são banhados diretamente pela hemolinfa e são divididos em dois segmentos: segmento superior ou distal e o segmento inferior ou proximal (Figura 2). O segmento superior ou distal é responsável pela ultrafiltração da hemolinfa do inseto, produzindo nas primeiras horas após a alimentação, um fluido rico em íons Na^+ e K^+ e, portanto, com uma grande excreção de água já que este segmento apresenta uma elevada permeabilidade à água (Maddrell, 1969). Já o segmento inferior ou proximal é responsável pelos processos reabsortivos do túbulo de Malpighi, principalmente KCl, de maneira que a urina produzida é extremamente diluída, pobre em K^+ , porém rica em Na^+ (Maddrell, 1978). A permeabilidade à água do segmento inferior é reduzida em relação ao segmento superior (O'Donnell & cols, 1982).

Estes mecanismos de transporte são de grande importância se levarmos em consideração que o *Rhodnius prolixus* ingere na sua alimentação um volume de sangue que pode chegar a dez vezes o seu próprio peso corporal, dependendo do seu estágio de desenvolvimento. A alimentação é seguida por uma rápida diurese, regulada por hormônios peptídicos. A ação desses peptídeos inicia-se dentro de 2-3 minutos após a ingestão de sangue, onde o animal excreta metade do volume ganho. Essa diurese é iniciada por um estímulo mecânico através da expansão do abdômen do animal. Este estímulo é captado por receptores de estiramento localizados na cutícula abdominal e transmitido para o sistema neurosecretório que libera a 5-hidroxitriptamina. Este sistema está localizado no gânglio mesotorácico que é associado ao nervo abdominal. A 5-HT liberada atua nos TMs do *Rhodnius prolixus*

A



B

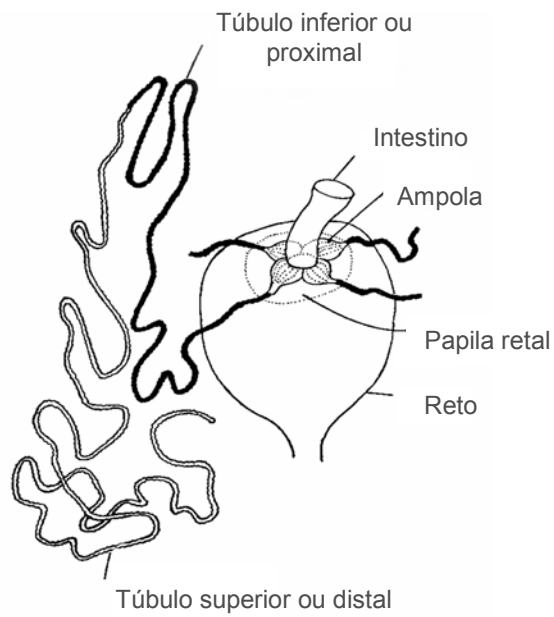


Figura 2- Esquema representativo do sistema gastrointestinal do *Rhodnius prolixus*
 A) O sistema gastrointestinal do *Rhodnius prolixus* B) Representação dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*: o segmento superior ou distal e o segmento inferior ou proximal.

aumentado a secreção de fluido (Madrell & cols, 1993, Orchard & cols, 1989) (Figura 3).

Outros hormônios atuam em sinergismo com a 5-HT. Logo após alimentação do inseto ocorre também a liberação do hormônio diurético (DH), que é necessário para obter a secreção máxima dos TMs. Este hormônio juntamente com a 5-HT nos TMs de *Rhodnius prolixus*, são capazes de aumentar os níveis intracelulares de AMPc e estimular a secreção de fluido em até cem vezes (Maddrell, 1971 e Maddrell & cols, 1993).

A velocidade do processo de excreção sugere fortemente o envolvimento das aquaporinas no transporte de água nos TMs de *Rhodnius prolixus*, tal como ocorre no epitélio renal de mamíferos.

I.1- *Rhodnius prolixus*:

O *Rhodnius prolixus* é um inseto pertencente à família Triatominae. São 118 espécies e 14 gêneros conhecidos, com seu tamanho variando de 5mm a 45mm (Figura 4). A maior incidência de triatomíneos ocorre no continente americano, com maior concentração na América Latina, e apenas 13 espécies foram encontradas fora deste continente (Juberg, 1996). Apesar do grande número de espécies existentes, apenas algumas participam ativamente da transmissão da doença de Chagas ao homem, dependendo do habitat que ocupam, podendo de acordo com este serem classificados como espécies silvestres, peridomiciliares e domiciliares, estando o *Rhodnius prolixus* presente em todos estes habitat (Barreto 1976).

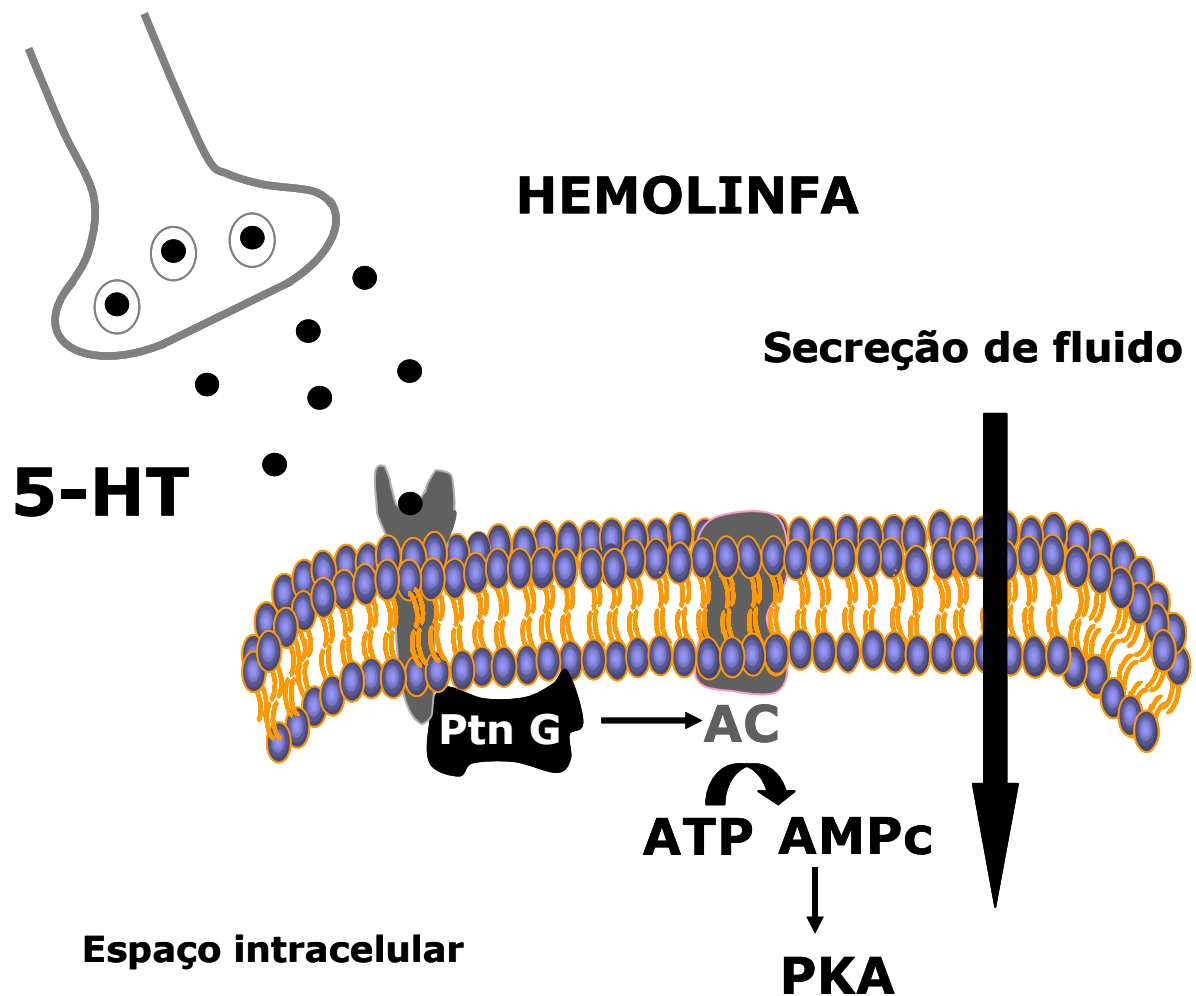


Figura 3- Esquema representativo da via de ativação da 5-HT. A 5-HT é armazenada em vesículas secretoras presentes no gânglio mesotorácico. Após receber um estímulo a 5-HT é liberada na hemolinfa e interage com receptores presentes na membrana basolateral das células dos TMs de *Rhodnius prolixus*. Esses receptores estão associados à proteína G, que ativa a adenilciclase a produzir AMPc, levando a ativação de proteinoquinase. A fosforilação de transportadores pela proteinoquinase acarreta um aumento da secreção de fluido pelos TMs, porém este mecanismo ainda não é bem esclarecido.



Figura 4: *Rhodnius prolixus*

A taxonomia do *Rhodnius prolixus* compreende:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Superclasse: Hexopoda

Classe: Insecta

Ordem: Hemiptera

Subordem: Heteroptera

Infraordem: Cimicomorpha

Família: Reduviidae

Subfamília: Triatominae

Gênero: *Rhodnius*

Espécie: *Rhodnius prolixus* Salt (McGavin, 1999).

Os insetos pertencentes à ordem Hemíptera se caracterizam por apresentarem um tipo de desenvolvimento com metamorfose incompleta (desenvolvimento hemimetábolo) onde a forma adulta é atingida gradualmente com mudas sucessivas,

passando por cinco estágios chamados ninfas até atingir o estágio adulto, caracterizado pela presença de asas e maturidade sexual. O *Rhodnius prolixus* muda de estágio somente após uma ingestão de sangue, isso ocorrendo aproximadamente 15 dias após a alimentação (Ruppert & Barnes, 1996).

O hábito alimentar dos insetos hematófagos se caracteriza por uma grande ingestão de sangue de uma só vez e por passarem longos períodos em jejum. Ao se alimentar *Rhodnius prolixus* ingere um grande volume de sangue que o deixa pesado e vulnerável a predação, sendo assim é necessário que o inseto tenha um mecanismo de excreção rápido e eficiente para perder o excesso de água e sal para reduzir o seu volume corporal, esse mecanismo é realizado pelos TMs (Stobbart & Shaw, 1964).

I.2- Aspectos anatomo-funcionais dos túbulos de Malpighi:

Os TMs de *Rhodnius prolixus* são longos túbulos, livres na hemolinfa, o qual se abrem ao nível do canal alimentar na junção entre o intestino médio e posterior (Stobbart & Shaw, 1964).

Os túbulos podem variar de 2 mm a mais de 100 mm em comprimento e 30 a 100µm de diâmetro, e são divididos em dois segmentos. O segmento superior ou distal (porção secretora dos túbulos de Malpighi) que sob estímulos de hormônios diuréticos, rapidamente transporta fluido da hemolinfa para o lúmen do túbulo (Maddrell, 1969). O segmento inferior ou proximal (porção reabsortiva dos túbulos de Malpighi) é responsável pelo transporte de uma solução hiperosmótica KCl do lúmen

para a hemolinfa. A transição entre os segmentos dos túbulos é abrupta e o fundo do túbulo distal termina em fundo cego (Wigglesworth, 1931).

As células dos TMs são compostas por simples camada de células epiteliais que são polarizadas, apresentando uma membrana apical (voltada para a luz do túbulo) e uma membrana basolateral (voltada para a hemolinfa). A membrana basolateral contém uma zona basal que se invagina para o interior da célula. Esta estrutura está presente em ambos os segmentos dos TMs, porém no segmento distal as invaginações são mais complexas com poucas mitocôndrias, enquanto que no segmento proximal as invaginações são mais regulares e paralelas e os espaços entre elas são preenchidos por mitocôndrias (Figura 5) (Wigglesworth & Salpeter, 1962).

Os dois segmentos dos TMs possuem células com limites definidos, tendo ambas um grande núcleo vesicular. O citoplasma das células do segmento distal apresenta muitos grânulos esféricos, cujas células são opacas, em virtude da presença de grânulos de cálcio no seu interior, chamados corpos de concreção, onde é estocada a maior concentração de cálcio do inseto, já as do segmento proximal são translúcidas e quase livre de grânulos (Wigglesworth & Salpeter, 1962, Maddrell & cols, 1991).

As células são na sua maioria binucleadas, elas crescem sem divisão celular à medida que o inseto muda de estágio, ou seja, o número de células do túbulo se mantém constante desde a eclosão do ovo, até a fase adulta. A cromatina em cada estágio dobra em quantidade, mostrando que ocorre duplicação do seu DNA, mas a célula não se divide. No primeiro estágio o

conteúdo nuclear é 4n, no segundo estágio 8n e assim sucessivamente até o quinto estágio onde se estabiliza em 64n (Maddrell & cols, 1985).

I.2.1- Transporte no segmento superior ou distal.

O segmento distal dos TMs é responsável pelo rápido transporte de fluido isosmótico da hemolinfa para o lúmen do túbulo (Maddrell, 1969). Neste segmento o transportador ativo primário e, portanto, gerador do gradiente eletroquímico é a H⁺-ATPase vacuolar presente na membrana apical. Essa ATPase transporta, com gasto de energia oriunda da quebra de ATP, H⁺ da célula para o lúmen do túbulo, tornando a luz tubular mais positiva em relação a célula- diferença de potencial (DDP) lúmen positiva (Wieczorek & cols, 1989; Maddrell & O'Donnell, 1992). Este transporte mantém um gradiente de próton através da membrana apical que favorece o movimento de H⁺ de volta para o interior da célula. Esse transporte de H⁺ se dá em troca pelo Na⁺ e/ou K⁺ que são transportados da célula para o lúmen através do trocador cation/H⁺ presentes na membrana apical. Vale ressaltar que este trocador tem como característica ser mais permeável ao Na⁺ em relação ao K⁺ (Ianowski & O'Donnell, 2001, Maddrell & O'Donnell,1992) (Figura 6).

Gutiérrez e colaboradores em 2004 utilizando ácido dihidroindonil-oxi-alcanoide, inibidor do cotransportador K⁺/Cl⁻ de hemácias (DIOA) e Probenecide (inibidor do trocador urato-anion), demonstraram que a taxa de secreção de fluido é diminuída quando o lúmen tubular é perfundido com estes inibidores e quando estes

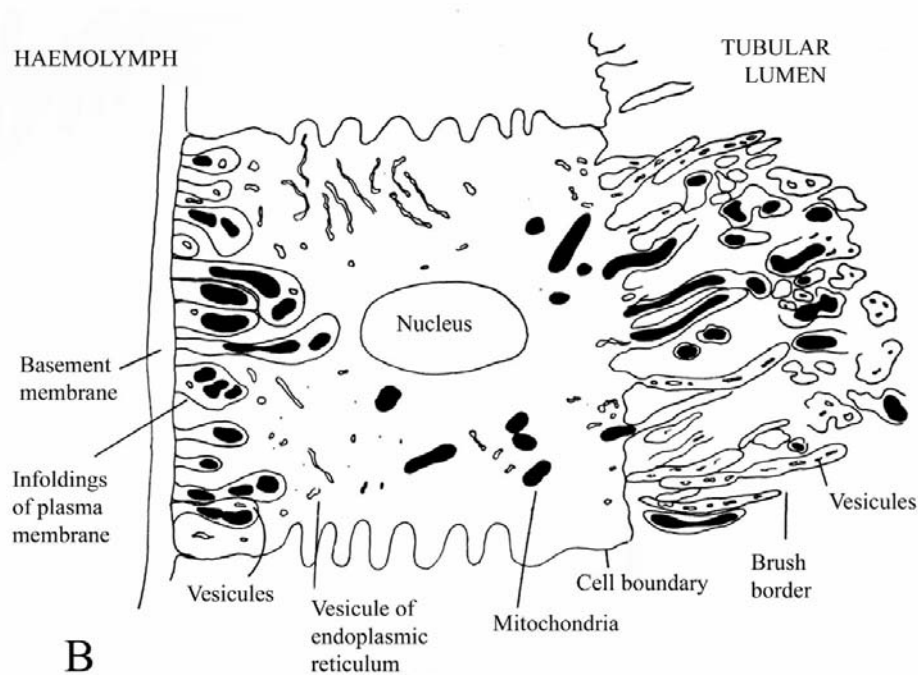
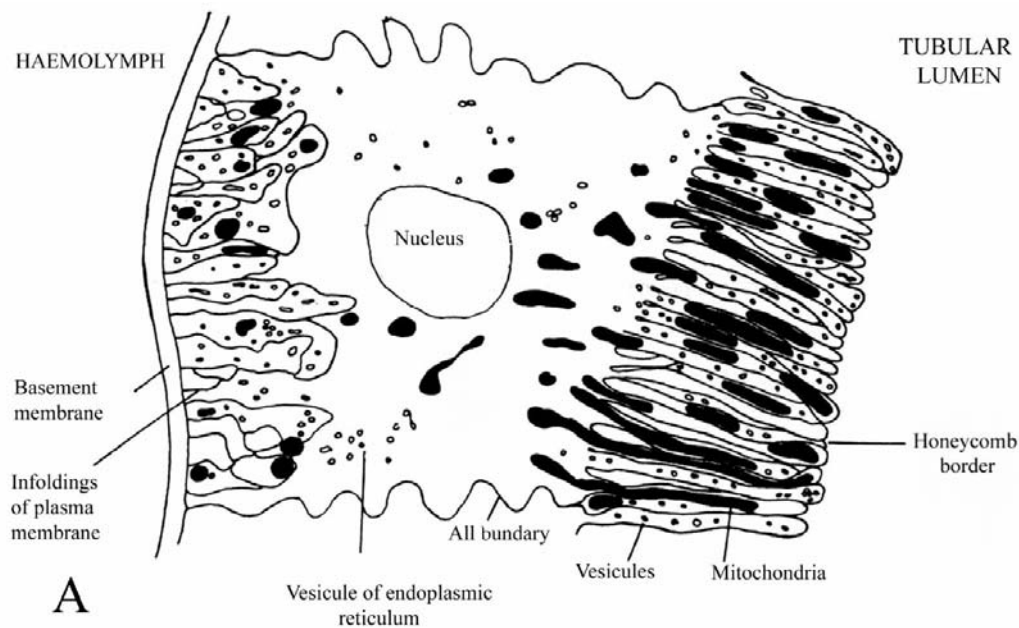


Figura 5: Esquema representativo das células dos diferentes segmentos dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*. A) Célula do segmento distal B) Célula do segmento proximal. Adaptado de Wigglesworth & Salpeter, 1962.

são adicionados na solução do banho (membrana basolateral), não ocorrem modificações na taxa de secreção. Esses dados sugerem a presença dos dois transportadores na membrana apical. Outros transportadores, tais como os canais de Cl^- e K^+ também estão presentes na membrana apical das células dos TMs (Gutiérrez & cols, 2004) (Figura 6).

Na membrana basolateral a entrada de íons nas células do segmento superior do túbulo envolve um cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ sensível a bumetanida. Este transportador transporta íons numa proporção de: 0.85 K^+ : 1.15 Na^+ : 2 Cl^- nos TMs de *Rhodnius prolixus*. Isso é facilmente entendido se levarmos em consideração que a hemolinfa deste inseto possui concentrações de 140 mmol/l de Na^+ e 3 mmol/l de K^+ , justificando, entre outros fatores, a prioridade dada ao transporte de Na^+ , sendo este íon capaz de competir pelo sítio de K^+ (Maddrell, 1991) (Figura 6).

Outros transportadores conhecidos e que também estão envolvidos no transporte de íons através da membrana basolateral são: 1) a bomba Na^+/K^+ -ATPase sensível a ouabaina, que transporta 3 Na^+ para a hemolinfa e 2 K^+ para a célula, sendo importante na fase secretora de fluido e 2) o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que transporta Cl^- para a célula e reabsorve HCO_3^- para hemolinfa, ajudando na manutenção do pH (Gutiérrez & cols, 2004, Maddrell, 1991, O'Donnell & cols, 1982) (Figura 6).

I.2.2- Transporte no segmento inferior ou proximal.

O segmento proximal é responsável pela reabsorção de uma solução hiperosmótica rica em KCl oriunda do segmento superior. Esse transporte preserva a

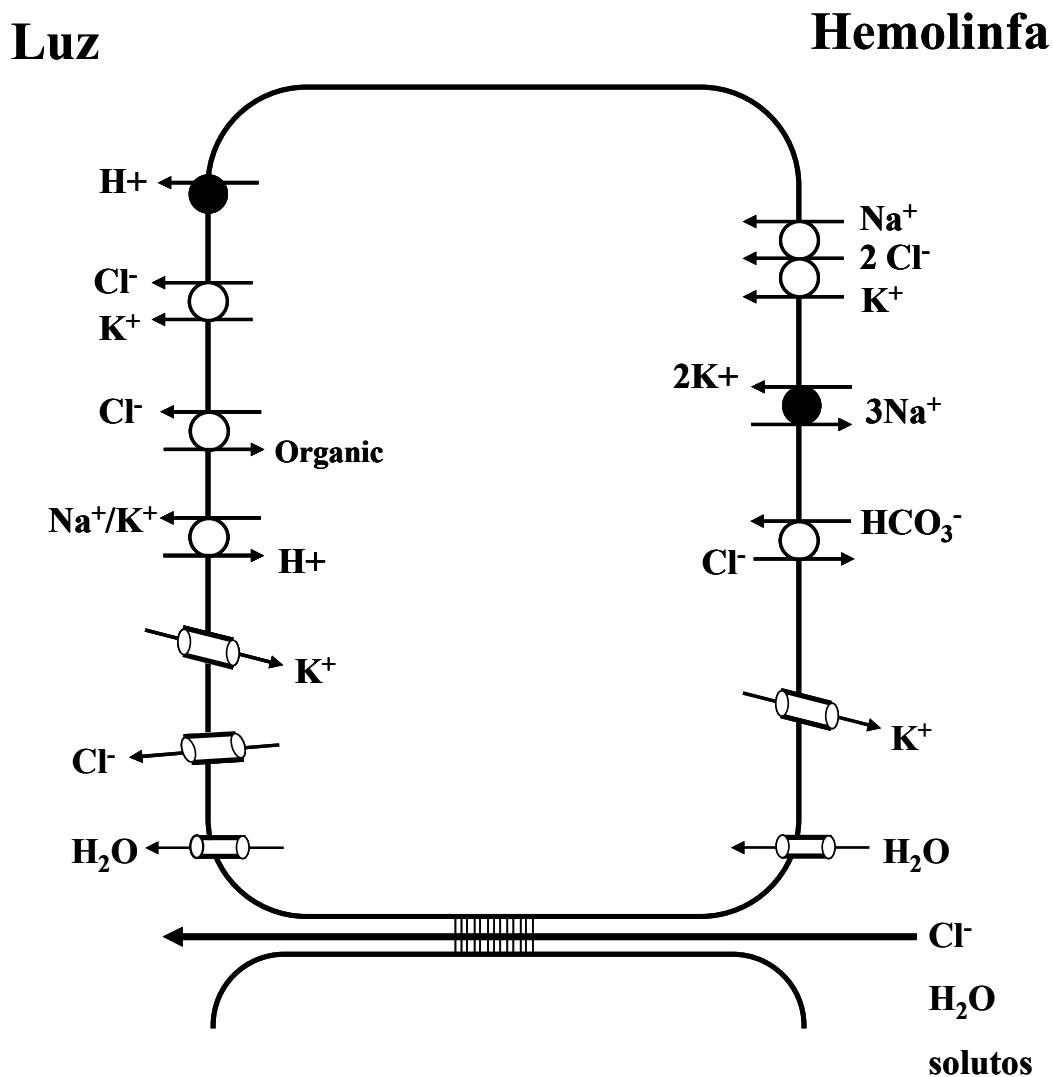


Figura 6: Modelo esquemático do segmento distal dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*. O processo de secreção ocorre da direita (hemolinfa) para a esquerda (luz tubular). As bombas (transporte ativo) são representadas pelos círculos cheios, os trocadores e co-transportadores pelos círculos vazios e os canais por cilindros.

osmolaridade da hemolinfa e sua concentração de potássio (Maddrell & Phillips, 1975).

Apesar da reabsorção de KCl criar um gradiente osmótico favorável para a reabsorção de água, a permeabilidade à água nesse segmento é quatro vezes menor em relação ao segmento superior. Assim sendo, apesar do gradiente osmótico a água não é reabsorvida, permitindo a eliminação do excesso desta (O'Donnell & cols, 1982, Haley & O'Donnell, 1997).

A reabsorção de K^+ no segmento proximal envolve a H^+/K^+ -ATPase presente na membrana apical das células, a qual troca o K^+ presente no lúmen tubular pelo H^+ intracelular. O movimento de K^+ das células do túbulo inferior para a hemolinfa se dá através do canal de K^+ sensível ao Ba^+ , sendo a reabsorção de K^+ acompanhada pela reabsorção equimolar de Cl^- (Haley and O`Donnell, 1997) (Figura 7).

O movimento de Cl^- no segmento proximal dos TMs, que ocorre da célula para a hemolinfa, é realizado por canais de Cl^- , e o transporte de Cl^- do lúmen para a célula envolve os trocadores Cl^-/HCO_3^- que são sensíveis a “4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2-2'-disulphonic acid” (SITS) ou “diisothiocyanatostilbene” (DIDS), conhecidos inibidores do trocador Cl^-/HCO_3^- e de canal de Cl^- (Boron, 1983, Dijkstra & cols, 1995, Tilmann, 1991) (Figura 7).

1.3- 5-Hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), cuja fórmula química é $C_{10}H_{12}N_2O$ é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, que é hidroxilado pela enzima triptofano-

Luz

Hemolinfa

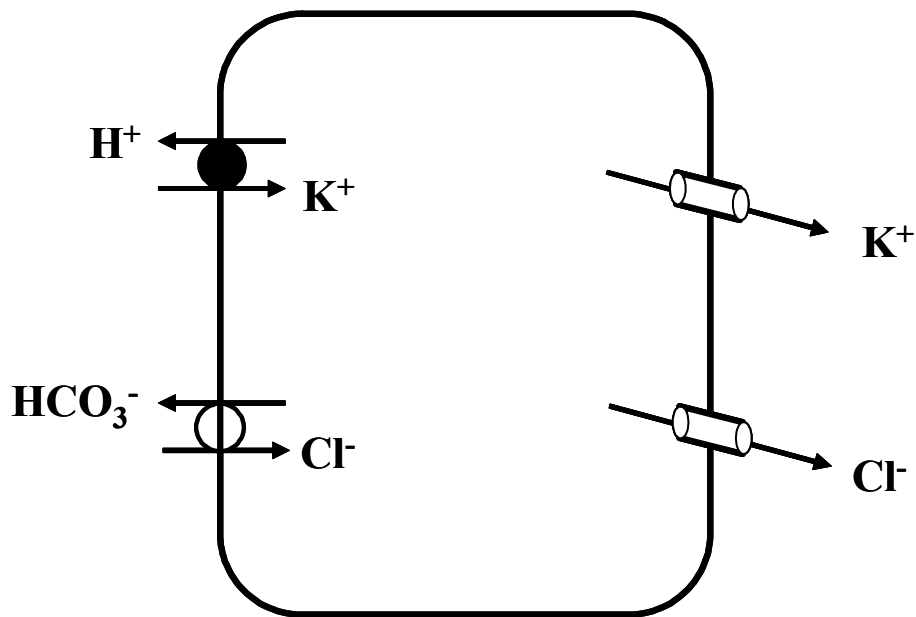


Figura 7: Modelo esquemático do segmento proximal dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*. O processo de secreção ocorre da direita (hemolinfa) para a esquerda (luz tubular). As bombas (transporte ativo) são representadas pelos círculos cheios, os trocadores e co-transportadores pelos círculos vazios e os canais por cilindros.

hidroxilase e carboxilado pela enzima triptofano-carboxilase, sendo convertido em 5-hidroxitriptamina. Nos seres humanos e nos insetos o triptofano precisa ser absorvido da dieta alimentar, pois não é produzido no organismo (Nogueira & cols, 2004).

Um dos aspectos que contribui para tornar a serotonina tão especial é a imensa variedade de funções a que está ligada no ser humano. Essa molécula atua no sistema motor, sendo relacionada com a contratilidade e motilidade muscular, na regulação dos sistemas cardiorrespiratório e endócrino, na regulação da temperatura, no sono, na percepção sensorial, na aprendizagem, na memória, no comportamento alimentar e sexual e mesmo em estados patológicos, tais como: distúrbio de humor, ansiedade, vício, depressão, entre outros (Nogueira & cols, 2004).

Em termos evolutivos, a 5-HT está presente em plantas e organismos primitivos, tais como certos protozoários e quase em todos os metazoários. Acredita-se que seu papel mais primordial seja o de regulador de atividades celulares para adaptar o organismo ao ambiente. Em organismos mais desenvolvidos, por outro lado, a serotonina adquire função hormonal, é liberada por células específicas na corrente sanguínea, de onde é carregada para agir sobre células-alvo distantes. Essa ação faz da serotonina um importante fator na morfogênese, nutrição celular, e também no controle e na coordenação da proliferação e diferenciação celular. Por outro lado, é sugerido que a função de neurotransmissor é a mais recente na evolução. A 5-HT atua como um mensageiro primário no sistema nervoso, passando informação de um neurônio a outro através das sinapses, espaços entre dois neurônios adjacentes (Nogueira & cols, 2004).

Nos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, como não há inervação, a regulação do transporte epitelial é mediada por mecanismos intrínsecos e por mensageiros que circulam na hemolinfa. Como comentamos anteriormente, é sabido que após o *Rhodnius prolixus* se alimentar de sangue ocorre a distensão de seu abdômen, este sinal é captado por receptores de estiramento (mecanorreceptores) presentes na cutícula abdominal e transmitindo até o sítio de liberação da 5-HT, que são neurônios localizados no sistema nervoso central, gânglio mesotorácico e corpus cardiacum (Chiang & Davey, 1988). Maddrell e seus colaboradores, (1963) demonstraram que a 5-HT é liberada na hemolinfa do *Rhodnius prolixus* um minuto após o início da alimentação. Durante essa fase a concentração de 5-HT aumenta rapidamente na hemolinfa atingindo um pico de concentração de aproximadamente $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ após 5 min do início da ingestão de sangue, e começa a declinar a níveis baixos 1h depois (Lange & cols, 1989). Elevada concentração de 5-HT é correlacionada com elevada taxa de diurese no *Rhodnius prolixus* (Maddrell & cols, 1991).

Foi encontrado nos TMs de *Rhodnius prolixus* receptores para 5-HT que podem ser bloqueados por ketanserina, conhecido inibidor específico para uma subclasse de receptor de 5-HT no sistema de vertebrados (Maddrell, 1991). Outros trabalhos demonstraram que a 5-HT ativa a adenilciclase presente na membrana das células isoladas dos TMs de *Rhodnius prolixus*, aumentando os níveis intracelulares do segundo mensageiro AMP cíclico. Estudos envolvendo os TMs isolados e incubados com AMPc exógeno mostraram ser estimulados até sua secreção máxima (Maddrell, 1991).

A estimulação da secreção de fluido dos TMs de *Rhodnius prolixus* pela 5-HT

produz uma mudança trifásica no potencial transepitelial (TEP). A primeira fase da estimulação é caracterizada pela mudança do TEP de -25 mV, (lúmen negativo em túbulos não estimulados) para -33 mV. Isso se deve ao estímulo do transporte através de canais de cloreto, presente na membrana apical por este hormônio. Os canais de cloreto transportam cloreto para o exterior da célula a favor de gradiente de concentração. Na segunda fase o TEP atinge o valor de +30 mV e posteriormente, o de -32 mV na fase 3 (Ilanowski and O'Donnell, 2001). Ilanowski e O'Donnell (2001) sugerem que essas fases (dois e três) do potencial são decorrentes da ativação seqüencial do transporte através da H⁺-ATPase tipo vacuolar apical (que secreta H⁺ para a luz tubular tornando-a mais positiva) e do cotransportador basolateral Na⁺:K⁺:2Cl⁻ (que secreta os íons Na⁺, K⁺, Cl⁻ aumentando a concentração iônica intracelular), respectivamente (Figura 6).

A Na⁺/K⁺-ATPase é um transportador importante para a manutenção das diferenças elétricas e iônicas entre os compartimentos intra e extracelulares de mamíferos, como por exemplo, nas células renais onde está presente na membrana basolateral, e é responsável pelo transporte ativo de Na⁺ e K⁺, criando gradiente favorável para o transporte de íons (Apell, 1989; Alberts & cols, 2004). Também nos insetos, a bomba participa do transporte transepitelial e da regulação do volume celular nos TMs de *Rhodnius prolixus*. Porém vale lembrar que o principal responsável pelo transporte ativo primário neste sistema é a H⁺-ATPase (Caruso-Neves & cols, 2001). Grieco e Lopes (1997) sugerem em seu trabalho que a serotonina, liberada após alimentação do inseto, inibe a atividade da bomba de Na⁺/K⁺. Acredita-se que a inibição leve ao aumento da concentração intracelular de Na⁺, causando o movimento de Na⁺ e água para o lúmen do túbulo e assim

umentando a taxa de secreção de fluido. Esta hipótese é confirmada pela observação de que a ouabaina aumenta a secreção de fluido em túbulos de Malpighi isolados e não estimulados (Nicolson, 1993). Como a secreção transepitelial continua mesmo com a inibição da bomba de Na^+/K^+ , pela ouabaina, isto confirma o papel central da H^+ -ATPase tipo vacuolar no transporte transepitelial (Beyenbach & cols, 2000; Janowski and O'Donnell, 2001).

Toda estimulação de transportadores iônicos ao longo dos TMs de *Rhodnius prolixus* pela 5-HT abordada até o presente momento é essencial para o movimento de água através desse epitélio, já que a 5-HT aumenta secreção de fluido nos TMs. Resolvemos estudar nesta dissertação a associação entre a 5-HT e o transporte de água transcelular via canais.

I.3-Canais de Água (Aquaporinas)

Após a descoberta da estrutura da membrana celular, foi esclarecida a capacidade das células em manter seu ambiente intracelular isolado do meio externo. E com a descoberta de canais, trocadores e co-transportadores explicações moleculares para o movimento de solutos através das membranas celulares foram fornecidas.

Embora se pensasse que a água somente atravessava a membrana lipídica por difusão simples, a observação de membranas com alta permeabilidade a água, como as da bexiga dos anfíbios e a membrana dos eritrócitos, deixava de desejar essa simples explicativa. Assim formas mais específicas de transporte na membrana celular deveriam estar presentes nos epitélios. O primeiro canal de água

caracterizado molecularmente foi denominado proteína integral formadora de canal (CHIP). O CHIP foi purificado dos eritrócitos e do rim (Denker & cols, 1988) e foi identificado como uma proteína tetramérica formadora de canal relacionado à proteína de lente, MIP (Smith and Agree, 1991). O cDNA do CHIP foi isolado da medula óssea (Preston and Agre, 1991) e sua função de canal seletivo de água foi demonstrada pela expressão em *Xenopus oocytes* (Preston & cols, 1992). O grupo de proteínas de canais de água é agora referido como “Aquaporinas” e CHIP têm sido designado como AQP1.

Portanto, o transporte de água através dos epitélios acontece tanto por difusão quanto por canais de água. A difusão da água através de todas as membranas biológicas ocorre em velocidade relativamente baixa. Já em epitélios que possuem uma alta permeabilidade à água, são encontrados os canais de água (Agree & cols, 2002).

As aquaporinas são proteínas transportadoras de água que fazem parte da família MIP (proteínas intrínsecas maiores) identificada originalmente nas células dos olhos de boi (MIP26 ou AQP0) (Preston & cols, 1992). Mais de 350 membros da família MIP tem sido identificados por homologia da seqüência de aminoácidos. Essa família é funcionalmente dividida em dois grupos: aquaporinas (AQP), canais seletivos de água; e aquagliceroproteínas que permitem o transporte de água, glicerol e solutos pequenos (Tabela 1). As estruturas primárias dessas proteínas são similares (250-290 aminoácidos) (Agree & cols, 2002).

Aquaporinas	Localizações	Referências
AQP0	olhos	Gorin & cols, 1984, Zampighi & cols, 1989
AQP1	rins, endotélio, olhos	Nielsen & cols, 1993c, Nielsen & cols, 1993b, Agree & cols, 2002
AQP2	rins, testículo	Nielsen & cols, 1993a
AQP4	cérebro, rins, retina	Nielsen & cols, 1993b, Nagelhus & cols, 1998
AQP5	glândulas salivares e lacrimais, pulmão	Nielsen & cols, 1997a
AQP6	rins	Yasui & cols, 1999
AQP8	rins, testículo, pâncreas, fígado, cólon	Ishibashi & cols, 1997, Koyama & cols, 1997, Borgnia & cols, 1999
AQP10	testículo	Hermo & cols, 2004
Aquagliceroproteínas		
AQP3	rins, vias aéreas, olho	Ecelbarger & cols, 1995, Nielsen & cols, 1997a, Hamann & cols, 1998
AQP7	rins, testículo, tecido adiposo	Ishibashi & cols, 1997; Kishida & cols, 2000, Borgnia & cols, 1999
AQP9	fígado, pulmão, testículo, baço	Tsukaguchi & cols, 1998, Borgnia & cols, 1999, Nielsen & cols, 2002

Tabela 1: Distribuição das aquaporinas e aquagliceroproteínas em diferentes órgãos dos mamíferos.

O canal de água é uma estrutura tetramérica formada por quatro monômeros de aquaporina. As aquaporinas possuem seis domínios transmembranais e terminações intracelulares NH₂ e COOH. Os domínios transmembranais são ligados por cinco alças (A-E), sendo duas alças extracelulares (A e C) e três intracelulares (B, D e E) (Figura 8). Na aquaporina 1 as alças B e E contêm uma seqüência de aminoácidos que é altamente conservada em todos os membros da família MIP, aspargina-prolina-alanina (NPA) (Figura 8). Como predito pelo modelo “hourglass”, as alças B e E interagem uma com a outra através das suas seqüências NPA, formando o poro do canal (Murata e cols, 2000). O aminoácido cisteína 189 presente na alça E e o sítio 73 da alça B foram identificados como sendo sítios

sensíveis ao mercúrio (Preston & cols, 1993). A permeabilidade do canal a água é bloqueada pelo mercúrio, e mutações introduzidas nas alças B e E resultaram em diminuição da função do CHIP recombinante sugerindo assim importância das alças B e E na formação do poro do canal (Jung & cols, 1994). Cada subunidade do tetrâmero contém um poro aquoso individual que permite passagem de uma única fileira de moléculas de água, mas interrompe a ligação de hidrogênio necessária para a passagem de próton (Agree & cols, 2002). A seletividade da aquaporina a água é devido à constrição no diâmetro do poro de aproximadamente 3Å, tendo a molécula de água 2.8Å de diâmetro (Murata & cols, 2000). A permeabilidade da AQP1 é de 3×10^9 moléculas por monômero por segundo (Zeidel & cols, 1992).

Echevarria e seus colaboradores, (2001) após descobrirem a presença do canal de água em TMs de *Rhodnius prolixus* (Rp-MIP), demonstraram que a estrutura do RP-MIP possui também seis domínios transmembranais hidrofóbicos que são ligadas por cinco alças (A-E), sendo que a alça B possui a seqüência NPA altamente conservada nos membros da família MIP e a alça E possui a seqüência NPV (aspargina-prolina-valina). E como todas aquaporinas, também possuem os segmentos N- e C- terminal localizados intracelularmente (Figura 9). Estes pesquisadores também demonstraram a presença da RP-MIP nas células dos segmentos distal e proximal dos túbulos de Malpighi e quando esta proteína é expressa em oócitos de *Xenopus laevis* a permeabilidade a água da membrana celular (Pf) aumenta em cerca de dez vezes. Este aumento do Pf, embora significativo, ($P < 0.001$) é pequeno comparado com a permeabilidade induzida pela maioria das AQPs conhecidas em mamíferos (Echevarria & cols, 2001). Este fato poderia ser explicado, provavelmente, pela existência da seqüência NPV, que

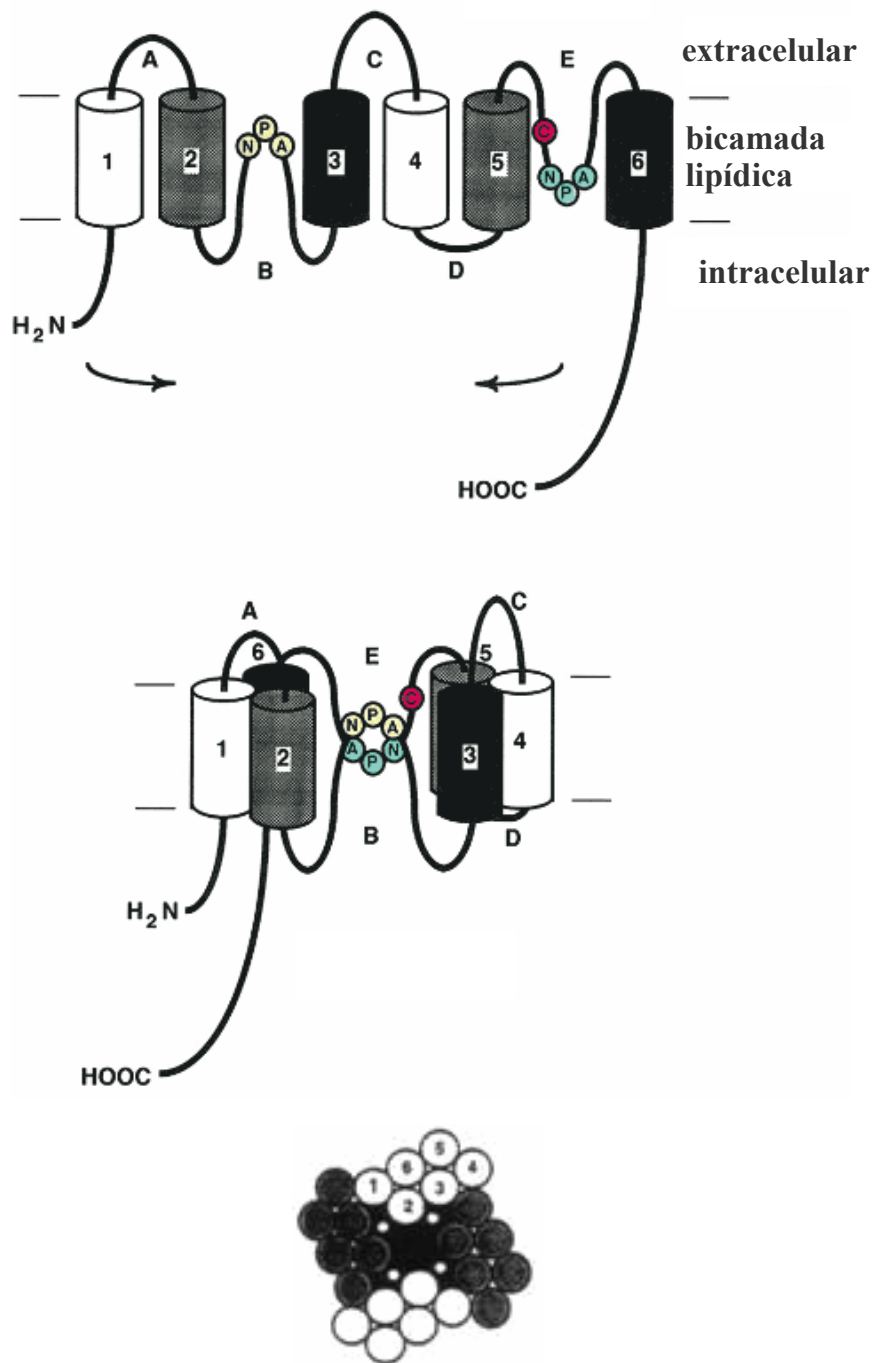
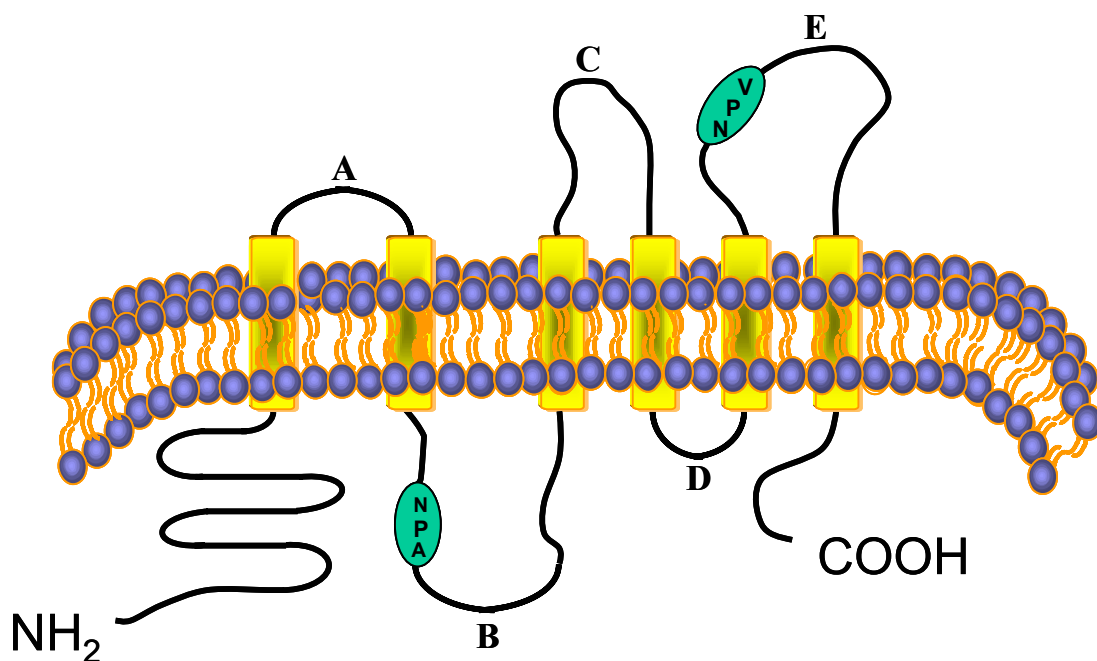


Figura 8: Modelo representativo da AQP1: Demonstração da estrutura da AQP1, as alças B e E contém o domínio NPA altamente conservado que forma o poro do canal. Modificado da revista *Journal of Biological Chemistry* (Jung & cols. 1994b).

prejudicar a conformação da RP-MIP, necessária para formação do poro do canal. Embora outras proteínas como a Nod26 (aquaporina expressa em bactéria fixadora de nitrogênio), que também contem a seqüência NPV, possua alta Pf (Echevarria e cols, 2001).

As proteínas RP-MIP contêm sítios de fosforilação: Ser11 para proteína quinase dependente de AMPc, Ser 25 e Ser 262 para caseína quinase II e também nove cisteínas que poderiam ser sítios para ligação de mercúrio, embora estudos tenham demonstrado que as RP-MIP são insensíveis ao mercúrio, similarmente as AQP4 e AQP7 (Hasegawa e cols, 1994; Ishibashi e cols, 1997; Echevarria e cols, 2001).

Extracelular



Intracelular

Figura 9: Modelo esquemático do RP-MIP. O canal é formado por seis domínios transmembranais, cinco alças (A-E), onde encontramos nas alças B e E a presença dos domínios NPA e NPV, respectivamente e os domínios N-terminal e C-terminal estão presente no meio intracelular.

II- Objetivo

Estudar a modulação de expressão da aquaporina em túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* pela 5-HT.

Objetivos específicos:

- detectar a presença das aquaporinas nos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*,
- investigar se a sua expressão é modulada após a alimentação do inseto,
- determinar o possível envolvimento da 5-hidroxitriptamina neste processo.

III.1- Colônia do *Rhodnius prolixus*.

Foram utilizados *Rhodnius prolixus* provenientes da colônia mantida pelo Prof. Hatisaburo Masuda (Departamento de Bioquímica Médica da Universidade do Rio de Janeiro) e gentilmente cedidos para a realização deste trabalho.

A colônia foi mantida a 28°C e umidade relativa de 70-80%. Os insetos foram alimentados através do oferecimento de sangue fresco oriundo da orelha de coelhos. As orelhas dos coelhos foram apresentadas aos animais e a alimentação foi espontânea. Os insetos se alimentam pela primeira vez duas semanas após a eclosão dos ovos e, novamente após quatro semanas. Entre o 2° e 4° estágio de desenvolvimento, os insetos foram alimentados a cada quatro semanas, no 5° estágio a cada cinco semanas. Os insetos adultos foram alimentados a cada três semanas. A muda ocorre aproximadamente 15 dias após cada alimentação, sendo que após o 5° estágio eles chegam à fase adulta, caracterizada pela presença de asas nos insetos. Nesta tese foram utilizados insetos machos adultos alimentados e sem alimentação por três semanas.

III.2- Dissecção

Os insetos tiveram suas patas, asas e cutícula superior cortadas, em seguida foram imobilizados em uma placa de parafina imersos em solução tampão livre de RNase que consiste em (em mol/l): NaCl, 133.6; KCl, 4.0; MgCl₂ · 6H₂O, 8.5; CaCl₂ · 2H₂O, 2.0; glucose 20.0; NaHCO₃, 10.2; NaH₂PO₄, 4.3; e Hepes, 8.6. Com o auxílio de duas pinças e lupa (aumento de 20x), os túbulos de Malpighi do

Rhodnius prolixus, contendo ambos os segmentos, foram cuidadosamente retirados, transferido para tubos de microcentrífuga do tipo “Eppendorf” contendo 500 µl da solução tampão livre de RNase e foram mantido nestes tubos a temperatura ambiente até o início dos experimentos. Os túbulos traqueais que porventura estivessem aderidos aos túbulos de Malpighi foram cuidadosamente retirados com auxílio de pinças e sob visão estereoscópica.

III.3- Grupos experimentais

Os túbulos de Malpighi dos insetos foram divididos em dois grupos: controle - sem alimentação por três semanas e alimentado com sangue de coelho 6 horas antes do sacrifício do animal. Os túbulos de Malpighi dissecados do grupo controle foram divididos em 4 subgrupos e foram mantidos em solução tampão que continha ou não 5-hidroxitriptamina e com ou sem análogo de AMPc (8-Bromoadenosina- 3',5'- ácido ciclofosfórico ou 8-Br-cAMP) por 6 horas de incubação (Figura 10).

- controle mantido em solução tampão (C)
- tratado com 5-hidroxitriptamina 10^{-6} mol/l (5-HT) (Sigma-RBI, USA)
- tratado com análogo de cAMP (8-Br-cAMP) 10^{-4} mol/l (AMPc)
- tratado com 5-hidroxitriptamina 10^{-6} mol/l junto com 8-Br-cAMP 10^{-4} mol/l (5-HT/AMPc);

Cada amostra continha TMs isolados de aproximadamente 50 animais.

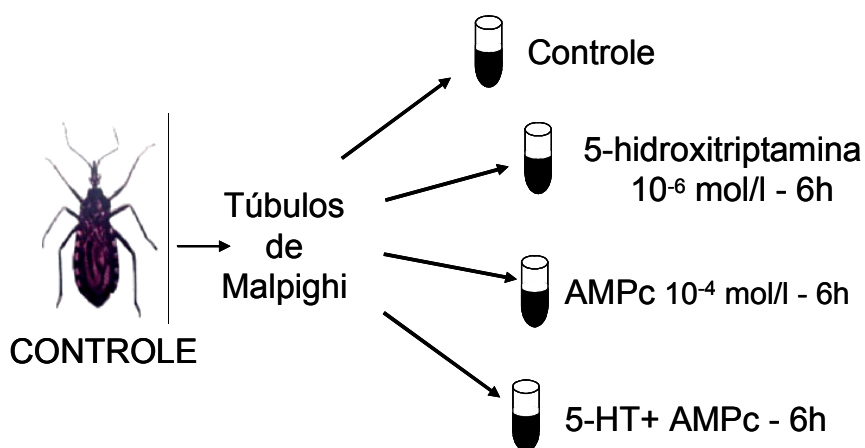


Figura 10 – Esquema representativo dos grupos experimentais.

III.4- Extração de RNA-total

Os túbulos de Malpighi, após o período de incubação de 6 horas, foram submetidos a uma rápida centrifugação 100.000 g por cinco minutos para retirada da solução tampão, em seguida, foram homogeneizados na presença do reagente TRIzol[®] (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA). O TRIzol[®] Reagent é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotilcianato correspondente a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi em 1987, utilizado na extração de RNA total. Após a extração, realizada de acordo com as instruções do fabricante, o RNA precipitado foi solubilizado em 20 µL de água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA-total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm (Hitachi U-1100, Japão). A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e pela razão entre os

comprimentos de onda 260 e 280 que deveriam estar acima de 1,7. O gel foi submerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 85 Volts por aproximadamente 20 minutos.

III.5- Transcrição Reversa (RT)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) 0,5 µg/mL de oligonucleotídeo dT (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA) foi incubado a temperatura de 65°C por 3 minutos com RNA-total extraídos de diferentes amostras. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 50 µL contendo 10 mM de dNTPs (Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), 0,1 M DTT (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 5X First Strand Buffer (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 3U de RNAsin e 2,5U MMLV-RT (ou SuperScript™ II RT) (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA) e foi realizada uma incubação a 37°C por 120 min seguida de uma incubação a 65°C por 10 min. Após as incubações, centrifugações seriadas foram feitas para precipitação e lavagem do pellet. O pellet foi ressuspensionado em 10µl de água DEPC e guardado a -20°C. Para certificarmos a ausência de contaminação ou amplificação de DNA genômico a transcriptase reversa não foi adicionada em um tubo experimental chamado de RT (-).

III.6- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a transcrição reversa o cDNA foi utilizado como molde nas reações de PCR contendo os oligonucleotídeos ou primers. Para a amplificação, foram utilizados 0.2 μ M de cada oligonucleotídeo, 0.2 mM dNTP (Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) 1.5 mM MgCl₂, 10X First Strand Buffer (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA) e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA), em um volume total de 50 μ l de reação. Foi confeccionado um par de oligonucleotídeos degenerados: (A= 5'GGNGSNCA YNTNAA YCCNGC3') e (B= 5'GGDSCVARNSWBCKNGCNGG3'), localizados na região NPA, que é altamente conservada em todos os membros da família MIP.

As reações de PCR utilizando oligonucleotídeos (A e B) degenerados foram iniciadas por uma desnaturação a 94°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos que compreendeu: um minuto a 94°C para desnaturação das fitas, seguido da temperatura específica de ligação dos oligonucleotídeos 43°C, por fim, um minuto a temperatura de 72°C para a ação da DNA polimerase. Após o último ciclo, todas as reações de PCR foram seguidas por uma extensão a 72°C por sete minutos.

Após o sequenciamento do produto de PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados, oligonucleotídeos específicos foram sintetizados (E= 5'CCAGTGGTGACAATATGT3 e F= 5'GGTACAAACAAATTCTACG3') para realizar o RT-PCR semi-quantitativo. As reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos foram iniciadas por uma desnaturação a 94°C por 5

minutos seguidos de 36 ciclos que compreendeu: um minuto a 94°C para desnaturação, seguido da temperatura específica de anelamento dos primers 50°C, por fim, um minuto a temperatura de 72°C para a ação da DNA polimerase. Ao final, as reações de PCR foram seguidas por uma extensão a 72°C por sete minutos.

Experimentos preliminares foram realizados para validar o método semiquantitativo do RT-PCR. Primeiramente, determinamos qual a concentração ideal de RNA (62.5 ng, 125, 250, 500, 1000 e 2000) usada para a amplificação Rp-MIP. E posteriormente realizamos experimentos para determinar o número de ciclos (31, 33, 35, 37, 39) que produziria um produto de PCR na fase linear de amplificação.

Todas as reações foram realizadas com um controle negativo, onde o cDNA foi substituído por água destilada. Após a reação de PCR, 25 µL de cada amostra, correspondente aos vários grupos experimentais foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizadas pelo brometo de etídio submetido à luz ultravioleta. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular esperado.

III.7- Sequenciamento

Os produtos do PCR realizado com oligonucleotídeos degenerados (A e B) foram purificados usando GeneClean (B1010, CA, USA), ligados ao vetor pCR-Script SK (+) (Stratagene, CA,USA) e depois seqüenciados. A seqüência do DNA foi determinada pelo uso de seqüência ciclo Taq polimerase e pelo sistema de

detecção semi-automático (Perkin-Elmer, Applied Biosystem, Foster City, CA).

III.8- Southern blotting

Southern blotting foi realizado nos produtos de PCR analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5%. O gel obtido foi desnaturado e neutralizado. Os fragmentos de cDNA, contidos no gel, foram transferidos para uma membrana Hybond N (Amersham, NJ, USA). Após a transferência, o material foi fixado à membrana através de irradiação ultra-ultravioleta (UV Cross linker Stratagene, La Jolla, CA, EUA). A membrana foi pré-hibridizada com uma solução QuikHyb (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) por 10 min a 37°C. Para hibridização foram utilizados como sonda oligonucleotídeos degenerados internos também localizados na região NPA, (C=5'AAYCCNGCNGTNACNBTNS3', e D=5'GCDGGRTTVATNSHNSMNCC3') marcados radioativamente com [γ 32 P] dATP (3.000 Ci/mmol, Amersham, IL, EUA), utilizando a enzima polinucleotídeo quinase T4. A cada sonda foi adicionado 1 μ g de DNA extraído de esperma de salmão. O DNA de esperma de salmão evita ligações não específicas da sonda à membrana.

A membrana foi lavada duas vezes por 15 minutos cada em 2X SSC e 0.1% SDS à temperatura ambiente e expostas em filmes de raio-X (Kodak X-OMAT Films TM Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, EUA) a - 70°C por no mínimo 16 horas.

III.9- Western Blotting

A expressão da proteína da aquaporina em TMs do *Rhodnius prolixus* foi avaliada pela técnica Western-blotting utilizando um anticorpo policlonal de coelho anti-AQP-1 (cedido gentilmente pelo Dr. Peter Agre, The Johns Hopkins School of Medicine), que reconhece um segmento localizado no domínio citoplasmático COOH-terminal da proteína da aquaporin 1 de coelho (Nielsen et al, 1993). Também foi utilizado um anticorpo monoclonal para MIP26 (AQP0) (cedido gentilmente pelo Dr. Ross Johnson, EUA), que reconhece um domínio intracelular da proteína MIP26 de camundongo que foi caracterizado por Sas e colaboradores em 1985. Estes anticorpos foram utilizados pela similaridade dessas proteínas (MIP26 e AQP1) com a Rp-MIP.

Os túbulos de Malpighi isolados foram homogeneizados em uma solução contendo 250 mmol/l de sucrose, 1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l de imidazol, pH 7.2, e os seguintes inibidores de protease: 1 mmol/l 4-(2-aminoetil)-benzenesulfonil fluorado, 1 mM de benzamida, 10 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml aprotinin, e 1 µg/ml de quimostatina. O homogenado foi centrifugado a 1000g por 10min. O sobrenadante foi retirado, e o pellet foi suspenso em 3 volumes da mesma solução, e a centrifugação foi repetida. Ambos os sobrenadantes foram centrifugados a 10.000g por 20 min para separação da fração mitocondrial. O sobrenadante formado foi centrifugado a 100.000g por 1 h, e o pellet contendo as membranas celulares foram suspensas em tampão de homogenização e a concentração das proteínas foi obtida utilizando-se o reagente

de Bradford, e a albumina bovina usada como padrão (Bradford, 1976).

Os extratos foram solubilizados aquecendo a 95°C por 2 min em solução tampão (15 g/l SDS, 10 mmol/l Tris-Cl pH 6.8, 6 g/l DTT, e 60 ml/l de glicerol). As proteínas (25µg) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PVDF-Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi bloqueada com 9% leite dissolvido em PBS e incubada com anticorpo policlonal específico anti-AQP-1 (1: 1,000) ou anticorpo monoclonal anti-MIP26 em PBS, pH 7.4, a 4°C por 12-24 h. Incubações seqüenciais foram feitas com anticorpo secundário de cabra anti-coelho IgG conjugado com fosfatase alcalina (1:1,000) contra anticorpo policlonal anti-AQP-1 e anticorpo secundário de cabra anti-camundongo IgG conjugado com fosfatase alcalina (1:1,000) contra o anticorpo MIP26.

O western blotting foi revelado utilizando 75mg/ml de líquido / nitroazul tetrazólio (NBT) e 50 mg/ml de solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) (ambos reagentes da Gibco-BRL- Life technologies, Rockvile - USA) em solução alcalina por 5 minutos.

III.10- Ensaio de proteção contra RNase (RPA)

O produto de PCR correspondendo a seqüência de nucleotídeos clonada Rp-MIP foi ligada a pCR-Script SK (+) e usada para transformar células supercompetentes Epicurian Coli XL1-blue (Stratagene, California, USA). Após checar a seqüência de nucleotídeos (Sequenase version 2.0, US Biochemicals,

Ohio, USA), esses fragmentos serviram como molde para síntese de RNA antisense. Sondas para Rp-MIP foram preparadas pela linearização de 1 µg do molde de DNA com Not-I (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA). Seguindo o protocolo Maxscript Kit (Ambion, Austin, Texas, USA), todos os moldes foram transcritos in vitro na presença de [α -³²P] UTP NEN, 3000 Ci/mmol (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) com RNA polymerase T7 para gerar sondas marcadas radioativamente RNA antisense. Antes de usar no RPA (RPAll kit; Ambion), todas as sondas foram avaliadas com 10 µg de RNA transportador de levedura na presença e na ausência de RNase A e T1, de acordo com as instruções de confecção. O Rp-MIP não digerido tem mais 116 nucleotídeos do que a sonda digerida. O RNA total (20 µg) do TMs de *Rhodnius prolixus* foi misturado com as sondas radioativas (1×10^5 cpm/amostra) e foram hibridizados a 45°C por 18 horas. Ambos RNase A e T1 (RPAll kit, Ambion, Texas, USA) foram usados para tratar as amostras a 37°C por 30 min. Os fragmentos protegidos foram separados por eletroforese em gel contendo 8 mol/l de uréia e 50 g/l poliacrilamida. As amostras foram transferidas para papel cromatográfico e expostas em filmes de auto-radiográficos dentro de uma caixa intensificadora e mantidos a -80 °C até a revelação.

III.11- Densitometria

As densitometria das bandas correspondentes ao tamanho esperado para o RT-PCR, RPA e Western foram feitas com a utilização de programa de análise

computacional (Sigma Gel v1.1, gel analysing software, Jandel, USA).

III.12- Análise estatística

Os resultados estão apresentados com média \pm EPM. Para análise dos experimentos com três grupos de animais ou mais foi realizado o teste de One-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman Keuls. Para a comparação de dois grupos experimentais utilizamos o teste *t*-student. A diferença foi aceita como significativa quando $P \leq 0,05$.

IV.1- Detecção do produto de PCR usando primers degenerados

A expressão do RNAm da aquaporina em túbulos de Malpighi foi determinada pela análise do RT-PCR e Southern blotting. O cDNA confeccionado a partir do RNA extraído dos TMs de *Rhodnius prolixus* foi amplificado com os oligonucleotídeos degenerados A e B, revelando um produto de PCR de 365 pares de base (Figura 11).

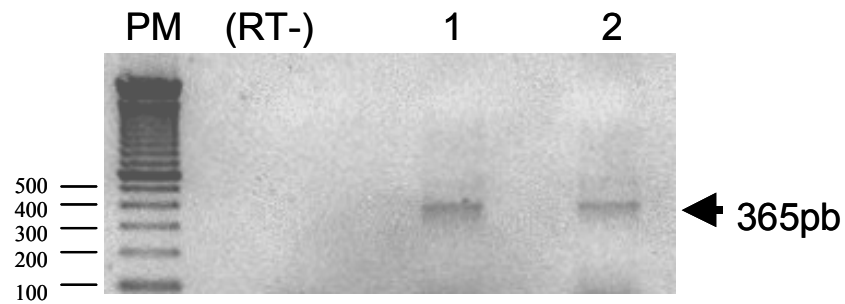
A técnica de Southern blotting utilizando como sonda oligonucleotídeos marcados radioativamente com [³²P] γdATP (C e D) demonstrou uma marcação de 365pb, confirmando o resultado obtido pelo PCR (Figura 11).

O sequenciamento do produto de PCR de 365pb demonstrou a mesma seqüência (nucleotídeos 349-714) clonada da aquaporina presente em TMs de *Rhodnius prolixus* (RP-MIP) por Echevarria & cols, 2001 (Figura 12).

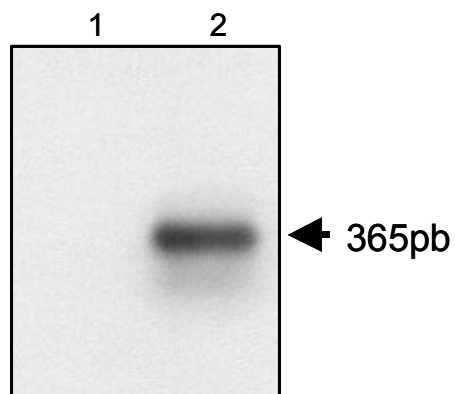
IV.2- Detecção da concentração ideal de RNA-total de Túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* utilizado para realizar o RT-PCR

Após a confirmação da expressão da aquaporina presente nos TMs de *Rhodnius prolixus*, a técnica de RT-PCR utilizando primers específicos (E e F) foi realizada para determinar a concentração necessária de RNA-total isolado dos TMs de *Rhodnius prolixus* para detecção do RNAm do RP-MIP sem atingir a saturação da reação de RT-PCR. Para a curva de concentração, foram utilizados cDNAs obtidos a partir de RNA-total dos TMs em crescentes concentrações: 125,

A



B



C

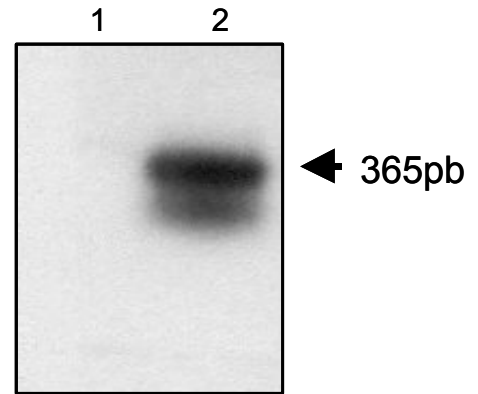


Figura 11: Detecção da aquaporina em TM de *Rhodnius prolixus*. **A)** Gel de agarose representativo do produto do RT-PCR para o gene da aquaporina, PM: marcador de peso molecular 1,000 a 100 pb, RT(-): controle negativo, amostras 1 e 2: produtos de 365pb do RT-PCR. **B e C)** Análise pelo Southern blotting [linha 1: RT (-); linha 2: ligação específica da sonda realizado com primers degenerados (B e C)] correspondente ao produto de PCR de 365pb.

```

1   tactggtgtg cagcttcttc caaacactct caaataaaaa taaaaataaa aaaacatatc
61  cagcatggaa tattctggca agttatttga gatgaatgca ttaatattgc tcatgacact
121 attccaatgc cggcggcaac taggaacaga cgaatgagta gcatctgtaa gaccaggatc
181 ggtgagacca aggatatgtc aaatgtggag attgaatcca gtctgaagat agaagataat
241 cacttgagtc atcgaccaag cttagcggtg caaacattct cttggagaaa atgcattgag
301 atatttattg cagaagtagt ggccacgtca ctgctcctat gtcttgggtg tatgagcaca
361 gttggtggat ttgatggttc tcaaagtgtc cacaagctac aaccggcttt agcttttggc
421 tttcttgttt cttcactaat tacgtcattt ggtcatattt cgggagctca tatgaatcca
481 gtggtgacaa tatgttttta catgatgggg accatcgaag cgtttttgat accgatttac
541 ctagcagctg aaattatagg atctgtattg ggaatgggat tacttttact tgtcacgcct
601 gtcggtatta ttggatcaag agatgtttgc accacgattc caaatccaac attaaatagc
661 tttcaagcat taggcgtaga atttgtttgt acctctttgc tacttttagt attacttggg
721 tgttctgatg tgaggaatgc tgataaacia gactcagtac cacttaagtt cgcaggtgtc
781 ataattacct tgtcccttct tgggtggacc tacactggag caagcgtaaa tcctgtaaga
841 agttttgcac cagcactctg gagtcacaat tggacagcta attgggtgta ctgggttggg
901 ctttcacttt ctggctttga taacaccttt tttctaccaa tgctgttttc caccgtaag
961 aaaatgaaga cttgcataat taagtgaatg atgattataa ttcatttgta aatatgtaca
1021 aatgttcata tcagtacaag gacaattttt aaaattacta gtggtaaatag tataaacatt
1081 tctttacggt aaagatcata aagcaagtaa attagctaa aaaaaaaaaa aaa

```

Figura 12: Seqüência de RP-MIP publicada por Echevarria & cols, 2001. Em negrito e itálico está representada a seqüência de nucleotídeos de 365 pb seqüenciados nesta dissertação (nucleotídeo 349 ao 714)

250, 500, 1000 e 2000ng. Os produtos de amplificação de tamanho esperado do RP-MIP (286pb) nas diferentes concentrações foram obtidos e os valores referentes às intensidades das bandas foram graficamente representados na figura 13.

A concentração escolhida para RP-MIP foi 500ng, por apresentar a intensidade da banda referente à fase exponencial de amplificação por RT-PCR (Figura 13).

IV.3- Determinação do número ideal de ciclos de PCR a ser utilizado para a amplificação do RNAm do RP-MIP.

Uma vez determinada a concentração de RNA-total a ser utilizada na reação de RT-PCR para devida observação do RNAm do RP-MIP, foi determinado o número de ciclos para que a reação de amplificação do gene não atingisse a saturação. Para realizar o experimento foi utilizada a concentração de 500ng de RNAtotal extraído dos TMs, sendo que os números de ciclos utilizados na reação de PCR foram: 31, 33, 35, 37, 39, 41 (Figura 14). A análise densitométrica das bandas revelou que a repetição do ciclo por 35 vezes é ideal para a realização dos experimentos, pois não é atingida a saturação da reação (Figura 14).

IV.4- Análise da expressão do RNA mensageiro dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes tratamentos.

A partir dos resultados obtidos, utilizamos a concentração de 500ng do RNA-

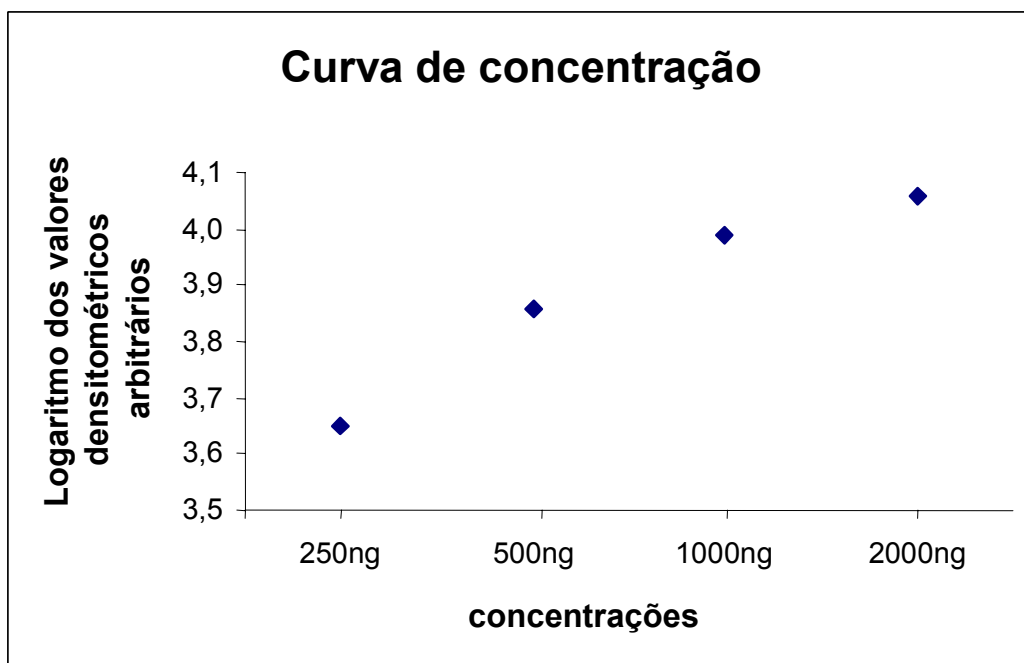
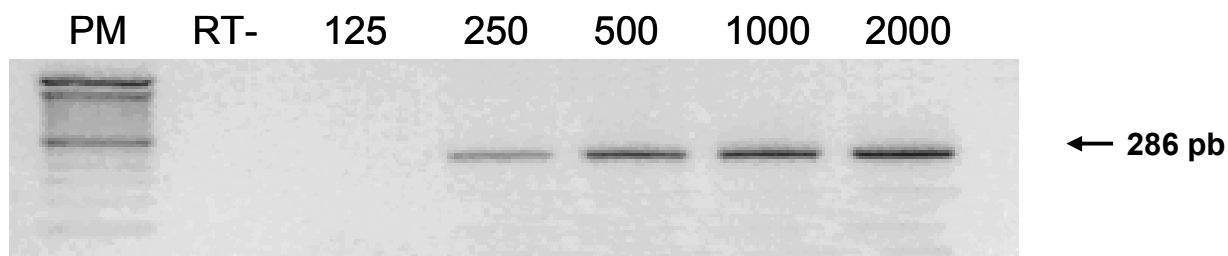


Figura 13: Curva de concentração: Gráfico demonstrativo do logaritmo dos valores obtidos na análise densitométrica do RT-PCR. Foto - Eletroforese em gel de agarose ilustrativa do RT-PCR da curva de concentrações crescentes de RNA (PM= peso molecular, RT= controle negativo sem transcriptase reversa).

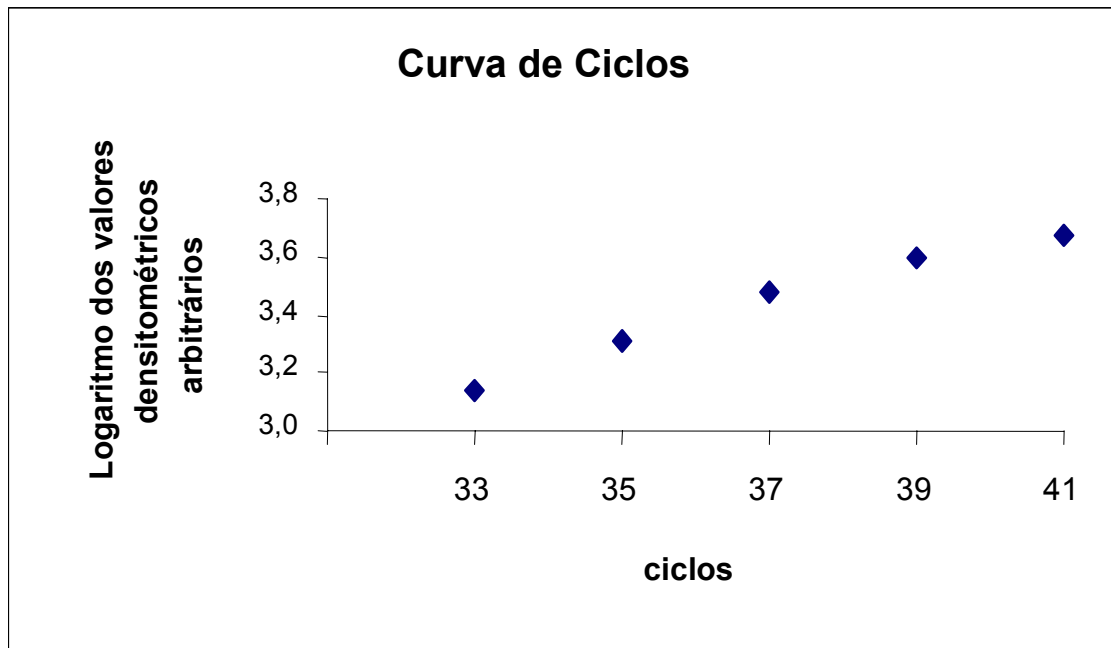
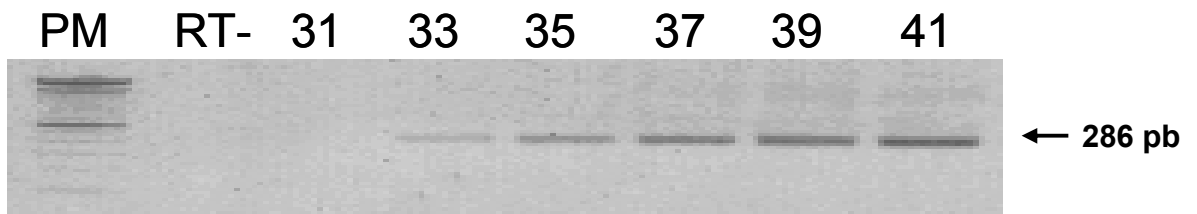


Figura 14: Curva de ciclos: Gráfico demonstrativo do logaritmo dos valores obtidos na análise densitométrica do RT-PCR. Foto - Eletroforese em gel de agarose ilustrativa do RT-PCR da curva de ciclos (PM= peso molecular, RT= controle negativo sem transcriptase reversa).

total do TMs, 35 ciclos e as condições já estabelecidas para realizarmos o RT-PCR utilizando os primers específicos (E e F).

Ambas as técnicas: ensaio de proteção contra RNase (RPA, Figura 15, n=4, $p \leq 0,05$) e RT-PCR (Figura 16, n=3, $p \leq 0,05$) demonstraram que a expressão do RNAm do Rp-MIP presente nos TMs aumenta ($2,5 \pm 0,25$ vezes no RPA e $3,9 \pm 0,96$ vezes no RT-PCR semi-quantitativo) nos animais alimentados em relação ao grupo controle (sem alimentação). O tratamento dos TMs com 5-hidroxitriptamina (10^{-6} mol/l) ou 8-Br-cAMP (10^{-4} mol/l) também foram capazes de aumentar a expressão do mRNA do Rp-MIP 1,87 e 2,5 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente (n=3, $p \leq 0,05$) (Figura 16). Porém o tratamento dos TMs com 5-hidroxitriptamina (10^{-6} mol/l) juntamente com 8-Br-cAMP 10^{-4} mol/l (5-HT/AMPC) aumentou a expressão do mRNA do Rp-MIP (2,48 vezes em relação ao grupo controle, n=3, $p \leq 0,05$), mas não sendo diferente do estímulo quando os TMs são tratados com os mesmos separadamente (5-HT e AMPC).

IV.5- Análise da expressão da proteína do RP-MIP através da técnica de western blotting

O western blotting foi realizado para analisar a expressão da proteína da aquaporina presente nos TMs de *Rhodnius prolixus*. Os anticorpos utilizados, anti-AQP-1 e anti-MIP26, demonstraram afinidade para a proteína de membrana dos TMs pela detecção de uma única banda de aproximadamente 26-28 kDa (Figura 17).

Em ambos os casos, utilizando os anticorpos anti-MIP26 ou anti-AQP-1 foi

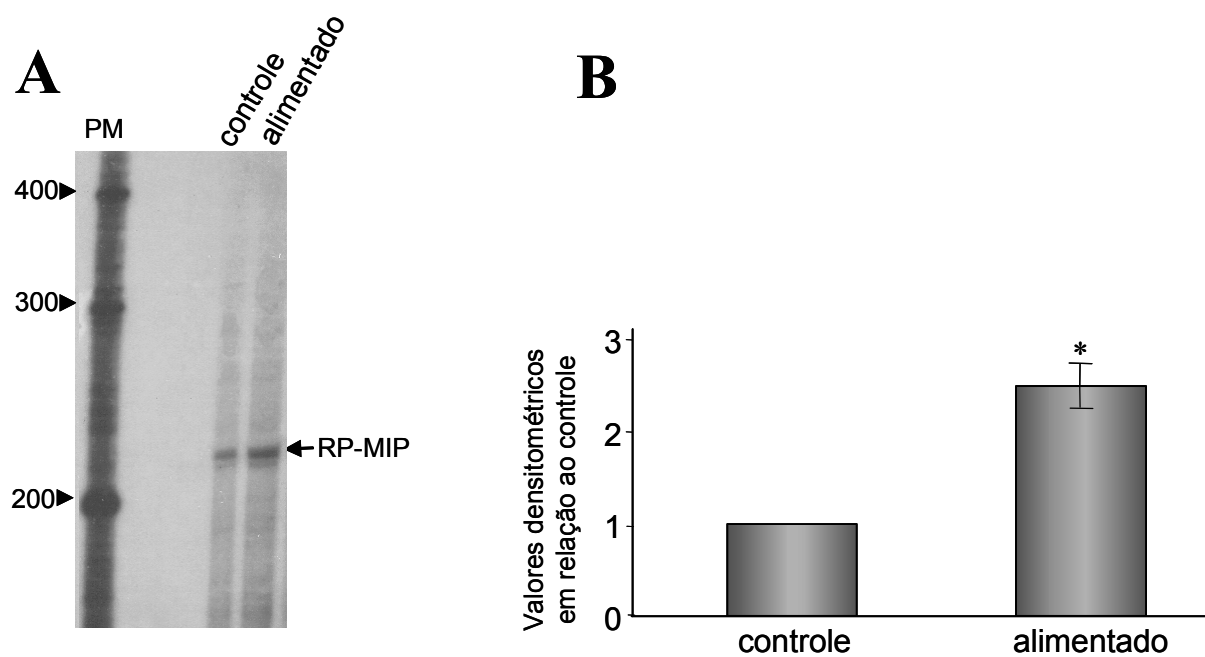


Figura 15: Detecção da expressão do RNAm da aquaporina pelo RPA em túbulos de Malpighi isolados de *Rhodnius prolixus*. A) Figura representativa do RPA (PM: peso molecular). B) Gráfico representativo da média dos valores obtidos pela análise densitométrica das bandas do grupo controle e alimentado (n=4; ANOVA: $P \leq 0,05$). (*) $P \leq 0,05$ em relação ao controle.

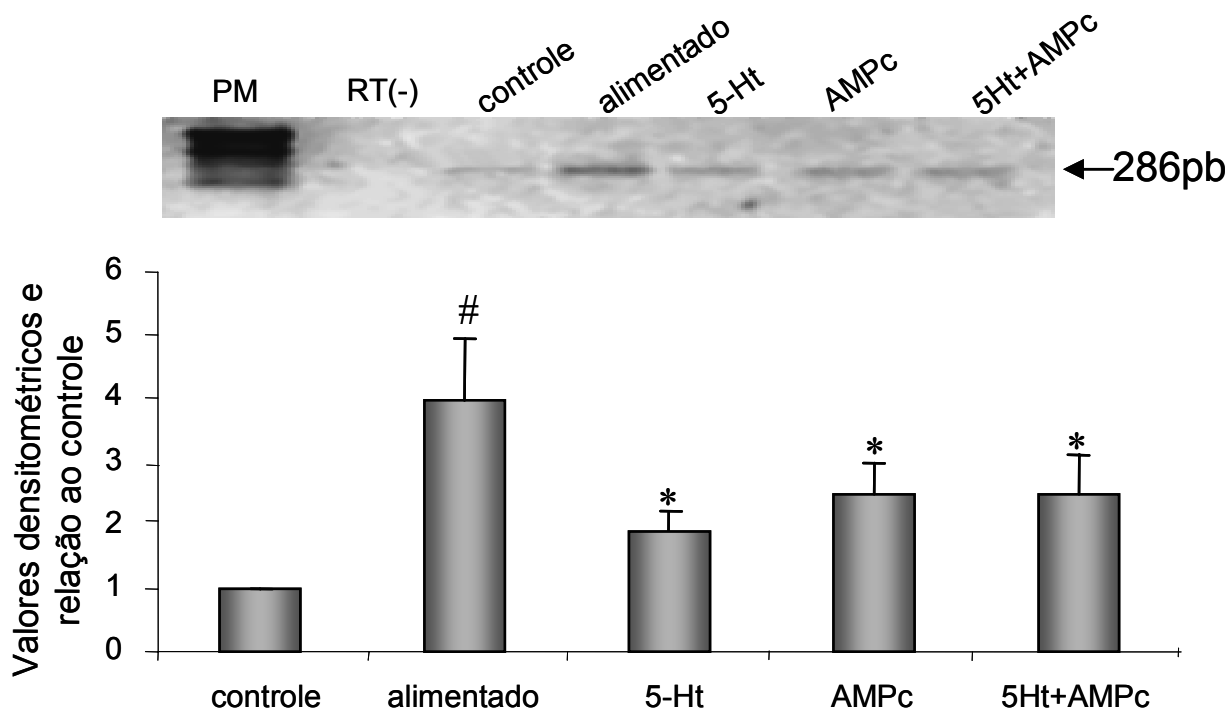


Figura 16: Produtos de RT-PCR para análise da expressão do RNAm do Rp-MIP isolado dos TMs de *Rhodnius prolixus*. Gel de agarose representativo do RT-PCR mostrando as bandas de 286pb correspondentes ao Rp-MIP, nos diferentes grupos: controle, alimentado, 5-HT, AMPc e 5-HT+ AMPc. RT (-): controle negativo realizado sem transcriptase reversa, PM: peso molecular. (*) $P \leq 0,05$ em relação ao controle. $P \leq 0,05$ em relação a todos os grupos. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3) dos valores densitométricos arbitrários em relação ao grupo controle.

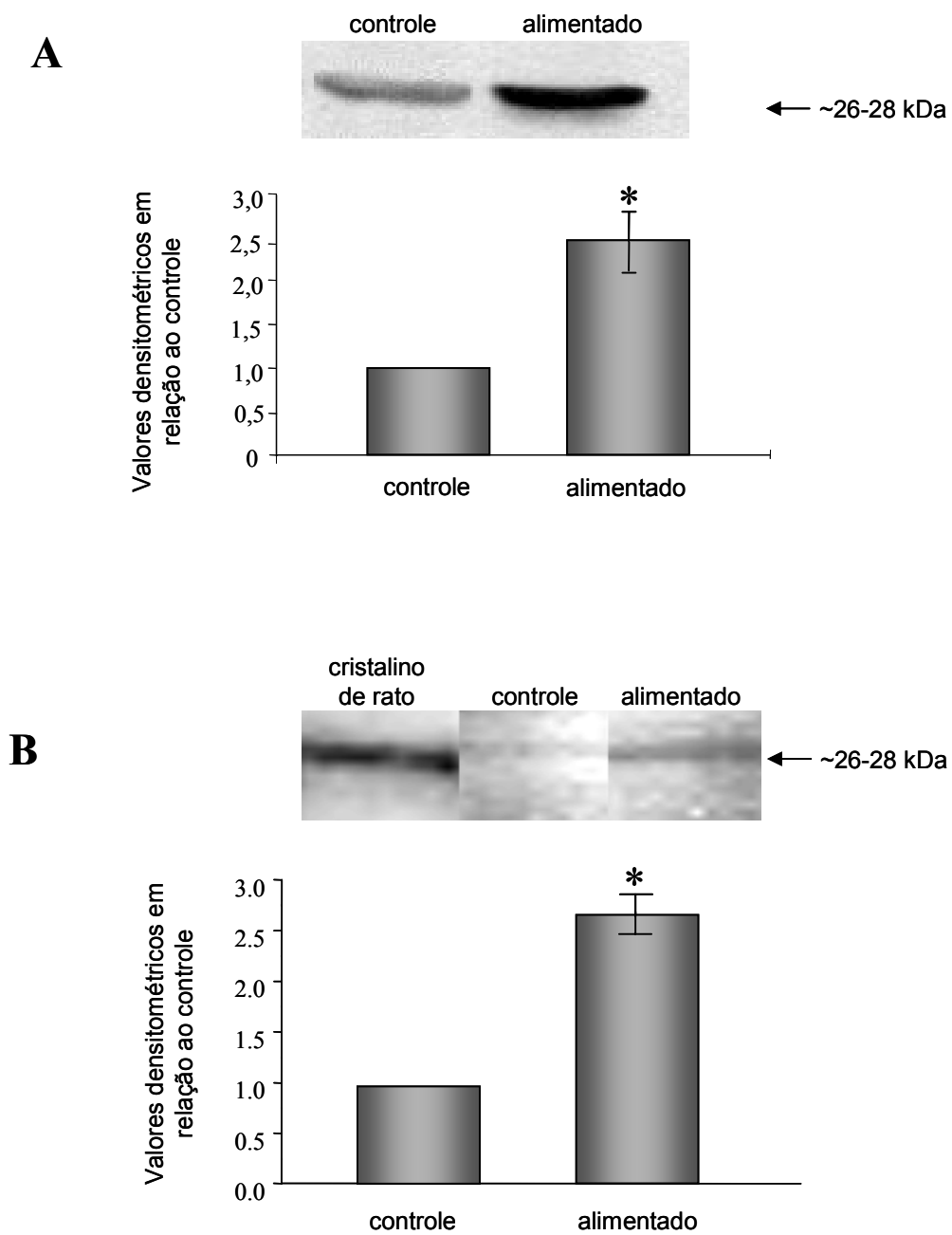


Figura 17: Análise da expressão da proteína do RP-MIP pela técnica de western blotting nos grupos controle e alimentado. A) Blot representativo utilizando o anticorpo anti-AQP-1. B) Blot representativo utilizando o anticorpo anti-MIP26. Em ambos (A e B), o gráfico representa a média dos valores densitométricos obtidos das bandas referentes aos grupos controle e alimentado (n=4). (*) $P \leq 0,05$ em relação ao controle.

demonstrado um aumento da expressão da proteína do grupo alimentado de aproximadamente 2,5 vezes em relação ao grupo controle (n=4, $p \leq 0,05$) (Figura 17).

A regulação do equilíbrio de água e solutos é necessária para a manutenção da composição do meio intra e extracelular. Nos insetos, o líquido que banha as células e, portanto, extracelular, é denominado hemolinfa. Para manter o equilíbrio da composição de ambos os meios, os insetos terrestres devem adquirir do ambiente, através da alimentação, a água e os solutos que perderam pela sua transpiração através superfície corporal e pela sua excreção através de suas fezes (Stobbart & Shaw, 1964).

Nos insetos o seu exoesqueleto (integumento) é dividido em três partes: epiderme, membrana basal e cutícula. Em ambientes secos a cutícula do inseto é impermeável à água e, portanto, adaptada para conservar as reservas hídricas, evitando perdas pela evaporação. No inseto *Rhodnius prolixus* a perda de água através da evaporação pela superfície corporal é bem pequena em relação às perdas pela excreção. (Nicolson, 1993, Stobbart & Shaw, 1964). Desta forma, no *Rhodnius prolixus*, o sistema excretor, representado pelos túbulos de Malpighi (TMs) e reto, desempenha um importante papel na manutenção e regulação do equilíbrio hidrossalino. Assim, os túbulos de Malpighi representam um excelente modelo para o estudo da regulação da secreção de fluidos e dos mecanismos humorais envolvidos uma vez que representa um sistema extremamente rápido e eficiente de transporte de água e solutos (Maddrell, 1981; Maddrell & O'Donnell, 1992).

Através da membrana celular (transporte transcelular) é sabido que a água é transportada por duas vias distintas: 1) difusão simples através da bicamada lipídica e 2) transporte mediado por canais. Estes canais, como já foi mencionado na Introdução, são denominados aquaporinas (Agre & cols, 1993). Ambos os transportes são passivo, a favor do gradiente de concentração, sem gasto de energia e dependem da permeabilidade da estrutura das membranas (Alberts & cols, 2004).

Evidências fisiológicas sugerem que o transporte de água que ocorre nos TMs de insetos está relacionado com a proteína da família MIP, a aquaporina ou canal de água. Estas evidências são: a) o aumento da secreção de fluido após estimulação dos TMs com hormônios diuréticos que tem como segundo mensageiro o AMPc, de forma semelhante a aquaporina-2 (AQP2) que tem sua expressão modulada pelo hormônio ADH via AMPc (Barret & Orchard, 1990; Maddrell & Schaub, 1998), b) inibição da secreção de fluido quando os TMs são incubados com moléculas de mercúrio (clássico inibidor das aquaporinas), característica semelhantes ao do canal AQP-1 (Dow & cols, 1995).

Nos últimos anos, foi identificada a aquaporina nos TMs da *Drosophila melanogaster* (Dow & cols 1995) e do *Aedes aegypti* (Pietrantonio & cols, 2000). A proteína encontrada no *Aedes aegypti* de aproximadamente 26 kDa é semelhante as aquaporinas do inseto *Haematobia irritans exigua* e *Cicadella viridis*, e a aquaporina 4 de mamífero (Beuron & cols, 1995; Borgnia & cols, 1999; Elvin & cols, 1999; Pietrantonio & cols, 2000). Esses achados reforçam a idéia de que esta proteína é amplamente distribuída em diferentes espécies, onde deve desempenhar importante papel fisiológico.

Portanto, nosso interesse, primeiramente, foi identificar a presença da aquaporina nos TMs de *Rhodnius prolixus*. Para tanto, utilizamos sempre *Rhodnius prolixus* machos adultos, e dissecamos os TMs com o máximo de cuidado, retirando todos os túbulos traqueais que por acaso estivessem aderidos aos TMs. Sendo este procedimento necessário devido à expressão das aquaporinas nas células traqueolares do inseto (Duchesne & cols, 2003). Após extração do RNA total dos TMs do *Rhodnius prolixus*, com a utilização de RT-PCR (Preston & Agre, 1991; Le Cahérec & cols, 1996, Elvin &

cols, 1999), foi possível detectar um produto de 365pb correspondente ao tamanho esperado para as aquaporinas, cuja especificidade foi confirmada pela análise do Southern blotting e sequenciamento do produto de PCR (Figura 11). Esse produto do PCR demonstrou ser idêntico à seqüência da nova isoforma de aquaporina, presente nos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, denominada Rp-MIP identificada e publicada por Echevarria e seus colaboradores em 2001 (Figura 12). O resultado obtido sugere fortemente que a Rp-MIP é a aquaporina predominante ou única nos TMs de *Rhodnius prolixus*. Nossos resultados respaldam estudos prévios que demonstraram a presença da aquaporina na membrana basolateral das células do segmento distal dos TMs do *Rhodnius prolixus*. Esses achados são altamente relevantes se considerarmos que o *Rhodnius prolixus* ingere uma grande quantidade de sangue ao se alimentar (podendo atingir 2-3 vezes seu peso corporal, se adulto), sendo que esse grande volume de água e eletrólitos precisa ser processado pelo aparelho digestivo e, em grande parte, ser excretado. Para acomodar e processar o que foi ingerido, o intestino e os TMs, respectivamente, absorvem e secretam uma grande quantidade de volume de água e sal, levando a uma rápida diurese (Miggiani & cols 1999). Alguns pesquisadores determinaram o papel da aquaporina na secreção do segmento distal dos TMs com a utilização de bloqueador de canais de água, o para-cloromercuribenzenosulfonado (pCMBS), e observaram a inibição de 54% da secreção de fluido (Gutiérrez e cols, 2004) nesse segmento.

Assim, para entender mais adequadamente sobre os mecanismos de excreção do *Rhodnius prolixus*, partimos para o nosso próximo objetivo onde foi verificar a possível modulação da expressão da aquaporina nos TMs de *Rhodnius prolixus* (Rp-MIP) após alimentação dos animais. Evidenciamos, utilizando as técnicas de RPA e RT-

PCR o aumento não só da expressão do RNAm da Rp-MIP do grupo de animais alimentados ($2,5 \pm 0,25$ vezes pela análise com RPA e $3,9 \pm 0,96$ vezes pelo RT-PCR semi-quantitativo) mas também da proteína (2,5 vezes pela técnica de western blotting), em relação ao grupo controle. Estes resultados chamaram nossa atenção para o possível envolvimento de hormônios diuréticos na regulação da expressão do Rp-MIP, uma vez que os insetos hematófagos necessitam de um mecanismo de excreção rápido e eficaz para controlar o aumento do seu volume corporal após alimentação com sangue. Este controle é realizado por hormônios que estimulam a diurese, aumentando o transporte de água e íon nos MTs do inseto (Gäde & cols 1997; Maddrell & cols 1991). Vários estudos evidenciaram esse controle em insetos. Nos mosquitos *Aedes aegypti*, a 5-HT ou serotonina, o fator natriurético de mosquito e o peptídeo diurético [similar ao fator liberador de corticotrofina (CRF)], influenciam na secreção de fluido dos TMs (Clark & cols, 1998; Petzel & cols, 1985; Pietrantonio & cols, 2000). No *Rhodnius prolixus* é sabido que a 5-HT é liberada pelas células neurosecretoras na hemolinfa três minutos após a alimentação do inseto, sendo esse valor mantido maior que os níveis basais até 24h após a alimentação. O aumento da concentração da 5-HT na hemolinfa leva a estimulação da secreção de fluido pelos TMs (Maddrell, 1963).

Desse modo, com o objetivo de determinar o possível envolvimento da 5-HT na modulação da expressão da Rp-MIP, nosso grupo experimental (controle) foi subdividido em subgrupos. Como já mencionado nos Materiais e Métodos, os TMs dos animais controle foram isolados e incubados (6 horas) em diferentes soluções contendo ou não 5-HT e/ ou análogo de AMPc. Escolhemos a incubação dos TMs por 6h, por ser o tempo necessário para modular a expressão do RNAm da AQP-2 presente nas

células renais pelo hormônio ADH (Hasler & cols, 2003). As concentrações utilizadas 10^{-6} mol/l e 10^{-4} mol/l, respectivamente para 5-HT e para o análogo de AMPc (8-Br-cAMP) foram escolhidas baseadas nos trabalhos de Maddrell e seus colaboradores (1991 e 1993). Esses pesquisadores observaram através da construção de uma curva dose-resposta para a estimulação da secreção de fluido pela 5-HT, que a dose de 10^{-6} mol/l leva a máxima secreção de fluido pelos TMs (Maddrell & cols 1993). Em outro trabalho foi demonstrado que a inibição realizada pelo ketaserin (conhecido inibidor dos receptores de 5-HT) é revertida quando os TMs são tratados com AMPc ($2,5 \times 10^{-4}$ mol/l), levando ao aumento da secreção de fluido (Maddrell & cols 1991).

Nossos resultados demonstraram que a 5-HT, quando incubada com os TMs dos *Rhodnius prolixus* é capaz de aumentar duas vezes a expressão do RNAm do Rp-MIP, porém este valor não diferiu estatisticamente do valor encontrado nos túbulos estimulados somente com AMPc (Figura 16). A incubação dos TMs com ambos 5-HT e AMPc não foi capaz de aumentar a expressão do RNAm de forma aditiva aos valores obtidos quando estes são utilizados separadamente (Figura 16). Ao avaliarmos esses resultados sugerimos que a modulação da expressão do RNAm da Rp-MIP pela 5-HT poderia ter o envolvimento do AMPc como segundo mensageiro. Os resultados obtidos em nosso estudo estão respaldados por outros trabalhos que demonstraram que a liberação da 5-HT na hemolinfa aumenta os níveis intracelulares de AMPc, estimulando a diurese do inseto (Lange & cols 1989; Maddrell & cols 1991; Maddrell & cols 1993). Além disso, outros trabalhos observaram que o tratamento dos TMs com análogo de AMPc induz a secreção de fluido e produz uma mudança no potencial transepitelial, idêntica a produzida pela 5-HT (Ilanowski & O'Donnell, 2001). Outra característica da ação da 5-HT nos TMs de *Rhodnius prolixus* é a inibição da atividade da Na^+/K^+ -

ATPase (Grieco & cols 1997) e estimulação do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ambos localizados na membrana basolateral das células do TMs (Ilanowiski & cols 2002), o que leva ao aumento da concentração intracelular de Na^+ , favorecendo o transporte de Na^+ e, conseqüentemente, o de água, da célula para a luz tubular e, portanto induzindo a secreção de fluido pelos TMs.

Entretanto, ao evidenciarmos, em nosso trabalho, o aumento (aproximadamente duas vezes) da expressão do RNAm da Rp-MIP (RT-PCR) do grupo de animais alimentados em relação aos grupos de animais tratados com AMPc e/ou 5-HT, sugerimos que outros hormônios diuréticos ou diferentes vias intracelulares podem estar envolvidos no aumento da expressão gênica do Rp-MIP após a alimentação. De acordo com a literatura o hormônio diurético (DH) ou CRF é também capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc, o potencial de transepitelial e a secreção dos MTs do *Rhodnius prolixus* (Montoreano & cols, 1990; Maddrell, 1991, O'Donnell & cols, 1996). Neste contexto, é sabido que este hormônio atua sinergicamente com a 5-HT aumentando a secreção de fluido pelos TMs (Maddrell & cols 1993).

Dada a importância da presença da aquaporina ao longo escala filogenética e a sua expressão na maioria dos epitélios absorptivos e secretores dos mamíferos e dos insetos, neste trabalho escolhemos o inseto *Rhodnius prolixus* não só pela peculiaridade de seu sistema excretor, mas também pelo fato de possuir uma grande importância epidemiológica, já que é um dos principais vetores da Doença de Chagas, (Dias & cols, 1997). Assim, o conhecimento do mecanismo de excreção de água e solutos dos TMs de *Rhodnius prolixus* e os transportadores relacionados, é de extrema importância se considerarmos que é através deste mecanismo que ocorre a transmissão do *Tripanosoma cruzi*. Este protozoário é armazenado no intestino do

Rhodnius prolixus e liberado durante a excreção do inseto, juntamente com suas fezes (Barreto, 1976; Fistein & Chowdhury, 1969).

Portanto, esta dissertação atingiu um dos seus principais propósitos que foi demonstrar o envolvimento da aquaporina no transporte de água nos TMs *Rhodnius prolixus* e a sua regulação pela 5-HT. Vale ressaltar que apontamos um mecanismo de modulação da expressão da aquaporina semelhante ao que ocorre nos túbulos coletores renais de mamíferos, onde a expressão da aquaporina 2, e destarte a regulação da excreção renal, é dependente do hormônio vasopressina ou ADH (Barret & Orchard, 1990, Nielsen & Agre, 1995, Katsura & cols, 1997). Sugerindo que a regulação da expressão das aquaporinas por hormônios é conservada ao longo da evolução.

Todavia, estudos mais aprofundados serão necessários para melhor caracterizar a função e a regulação da aquaporina nos TMs de *Rhodnius prolixus*.

Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB & Nielsen S. (1993) Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 265: F463-76.

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino W B, Ottersen O P, Fujiyoshi Y, Engel A & Nielsen S. (2002) Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542(1): 3-16.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P. (2004) *Biologia Molecular da Célula.* 4^a ed. Porto Alegre: Artmed.

Apell HJ. (1989) Electrogenic properties of the Na, K pump. *J Membr Biol. Sep;* 110(2):103-14.

Barret FM & Orchard I. (1990) Serotonin-induced elevation of cyclic AMP levels in the epidermis of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 36: 625-633.

Barreto MP. (1976) Ecologia dos triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* 10: 339-353.

Beuron F, Le Cahérec F, Guillam Mt, Cavalier A, Garret A, Tassan JP Delamarche C, Schultz P, Mallouh V, Rolland JP, Hubert JF, Gouranton J & Thomas D. (1995) Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *J. Biol. Chem.* 270(29): 17414-17422.

Beyenbach KW, Pannabecker TL & Nagel W. (2000) Central role of the apical membrane H⁺-ATPase in electrogenesis and epithelial transport in Malpighian tubules. J. Exp. Biol. 203: 1459 -1468.

Borgnia M, Nielsen S, Engel A & Agre P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Annu. Rev. Biochem. 68: 425-458.

Boron WF. (1983) Transport of H⁺ and of ionic weak acids and bases. J. Memb. Biol. 72(1-2): 1-16.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-54.

Caruso-Neves C, Silva IV, Morales M.M & Lopes AG. (2001) Cytoskeleton elements mediate the inhibition of the Na⁺/K⁺ ATPase activity by PKC in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules during hyperosmotic shock. Arch. Insect Biochem. Physiol. 48: 81-88.

Chiang RG & Davey KG. (1988) A novel receptor capable of monitoring applied pressure in the abdomen of an insect. Science. 241: 1665 –1667.

Chomczynski P & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162(1): 156-9.

Clark TM, Hayes TK, Holman GM & Beyenbach KW. (1998) The concentration-dependence of CRF-like diuretic peptide: mechanisms of action. *J. Exp. Biol.* Jun; 201 (Pt 11): 1753-62.

Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP & Agre P. (1988) Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol Chem.* 263: 15634-15642.

Dias JC, Silveira AC & Schofield CJ. (1997) The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(5): 603-12.

Dijkstra S, Leysens A , Van Kerkhove E, Zeiske W & Steels P. (1995) A cellular pathway for Cl⁻ during fluid secretion in ant Malpighian tubules: Evidence from ion-sensitive microelectrode studies? *J. Insect Physiol.* 41: 695-703.

Dow JAT, Kelly DC, Davies AS, Maddrell SH & Brown D. (1995) A novel member of the major intrinsic protein family in *Drosophila*: are aquaporins involved in insect Malpighian tubule fluid secretion? *J. Physiol. London.* 489: 110-111.

Duchesne L, Hubert JF, Verbavatz JM, Thomas D & Pietrantonio PV. (2003) Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin, present in tracheolar cells, transports water, not glycerol, and forms orthogonal arrays in *Xenopus oocyte* membranes. *Eur. J. Biochem.* Feb; 270(3): 422-9.

Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S & Knepper MA. (1995) Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 269: F663-672.

Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez-Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA & Whitttembury G. (2001) Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflugers Arch.* 442(1): 27-34.

Elvin CM, Bunch R, Liyou NE, Pearson RD, Gough J & Drinkwater RD. (1999) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an aquaporin-like gene from adult buffalo fly. *Insect Mol. Biol.* 8(3): 369-380.

Fistein B & Chowdhury MN. (1969) The uptake of *Trypanosoma cruzi* by *R. prolixus* and its later excretion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63(6): 883-884.

Froger A, Tallur B, Thomas D & Delamarche C. (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science.* 7: 1458-1468.

Gäde G. (2004). Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides. *Annu Rev Entomol.* 49: 93-113.

Gorin M, Yancey S, Cline J, Revel J & Horwitz J. (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane. *Cell.* 39: 49-59.

Grieco MAB & Lopes AG. (1997) 5-hydroxytryptamine regulates the (Na⁺+K⁺)ATPase activity in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: evidence for involvement of G-protein and cAMP-dependent protein kinase. Arch. Biochem. Biophys. 36: 203 –214.

Gu F, Hata R, Toku K, Yang L, Ma YJ, Maeda N, Sakanaka M & Tanaka J. (2003) Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. J. Neurosci. Res. 72(6): 709-715.

Gutierrez AM, Hernandez CS & Whitembury G. (2004) A model for fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UMT). J. Membr. Biol. Nov; 202(2): 105-14.

Haley C & Donnell M. (1997) K⁺ reabsorption by the lower Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: inhibition by Ba²⁺ and blockers of H⁺/K⁺-ATPases. J. Exp. Biol. 200(Pt 1): 139-47.

Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P & Nielsen S. (1998) Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. Am. J. Physiol 274: C1332-1345.

Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA & Verkman AS. (1994) Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem.* 269: 5497–5500.

Hasler U, Mordasini D, Bianchi M, Vandewalle A, Feraille E & Martin PY. (2003) Dual influence of aldosterone on AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J. Biol. Chem.* 278(24): 21639-48.

Hernandez CS, Gutierrez AM, Vargas-Janzen A, Noria F, Gonzalez E, Ruiz V & Whittembury G. (2001) Fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UMT): water osmotic permeabilities and morphometric studies. *J. Membr. Biol.* Dec 1; 184(3): 283-90. Epub 2002 Feb 05.

Hermo L, Krzeczunowicz D & Ruz R. (2004) Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. *J. Androl.* 25(4): 494-505.

Ianowski JP & O'Donnell MJ. (2001) Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *J. Insect Physiol.* 46: 107–117.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F & Sasaki S. (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.* 272: 20782-20786.

Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr & Huet-Hudson YM. (2003) Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol. Reprod.* 69(5): 1481-1487.

Juberg J. (1996) A taxonomia de triatomíneos baseada nas estruturas fállicas (Hemíptera, Reduviidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 48p.

Jung JS, Preston, GM, Smith BL, Guggino WB & Agre P. (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269: 14648-14654.

Katsura T, Gustafson CE, Ausiello DA & Brown D. (1997) Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol. Jun;* 272(6 Pt 2): F817-22.

Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y & Matsuzawa Y. (2000) Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 20896-20902.

Kollien AH & Schaub GA. (1998) Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector – a review. Tokai J. Exp. Clin. Med. 23(6): 335-340.

Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K & Kihara I. (1997) Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. J. Biol. Chem. Nov 28; 272(48): 30329-33.

Lange AB, Orchard I & Barrett FM. (1989) Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol. 35(5): 393-399.

Le Cahérec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnac G, Guillam MT, Thomas D, Gouranton J & Hubert JF. (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin functional comparison with aquaporin 1. Eur. J. Biochem. 241: 707-715.

Maddrell SHP. (1963) Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Salt.I. The control of diuresis. J. Exp. Biol. 40: 247-256.

Maddrell SHP. (1969) Secretion by Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. J. Exp. Biol. 51: 71-97.

Maddrell SHP. (1978) Physiological discontinuity in an epithelium with an apparently uniform structure. *J. Exp. Biol.* 75: 133-145.

Maddrell SHP. (1991) The fastest fluid-secreting cell known: the upper Malpighian tubule cell of *Rhodnius*. *BioEssays.* 13: 357-362.

Maddrell SHP, Herman WS, Farndale RW & Riegel JA. (1993) Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect. *J. Exp. Biol.* 174: 65-80.

Maddrell SH, Herman WS, Mooney RL & Overton JA. (1991) 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol. Mar;* 156: 557-66.

Maddrell SHP, Lane NJ, Harrison JB & Gardiner BOC. (1985) DNA-replication in binucleate cells of the Malpighian tubules of Hemiptera insects. *Chromossoma* 91: 201-209.

Maddrell SH & O'Donnell MJ. (1992) Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *J. Exp. Biol.* 172: 417-429.

Maddrell SHP & Phillips JE. (1975) Secretion of hypo-osmotic fluid by the lower Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 62: 671-683.

Maddrell SH, Pilcher DE & Gardiner BO. (1971) Pharmacology of the Malpighian tubules of *Rhodnius* and *Carausius*: the structure-activity relationship of tryptamine analogues and the role of cyclic AMP. J. Exp. Biol. Jun; 54(3): 779-804.

McGalvin GC. (1999) Bugs of the world. 1st ed. London: Blandford Press.

Miggiani L, Orchard I & TeBrugge V. (1999) The distribution and function of serotonin in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. A comparative study with the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol. Nov; 45(11): 1029-1036.

Monterano R, Triana F, Abate T & Rangel-Aldo R. (1990) Cyclic AMP in the Malpighian tubule fluid and urine of *Rhodnius prolixus*. Gen. Comp. Endocrinol. 77: 136-142.

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A & Fujiyoshi Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. Nature. Oct 5; 407(6804): 599-605.

Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake J H, Nielsen S, Agre P & Ottersen OP. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. J. Neurosci. 18: 2506-2519.

Nicolson SW. (1993) The ionic basis of fluid secretion in insect Malpighian tubules: advances in the last ten years. *J. Insect Physiol.* 39: 451-453.

Nielsen S & Agre P. (1995) The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* 48(4): 1057-1068.

Nielsen S, Digiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA & Harris HW. (1993a) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 11663-11667.

Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* Jan; 82(1): 205-44. Review.

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI & Agre P. (1993b) Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 7275-7279.

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA & Agre P. (1993c) CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* 120: 371-383.

Nielsen S, King LS, Christensen BM & Agre P. (1997a) Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am. J. Physiol.* 273: C1549-1561.

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P & Ottersen OP. (1997b) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17: 171-180.

Nishimura H & Fan Z. (2003) Regulation of water movement across vertebrate renal tubules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* Nov; 136(3): 479-98. Review.

Nogueira MI, Takase LF, Souza SL, Mascaro MB, Ocanã RP & Castro RM. (2004) Serotonina- A trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica. *Ciência Hoje.* 34(202): 30-35.

O'Donnell M, Aldis G & Maddrell SH. (1982) Measurements of osmotic permeability in the Malpighian tubules of an insect, *Rhodnius prolixus* stall. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. B.* 216: 267-277.

O'Donnell MJ, Dow JA, Huesmann GR, Tublitz NJ & Maddrell SH. (1996) Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* May; 199(Pt 5): 1163-75.

Orchard I, Lange AB, Cook H & Ramirez JM. (1989) A subpopulation of dorsal unpaired median neurons in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* displays serotonin-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* Nov 1; 289(1): 118-28.

Petzel DH, Hagedorn HH & Beyenbach KW. (1985) Preliminary isolation of mosquito natriuretic factor. *Am J Physiol.* Oct; 249(4 Pt 2): R379-86.

Phillips J. (1981) Comparative physiology of insect renal function. *Am. J. Physiol.* 263: R241-R257.

Pietrantonio PV, Jagge C, Keeley LL & Ross LS. (2000) Cloning of an aquaporin-like cDNA and in situ hybridization in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol. Biol.* Aug; 9(4): 407-18.

Preston GM & Agre P. (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 KD: Member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(24): 11110-11114.

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB & Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* Apr 7; 256(5055): 385-7.

Preston GM, Jung JS, Guggino WB & Agre P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* Jan 5; 268(1): 17-20.

Ruppert EE & Barnes RD. (1996) Zoologia dos invertebrados, 6ª edição. São Paulo: Editora Roca Ltda. Cap 16.

Sas DF, Sas Jane, Johnson KR, Menko S & Johnson RG. (1985) Junctions between lens fiber cells are labeled with a monoclonal antibody show to be specific for MP26. J.Cell Biol. 100: 216-225.

Smith BL & Agree P. (1991) Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exist as a multisubunit oligomer similar to channel protein. J. Biol. Chem. 266: 6407-6415.

Stobbart RH & Shaw J. (1964) Salt and water balance: excretion. pp. In Rockstein, M. The Physiology of insecta. Academic Press. New York. vol. 3: 189 – 258.

Te Brugge VA, Schooley DA & Orchard I. (2002) The biological activity of diuretic factors in *Rhodnius prolixus*. Peptides. Apr; 23(4): 671-81.

Tilman M, Kunzelmann K, Frobe U, Cabantchik I, Lang HJ, Englert HC & Greger R. (1991) Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. Pflügers Archiv. Jul; 418(6): 556-63.

Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, Van Hoek AN & Hediger MA. (1998) Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. J. Biol. Chem. 273: 24737-24743.

Whittembury G, Biondi AC, Paz-Aliaga A, Linhares H, Parthe V & Linhares N. (1986) Transcellular and paracellular flow of water during secretion in upper segment of Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: solvent drag of molecules of graded size. J. Exp. Biol. 123: 71-92.

Whittembury G, Echevarria M, Vargas-Janzen A, Hernández CS, Gutiérrez AM & González E. (1999) Relation between trans and paracellular water pathway in a secreting epithelium. XVth International Congress of Nephrology, Buenos Aires, Argentina, Abstracts, p 126.

Wieczorek H, Weedth S, Schindlbeck M & Klein U. (1989) A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut. J. Biol. Chem. 264: 11143 –11148.

Wigglesworth VB. (1931) The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of excretory system. J. Exp. Biol. 8: 428-442.

Wigglesworth VB & Salper MM. (1962) Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Salt (Hemiptera). J. Ins. Physiol. 8: 299-307.

Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S & Agre P. (1999) Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 96: 5808-5813.

Zampighi GA, Hall JE, Ehring GR & Simon, SA. (1989) The structural organization and protein composition of lens fiber junctions. J. Cell Biol. 108: 2255-2275.

Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL & Agre P. (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. Biochem. Aug 25; 31(33): 7436-40.

Rhodnius prolixus Malpighian Tubule's Aquaporin Expression Is Modulated by 5-Hydroxytryptamine

Sabrina V. Martini,¹ Regina C. Goldenberg,¹ Fabio S. A. Fortes,¹ Antônio C. Campos-de-Carvalho,¹ Dóris Falkenstein,² and Marcelo M. Morales^{1*}

The purpose of the present study was to detect the presence of an aquaporin-like water channel, a member of the major intrinsic protein (MIP) family, in the Malpighian tubule (MT) of the hematophagous insect *Rhodnius prolixus*, which excrete a large bulk of fluid after a massive blood meal, and its possible regulation by 5-hydroxytryptamine (5-HT). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Southern blots of cDNA was obtained from adult *R. prolixus* MT poly (A)⁺ RNA. Employing degenerate primers corresponding to the NPA (amino acid sequence motifs repeats Asn-Pro-Ala) highly conserved domain of amino acids sequences of all members of the MIP gene family, we were able to identify a 365-base pair PCR product. The *R. prolixus* MT mRNA expression of this water transporter is increased in the animal after blood meal and in tubules treated with 5-hydroxytryptamine or cAMP. The up-regulated expression of MT MIP mRNA after a blood meal is probably due to the action of 5-hydroxytryptamine via a cyclic AMP dependent pathway. Arch. Insect Biochem. Physiol. 57:133–141, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEYWORDS: *Rhodnius prolixus*; water channel; RP-MIP; insect; cAMP

INTRODUCTION

Water is the major component of living cells and the ability to absorb and secrete water must be considered a fundamental property of life. Cell membranes are exquisitely selective barriers that control the solute composition of enclosed compartments by regulating the entry of ions, solutes, and water into cells. In general, osmotic forces drive water through the plasma membrane via selective channels called aquaporins (AQP) that are responsible for the rapid water fluxes through cell membranes (Agre et al., 1993; Borgnia et al., 1999).

These channels, first cloned in erythrocyte membranes, were also identified in renal epithelial cells by Agre and Preston and called AQP1 (Denker et al., 1988; Preston and Agre, 1991). Aquaporins are widely distributed in different species and different homologues have been identified in several mammalian tissues (Borgnia et al., 1999). Hormones like aldosterone, estrogen, testosterone, vasopressin, and others can modulate the expression of several aquaporins in different tissues (Nielsen and Agre, 1995; Gu et al., 2003; Hasler et al., 2003; Jablonski et al., 2003). It is a classic example that the stimulation of renal-collecting ducts principal

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Contract grant sponsor: Fundação José Bonifácio (FUJB); Contract grant sponsor: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Correspondence to: Marcelo M. Morales, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco G, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: mmorales@biof.ufrj.br

Received 19 July 2003; Accepted 13 July 2004

cells apical membranes' aquaporin-2 expression by vasopressin peptide also known as anti-diuretic hormone acts via cAMP (Nielsen and Agre, 1995). The aquaporins belong to a large family of proteins called MIP (major intrinsic proteins) originally identified in bovine lens fiber cells (MIP 26 or AQP0). This family includes not only the water selective channels but also the glycerol facilitator transporter (GlpF) found mainly in bacteria and yeast (Froger et al., 1998). Proteins belonging to the MIP family present two internal amino acid sequence motif repeats Asn-Pro-Ala (NPA), which are highly conserved throughout the phylogenetic tree (Borgnia et al., 1999).

Aquaporin homologues were also identified in bacteria, yeast, invertebrates, and plant tissues (Froger et al., 1998). Recently, new members of the MIP family were identified in insects: the AQP_{ic}, characterized in the digestive tract of a homopteran sap-sucking insect *Cicadella viridis* (Beuron et al., 1995; Le CahÉrec et al., 1996), an MIP protein channel observed in the brain and in the MT of *Drosophila melanogaster* (Dow et al., 1995), and an AqpBF1 in the buffalo fly *Haematobia irritans exigua* (Elvin et al., 1999).

Paracellular and transcellular routes have been proposed to explain transepithelial water movement in MT of insect *Rhodnius prolixus* (Whittembury et al., 1986; Hernández et al., 2001). Studies have indicated that the osmotic water permeability, both basal and 5-HT stimulated, of basolateral membrane of *R. prolixus* MT can be inhibited partially with mercurial reagents, suggesting that aquaporins may be implicated in water secretion in this epithelia (Whittembury et al., 1999; Echevarria et al., 2001).

Using the *Xenopus laevis* oocyte expression, it was shown that this transport is secondary to water permeability via aquaporins (Echevarria et al., 2001). The aquaporin-related protein was cloned from *R. prolixus* MT and called RP-MIP (Echevarria et al., 2001). Water secretion through MT is essential for the transmission of the protozoa *Trypanosoma cruzi*, a cause of Chagas disease. The *T. cruzi* is mainly transmitted through the insects *Triatoma infestans* and *R. prolixus* (Dias et al., 1997) and it

is found in the intestinal tract of both vectors. The protozoan transmission to the mammalian host occurs after blood meal and this leads to stimulation of MT secretion and increases the feces volume in the insect rectum, thus stimulating defecation which promotes the parasite's excretion (Fistein and Chowdhury, 1969; Kollien and Schaub, 1998).

Therefore, the main purpose of this study was to investigate if Rp-MIP expression is modulated during insect blood feeding and the possible involvement of the diuretic peptide, 5-hydroxytryptamine, in this process. 5-HT is important in the *R. prolixus* MT secretion process once it is released into the haemolymph shortly after the onset feeding from a neurosecretory system localized in the mesothoracic ganglion that is associated with abdominal nerves (Lange et al., 1989; Ochard, 1989). The cellular action of 5-hydroxytryptamine involves the increase of intracellular concentration of cyclic AMP second messenger (Maddrell et al., 1991).

MATERIALS AND METHODS

Animal and Malpighian Tubule Treatment

Male adult (2–3 months old) *R. prolixus*, were obtained from laboratory cultures reared at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ in the Department of Biochemistry of the Federal University do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil. The MT were dissected from *R. prolixus* under stereomicroscopy (Wild Heerbrugg, M5 APO, Switzerland) and homogenized in RNase free buffer solution consisting of (in mmol/l): NaCl, 133.6; KCl, 4.0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0; glucose 20.0; NaHCO_3 , 10.2; NaH_2PO_4 , 4.3; and HEPES, 8.6, at 4°C . All tracheal fragments associated to MT were carefully removed during dissection.

Animals were divided in two groups: a group that was not fed for 3 weeks (control) and a group fed a rabbit blood meal 6 h before sacrificing the animals (Blood-fed). The MT were removed and kept in RNase free buffer until RNA isolation. Dissected Malpighian tubules from the control group were divided in 4 different sub-groups also kept in buffer solution containing, or not, 5-hydroxytryptamine with or without cAMP analogue for

6 h. Dissected MT from the control group were divided in 4 different groups: control (C); treated with 5-hydroxytryptamine at 10^{-6} mol/l (5-HT) (Sigma-RBI, St. Louis, MO), treated with a cell-permeable cAMP analogue, 8-Bromo-adenosine-3',5'-cyclophosphoric acid or 8-Br-cAMP at 10^{-4} mol/l (cAMP) (Sigma-RBI), and treated with both 5-hydroxytryptamine and 8-Br-cAMP at the same concentrations used in the other groups (5-HT + cAMP). Each sample contained MT isolated from approximately 50 animals. 5-hydroxytryptamine at 10^{-6} mol/l and cAMP at 10^{-4} mol/l was chosen based on previous publication (Maddrell et al., 1991).

Isolation of RNA

The mRNA from these tubules was isolated using the QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech, Gaithersburg, MD). Total RNA was isolated using Trizol reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY).

Reverse-Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

To synthesize first-strand DNA (cDNA), 1 µg of mRNA isolated from *R. prolixus* MT was reverse-transcribed with SuperScript kit (Gibco BRL) at 37°C for 60 min, and the reaction was terminated by extraction with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI, 25/24/1 v/v) and precipitation with 100% ethanol. The cDNA synthesis was primed with a degenerate anti-sense oligonucleotide (B=5'GGDSCVARNSWBCKNGCNGG3') located in the NPA region, which is conserved in all members of the MIP family in different species. The PCR technique was used to amplify the synthesized cDNA. The following solution was employed: 0.2 µM of each primer, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), and 1.5 mM MgCl₂ plus 2.5 U of Amplitaq (Perkin Elmer, NJ). One pair of degenerate external upstream (A = 5'GGNGSNCAAYNTNAAAYCCNGC3') and downstream (B = 5'GGDSCVARNSWBCKNGCNGG3') oligonucleotides, corresponding to the NPA region of the MIP family, was used. The PCR

was performed with an initial melting step of 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (43°C, 1 min), and extension (72°C, 1 min). The final elongation was at 72°C for 7 min.

After the sequencing of PCR products amplified using degenerate primers, RT-PCR specific primers were synthesized (sense = 5'CCAGTGGT-GACAATATGT3' and antisense = 5'GGTACAAACA-AATTCTACG3') for the semi-quantitative RT-PCR. The PCR reaction amplified a product of 286 bp with an initial melting step of 94°C for 5 min, 36 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (50°C, 1 min), and extension (72°C, 1 min). The final elongation was at 72°C for 7 min.

The semi-quantitative method of RT-PCR was validated in preliminary experiments (not shown). First, the optimal PCR conditions that yielded a single band on agarose gel electrophoresis were determined for each gene in the same reaction tube. Second, to determine whether the method was semi-quantitative, serial amounts of total RNA (62.5 ng, 125, 250, 500, 1,000, and 2,000) were used for RT-PCR amplification for Rp-MIP. Third, experiments were performed to determine the optimal number of PCR cycles that yielded PCR products in the linear phase of amplification. Finally, to ensure that the reactions were consistent, PCR reactions were performed at least twice. Only one of these reactions was included for final densitometric analysis, and the selection was arbitrary. The amount of 500 ng of total RNA and 35 cycles proved to be the best condition to compare the expression between samples. At this condition, the PCR was found to be at an exponential phase of amplification.

All reactions included a negative control (cDNA replaced with double distilled water). The identity of the amplification was confirmed by determination of the molecular size on 1.6% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining under ultraviolet light.

PCR Products Sequencing

PCR products were purified using GeneClean (B101, CA), ligated to pCR-Script SK (+) vector

(Stratagene, La Jolla, CA) and then sequenced. DNA sequence was determined by the use of Taq polymerase cycle sequencing and a semi-automated detection system (Perkin-Elmer, Applied Biosystem, Foster City, CA).

Southern Blotting

Southern blotting was performed on PCR-amplified products analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels. DNA was transferred to Hybond N⁺ membrane (Amersham, NJ, USA). The blots were prehybridized in QuikHyb solution (Stratagene) for 10 min at 37°C. The internal up- and down-stream degenerate primers, also located in the NPA region (C=5′AAYCCNGCNGTNACNBTNS3′, and D=5′GCDGGRTTVATNSHNSMNCC3′), were used as probes, and end-labeled with [γ^{32} P] ATP (3,000 Ci/mol, Amersham, Livingston, NJ) with T4 polynucleotide kinase. Each probe was added to the QuikHyb (Stratagene) together with 100 μ g of salmon sperm DNA (Sigma). The blots were washed twice for 15 min in 2 \times SSC (0.3 mol/l NaCl, 0.03 mol/l sodium citrate, pH 7.0) and 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) at room temperature. The blots were exposed to an autoradiography film at -70°C.

RNase Protection Assay (RPA)

The PCR product corresponding to nucleotides 352–567 of the cloned Rp-MIP sequence (Echevarria et al., 2001) was ligated to pCR-Script SK (+) and used to transform Epicurian Coli XL1-blue supercompetent cells (Stratagene). After checking the nucleotide sequences (Sequenase version 2.0, US Biochemicals, Cleveland, OH), these fragments served as templates for antisense RNA synthesis. Probes for Rp-MIP were prepared by linearization of 1 μ g template DNA with Not-I (Gibco BRL). Following the Maxscript Kit protocol (Ambion, Austin, TX), all templates were transcribed in vitro in the presence of [α - 32 P] UTP NEN, 3,000 Ci/mmol (Amersham, Arlington Heights, IL) with RNA polymerase T7 to generate radiolabeled antisense RNA probes. Prior to use in the RPA (RPAII kit; Ambion),

all probes were evaluated with 10 μ g of yeast transfer RNA (tRNA) in the presence and absence of RNase A and T1, according to the manufacturer's instructions. The undigested Rp-MIP, was 116 nucleotides larger than the digested probe. Total RNA (20 μ g) from *R. prolixus* MT tissue was mixed with each radiolabeled antisense probe (1×10^5 cpm/sample) and hybridized at 45°C for 18 h. Both RNase A and T1 (RPAII kit, Ambion) were used to treat the samples at 37°C for 30 min. The protected fragments were separated electrophoretically on 8 mol/l urea gels containing 50 g/l polyacrylamide. The samples were transferred to chromatography papers and exposed to X-ray films with an intensifying screen at -80°C prior to exposure.

Immunoblotting of Membranes

Expression of aquaporin in the MT was assessed by Western blot using the rabbit affinity-purified anti-AQP-1 polyclonal antibody (kindly provided by Dr. Peter Agre, The Johns Hopkins School of Medicine), which recognizes a 4-kDa segment located at the cytoplasmic COOH-terminal domain of the aquaporin 1 protein (Nielsen et al., 1993). Also a monoclonal antibody to lens MIP26 (kindly provided by Dr. Ross Johnson) was used because of its similarity to *R. prolixus* MIP. This antibody recognizes an intracellular domain of the major lens membrane protein MIP26 and was characterized by Sas et al. (1985). Isolated tubules were homogenized and solubilized in ice cold 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, and 20 mM imidazole, pH 7.2, containing the protease inhibitors: 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 1 mM benzamide, 10 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml chymostatin, pH 7.2. The homogenates were centrifuged at 1,000g for 10 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. The supernatants were centrifuged at 100,000g for 1 h at 4°C, and the pellets containing the cell membranes were suspended in ice-cold homogenization buffer. All the extracts were solubilized by heating at 95°C for 2 min in sample buffer (1.5% SDS, 10 mM Tris-Cl, pH 6.8, 0.6% dithiothreitol, and 6% glycerol). The membrane

proteins (25 µg /lane) were separated in a 7% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The membranes were blocked with 9% nonfat milk in PBS and incubated with the affinity-purified anti-AQP-1 specific antibody (1:1,000) in PBS and 0.05% tween 20, pH 7.4, at 4°C for 12–24 h. Sequential incubation was performed with a secondary antibody goat anti-rabbit IgG (H+L) for alkaline phosphatase (1:1,000) for anti-AQP-1 polyclonal antibody and goat anti-mouse IgG for alkaline phosphatase (1:1,000) for the antibody to lens MIP26. *R. prolixus* aquaporin protein bands were detected using an alkaline solution (100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris pH = 9.5), 75 mg/ml of nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 50 mg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) (all from Life Technologies, Rockville, MD) for 5 min.

Densitometric Analysis

The densitometric analysis of the bands corresponding to the expected sizes for RT-PCR, RPA, and Immunoblotting was analyzed with the aid of Sigma Gel v1.1 software (Jandel Scientific, Corte Madera, CA).

RESULTS

Detection of PCR Products Using Rp-MIP Degenerated Primers

The aquaporin-like mRNA expression in MT was determined by RT-PCR and Southern blot analysis. Proteins of the MIP family present a highly conserved domain of amino acid NPA sequences, which makes the use of degenerate primers the tool to detect PCR homologue nucleotide sequences of aquaporin. Amplification of cDNA with the degenerated external oligonucleotide primers A and B revealed a specific PCR product of 365-base pairs (Fig. 1). There was no detection of a positive PCR product in the sample without cDNA (RT-).

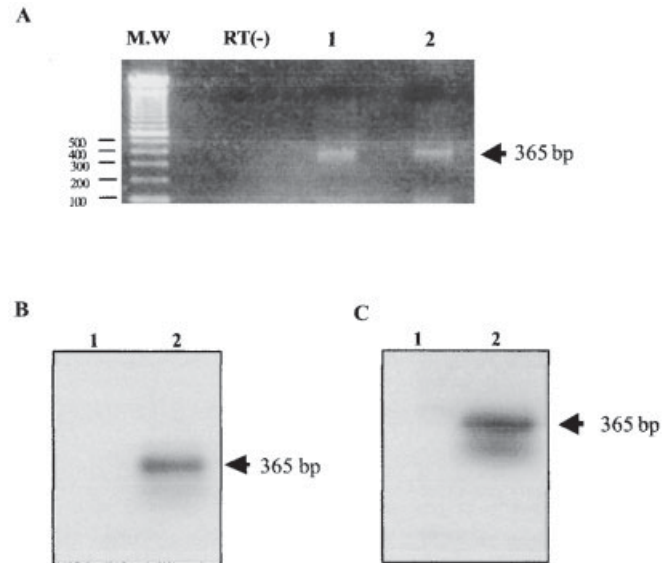


Fig. 1. Aquaporin-like cDNA detection in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. A: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products for aquaporin (M.W: molecular weight ladder 1,000 to 100 bp; RT(-): negative control without cDNA; Lanes 1,2: MT cDNA detecting a 365-bp product. B: Southern blot analysis [lane 1: RT (-); lane 2: specific binding of probes made with internal up-stream primer] to the corresponding 365-bp PCR product. C: Southern blot analysis [lane 1: RT (-); lane 2: specific binding of probes made with internal down-stream primer] to the corresponding 365-bp PCR product.

The specific identity of this PCR product was confirmed by Southern blot analyses. The Southern blot showed a positive result using both internal primers confirming that the PCR product of 365 bp is derived from a messenger RNA of a protein containing an NPA amino acid domain (Fig. 1).

The sequencing of the 365-bp PCR product show the same sequence (nucleotides 349–713) cloned from Malpighian tubules of *R. prolixus* (Rp-MIP) (Echevarria et al., 2001).

Messenger RNA Expression Analysis From Malpighian Tubules of *R. prolixus* Subjected to Different Treatments

Both RNase protection assay (RPA, Fig. 2, n = 4, $P \leq 0.05$) and semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3, n = 3, $P \leq 0.05$) showed that Rp-MIP mRNA from MT increased (2.5 ± 0.25 -fold by RPA and $3.9 \pm$

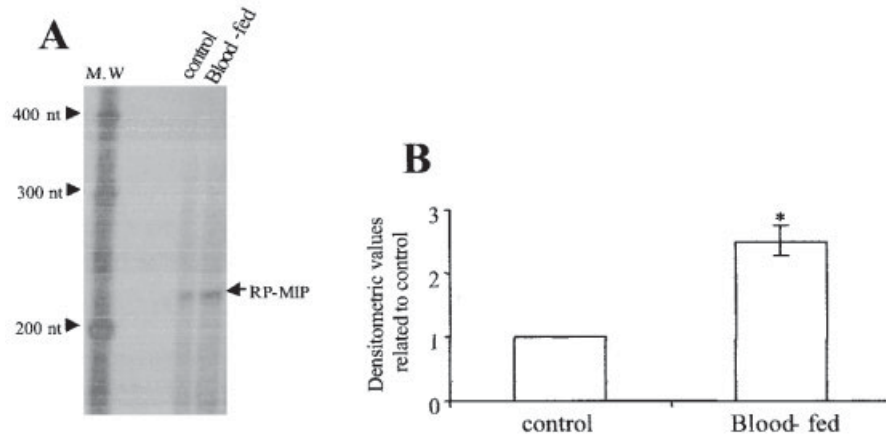


Fig. 2. Rp-MIP messenger RNA detection by RNase protection assay performed on total RNA isolated from MT of *Rhodnius prolixus* control and blood-fed. **A:** Representative RPA made with 20 μg of total mRNA derived from the animal's MT. **B:** Values obtained for the densitometric

analysis of the specific activity of the Rp-MIP bands obtained in four RPA experiments. ($n = 4$; ANOVA: $P \leq 0.05$). * $P \leq 0.05$ vs. control. Graph represents the mean \pm SEM ($n = 4$) of the relative densitometry values.

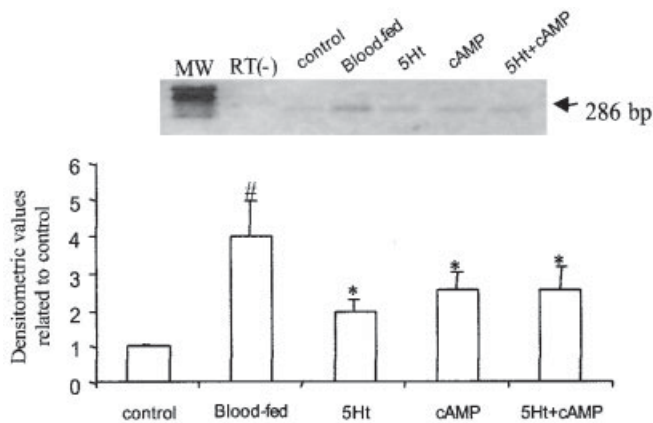


Fig. 3. Relative expression of Rp-MIP performed in the total RNA isolated from *Rhodnius prolixus* MT obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products. **Inset:** Agarose gel of semi-quantitative RT-PCR experiment shows bands corresponding to MIP mRNA of control (not treated), blood-fed, and treated Malpighian tubules. RT (-): negative control, performed with 500 μg of total RNA derived from control MT in the absence of reverse transcriptase; Molecular Weight Marker (MW): 100 bp ladder (Gibco BRL). *, Rp-MIP mRNA expression in after-meal and treated tubules was significantly different from non-treated tubules ($P < 0.05$). #, mRNA expression from blood-fed group was significantly different from all other groups. Graph represents the mean \pm SEM ($n = 3$) of the relative densitometry values.

0.96-fold by semi-quantitative RT-PCR) in animals blood-fed.

Treatment of dissected MT with 5-hydroxytryptamine (10^{-6} mol/l) or cAMP (10^{-4} mol/l) also increased Rp-MIP mRNA expression 1.87- and 2.5-fold, respectively ($n = 3$, $P \leq 0.05$) (Fig. 3). MT treatment with both cAMP and 5-hydroxytryptamine did not have an additive effect on Rp-MIP mRNA expression (2.48-fold of control values, $n = 3$, $P \leq 0.05$).

Immunoblot

The Western blot showed the affinity of anti-AQP-1 and MIP26 antibody to membrane proteins derived from MT, by detection of a major band of approximately 26–28 kDa (Fig. 4). To examine expression using both antibodies in the four different experimental groups, we performed Western blot analysis using 100 μg protein for each sample group.

The AQP-1 antibody recognizes the 26–28 kDa band representing the nonglycosylated form of the protein (Fig. 4A). A second band of 50 kDa was also present in all experiments using anti-AQP-1 and probably corresponds to the glycosylated AQP1 isoform (data not shown). This pattern of AQP1-positive bands is similar to that previously

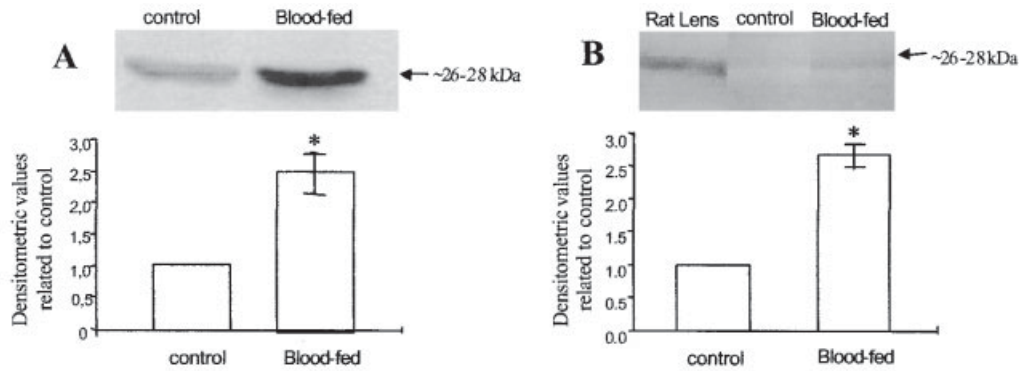


Fig. 4. Western blot analysis of Rp-MIP expression in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **A**: Representative blot using anti-AQP-1 antibody for control and blood-fed groups. Graph represents the mean \pm SEM ($n = 3$) of the relative densitometry values. *Protein expression in con-

trol *R. prolixus* MT was significantly different from blood-fed ($P < 0.05$). **B**: Representative blot using anti-MIP26 antibody. Rat lens homogenate was used as positive control for MIP26 and homogenates of control and blood-fed *R. prolixus* are pointed out.

described in rat and human kidney membranes and red blood cells (Nielsen et al., 1993; Valenti et al., 1994; Devuyst et al., 1996).

Blots using the MIP26 antibody showed a single band of approximately 28 kDa (Fig. 4B).

In both cases, using anti-MIP26 or anti-AQP-1 antibodies, fed animals showed an increase in protein expression of approximately 2.5-fold over control, not fed animals ($n = 4$, $P \leq 0.05$).

DISCUSSION

Physiological evidence suggests that fluid secretion and absorption in MT is related to an MIP family protein resembling an aquaporin channel. Among this evidences we can cite: (1) the osmotic water permeability of the basolateral membrane of *R. prolixus* MT, both basal and 5-HT stimulated, can be inhibited partially with mercurial reagent (Whittembury et al., 1999), (2) inhibition of MT fluid secretion with mercurial molecules that is reverted with β mercaptoethanol (Dow et al., 1995). Recently, one isoform of aquaporin in *R. prolixus* MT was identified and sequenced and named as Rp-MIP (Echevarria et al., 2001). In our studies, we also detected a 365-bp product by RT-PCR using degenerated primers located in the conserved NPA repeats of MIP family (Preston and Agre, 1991; Le Cahérec et al., 1996, Elvin et al., 1999). The speci-

ficity of this product was confirmed by Southern blot analysis using the internal up- and down-stream degenerated primers as probes and sequencing of PCR products (Fig. 1). The nucleotide sequences of different PCR products (20 different clones) were identical to the recently published sequence identified for *R. prolixus* (Echevarria et al., 2001). No other different aquaporin-related gene product was detected suggesting that Rp-MIP is the prevalent product in *R. prolixus* MT.

The observation that the Rp-MIP mRNA in MT is increased after feeding, draws our attention to the possible involvement of insect diuretics in this process and in the expression of Rp-MIP. Our results show that after 6 h of incubation with 5-HT or cAMP, time enough to see the changes in gene expression after stimulation by hormones (Hasler et al., 2003), an increase of approximately 2-fold is observed in the expression of Rp-MIP mRNA (Fig. 3). But stimulation with both cAMP and 5-HT was not able to additionally increase the levels of mRNA message. These results are reasonable if we consider that in other studies, an increase of 5-HT concentration by about 3-fold was demonstrated within the haemolymph just after 5 min of *R. prolixus* blood feeding. The concentration of 5-HT is maintained higher than basal levels until 24 h after blood feeding (Lange et al., 1989) and the released 5-HT is known to lead to an increase of intracellu-

lar concentration of cyclic AMP that enhance diuresis (Lange et al., 1989; Maddrell et al., 1991, 1993). It is well known that 5-HT inhibits Na^+/K^+ -ATPase (Grieco et al., 1997) and stimulates basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (Ianowski et al., 2002) activities in MT of *R. prolixus* that would increase the intracellular Na^+ concentration, causing Na^+ and water movement to the lumen of the tubule and, thus, increasing the rate of fluid secretion.

Our findings, which show the stimulation of expression of RP-MIP in Malpighian tubules cells of *R. prolixus*, suggest that transcellular water transport is important for insect osmoregulation and adaptation to distinct environments. Some sucking insects gain two times or more their body weight after a meal of sap or blood. To control the increase in body fluid volume, a hormone-controlled fast diuresis is activated, during which a very high rate of water and ion transport is observed in the insect MT (Gäde et al., 1997; Maddrell et al., 1991).

In addition, our data show that after a meal, the expression of RP-MIP mRNA is increased by 2.5- ± 0.25-fold by RPA and 3.9- ± 0.96-fold by semi-quantitative RT-PCR over control levels. This level of stimulation is at least double that achieved by cAMP and/or 5-HT action. Those results suggest that other diuretic hormones or intracellular pathways may also be involved in the Rp-MIP mRNA expression in *R. prolixus* MT.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Tania M. O. Carvalho for the manuscript revision.



LITERATURE CITED

- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 265:F463–476.
- Beuron F, Le Cahérec F, Guillam Mt, Cavalier A, Garret A, Tassan JP, Delamarche C, Schultz P, Mallouh V, Rolland JP, Hubert JE, Gouranton J, Thomas D. 1995. Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *J Biol Chem* 270:17414–17422.
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 68:425–458.
- Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. 1988. Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 263:15634–15642.
- Devuyst O, Burrow CR, Smith BL, Agre P, Knepper MA, Wilson PD. 1996. Expression of aquaporins-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 271:F169–F183.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. 1997. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:603–612.
- Dow JAT, Kelly DC, Davies AS, Maddrell SH, Brown D. 1995. A novel member of the major intrinsic protein family in *Drosophila*: are aquaporins involved in insect Malpighian tubule fluid secretion? *J Physiol Lond* 489:110–111.
- Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez-Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA, Whitembury G. 2001. Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflugers Arch* 442:27–34.
- Elvin CM, Bunch R, Liyou NE, Pearson RD, Gough J, Drinkwater RD. 1999. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an aquaporin-like gene from adult buffalo fly. *Insect Mol Biol* 8:369–380.
- Fistein B, Chowdhury MN. 1969. The uptake of *Trypanosoma cruzi* by *R. prolixus* and its later excretion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 63:883–884.
- Froger A, Tallur B, Thomas D, Delamarche C. 1998. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Prot Sci* 7:1458–1468.
- Gäde G, Hoffman KH, Spring JH. 1997. Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiol Rev* 77:963–1032.
- Grieco MAB, Lopes A. 1997. 5-Hydroxytryptamine regulates the (Na^+/K^+)ATPase activity in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: evidence for involvement of G-protein

- and cAMP-dependent protein kinase. *Arch Insect Biochem Physiol* 36:203–214.
- Gu F, Hata R, Toku K, Yang L, Ma YJ, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. 2003. Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 72:709–715.
- Hasler U, Mordasini D, Bianchi M, Vandewalle A, Feraille E, Martin PY. 2003. Dual influence of aldosterone on AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J Biol Chem* 278:21639–21648.
- Hernández CS, Gutierrez AM, Vargas-Janzen A, Noria E, Gonzalez E, Ruiz V, Whittembury G. 2001. Fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UMT): water osmotic permeabilities and morphometric studies. *J Membr Biol* 184:283–290.
- Ianowski JP, Christensen RJ, O'Donnell MJ. 2002. Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of *Rhodnius prolixus*: evaluation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport across the basolateral membrane. *J Exp Biol* 205:1645–1655
- Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr, Huet-Hudson YM. 2003. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol Reprod* 69:1481–1487.
- Kollien AH, Schaub GA. 1998. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector: a review. *Tokai J Exp Clin Med* 23:335–340.
- Lange AB, Orchard I, Barrett FM. 1989. Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 35:393–399.
- Le Cahérec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnet G, Guillam MT, Thomas D, Gouranton J, Hubert JF. 1996. Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin functional comparison with aquaporin 1. *Eur J Biochem* 241:707–715.
- Maddrell SH, Herman WS, Mooney RL, Overton JA. 1991. 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* 156:557–566.
- Maddrell SHP, Herman WS, Farndale RW, Riegel JA. 1993. Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect. *J Exp Biol* 174:65–80.
- Nielsen S, Agre P. 1995. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int* 48:1057–1068.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen E.I., Knepper MA, Agre P. 1993. CHIP 28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120:371–383.
- Orchard I. 1989. Serotonergic neurohaemal tissue in *Rhodnius prolixus*: synthesis, release and uptake. *J Insect Physiol* 35:943–947.
- Preston GM, Agre P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 KD: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11110–11114.
- Sas DE, Sas Jane, Johnson KR, Menko S, Johnson RG. 1985. Junctions between lens fiber cells are labeled with a monoclonal antibody show to be specific for MP26. *J Cell Biol* 100:216–225.
- Valenti G, Verbavatz JM, Sabolic I, Ausiello DA, Verkman AS, Brown D. 1994. A basolateral CHIP28/MIP26-related protein (BLIP) in kidney principal cells and gastric parietal cells. *Am J Physiol* 267:C812–C820.
- Whittembury G, Biondi AC, Paz-Aliaga A, Linhares H, Parthe V, Linhares N. 1986. Transcellular and paracellular flow of water during secretion in upper segment of Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: solvent drag of molecules of graded size. *J Exp Biol* 123:71–92.
- Whittembury G, Echevarria M, Vargas-Janzen A, Hernández CS, Gutiérrez AM, González E. 1999. Relation between trans and paracellular water pathway in a secreting epithelium. XVth International Congress of Nephrology, Buenos Aires, Argentina, Abstracts, p 126.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)