

METABOLISMO DE HEME E FERRO EM *Rhodnius*
prolixus E *Diatraea saccharalis*

JOSÉ ROBERTO DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Janeiro de 2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.


METABOLISMO DE HEME E FERRO EM *Rhodnius
prolixus* E *Diatraea saccharalis*

JOSÉ ROBERTO DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Biociências e Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Marílvia Dansa de Alencar Petretski

CAMPOS DOS GOYTACAZES

ANE O E 

Neste momento tão importante de minha vida dedico esta tese ao grande novo amor de minha vida: meu filho DANIEL. Agradecerei sempre a Deus por ter me dado esse lindo presente. Você é tudo de bom em minha vida meu filho.

Agradecimentos

Sem sombra de dúvidas, este é mais um dos grandes momentos de minha vida. Aqui tenho muito a agradecer aqueles que me proporcionaram carinho, dedicação, exemplo, conselhos e tudo que foi necessário para a realização deste trabalho. Seguem-se então algumas considerações.

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer a Deus por este grande momento de minha vida.

Em dezembro de 1995, cheguei até o LQFPP para uma entrevista. Acabei convencendo e fiquei com uma vaga no laboratório. Por isso, gostaria de agradecer à minha orientadora e amiga Marílvia Dansa, que me proporcionou este momento tão importante.

João Cláudio, Alexandra, Mariana, Josiana, Pink. Gostaria de fazer um agradecimento especial à Flávia e ao Wendel, por terem me ensinado muito nesses últimos anos de convivência. Estou aprendendo a ensinar. Meus sinceros agradecimentos a todos os professores e amigos deste laboratório: Carlos Logullo, Carlos Peres, Kátia, Elenir novamente, Olga e ao Xavier. Gostaria atambém de agradecer ao amigo professor Ulysses Lins, pelas análises no 912!!! Obrigado camarada.

Gostaria também de agradecer a todos os amigos de outros laboratórios, e especial Beatriz Ferreira, Adriana Dutra, Giovana Alves, Noil, Ari e Artur por todo apoio importantíssimo!!! Obrigado meus amigos.

Agradeço também a todos os que não estão listados nessa pequena lista. Mas saibam que não por isso deixam de ser importantes.

Índice

Lista de figuras-----	IX
Lista de tabelas-----	XI
Resumo-----	XII
Abstract-----	XIV
1 – Introdução-----	01
1.1 - A classe Insecta e a hemotofagia-----	01
1.2 – A ordem hemíptera-----	03
1.2.1 - O <i>Rhodnius prolixus</i> e a digestão sangüínea-----	05
1.3 - A <i>Diatraea saccharalis</i> -----	12
1.3.1 - O ciclo de vida e descrição.-----	12
1.4 - Metabolismo de ferro em insetos-----	13
1.5 - Justificativa do trabalho-----	17
2 – Objetivos-----	18
3 - Materiais e métodos-----	19
3.1 - Colônia de insetos-----	19
3.1.1 - Alimentação dos insetos-----	19
3.1.2 – Coleta de hemolinfa dos insetos-----	20
3.2 – Verificação da passagem de um análogo do heme do lúmen intestinal para a hemocele de <i>Rhodnius prolixus</i> -----	20
3.3 - Microscopia eletrônica de transmissão-----	21
3.3.1- Localização da atividade peroxidásica-----	22
3.4 - Dosagem de ferro no epitélio intestinal de <i>Rhodnius prolixus</i> -----	22
3.5 - Fracionamento celular do epitélio intestinal de <i>R. prolixus</i> em gradiente descontínuo de sacarose para obtenção de retículo endoplasmático.-----	23
3.6 - Ensaio da atividade da NADPH citocromo c oxido-redutase-----	23
3.7 – Atividade de liberação de ferro a partir de hemina na presença de NADPH-----	24

3.8 - Ensaio de degradação de heme nas frações do gradiente-----	24
3.9 - Ultracentrifugação da hemolinfa-----	24
3.9.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-----	25
3.9.2 - Cromatografia-----	25
3.9.3 – Dosagens de ferro nas amostras de ferritina-----	26
3.9.4 - Focalização isoelétrica-----	26
3.9.5 - Acoplamento de isotiocianato de fluoresceína (FITC) à ferritina de <i>D. saccharalis</i> -----	26
3.9.6 - Captação de ferritina de <i>D. saccharalis</i> marcada com FITC pelos ovócitos de <i>D. saccharalis</i> -----	27
4 – Resultados-----	28
4.1 – Verificação da passagem de paládio meso-porfirina do lúmen intestinal para a hemocele de <i>R. prolixus</i> após alimentação com plasma enriquecido com paládio meso-porfirina-----	28
4.2 - Análise das células epiteliais do intestino médio de <i>R. prolixus</i> através da microscopia eletrônica de transmissão-----	28
4.2.1 - Detecção de heme nas células epiteliais do intestino médio de <i>R. prolixus</i> -----	30
4.3 - Dosagens de ferro no epitélio do intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> -----	35
4.4 - Detecção da atividade de degradação de heme em frações enriquecidas com retículo endoplasmático do epitélio intestinal de <i>R. prolixus</i> -----	36
4.5 - Detecção de proteína de ligação de ferro na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> e <i>D. saccharalis</i> -----	40
4.5.1 - Caracterização da proteína de ligação de ferro da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> -----	42
4.5.2 - Purificação da ferritina de <i>D. saccharalis</i> -----	45
4.5.3 – Dosagem de ferro na ferritina purificada-----	47

4.5.4 - Focalização isoeétrica das subunidades da ferritina de <i>D. saccharalis</i>	47
4.6 - Incorporação de ferritina marcada com FITC por ovócitos de <i>D. saccharalis</i>	49
5 – Discussão	52
6 – Conclusões	60
7 – Referências	61
8 – Anexo	72

Lista de figuras

- Figura 1 – Ciclo de vida do *R. prolixus*. O esquema mostra os estádios desde ovo a adulto, passando pelos cinco estádios de ninfa (Buxton, 1930). -----06
- Figura 2 - Desenho esquemático do trato digestivo de *R. prolixus* e suas divisões segundo Billingsley & Downe (1983). -----07
- Figura 3 – Estrutura da molécula de heme (ferro-protoporfirina IX).-----08
- Figura 4 - Estrutura proposta para a hemozoína segundo Bohle *et al.* (1997).-----10
- Figura 5 - Via de degradação de heme conhecida em vertebrados (Yoshida & Migita, 2000). --
-----11
- Figura 6 - Ciclo de vida da *D. saccharalis*. -----13
- Figura 7 – Espectros de emissão de fluorescência da hemolinfa de insetos alimentados com plasma de coelho contendo paládio meso-porfirina 1 mM, hemolinfa de insetos alimentados com sangue de coelho, paládio em PBS e hemolinfa de insetos alimentados com sangue de coelho e posteriormente incubada com paládio.-----29
- Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando o aspecto das estruturas eletron densas nas células do epitélio intestinal de *R. prolixus* 5 dias após a alimentação. ----31
- Figura 9 – Análise elementar das estruturas eletron densas das células do epitélio intestinal de *R. prolixus* através da imagem espectroscópica de elétrons (B e C) e espectroscopia de perda de energia de elétrons (D).-----32
- Figura 10 - Célula epitelial do intestino de *R. prolixus* mostrando atividade peroxidásica associada ao heme. -----33

Figura 11 - Células epiteliais do intestino de <i>R. prolixus</i> mostrando o aspecto das estruturas eletrondesas em insetos de 18 dias após a alimentação em sangue de coelho e de insetos alimentados com plasma de coelho 6 dias após alimentação-----	34
Figura 12 – Detecção de ferro no epitélio intestinal de <i>R. prolixus</i> (porção posterior), nos dias após a alimentação com sangue de coelho. -----	35
Figura 13 – Produção de ferro livre a partir de heme utilizando-se extrato de intestino de <i>R. prolixus</i> de 5 dias após a alimentação. -----	37
Figura 14 – Localização da fração de retículo endoplasmático nas frações celulares obtidas por ultracentrifugação do epitélio intestinal de <i>R. prolixus</i> através da atividade da citocromo c oxidoreductase.-----	38
Figura 15 – Ensaio de degradação de heme nas diferentes frações celulares. -----	39
Figura 16 – (A) Gel de poliacrilamida nativo (7-22%) das amostras do fundo do tubo após ultracentrifugação da hemolinfa de <i>R. prolixus</i> (fRH) e de <i>D. saccharalis</i> (fDs). Os géis foram corados para ferroproteínas e para proteínas totais.-----	41
Figura 17 – Gel de poliacrilamida da ferritina isolada da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> . A: Gel nativo (7%) com a proteína extraída de um gel nativo e previamente tratada com calor, corado com azul de Coomassie e para ferroproteínas (B). SDS-PAGE mostrando as subunidades da ferritina-----	43
Figura 18A – Alinhamento de seqüência da subunidade de aproximadamente 32 kDa da ferritina de <i>D. saccharalis</i> com as subunidades da ferritina de <i>Trichoplusia ni</i> e de outros insetos.-----	44
Figura 18B – Alinhamento de seqüência da subunidade de aproximadamente 26 kDa da ferritina de <i>D. saccharalis</i> com as subunidades da ferritina de <i>Trichoplusia ni</i> e de outros insetos.-----	44
Figura 19 – Isolamento da ferritina através de cromatografia de gel filtração em superose 6B (FPLC) após ultracentrifugação e tratamento térmico. -----	45

Figura 20 – Gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS da ferritina isolada da hemolinfa de <i>D. saccharalis</i> . -----	46
Figura 21 – Eletroforese bidimensional da ferritina de <i>D. saccharalis</i> . -----	48
Figura 22 – Incorporação de ferritina pelos ovócitos de <i>D. saccharalis</i> .-----	50
Figura 23 – Incorporação de ferritina marcada com FITC no tempo de 5 minutos após incubação <i>in vitro</i> .-----	51

Lista de tabelas

Tabela 1 – Quantificação de ferro na ferritina purificada. A massa de ferro é mostrada por massa de proteína. Os dados são representados como medi e desvio padrão para 3 quantificações.-----	47
--	----

RESUMO

O intestino médio de *Rhodnius prolixus* foi analisado através de microscopia eletrônica de transmissão e imagem espectroscópica com o intuito de se localizarem estruturas celulares envolvidas com o metabolismo de heme. Foram detectadas estruturas eletrondensas no intestino médio posterior. Estas estruturas foram designadas como hemoxissomos. Os hemoxissomos estão presentes nas células epiteliais em vários momentos após a alimentação sanguínea e, em vários momentos após a alimentação, algumas destas estruturas se tornam menos eletrondensas. Através das imagens espectroscópicas, podemos visualizar grandes depósitos de ferro e oxigênio nestas estruturas. O ferro está provavelmente associado ao anel porfirínico como um complexo ferro-protoporfirina IX, como foi detectado usando a diaminobenzidina. Uma observação interessante foi a presença de retículo endoplasmático (RE) ao redor dos hemoxissomos durante alguns momentos especiais. O conteúdo de ferro no epitélio do intestino médio posterior foi monitorado e se manteve constante nos dias iniciais após a alimentação, mas se tornou mais elevado no final do processo digestivo (do dia 13 até o dia 20). Estes resultados estão em concordância com as observações de que a aparência dos hemoxissomos muda no final do processo digestivo. A habilidade de degradar heme parece depender da presença de RE como foi observado usando um ensaio de degradação de heme na presença de uma fração enriquecida com RE. Estes resultados sugerem que os hemoxissomos podem desempenhar um papel na detoxificação de heme. Neste trabalho, nós também identificamos uma proteína de ligação de ferro na hemolinfa de *R. prolixus* e *Diatraea saccharalis* através da ultracentrifugação em gradiente de densidade de KBr seguida por um protocolo de coloração de ferro em gel de poliarilamida. As proteínas de ligação de ferro desempenham um papel essencial para manter o balanço de ferro sob controle. Em *R. prolixus*, embora tenhamos identificado uma proteína de ligação de ferro, não obtivemos massa protéica suficiente para caracterizá-la. Sendo assim, purificamos a proteína de ligação de ferro da hemolinfa de *D. saccharalis*. A seqüência amino-terminal revelou que esta proteína está estritamente relacionada com ferritinas de outros lepidópteros. Para estudarmos o papel desempenhado por esta proteína no metabolismo de ferro, FITC foi acoplado à ferritina e 10 µg desta proteína foram injetados na hemocele de fêmeas adultas. Após 6 horas e 30 minutos desde a injeção nós observamos que a fluorescência estava localizada nos ovócitos em crescimento, sugerindo que esta proteína está sendo internalizada. Esta ferritina

carrega uma massa apreciável de ferro. Este ferro pode suportar a síntese de heme para os ovócitos em crescimento e para o futuro embrião.

ABSTRACT

Rhodnius prolixus midgut was analysed using transmission electron microscopy and electron spectroscopic imaging in order to localize the cellular structures involved in haem metabolism. In the posterior midgut, special cellular electron-dense structures were observed. These structures are here designated haemoxisomes. Haemoxisomes are present in the epithelial cells at various time points after a blood meal. Several days after the blood meal, some of them become less electron-dense. By electron spectroscopic imaging, large amounts of iron and oxygen were detected in these cellular structures. The iron is probably bound to the porphyrin ring as an iron-protoporphyrin IX complex, as detected using the diaminobenzidine technique. An interesting observation was the presence of endoplasmic reticulum surrounding the haemoxisomes during some special periods. Iron content was monitored in the posterior midgut epithelium and was found to be constant at the initial days after a blood meal, but slightly higher at the end of the digestive process (from 13th up to 20th day). These results are in agreement with the observation that the appearance of the haemoxisomes changes at the end of the digestive process. The ability to degrade haem seems to depend on the presence of endoplasmic reticulum, as observed using a haem degradation assay in the presence of an endoplasmic reticulum-enriched fraction. Taken together these results suggest that haemoxisomes may play a role in intracellular haem detoxification. In this work, we also identified an iron-binding protein in the haemolymph from both *R. prolixus* and *Diatraea saccharalis* by means of sucrose density gradient ultracentrifugation, followed by an iron staining protocol. Iron-binding proteins play some crucial roles to keep the iron balance under control. In *R. prolixus*, even though we were able to identify the protein, we did not have enough protein in order to characterize it. So, we purified an iron-binding protein from the haemolymph of *D. saccharalis*. The N-terminal sequencing revealed that this protein is closely related to other lepidopteran ferritins. In order to study the role played by ferritin in the iron metabolism, we coupled ferritin with FITC and injected 10 µg of this protein into the haemocoel of *D. saccharalis* adults' female. After 6 hours and 30 min since the injection we observed that the fluorescence was located in the growing oocytes, suggesting that the ferritin is being taken up. *D. saccharalis* ferritin carries about 3 times its own weight in iron. This iron may support the synthesis of haem for growing oocytes and for future embryo.

1 - Introdução

1.1 - A classe Insecta e a hematofagia

A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso dos artrópodes e compreende cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidas. Os insetos representam o grupo mais importante do reino animal, quer sob o aspecto econômico, ou sob o aspecto médico (Lehane, 1991). A classe Insecta é sem dúvida a classe que maior sucesso evolutivo obteve dentre as espécies eucarióticas. Um dos fatores que contribuíram para o sucesso evolutivo dos insetos foi o fato de manterem um ciclo de vida altamente especializado, onde adultos e ninfas, ou larvas, se desenvolvem em sua grande maioria, com hábitos alimentares diferentes. Um fator que contribuiu muito para o sucesso adaptativo do grupo foi sem dúvida a presença de asas, que possibilitou a este conquistar os ambientes mais diversos possíveis. Esta característica lhes permite uma maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração.

Calcula-se que o número total de espécies de insetos esteja entre 1 e 10 milhões. Destas, poucas se alimentam de sangue: somente 300 a 400 espécies, quase todas de grande importância para o homem, seja na transmissão de patógenos na medicina e veterinária, seja pela perda sanguínea que acarreta baixa produtividade na pecuária (Lehane, 1991).

A evolução do hábito de sugar sangue parece ter se dado, a princípio, pela associação prolongada entre insetos e vertebrados (Lehane, 1991). Os insetos teriam sido atraídos para os ninhos dos animais vertebrados que lhes ofereciam calor e umidade. Em áreas semi-áridas ou áridas, o habitat oferecido pelos ninhos pode ter sido essencial para a sobrevivência dos insetos, pois esses locais apresentam um abundante suprimento de alimentos. Certamente, muitos insetos dos dias atuais, como os psocódios, são atraídos pelas altas concentrações de matéria orgânica que é encontrada nos ninhos (Lehane, 1991)

As partes bucais se desenvolveram para este estilo de vida, sendo provavelmente do tipo mastigador. Embora estas partes bucais não sejam primariamente adaptadas para perfurar a pele, alguns malófagos se alimentam de sangue. *Menacantus straminus*, um malófago atual, se alimenta nas partes basais das penas ou na pele de galinha freqüentemente por lesões provocadas no local. Estas lesões provocadas por este tipo de alimentação dão ao inseto acesso ao sangue do qual ele se alimenta (Emmerson *et al.*, 1973). O sangue tem um valor nutricional mais elevado que a pele e, ainda, é mais fácil de digerir. Uma vez que o sangue

tenha sido encontrado pelos insetos de uma forma regular, é provável que seu alto valor nutricional tenha favorecido o desenvolvimento de um grupo de insetos que regularmente exploram o sangue como um recurso. Isto teria se desenvolvido progressivamente, através de adaptações fisiológicas, de comportamento e morfológicas, primeiro para a hematofagia facultativa e, eventualmente em alguns insetos, para a hematofagia obrigatória (Lehane, 1991).

Outras formas de associação podem ter sido estabelecidas devido à atração dos insetos pelas secreções do hospedeiro vertebrado, ou pelo uso do vertebrado como sítio de aquecimento e de enxame (Lehane, 1991). Mas provavelmente o fator mais importante foi o uso dos adubos do hospedeiro (fezes) como habitat larval. *Haematobia irritans* é um exemplo de colonizador de fezes para a criação de larvas. Esta espécie só deixa o hospedeiro vertebrado para realizar a oviposição nas fezes do mesmo (Mohr, 1943). Este tipo de adaptação permite à fêmea adulta não se afastar do seu hospedeiro, que é sua fonte de alimento, durante a dispersão de suas larvas. Isto lhe confere uma grande vantagem. Assim, nas fêmeas o aparecimento do hábito de se alimentar de sangue pode ser explicado pelas vantagens oferecidas, não só pelo fato de o sangue ser altamente nutritivo, mas também devido ao uso das fezes do mesmo animal para a oviposição. Nos machos a questão é mais difícil. Uma explicação plausível é o fato da associação com o vertebrado minimizar o tempo e a energia investidos na procura do hospedeiro, onde as fêmeas se encontram. Estando o macho em associação com o vertebrado, mesmo sem se alimentar de sangue, ele garante que a fêmea que se alimenta de sangue chegará ao local de alimentação, onde ele se encontra. É o que acontece com a mosca Tsetse e o mosquito *Aedes aegypti*, por exemplo (Teesdale, 1955).

A evolução das partes bucais foi de crucial importância para possibilitar o hábito de se alimentar de sangue. Discute-se também que os insetos hematófagos podem ter surgido de espécies de insetos que se alimentavam de seiva de plantas. Estes já teriam as partes bucais pré-adaptadas para o hábito de perfurar e sugar (Lehane, 1991). A mudança do alimento alvo teria sido possível se estes insetos tivessem mantido uma relação restrita com os vertebrados. Tal associação pode ter ocorrido através da atração destes insetos pelas secreções corpóreas dos vertebrados ou pelo uso das fezes destes como um meio para a criação de larvas, como mencionado acima. Outra possibilidade é que esses insetos teriam sido atraídos para os ninhos para se alimentarem de frutas ou sementes estocados pelos vertebrados. Além das adaptações morfológicas, os organismos hematófagos em geral desenvolveram ferramentas bioquímicas

para possibilitá-los se alimentar de sangue. As glândulas salivares de artrópodes hematófagos, por exemplo, são dotadas de verdadeiros coquetéis farmacológicos (Law *et al.*, 1992). As moléculas presentes na saliva de artrópodes hematófagos têm o papel de driblar a homeostasia do hospedeiro vertebrado possibilitando então conseguir sugar sangue em grandes quantidades em pequenos intervalos de tempo (Law *et al.*, 1992).

Existem 4 principais ordens onde se encontram os insetos hematófagos: Diptera, Hemiptera, Phthiraptera e Siphonaptera. Em vários destes insetos a alimentação se caracteriza pela ingestão de grande quantidade de sangue que chega em algumas espécies a perfazer 10 vezes seu próprio peso. Esta grande quantidade de sangue ingerida de uma só vez minimiza o número de visitas que um ectoparasita temporário precisa fazer ao hospedeiro e, portanto, diminui o risco que estas investidas representam (Lehane, 1991). Por outro lado, uma desvantagem é a diminuição da mobilidade do inseto alimentado. Outra desvantagem aparente é a grande quantidade de água ingerida, que requer um sistema eficiente e rápido de remoção de água e concentração do material solúvel. Parece que um dos grandes passos que permitiu a adaptação à hematofagia pelos insetos, foi a adaptação ao uso do sódio para controlar a absorção de água, visto que no sangue este se encontra em abundância e sua absorção se processa ativamente (Barrett, 1982). Em insetos fitófagos, como no *Dysdercus peruvianus*, por exemplo, o potássio é usado para controlar a absorção de água, não dependendo da dieta de sódio (Silva *et al.*, 1995).

1.2 – A ordem hemíptera

A ordem Hemiptera contém os insetos conhecidos como percevejos verdadeiros. A maioria dos hemípteros é hematófaga ou sugadora de seiva de plantas, mas três famílias contêm várias espécies de pequenos a grandes insetos hematófagos. A primeira destas famílias é a Cimicidae, onde todos os membros são hematófagos. Esta família é distribuída em todo o mundo e inclui as espécies conhecidas como *Cimex lectularis* e *Cimex hemipterus*, que normalmente se alimentam no homem. A maioria dos representantes da família Cimicidae é parasita de morcegos e aves, embora uma minoria se alimente em mamíferos (Lehane, 1991).

A segunda família de percevejos hematófagos é a Polycetenidae. Todos os membros deste grupo são ectoparasitas permanentes, hematófagos obrigatórios que vivem em

microquirópteros tanto do Novo quanto do Velho Mundo. Estes insetos sem olhos apresentam apenas dois estádios de ninfa após o nascimento.

A terceira família de hemípteros que contém os percevejos hematófagos é a Reduviidae, onde está contida a subfamília Triatominae, na qual todas as cento e cinquenta e cinco espécies são hematófagas obrigatórias. Nesta família se encontram várias espécies de vetores do *Tripanossoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas. Estes percevejos se alimentam em uma variedade de vertebrados incluindo o homem e, muitos são intimamente associados com os sítios de repouso habitual ou com os ninhos de aves, mamíferos e outros animais (Lehane, 1991). Os triatomíneos que são importantes, de uma perspectiva humana, estão amplamente confinados às Américas. Algumas espécies, *Triatoma infestans* em particular e, em menor extensão *Rhodnius prolixus* e outras espécies, têm se tornado restritamente associadas com as áreas domiciliares e peridomiciliares do homem.

As menores espécies de triatomíneos, *Alberprosenia goyovargasi*, têm adultos com 0,5 cm de comprimento, e as maiores, como *Dipetalogaster maximus*, podem ter até 4,5 cm de comprimento. Uma fêmea adulta de *T. infestans* produz pequenos agregados de ovos subsequentes a cada alimentação com sangue. Ao longo de sua vida, de seis meses a um ano, ela pode produzir de cem a trezentos ovos (Lehane, 1991). Os ovos eclodem em dez a trinta dias e há cinco estágios de ninfa. Os percevejos triatomíneos são hematófagos obrigatórios; a maioria se alimenta à noite e possui uma picada quase sem dor.

As espécies domésticas, como *T. infestans*, provavelmente se utilizam da transferência passiva em móveis, etc., para regiões ainda não infestadas. Os insetos adultos são capazes de realizarem vôos curtos, que provavelmente são importantes para dispersão local. Em comum com os outros insetos que se alimentam exclusivamente de sangue, os triatomíneos têm microorganismos simbiotes. Estes microorganismos estão presentes no lúmen do intestino e fornecem nutrientes adicionais, sem os quais as ninfas não se desenvolveriam com sucesso até alcançar o estágio adulto (Lehane, 1991).

Os hemípteros são excepcionais no uso de enzimas catepsina-símile no seu processo digestivo. Isto é consistente com a hipótese de que os insetos hematófagos tenham surgido a partir de sugadores de seiva vegetal (Houseman & Downe, 1983; Billingsley & Downe, 1988; Terra *et al.*, 1988). Os sugadores de seiva, não necessitando de proteinases, podem ter perdido suas tripsinas digestivas. Entretanto, ao mudarem seu hábito alimentar, precisaram readquirir a atividade proteolítica no lúmen intestinal. Sugere-se que, tendo perdido suas tripsinas, eles

tiveram de fazer uso das catepsinas que estão contidas nos lisossomos de todas as células, redirecionando-as para a digestão extracelular (Lehane, 1991).

1.2.1 - O *Rhodnius prolixus* e a digestão sangüínea

Rhodnius prolixus, um dos nossos modelos de estudo, é um hemíptero hematófago obrigatório da família Reduviidae, um potencial vetor do agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*. Este inseto é um hemimetábolo e passa por 5 mudas até atingir a fase adulta. Cada muda, assim como cada ciclo reprodutor é sincronizado por uma única alimentação na qual o inseto ingere uma quantidade de sangue equivalente a até 9 vezes seu próprio peso (Friend, 1965). A quantidade (Friend, 1965) e a qualidade (Valle *et al.*, 1987) do sangue ingerido afetam diretamente o desenvolvimento e a produção de ovos do *Rhodnius*. Após a alimentação, o animal tem um período de jejum prolongado, que pode chegar a alguns meses. Por volta do terceiro dia após a alimentação, os ovários do *R. prolixus* já se encontram repletos de ovócitos, e por volta do sexto dia após a alimentação, estes insetos iniciam a postura. As ninfas eclodem dentro de um período de dez a vinte dias após a postura, e estas também se alimentam de sangue. Após cada alimentação se dá uma muda (Buxton, 1930). Este inseto possui cinco estádios de ninfa, após os quais se torna adulto, apresentando asas e maturidade sexual (figura 1). Os adultos, machos e fêmeas, se alimentam de sangue e, a partir daí, os ciclos alimentares sincronizam o ciclo reprodutor. O *R. prolixus* não tem hospedeiro preferencial, alimentando-se em qualquer vertebrado de sangue quente, inclusive o homem. É hospedeiro intermediário de tripanossomatídeos, e apontado como o principal vetor da doença de Chagas em países como Venezuela e Colômbia. No Brasil tem importância secundária como vetor, visto que *Triatoma infestans* é apontado como o principal veiculador da doença no país, mas o *R. prolixus*, ainda assim, é considerado um vetor em potencial.

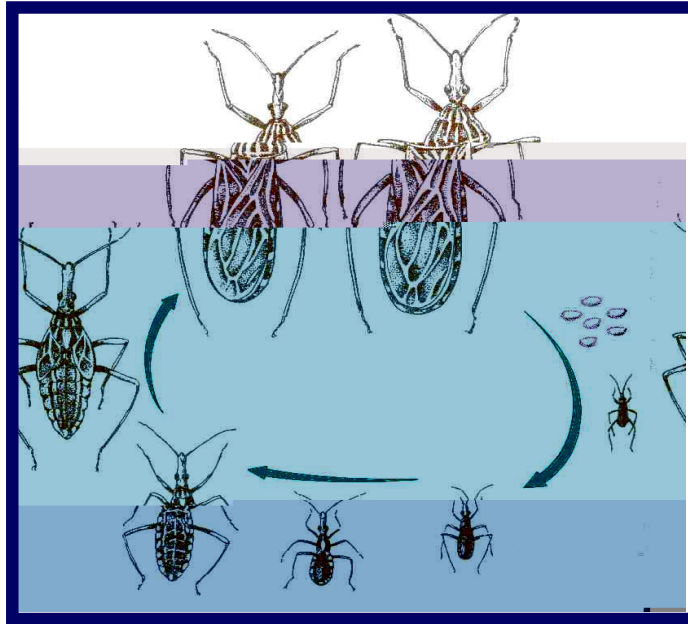


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *R. prolixus*. O esquema mostra os estádios desde ovo a adulto, passando pelos cinco estádios de ninfa (Buxton, 1930). Em termos de escala uma fêmea adulta de *Rhodnius*, mostrada na parte superior da ilustração, mede aproximadamente dois cm.

O aparelho digestivo do *R. prolixus* é dividido em intestino médio anterior e intestino médio posterior. O intestino médio posterior por sua vez é subdividido em porção anterior e posterior, segundo Billingsley & Downe (1983) (figura 2). Após a ingestão, o sangue é estocado no intestino médio anterior onde se dá início a uma intensa atividade de lise das hemácias (Billingsley, 1990). Após a hemólise, o inseto então digere e absorve os produtos da digestão do sangue do hospedeiro vertebrado (Lehane, 1991). A etapa de digestão das proteínas sanguíneas se inicia na porção posterior do intestino médio do *R. prolixus*, onde as catepsinas B e D, aminopeptidases, carboxipeptidases, (Houseman & Downe, 1983) e outras enzimas hidrolíticas, (Ferreira *et al.*, 1988) são ativas nesta porção do intestino. Uma característica marcante no intestino dos hemípteros é a presença de um sistema de membranas que reveste as células epiteliais no lado luminal, conhecidas como membranas perimicrovilares. Estas membranas separam o conteúdo luminal das células epiteliais durante o ciclo digestivo destes insetos (Silva *et al.*, 2004). No lúmen intestinal do *R. prolixus*, a

hemoglobina é digerida, e um dos mais importantes produtos gerados é o heme, o grupamento prostético daquela proteína (figura 3). O heme, ou ferroprotoporfirina IX, é um composto cuja importância biológica é amplamente conhecida, já que se encontra envolvido como grupamento prostético de proteínas envolvidas em processos fundamentais como a respiração celular, detoxificação, transporte de oxigênio, entre outros, em um grande número de organismos. Desta forma, a utilização do heme da alimentação pelo inseto poderia ser uma grande economia em termos metabólicos, pois poderia dispensar ou minimizar a utilização da via metabólica de biossíntese de heme presente na maior parte dos organismos vivos. Isto de fato parece ocorrer já que tem sido demonstrado que parte do heme gerado no aparelho digestivo é capaz de ser absorvido pelo *Rhodnius prolixus* (Dansa-Petretski *et al.*, 1995). Mas certamente esta não é a principal fonte de heme para o inseto, visto que a via de biossíntese de heme é de fundamental importância para a ovogênese do *Rhodnius prolixus*, como demonstrado por Braz *et al.* (2001). No carrapato bovino *Boophilus microplus* o cenário é de uma verdadeira economia metabólica, pois este artrópode tem como única fonte de heme, aquela derivada da degradação da hemoglobina do hospedeiro vertebrado, visto que a via de biossíntese de heme está ausente neste modelo (Braz *et al.*, 1999).

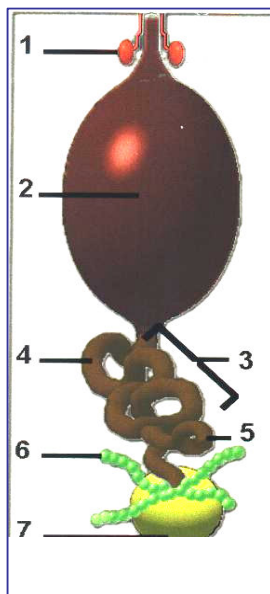


FIGURA 2 - Desenho esquemático do trato digestivo de *R. prolixus* e suas divisões segundo Billingsley & Downe (1983). **1** - Glândula salivar; **2** - Intestino médio anterior; **3** - Intestino médio posterior; **4** - Porção anterior do intestino médio posterior; **5** - Porção posterior do intestino médio posterior; **6** - Túbulos de Malpighi; **7** - Reto (ampola retal).

Apesar das vantagens aparentes do fornecimento do grupamento heme na dieta, esta molécula também oferece sérios riscos aos organismos hematófagos, pois o heme promove eficientemente o aparecimento de espécies reativas de oxigênio, (Liu *et al.*, 1985; Gutteridge & Smith, 1988; Van der Zee *et al.*, 1996; Deterding *et al.*, 2004), conhecidas por iniciarem reações deletérias a várias biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (Aft & Muller, 1983; Vincent *et al.*, 1988; Tappel, 1955; Schmitt *et al.*, 1993). Uma das soluções encontradas pelo *Rhodnius* é a síntese de uma proteína de ligação de heme, a RHBP (*Rhodnius* heme-binding protein) (Oliveira *et al.*, 1995), cuja função antioxidante foi descrita por Dansa-Petretski *et al.* (1995). Esta proteína, presente na hemola 7fra do i

Um outro processo antioxidante descrito em *R. prolixus*, é a formação de hemozoína (Oliveira *et al.*, 1999). A hemozoína, também conhecida como pigmento da malária, é uma forma agregada de heme, onde uma molécula de heme está associada à outra através de ligações iônicas entre o íon ferro de uma molécula de heme e o grupo carboxila dissociada de um grupamento propionato do anel porfirínico de uma outra molécula de heme, como determinado por estudos através de espectrometrias infravermelha e de absorção de raio-X (Slater *et al.*, 1991; Bohle *et al.*, 1997). A complexa estrutura da hemozoína é mantida por interações iônicas entre as moléculas de heme e por pontes de hidrogênio entre as cadeias já formadas (figura 4). Este pigmento (hemozoína) exerce um papel protetor no *Plasmodium*, pois ele reduziria a formação de radicais livres que são extremamente tóxicos para a célula (Bohle *et al.*, 1997). Este mecanismo de defesa só havia sido descrito no parasita causador da malária, o *Plasmodium* (Slater, 1992; Slater & Cerami, 1992; Arese & Schwarzzer, 1997; Ridley *et al.*, 1997) mas, da mesma forma que no *Plasmodium*, no *Rhodnius* a formação deste agregado de heme exerce uma proteção adicional contra os efeitos tóxicos gerados pelo grupamento heme, mantendo-o em uma forma incapaz de passar do lúmen intestinal para a hemocele do inseto (Oliveira *et al.*, 2000). No que diz respeito ao potencial oxidante da molécula de heme, foi demonstrado que de fato a hemozoína apresenta um potencial pró-oxidante reduzido, quando comparado com heme livre (Oliveira *et al.*, 2002). Sendo assim, esta seria a primeira linha de defesa encontrada pelo inseto para se proteger contra os efeitos tóxicos gerados pelo heme derivado da hemoglobina. Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que o processo de formação de hemozoína está diretamente relacionado com as membranas perimicrovilares em *Rhodnius prolixus*. Estas membranas, de maneira bastante eficiente, promovem a agregação de heme *in vitro*. Além disso, a quantidade de hemozoína formada, *in vivo*, mostra uma dependência direta da quantidade de membranas perimicrovilares presente no intestino deste inseto (Silva, 2001).

Um modelo bastante interessante do ponto de vista fisiológico é o carrapato bovino *Boophilus microplus*. Este aracnídeo se caracteriza pela ingestão de uma grande quantidade de sangue, chegando a 100 vezes o próprio peso, seguida de um processo digestivo intracelular. Durante a digestão do carrapato, as células digestivas estocam heme em estruturas denominadas hemossomos (Lara *et al.*, 2003). Estes hemossomos são estruturas que seqüestram o heme, diminuindo a disponibilidade desta molécula livre no interior das células. Sendo assim, este representa um sistema de defesa bastante interessante. Lara *et al.* (2005)

demonstraram a rota deste heme nas células intestinais do carrapato bovino, mostrando fortes evidências da presença de proteínas envolvidas com o transporte de heme no interior destas células. A hemoglobina é digerida no interior de vesículas denominadas vesícula digestivas e o heme é direcionado para os hemossomos. Um outro dado interessante é que uma grande parte do heme gerado durante a digestão da hemoglobina é incorporado na proteína precursora hemolinfática da vitelina, a vitelogenina (Logullo *et al.*, 2002). Este heme aparentemente serve com fonte para a construção de heme-proteínas do embrião em desenvolvimento, visto que este carrapato não é capaz de sintetizar heme, ao contrário do *R. prolixus* (Braz *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado por Logullo *et al.* (2002) que a vitelina em *Boophilus microplus* apresenta uma função antioxidante. Apesar destes dados, ainda resta muito a ser elucidado a respeito do metabolismo intracelular de heme em invertebrados. Em *Rhodnius prolixus*, por exemplo, não há dados sobre o metabolismo de heme intracelular.

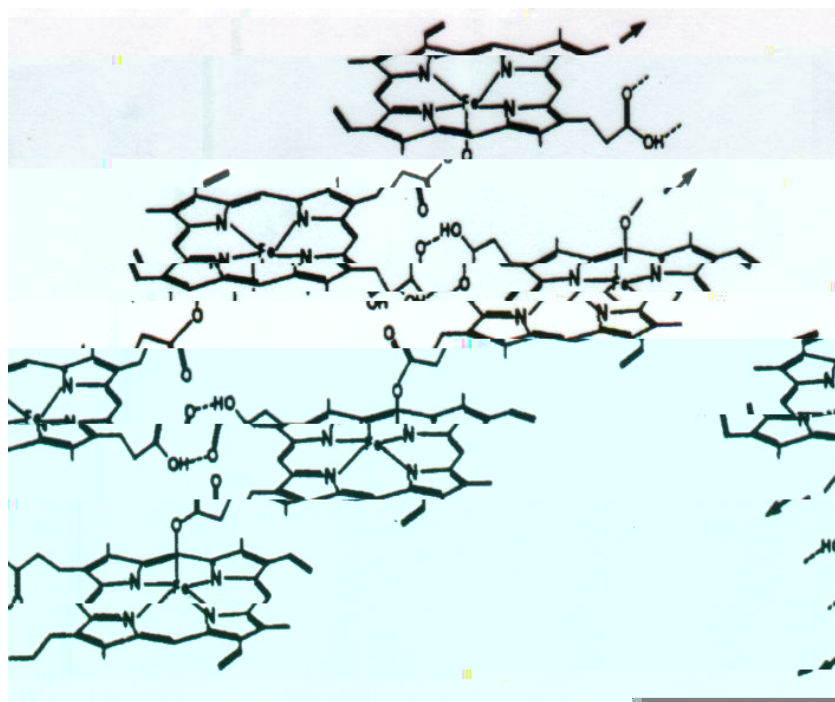


Figura 4 - Estrutura proposta para a hemozoína segundo Bohle *et al.* (1997). As setas indicam o sentido de prolongação das cadeias do polímero.

Em vertebrados, um sistema de detoxificação de heme é a sua degradação pela enzima microsossomal heme oxigenase (Maines, 1988), dando origem aos pigmentos da bile (biliverdina e bilirubina), ferro e monóxido de carbono (figura 5). A heme oxigenase converte o heme à biliverdina IX α , usando NADPH como fonte de poder redutor e em seguida a biliverdina redutase converte biliverdina a bilirrubina IX α , também usando NADPH como fonte de poder redutor (Yoshida & Migita, 2000). Além de diminuir a concentração de heme que é potencialmente tóxico, as heme oxigenases desempenham um importante papel no metabolismo celular, sendo induzidas em resposta ao estresse em vários organismos (Shibahara *et al.*, 1987). As heme oxigenases não agem apenas como proteção contra o heme, mas também como uma fonte de monóxido de carbono e biliverdina que são importantes na sinalização celular e como seqüestradores de radicais livres (Dore *et al.*, 1999; Stocker & Peterhans, 1989). Zhang *et al.* (2004) clonaram e expressaram uma heme oxigenase de *Drosophila* e demonstraram que esta enzima apresenta a capacidade de degradar heme, produzindo biliverdina, monóxido de carbono e ferro na presença de NADPH como poder redutor.

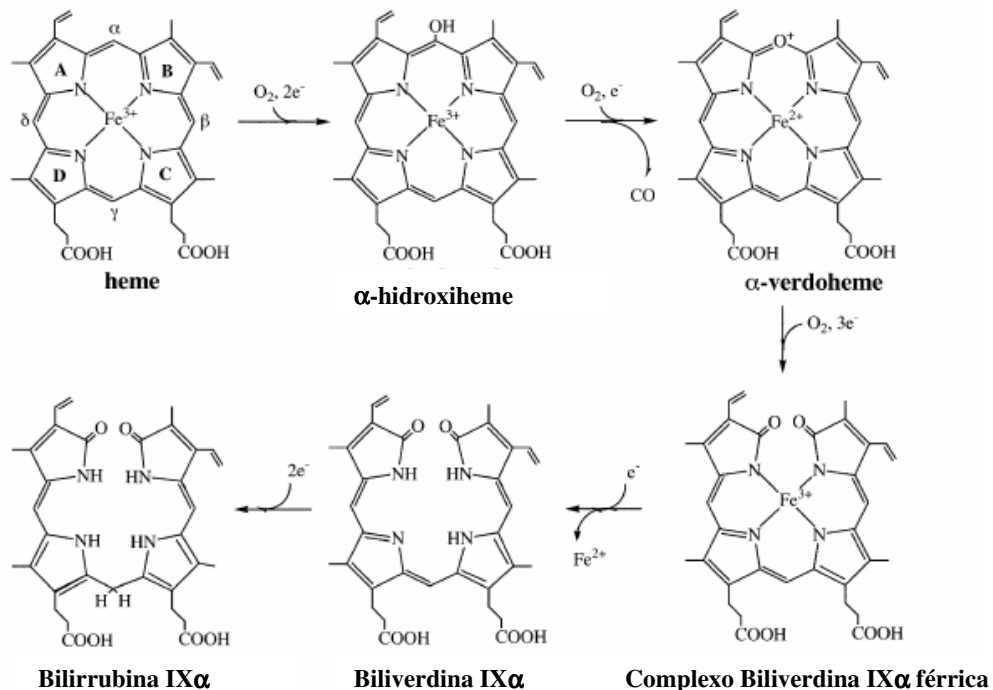


Figura 5 – Via de degradação de heme conhecida em vertebrados (Yoshida & Migita, 2000). A conversão de heme à biliverdina IX α é catalisada pela heme oxigenase e de biliverdina IX α à bilirrubina IX α é catalisada pela biliverdina redutase.

1.3 - A *Diatraea saccharalis*

A *Diatraea saccharalis*, nosso segundo modelo experimental, é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera e é a principal praga da cana-de-açúcar, sendo, provavelmente, nativa da

marrom, alongada e fina, medindo de 16 a 20 mm de comprimento. A duração do estágio pupal, geralmente, é de oito a nove dias.

Adultos apresentam cor amarelada, possuem em média a extensão da asa de 18 a 28 mm para os machos e 27 a 39 mm para as fêmeas. Os adultos apresentam hábitos noturnos, permanecendo escondidos durante o dia. O oviposição começa no final da tarde continuando durante toda a noite. As fêmeas podem colocar os ovos por até quatro dias. A duração do estágio adulto é de três a oito dias.

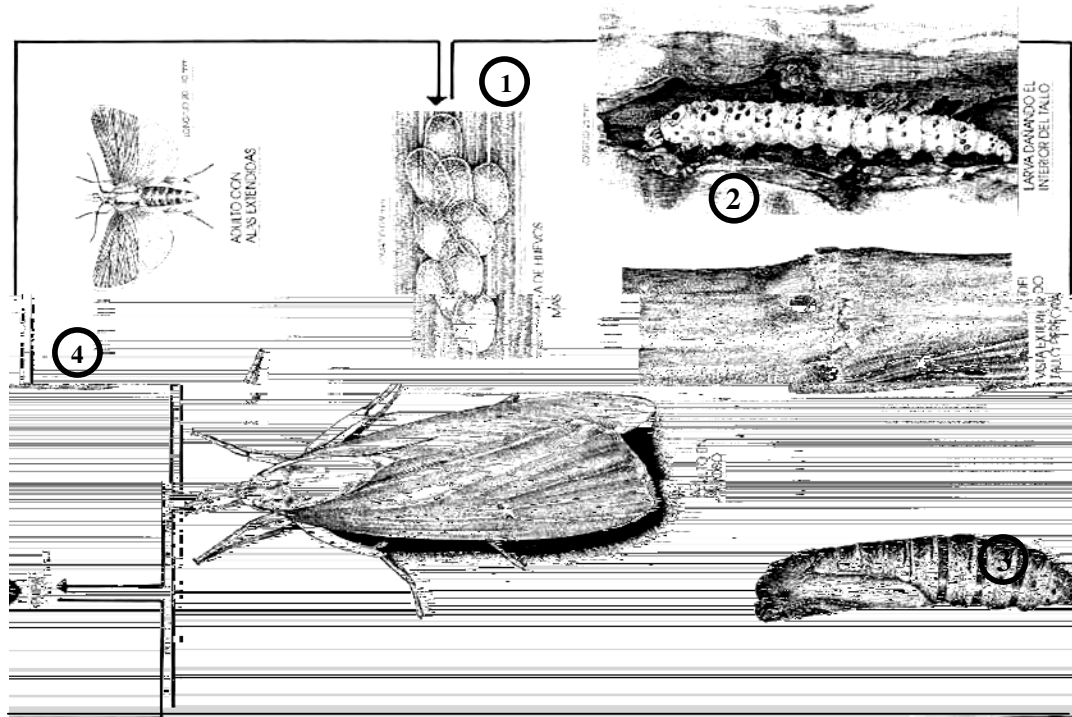


Figura 6 - Ciclo de vida da *D. saccharalis*. O esquema mostra os estádios de ovo (**1**: 1,16 mm de comprimento e 0,75 mm de largura), larva no interior do colmo de uma planta (**2**: 20-30 mm), pupa (**3**: 16 a 20 mm) e adulto (**4**: 16 a 20 mm).

1.4 - Metabolismo de ferro em insetos

O ferro é um elemento essencial para muitos processos redox em todos os eucariotos e muitos procariotos (Kaplan, 2002). No entanto, os organismos que dependem do ferro para o metabolismo oxidativo devem lidar não só com o fato de este elemento ser de suma importância fisiológica, mas também com o fato de este ser uma potente toxina. Em vertebrados o sistema de aquisição e balanço de ferro é bastante compreendido, embora ainda

haja muito a ser elucidado. Nestes organismos são conhecidas as proteínas de ligação de ferro, onde se destaca a transferrina, uma proteína sérica com dois lóbulos funcionais para a ligação de ferro responsável pelo transporte de ferro. A lactoferrina, encontrada no plasma e em outros fluidos corporais, parece desenvolver um importante papel como antibiótico, ligando ferro e tornando-o indisponível para bactérias que necessitam deste elemento para sua proliferação (Yoshiga *et al.*, 1997). Uma outra proteína ligante de ferro muito conhecida em vertebrados e em invertebrados é a ferritina, uma proteína globular envolvida com o estoque de ferro intracelular (Kaplan, 2002). Em vertebrados, a ferritina é uma proteína composta por 24 subunidades. Ela-

estudos mostram ainda que esta proteína apresenta efeito bacteriostático, o que não fora mostrado para transferrina (Goetz *et al.*, 2002).

Em insetos, assim como em vertebrados, o ferro além de se comportar como um elemento essencial para os processos redox também apresenta efeitos deletérios para o inseto (Nichol *et al.*, 2002). De maneira geral, os insetos são capazes de produzir proteínas ligadoras de ferro como transferrinas e ferritinas (Winzerling *et al.*, 1995a; Winzerling *et al.*, 1995b; Nichol *et al.*, 2002). Apesar de se ter conhecimento de um número considerável de proteínas ligantes de ferro caracterizadas em insetos (Kim *et al.*, 2001; Capurro *et al.*, 1996; Jamroz *et al.*, 1993; Yoshiga *et al.*, 1997; Pham, 2002), pouco se conhece a respeito do metabolismo de ferro nesses animais (Nichol *et al.*, 2002). A ferritina em vertebrados é uma proteína de ligação de ferro encontrada preferencialmente no interior de células epiteliais, onde desempenha um papel no estoque de ferro intracelular. Contudo, em insetos, ao contrário de vertebrados, esta proteína é encontrada em quantidades apreciáveis tanto na hemolinfa quanto nas células epiteliais (Locke & Nichol, 1992; Nichol *et al.*, 2002). Em insetos, assim como em vertebrados, a ferritina é composta por subunidades do tipo L e do tipo H. As subunidades das ferritinas descritas em insetos têm massas moleculares que vão de 24 a 35 kDa (Nichol *et al.*, 2002). Genes para as diversas subunidades descritas em insetos já foram clonados e sequenciados (Nichol *et al.*, 2002). Kim *et al.* (2001) caracterizaram a ferritina de *Galleria mellonella* (Lepidoptera) e localizaram esta proteína em tecidos como testículos e ovários. Outros estudos têm mostrado a influência da disponibilidade de ferro na síntese de subunidades das ferritinas de *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* (Georgieva *et al.*, 1999; Dunkov *et al.*, 2002). Dunkov *et al.*, (2002) mostraram ainda a alteração na expressão das diferentes subunidades da ferritina de *A. aegypti* sob condições onde se variava a disponibilidade de ferro. Apesar destes trabalhos, ainda resta muito a ser investigado acerca dos papéis da ferritina no metabolismo de ferro em insetos.

IRE/IRP1 é um mecanismo que permite o controle traducional, em resposta ao ferro, da síntese de ferritina em insetos.

A transferrina em vertebrados é uma proteína sérica envolvida com o transporte de ferro (Kaplan, 2002). Apresenta dois lóbulos funcionais cada um com capacidade de ligar um átomo de ferro com alta afinidade. Já em insetos esta proteína apresenta apenas um lóbulo capaz de ligar um átomo de ferro (Bartfeld & Law, 1990). Um único exemplo de transferrina de inseto com dois lóbulos funcionais, ambos com capacidade de ligar ferro, foi descrito em 1993 por Jamroz *et al.* em estudos com a barata *Blaberus discoidalis*. Assim como acontece com a ferritina, os papéis da transferrina no metabolismo de ferro em insetos também não estão completamente elucidados. Alguns estudos já mostraram que esta proteína sofre um aumento de sua expressão quando células de mosquito *A. aegypti* são desafiadas com bactérias, sendo então consideradas como proteína de fase aguda na infecção (Yoshiga *et al.*, 1997). O que se discute neste trabalho é que os níveis de transferrina aumentados durante uma infecção, limitariam a disponibilidade de ferro, privando um organismo invasor deste elemento. O fato de a maior parte das transferrinas de insetos não apresentarem um dos lóbulos funcionais capaz de ligar ferro, mais especificamente falando o lóbulo carboxi-terminal, coloca estas transferrinas num cenário interessante. A maior parte dos patógenos com capacidade de seqüestrar transferrina, o faz através de um processo de captura mediado por receptores que ligam o lóbulo carboxi-terminal destas proteínas. Na ausência deste lóbulo, as transferrinas de insetos estariam adaptadas para um mecanismo de escape, mantendo o ferro ligado ao seu único lóbulo funcional (na porção amino-terminal) e tornando-o indisponível para os patógenos (Yoshida *et al.*, 1997). Poucos são os dados correlacionando a transferrina com o metabolismo de ferro em insetos. Heubers *et al.* (1988) demonstraram que quando transferrina marcada com ferro radioativo foi injetada na hemolinfa de *M. sexta*, o ferro rapidamente deixou a hemolinfa e pôde ser encontrado na carcaça e no corpo gorduroso. Após 24 horas este ferro reapareceu na hemolinfa associado à ferritina. Estes dados sugerem que a transferrina pode entregar ferro para tecidos. No entanto, ainda não se conhecem receptores para transferrina em insetos. Nem mesmo no genoma de *Drosophila melanogaster* foi evidenciada qualquer seqüência homóloga a receptores de transferrina de vertebrados (Adams *et al.*, 2000). É possível que o mecanismo de captação de ferro transportado pela transferrina nos tecidos de insetos seja mediado por uma classe diferente de receptores, ou que o ferro seja captado por um mecanismo de transporte diferente (Nichol *et al.*, 2002).

1.5 - Justificativa do trabalho

No presente trabalho nós estudamos o metabolismo de heme-ferro em insetos. Inicialmente nossos estudos se concentraram no *Rhodnius prolixus* como modelo experimental. Nossas perguntas surgiram a partir do momento em que identificamos a presença de estruturas contendo heme nas células epiteliais do intestino médio de *R. prolixus*. Iniciamos então um estudo descritivo da presença destas estruturas celulares em alguns momentos do ciclo alimentar do *R. prolixus*. Com a descrição de uma provável heme oxigenase em *Rhodnius prolixus*, tanto nos vasos dorsais quanto no próprio intestino (Cruz-Oliveira *et al.*, 2002), começamos a investigar o papel das estruturas contendo heme no processo de degradação de heme no epitélio intestinal deste inseto com o sentido de contribuirmos com dados que expliquem este mecanismo de defesa. A estas estruturas eletrondensas chamamos de hemoxissomos. O processo de degradação de heme gera como subprodutos biliverdina, CO e ferro livre. Sendo assim, o estudo de proteínas de ligação de ferro se torna algo interessante do ponto de vista fisiológico, pois o inseto deve apresentar formas de lidar com o ferro disponibilizado a partir da degradação de heme. Um outro modelo de estudo usado em nosso trabalho foi a broca da cana-de-açúcar, a *Diatraea saccharalis*, um inseto fitófago. Para este lepidóptera nada se conhece a respeito de proteínas de ligação de ferro e por ser um hemíptera foi escolhido como modelo para comparação com nosso modelo hematófago. A purificação e caracterização de proteínas ligantes e de transporte de ferro da hemolinfa de insetos, assim como o entendimento de seus papéis, podem fornecer dados que ajudem a compreender o metabolismo de ferro nestes modelos.

2 - Objetivos

Neste trabalho temos como objetivos:

- Identificar estruturas envolvidas com o armazenamento de heme nas células epiteliais do intestino médio posterior de *Rhodnius prolixus* e, investigar o papel destas estruturas celulares no metabolismo de heme neste inseto;
- Investigar o papel do retículo endoplasmático no processamento do heme presente em estruturas eletrondensas do intestino médio de *R. prolixus* (hemoxissomos);
- Identificar proteínas de ligação de ferro em *R. prolixus* e *Diatraea saccharalis*;
- Purificar e caracterizar a ferritina da hemolinfa de *D. saccharalis*;

3 - Materiais e métodos

3.1 - Colônia de insetos

A colônia de *Rhodnius prolixus* é mantida em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia, em nosso laboratório a uma temperatura de 28°C, e umidade relativa de aproximadamente 80%. Estes insetos são provenientes de uma colônia mantida pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos, do Departamento de Bioquímica Médica, UFRJ. A colônia de *Diatraea saccharalis* é mantida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Campos dos Goytacazes, em tubos de ensaio tampados com algodão. A temperatura de incubação fica em torno de 28 °C e 60% de umidade relativa com um fotoperíodo natural. As larvas eclodem após 4 a 9 dias. Os insetos usados nos experimentos foram larvas de 4º estágio (com aproximadamente 17 dias de vida).

3.1.1 - Alimentação dos insetos

Os *R. prolixus* são alimentados com uma periodicidade de 20 dias para adultos e 30 dias para os diferentes estádios, com sangue de coelho, diretamente na orelha dos animais imobilizados em caixas de contenção. Em nosso trabalho usamos fêmeas adultas de *R. prolixus* a partir de segunda alimentação. No caso de dietas artificiais, utilizamos um alimentador artificial descrito por Garcia *et al.* (1975). Dietas artificiais, como plasma de coelho, são usadas para alimentar fêmeas adultas com a intenção de livrar o intestino do inseto do heme que fica impregnado no mesmo. As *D. saccharalis* são mantidas em frascos de vidro contendo uma dieta artificial, desde o estágio de ovo até seu estágio de pupa.

A dieta artificial é desenvolvida pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e mantida a temperatura ambiente. Composição do meio artificial: Água destilada (1.558,0 mL), Aureomicina (0,50g), Sais de Wesson (18,0g), Caseína (54,0g), Sacarose (90,0g), Germe de trigo (54,0g), Cloreto de colina (1,8g), Solução vitamínica (18,0 mL), Ácido ascórbico (7,2g), Formaldeído 37,2% (0,9 mL), Metil-p-hidroxibenzoato (2,7g), Bacto-agar (36g).

A solução vitamínica consta das seguintes vitaminas, dissolvidas em 1.000 ml de água destilada: Niacinamida (1 g), Pantotenato de cálcio (1 g), Riboflavina (0,5 g), Tiamina (0,25

g), Piridoxina (0,25g), Ácido fólico (0,1 g), Biotina (0,02g), Vitamina B12 (1000 mg/cc)(2 mL).

O meio artificial depois de pronto é transferido para tubos de ensaio tampados com algodão e previamente esterilizado a 150 °C por 3 horas.

3.1.2 - Coleta de hemolinfa dos insetos

A coleta da hemolinfa em adultos de *R. prolixus* é realizada cortando-se as pontas das patas anteriores deste inseto e efetuando uma leve pressão sobre o abdome do inseto. A hemolinfa é coletada em capilares e rapidamente transferida para tubos eppendorfs contendo alguns cristais de feniltiocarbamida, EDTA 5 mM, e na presença de coquetel de inibidores de protease (SBTI: inibidor de tripsina de soja, leupeptina e antipafan, na concentração final de 0,05 mg/mL e benzamidina 1 mM) . Após a coleta da hemolinfa, esta é centrifugada a 11.000 xg por 10 minutos a 4 °C para eliminação da fração celular. A hemolinfa de larvas de 5 estágio de *D. saccharalis* é coletada através de uma incisão realizada na base da futura perna dianteira do inseto e a hemolinfa é coletada na presença de feniltiocarbamida, e uma solução contendo 5mM de EDTA e uma mistura de inibidores de protease: PMSF e Benzamidina (concentração final dos inibidores 1 mM). Os hemócitos são removidos por centrifugação a 11.000 xg por 10 minutos (Winzerling *et al.*, 1995b).

3.2 – Verificação da passagem de um análogo do heme do lúmen intestinal para a hemocele de *R. prolixus*

Um grupo de *R. prolixus* foi alimentado com plasma de coelho enriquecido com paládio meso-porfirina (Pd-mP) (1 mM) (meso-tetra-(4-trimetilaminofenil) paládio porfirina). O paládio é uma metaloporfirina fluorescente usada neste trabalho como um análogo do heme. Três dias após a alimentação com plasma enriquecido com paládio meso-porfirina, a hemolinfa dos insetos alimentados foi coletada e em seguida submetida a uma análise de emissão de fluorescência no fluorímetro. A 1990 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,15, pH 7,2 foram adicionados 10 µL de hemolinfa. Essa mistura foi levada ao fluorímetro, onde foi excitada com o comprimento de onda de 400 nm. A emissão foi registrada na faixa de 520 nm até 700 nm. Como controles, foram analisadas as hemolinfas de insetos

alimentados em sangue de coelho 3 dias após a alimentação. Analisamos também hemolinfa de insetos alimentados com sangue de coelho e previamente incubada com 5 µL de uma solução de paládio meso-porfirina 5,8 mM dissolvida em NaOH 0,1 N. Também fizemos uma análise somente do paládio meso-porfirina (5 µL da solução 5,8 mM) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,15, pH 7,2 para verificarmos o seu padrão de emissão.

3.3 - Microscopia eletrônica de transmissão

Para a preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os intestinos, ainda com conteúdo luminal, de fêmeas adultas foram dissecados em salina gelada (NaCl 0,15 M a 4 °C). Os intestinos foram removidos em dias subsequentes à alimentação e fixados em glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, paraformaldeído 4% e CaCl₂ 5 mM. O material processado passou por uma etapa de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% durante 30 minutos e lavado em tampão cacodilato 100 mM, pH 7,2. O material foi posteriormente desidratado em séries graduadas de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100% superseca) e logo após sofreu infiltração e polimerização em epon. De todos os materiais foram feitas pirâmides em um aparelho destinado para tal finalidade (ultratrím Reichert), e depois foram extraídos cortes ultrafinos em um ultramicrotomo Reichert Ultracuts. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. Após a contrastação o material foi analisado ao microscópio eletrônico Omega 900 da Zeiss operado em 80 kV. O epitélio intestinal de *Rhodnius* também foi processado para espectroscopia de perda de energia de elétrons e para a confecção de imagens espectroscópicas de elementos. O material foi processado como descrito acima, porém omitindo-se as etapas de pós-fixação em tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio, assim como a etapa de contrastação. Cortes ultrafinos deste material foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Omega 912 da Zeiss acoplado a um sistema de análise de imagens (SIS GmbH, Alemanha). O microscópio foi operado em 80 kV com uma abertura de objetiva de 90 µm e uma abertura de seleção de energia de aproximadamente 20 eV. Os mapas de distribuição do oxigênio e ferro foram calculados usando o método com três janelas (Reimer, 1991). Duas janelas de energia abaixo (Fe: 690 eV, 675 eV; O: 525 eV, 510 eV) e uma acima (Fe: 718 eV; O: 545 eV) de cada elemento foram utilizadas. Para a realização dos espectros de perda de energia de elétrons, o

microscópio foi operado da mesma maneira, mas com uma objetiva de 30 μm e uma abertura de seleção de energia de 2 eV, aproximadamente. As intensidades das perdas de energias foram registradas serialmente em intervalos de 2 eV por um fotomultiplicador acoplado a um multímetro digital conectado a um programa de análise de imagem (SIS GmbH, Alemanha).

3.3.1- Localização da atividade peroxidásica

Graham & Karnovsky (citados em Padykula, 1988) introduziram um método para localização ultra-estrutural da atividade peroxidásica enzimática ou química pelo tratamento dos tecidos com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. A diaminobenzidina sob oxidação produz polímeros insolúveis (indamina). Este método, seguido de algumas modificações, foi aplicado para detecção da atividade peroxidásica associada ao anel porfirínico. Os intestinos de insetos foram fixados em glutaraldeído 1%, em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, por 12 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi lavado em tampão cacodilato 100 mM, pH 7,2, e incubado em um meio contendo diaminobenzidina 2,5 mM em tampão cacodilato 100 mM, pH 6,5 durante 60 minutos. Após este período o tecido foi transferido para a mesma solução contendo H_2O_2 0,03%, onde ficou incubado por 60 minutos. Terminada a incubação, o material foi lavado em tampão cacodilato, pH 6,5, e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 100 mM, pH 7,2, e processado para microscopia eletrônica de transmissão.

3.4 - Dosagem de ferro no epitélio intestinal de *R. prolixus*

As dosagens de ferro foram realizadas utilizando-se um kit diagnóstico desenvolvido pelo laboratório Quibasa Química Básica Ltda. Os intestinos de insetos de 1, 3, 5, 7, 13, 16 e 20 dias após a alimentação em sangue de coelho foram dissecados em salina gelada (NaCl 0,15 M). O conteúdo intestinal foi descartado e os epitélios lavados foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador do tipo “potter” em 400 μL de salina gelada. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 5 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens. 200 μL da amostra foram adicionados a 800 μL do tampão redutor (ácido succínico 250 mmol/L, hidroxilamina 140 mmol/L, surfactante e estabilizador) e 20 μL do reagente de cor (ferrozina 12 mmol/L). Os tubos foram incubados em

banho Maria a 37 °C por 10 minutos e as absorvâncias foram determinadas a 560 nm. Foi utilizado um padrão contendo ferro (100 µg/dL).

3.5 – Fracionamento celular do epitélio intestinal de *R. prolixus* em gradiente descontínuo de sacarose para obtenção de retículo endoplasmático

O procedimento de isolamento de retículo endoplasmático foi baseado na metodologia descrita por Graham & Rickwood (1997). Os intestinos de *R. prolixus* (160 intestinos), 4 dias após a alimentação em sangue de coelho, foram dissecados em solução salina (NaCl 0,15 M) gelada. Os seus conteúdos foram eliminados e os epitélios coletados e homogeneizados em “potter” em 2 mL tampão de lise (tris-maleato 37 mM, pH 6,4, sacarose 0,5 M, MgCl₂ 5mM e dextran 1% (p/v)). Após a homogeneização (20 golpes), a amostra foi centrifugada a 6000 xg por 15 minutos para eliminação de células não lisadas, núcleos e mitocôndrias. O sobrenadante foi então aplicado no topo de um gradiente descontínuo de sacarose (44%, 51% e 68% (p/v)), em tampão tris-maleato 37 mM, pH 6,4, sacarose 0,5 M, MgCl₂ 5mM e dextran 1% (p/v). Após centrifugação a 85.000 xg por 90 minutos, as frações foram coletadas do topo para a base com auxílio de uma pipeta. Foram obtidas um total de 5 frações (1 mL).

3.6 - Ensaio da atividade da NADPH citocromo c oxidoreductase

A enzima NADPH citocromo *c* oxidoreductase é uma enzima marcadora de retículo endoplasmático (Harano & Onura, 1977) e foi usada como ferramenta para determinar a presença de retículo endoplasmático do epitélio intestinal de *R. prolixus* nas frações do gradiente descontínuo de sacarose. A atividade foi medida espectrofotometricamente a 550 nm por cinética enzimática em um tempo total de 180 segundos, medindo-se as absorvâncias em intervalos de 5 segundos. A determinação da atividade foi feita com 0,1 mL da solução de NADPH (sorbitol 0,6 M, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,4, 1 mM NADPH) com 0,9 mL da solução de citocromo *c* (sorbitol 0,6 M, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,4 contendo 2,6 mg/100 mL de KCN (cianeto de potássio) e 1 mg/mL de citocromo *c*). O ensaio foi realizado a 30 °C e foram utilizados 30 µL de cada fração para o ensaio.

3.7 – Atividade de liberação de ferro a partir de heme na presença de NADPH

Com a intenção de se verificar a degradação de heme na presença de NADPH, foi preparado um ensaio utilizando-se extratos do epitélio intestinal de *R. prolixus* de 5 dias após a alimentação. Foram utilizados 10 intestinos que foram homogeneizados em 200 µL de solução salina (NaCl 0,15 M) gelada. O ensaio foi baseado na quantificação do ferro liberado após o ensaio. O meio de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, heme 13 µM e NADPH 150 µM. Ao meio de reação foram adicionados 50 µL do extrato de intestinos. A reação se procedeu por 30 minutos a 30°C. Após o ensaio, o meio de reação foi centrifugado a 15000 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de ferro livre como mencionado no item 3.4. No ensaio controle foi omitido o NADPH.

3.8 - Ensaio de degradação de heme nas frações do gradiente de KBr

O ensaio de degradação de heme foi baseado no procedimento descrito por Zhang *et al.* (2004), com poucas modificações. A atividade foi monitorada espectrofotometricamente medindo-se o decaimento da absorvância em 340 nm, o que corresponde ao consumo de NADPH. O meio de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, heme 10 µM, deferoxamina 1 mM, 100 µL de amostra e NADPH 130 µM, adicionados imediatamente antes do início da reação. O tempo de cada ensaio foi de 15 minutos onde as absorvâncias foram registradas a cada 1 minuto. As porções lineares das curvas foram utilizadas para cálculo das atividades. Os deltas de absorvância de cada curva foram extraídos e divididos por 6,22, que é o coeficiente de extinção molar do NADPH a 30 °C. As atividades são expressas em miliunidades de atividade por mL em cada fração.

3.9 - Ultracentrifugação da hemolinfa

O procedimento de ultracentrifugação foi utilizado para a purificação de ferritina segundo Capurro *et al.* (1996). Aproximadamente 3 mL de hemolinfa foram diluídos em tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0, na presença de EDTA 5 mM,

benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, feniltiocarbamida 0,5 mM, contendo KBr 3,7 M. Esta hemolinfa (5 mL) foi adicionada no fundo do tubo de ultracentrífuga e coberta com 5 mL do mesmo tampão acima. Os tubos foram centrifugados a 100.000 xg por 24 horas a 4 °C. As frações do topo foram utilizadas para purificação de lipoforina enquanto a subfase foi dialisada contra água para posteriores procedimentos cromatográficos. O fundo do tubo, onde se depositou um material de cor marrom, bastante denso e de consistência gelatinosa foi dissolvido em tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e utilizado para verificação da presença de ferritina e etapas posteriores de purificação.

3.9.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para análise das proteínas da hemolinfa utilizamos eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Laemmli, 1970) e em condições não desnaturantes (Davis, 1964). Os géis foram corados por azul de Coomassie R ou nitrato de prata. Os géis sem SDS foram corados por ferricianeto de potássio 1% em HCl 0,1 N por 5 minutos para a visualização de ferroproteínas, segundo Capurro *et al.* (1996). As dosagens de proteínas para normalização nos géis foram realizadas segundo Bradford (1976).

3.9.2 – Cromatografia de exclusão molecular em FPLC

Para purificação da ferritina foram utilizados os sedimentos marrons obtidos durante o procedimento de ultracentrifugação descrito acima. Estes sedimentos, ressuspensos em tampão tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, pH 8,4 foram aquecidos por 30 minutos a 75 °C para desnaturação de outras proteínas, uma etapa de pré-seleção de ferritina, uma proteína termo-resistente. Após aquecimento, as amostras foram centrifugadas a 11.000 xg por 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação, os sedimentos existentes foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados nas etapas seguintes. Em seguida, estas amostras foram dialisadas contra o mesmo tampão descrito acima a 4 °C, por um período de trinta horas com quatro trocas pelo menos. Após diálise, as amostras foram reunidas e submetidas a uma cromatografia de gel filtração em uma coluna Superose 6B, equilibrada com tampão tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,4, em FPLC, com um fluxo de 0,2 mL/minuto. O grau de pureza da ferritina foi analisado através de géis de poliacrilamida corados por nitrato de prata e azul de Coomassie.

3.9.3 – Dosagens de ferro nas amostras de ferritina

As dosagens do ferro presente na ferritina foram realizadas utilizando-se o espectrômetro de massa acoplado a fonte de plasma induzido (ICP-MS) (Gallagher *et al.*, 2001). As amostras contendo ferritina foram diluídas 100 vezes em água deionizada. Esta solução foi injetada diretamente no espectrômetro previamente calibrado.

3.9.4 - Focalização isoeletrica

Para focalização isoeletrica da ferritina foi utilizada uma fita de pH imobilizado (Amersham Pharmacia Biotech). A focalização isoeletrica (IEF) e o SDS – PAGE, foram realizados com auxílio do *IPGphor* e do *MULTIphor* (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. Na primeira dimensão, cerca de 20 µg de ferritina foram focalizadas isoeletricamente a 50mA e 20°C, em um gradiente de pH variando de 3 a 10 em condições crescentes de voltagem atingindo aproximadamente 24.000 volts/hora ao final da focalização. Na segunda dimensão, após a focalização, a fita foi colocada sobre um gel de poliacrilamida homogêneo na concentração de 12% na presença de SDS. As condições de separação ocorreram em uma corrida em 20mA. O gel foi revelado com nitrato de prata e posteriormente digitalizado. Foi analisado o ponto isoeletrico das subunidades da proteína com auxílio do software, *Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics Ltd)*.

3.9.5 - Acoplamento de isotiocianato de fluoresceína (FITC) à ferritina de *D. saccharalis*

Cerca de 300 µg da ferritina isolada de *D. saccharalis* foram dialisadas contra tampão bicarbonato-carbonato de sódio 750 mM, pH 9,5. Após a diálise, 7,5 µL de uma solução de FITC (50 µg/ µL, dissolvido em DMSO), foram adicionados a esta amostra e a mistura foi incubada por 1 hora ao abrigo da luz. Após o período de incubação, o complexo ferritina-FITC foi exaustivamente dialisado contra água destilada, e liofilizado. Após liofilização, a proteína marcada foi ressuspensa em 300 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. O complexo foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), em condições

nativas, seguido de observação do complexo em um sistema de captação de imagens com lâmpada ultravioleta, em um Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

3.9.6 - Captação de ferritina de *Diatraea saccharalis* marcada com FITC pelos ovócitos de *Diatraea saccharalis*

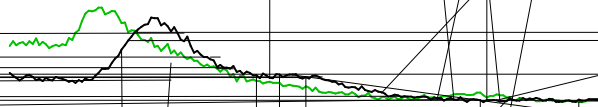
Os experimentos de captação de ferritina marcada com FITC foram realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, cerca de 10 µg de ferritina marcada com FITC foram injetados no abdome de fêmeas adultas com o auxílio de uma seringa Hamilton. Após 6 horas e 30 minutos, os ovários foram dissecados.

4 - Resultados

4.1 – Verificação da passagem de paládio meso-porfirina do lúmen intestinal para a hemocele de *R. prolixus* após alimentação com plasma enriquecido com paládio meso-porfirina

Muitas metaloporfirinas não apresentam fluorescência. No entanto, Lara *et al.* (2003) verificaram que paládio meso-porfirina exibe fluore

heme pode requerer, mesmo que temporariamente, a participação de estruturas celulares capazes de seqüestrar esta molécula. No intuito de verificar a existência de estruturas candidatas a esta função, foi iniciada uma análise do epitélio intestinal de *R. prolixus* utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. Na figura 8A pode ser observada a presença de estruturas eletrondensas no citoplasma das células epiteliais do intestino médio posterior de *R. prolixus*, 4 dias após a alimentação sanguínea. Associado a estas estruturas pode-se observar a existência de retículo endoplasmático. Estas estruturas celulares se apresentam envoltas por membranas, como pode-se observar na figura 8B. Quando as estruturas eletrondensas foram submetidas a uma análise utilizando a espectroscopia de perda de energia de elétrons, é possível observar que estas apresentam ferro em seu interior (figura 9D). As figuras 9B e 9C mostram a co-localização de ferro e oxigênio na mesma estrutura.



4.2.1 - Detecção de heme nas células epiteliais do intestino médio de *R. prolixus*

Ao verificarmos a presença de ferro nas estruturas eletrondensas encontradas nas células do epitélio do intestino médio posterior de *R. prolixus*, o próximo passo foi averiguar se este ferro estava associado ao grupamento heme. Utilizando a diaminobenzidina, detectamos a atividade peroxidásica associada ao anel porfirínico (heme) nas mesmas estruturas. A figura 10A mostra a marcação positiva em estruturas presentes nas células epiteliais do intestino médio posterior de *R. prolixus*, 5 dias após a alimentação com sangue de coelho. Este resultado sugere que pelo menos parte do ferro presente nestas estruturas está associada ao anel porfirínico. Também podemos observar na figura 10B, que estruturas eletrondensas, presentes nas células epiteliais do intestino médio posterior de insetos de 16 dias após a alimentação, também apresentam atividade peroxidásica, indicando a presença de heme nas mesmas. Nas figuras 10C e 10D estão representados os controles referentes às figuras 10A e 10B respectivamente, onde foram omitidas as incubações com diaminobenzidina e não mostram os precipitados eletrondensos característicos da reação do heme com a diaminobenzidina.

Na análise das células epiteliais do intestino médio de insetos em períodos mais avançados do ciclo alimentar foi verificada uma alteração no aspecto destas estruturas eletrondensas. A figura 11A mostra o aspecto menos compacto de estruturas eletrondensas ao lado de outras com aspecto mais compacto, nas células

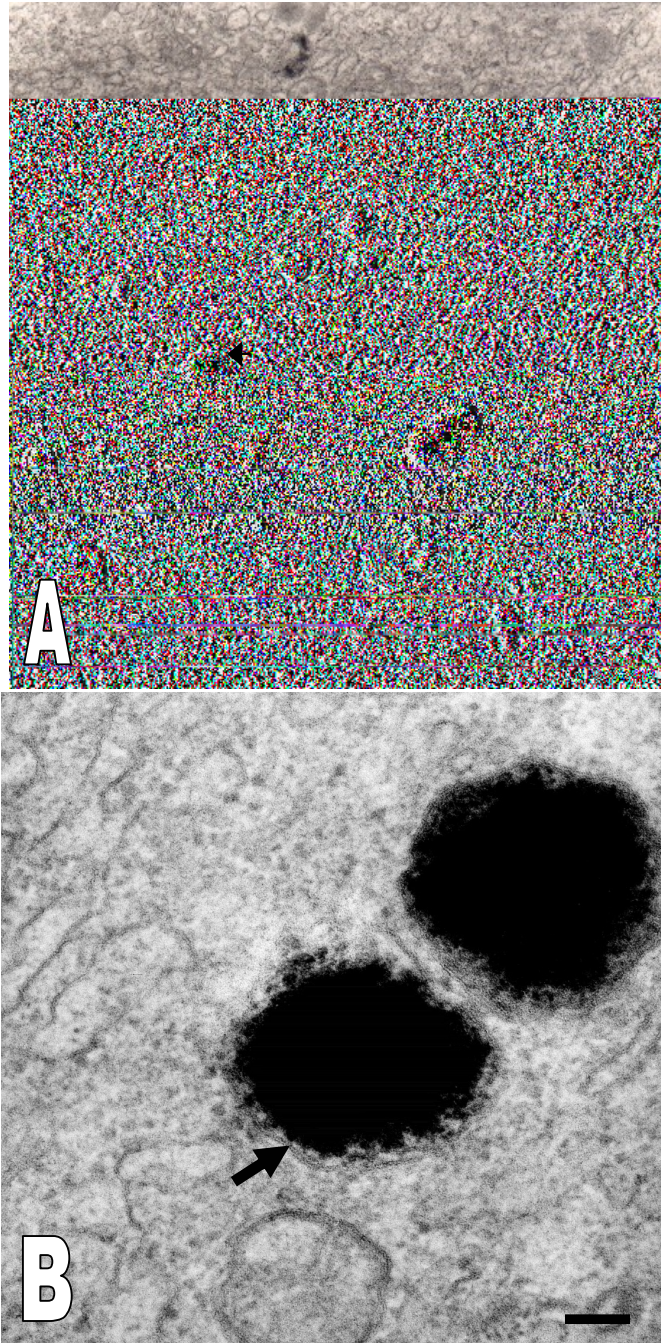


Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando o aspecto das estruturas eletron-densas nas células do epitélio intestinal de *R. prolixus*, 4 dias após a alimentação. Em A temos uma imagem em menor aumento mostrando a distribuição das estruturas. Ao redor das estruturas pode-se perceber a existência de retículo endoplasmático (▶). Barra 0,6 μ . Em B temos uma imagem em maior aumento, onde podemos verificar a presença de membranas ao redor desta estrutura (➡). Barra: 0,09 μ .

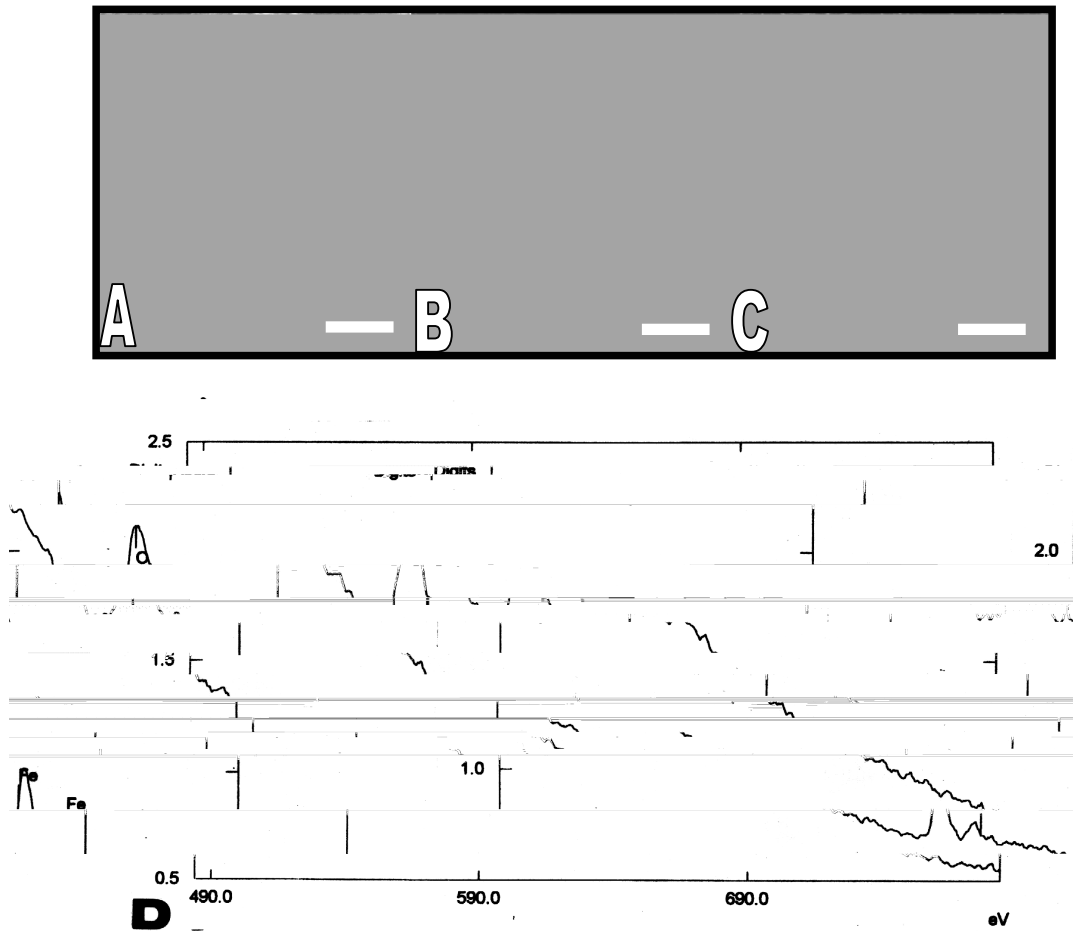


Figura 9 – Análise elementar das estruturas eletrondensas das células do epitélio intestinal de *R. prolixus* através da imagem espectroscópica de elétrons (B e C) e espectroscopia de perda de energia de elétrons (D). Em A, temos uma estrutura eletrondensa de uma célula epitelial do intestino médio posterior de insetos de 5 dias após a alimentação observado através do microscópio eletrônico de transmissão. Em B, imagem espectroscópica mostrando a presença de ferro na estrutura. Em C, imagem espectroscópica mostrando a presença de oxigênio. Em D, espectro de perda de energia de elétrons da estrutura mostrada na figura 9A, confirmando a presença de ferro e oxigênio. O material foi processado para microscopia eletrônica de transmissão sem qualquer etapa de pós-fixação e contrastação. Barra 0,09 μm .

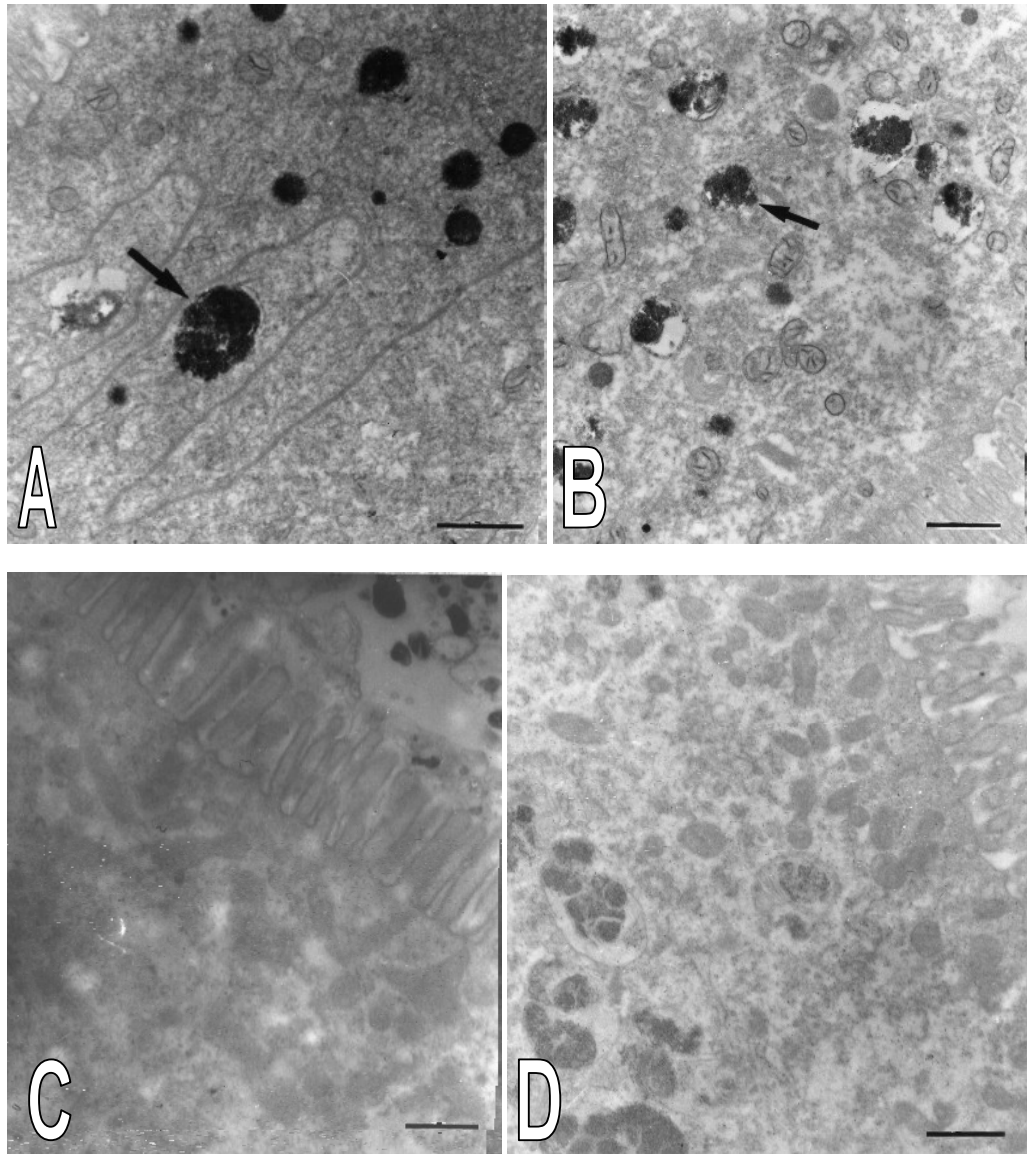


Figura 10 - Célula epitelial do intestino de *R. prolixus* mostrando atividade peroxidásica associada ao heme. (A), Célula epitelial, 5 dias após a alimentação em sangue de coelho. Note a marcação no interior das estruturas (→) referente à precipitação de indamina. (B), Célula epitelial, 16 dias após a alimentação mostrando a marcação no interior das estruturas (→). Em C e D estão os respectivos controles de A e B, onde foi omitida a diaminobenzidina, logo não apresentando a precipitação de indamina. Barras 0,7 μ m.

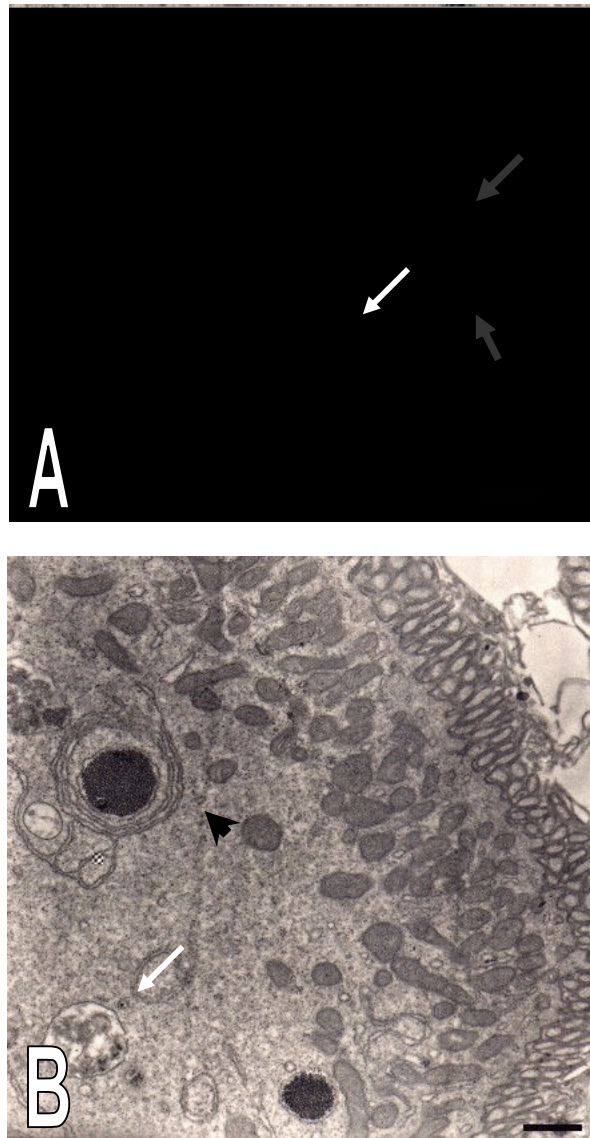


Figura 11 - Células epiteliais do intestino de *R. prolixus* mostrando o aspecto das estruturas eletrondensas em insetos de 18 dias após a alimentação em sangue de coelho (→) (A). Barra 0,7 μm . Note a presença de estruturas com aspecto mais compacto próximas a estruturas com aspecto menos compacto. Em B está uma célula epitelial do intestino de insetos alimentados com plasma de coelho, mostrando estruturas eletrondensas envoltas por reticulo endoplasmático rugoso (➤). Barra 0,6 μm . Note a presença de uma estrutura com aspecto menos compacto (→), similar às presentes nas células mostradas em A.

4.3 – Dosagens de ferro no epitélio do intestino médio posterior de *R. prolixus*

As concentrações de ferro livre no intestino médio posterior de *R. prolixus* foram medidas 1, 3, 5, 7, 13, 16 e 20 dias após a alimentação dos animais com sangue de coelho. Foi verificada uma pequena variação nas concentrações de ferro nos dias iniciais do processo digestivo (figura 12). No entanto, uma elevação significativa dos níveis de ferro foi observada principalmente nos dias 13, 16 e 20 após a alimentação, mostrando que estes aumentos nos níveis de ferro ocorrem em momentos mais avançados do ciclo alimentar. Estas diferenças nos níveis de ferro, quando comparamos os dias 13, 16 e 20 após a alimentação com os demais, foram estatisticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$, seguida de comparação entre médias utilizando o teste Student-Newman-Keul).

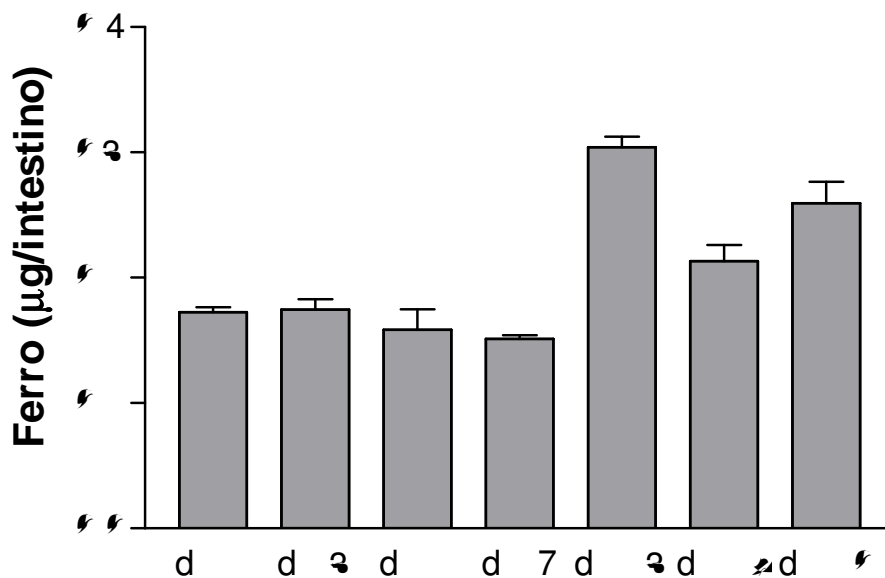


Figura 12 – Detecção de ferro no epitélio intestinal de *R. prolixus* (porção posterior), nos dias após a alimentação com sangue de coelho. As barras representam as médias e os desvios de três experimentos. Cada experimento foi realizado com 3 amostras diferentes para cada ponto. Os níveis de ferro nos dias 13, 16 e 20 são estatisticamente diferentes daqueles registrados nos demais dias (ANOVA, $p < 0,05$, Student-Newman-Keul, $n=6$).

4.4 - Detecção da atividade de degradação de heme em frações enriquecidas com retículo endoplasmático do epitélio intestinal de *R. prolixus*

A atividade de degradação de heme foi avaliada primeiramente em extratos totais de epitélios intestinais de *R. prolixus* de 5 dias após a alimentação sanguínea, através da medida da produção de ferro nessas amostras. Como pode ser visualizada na figura 13, a produção de ferro livre é mais elevada na presença de NADPH, indicando que ocorre consumo de NADPH, o que sugere um sistema de processamento de heme. As médias são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, t-test).

Diante das observações feitas na figura 13 e nas eletromicrografias do epitélio intestinal de *R. prolixus* em diferentes dias após a alimentação, onde foram observadas estruturas eletrondensas com retículo endoplasmático ao seu redor, o extrato total do epitélio intestinal de insetos de 4 dias após a alimentação em sangue de coelho foi submetido a um fracionamento celular, para o isolamento da fração enriquecida com retículo endoplasmático.

As frações obtidas num gradiente descontínuo de sacarose foram testadas primeiramente para identificação das frações

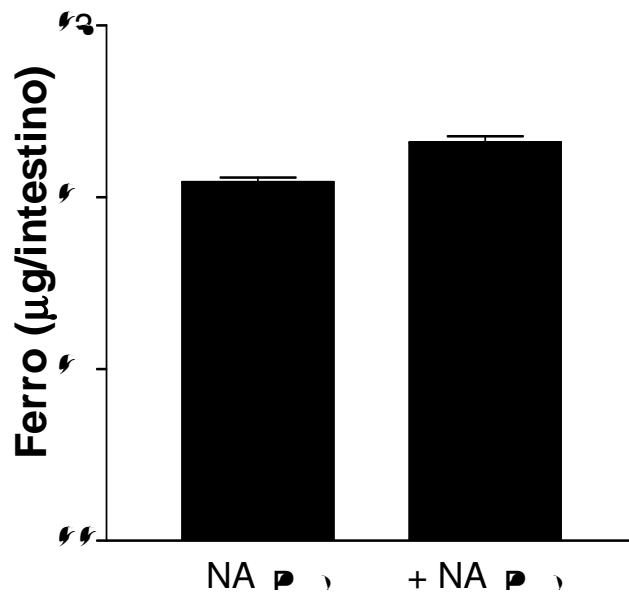


Figura 13 – Produção de ferro livre a partir de hemina utilizando-se extrato de intestino de *R. prolixus* de 5 dias após a alimentação. O ensaio foi baseado na quantificação de ferro liberado no intervalo de 30 minutos na temperatura de 30 °C. Na coluna da esquerda o meio de incubação contém tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4 e hemina 16 µM. Na coluna da direita representa o mesmo meio de reação agora contendo NADPH 150 µM. As barras indicam as médias e os desvios correspondentes a seis repetição com três amostras diferentes. As médias são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, t-test, $n = 6$).

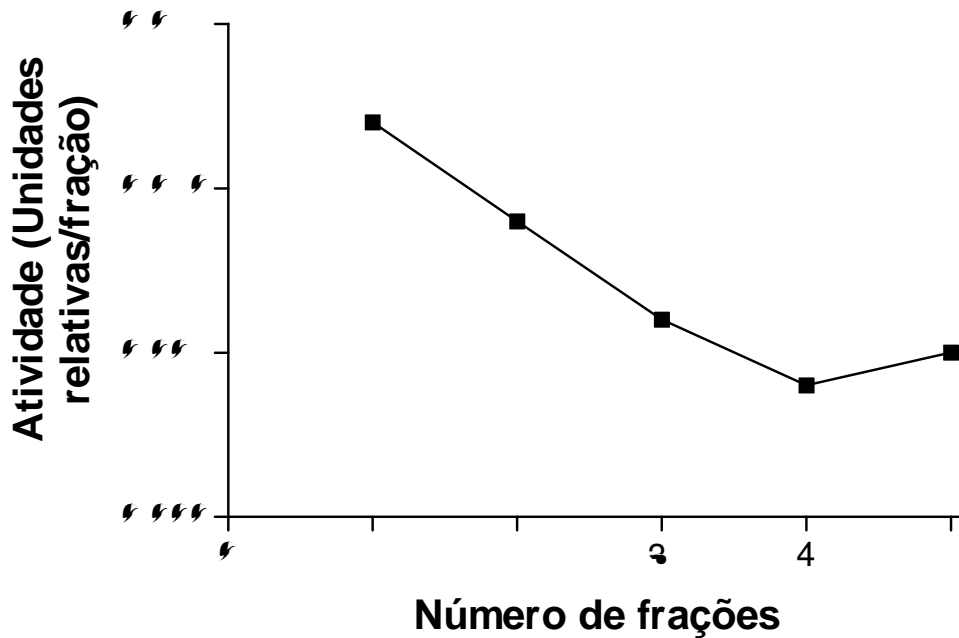


Figura 14 – Localização da fração de retículo endoplasmático nas frações celulares obtidas por ultracentrifugação do epitélio intestinal de *R. prolixus*, através da atividade da citocromo c oxidoreductase. O ensaio foi baseado na oxidação do citocromo c e foi medida espectrofotometricamente a 550 nm. Os pontos representam médias de dois experimentos cada um com dois conjuntos de frações do gradiente.

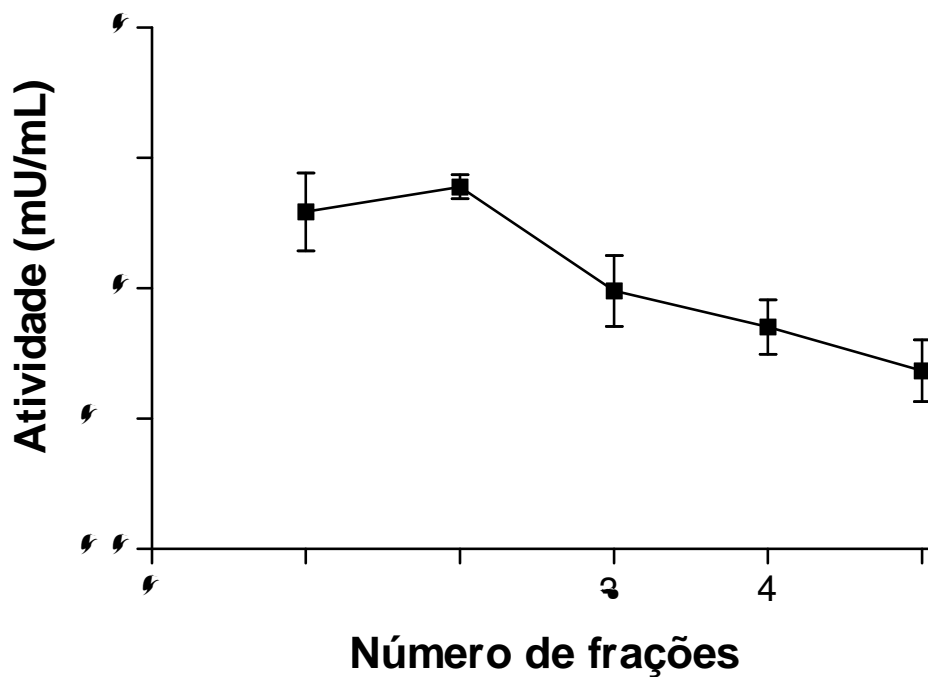


Figura 15 – Ensaio de degradação de heme nas diferentes frações do gradiente. O ensaio foi baseado no consumo de NADPH na presença de hemina. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, hemina 10 μ M, deferoxamina 1 mM, 100 μ L de amostra e NADPH 130 μ M, adicionados logo antes do início da reação. O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro Specord M500 (Shimadzu) a 30 °C em um intervalo de 15 minutos, registrando-se as absorvâncias a 340 nm a cada 1 minuto. As frações 1 e 2 são estatisticamente diferentes das frações 4 e 5 (ANOVA, $p < 0,05$, Student-Newman-Keul, $n=6$).

4.5 - Detecção de proteína de ligação de ferro na hemolinfa de *R. prolixus* e *D. saccharalis*

Os resultados referentes à presença de uma atividade de degradação de heme e à presença de ferro no epitélio intestinal de *R. prolixus*, levam necessariamente a questões referentes ao transporte e metabolismo de ferro nesse inseto. Para tanto foi iniciado um trabalho de identificação de possíveis proteínas de ligação de ferro na hemolinfa desse inseto. A hemolinfa de *R. prolixus* foi então submetida aos processos de ultracentrifugação em gradiente de densidade em KBr, utilizando-se hemolinfa de insetos de 5 dias após a alimentação com sangue de coelho. A hemolinfa foi centrifugada a 100.000 xg durante 16 horas. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Quando foram alterados o tempo de centrifugação e a velocidade de centrifugação, utilizando agora 142.000 xg por 20 horas, foi possível observar, no fundo do tubo, um pequeno sedimento marron. Este sedimento foi coletado e, após ser ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, foi aplicado em gel de poliacrilamida (7-22%) na ausência de SDS. Todo o sedimento encontrado no fundo do tubo que continha hemolinfa de aproximadamente 170 *Rhodnius* foi usada para aplicação no gel. O gel foi submetido a uma etapa de coloração com ferricianeto de potássio 1% em HCl 0,1 N, e uma única banda corada com baixa mobilidade no gel foi observada (figura 16A). O mesmo procedimento foi realizado com a hemolinfa de um animal fitófago, *D. saccharalis*, o que gerou um excelente rendimento com a formação de um pronunciado sedimento marron no fundo do tubo. Quando este sedimento foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio e submetido à eletroforese, nas mesmas condições descritas para *R. prolixus*, foi detectada uma banda em uma região similar à observada em *R. prolixus*, (figura 16A). Como pode ser visto na figura 16B, as amostras ainda não estão totalmente purificadas, mas o intuito do experimento foi apenas a visualização de proteínas que pudessem conter ferro associado às mesmas.

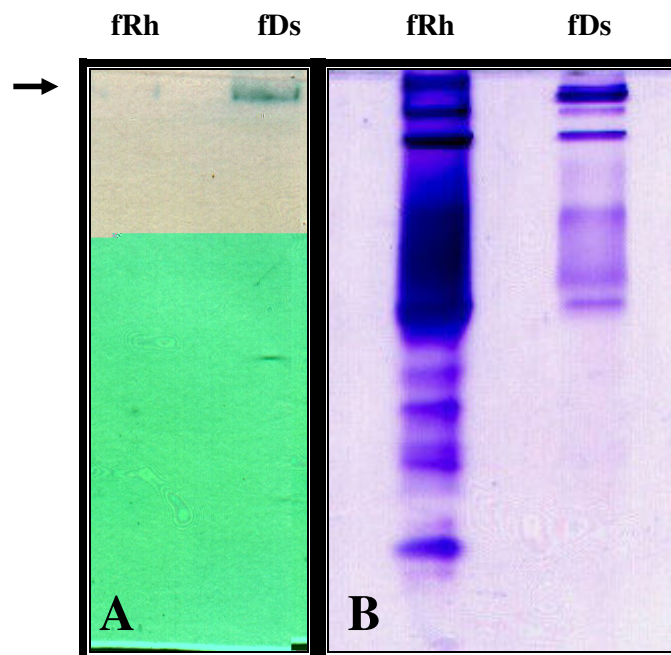


Figura 16 – (A) Gel de poliacrilamida nativo (7-22%) das amostras do fundo do tubo após ultracentrifugação da hemolinfa de *R. prolixus* (fRh) e de *D. saccharalis* (fDs). Os sedimentos foram ressuspensos em 200 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Aproximadamente 50 μ L de cada amostra foram aplicados em cada raia, sem levar em consideração a quantidade de proteínas totais. Nos 50 μ L da amostra de *Rhodnius* estava todo o sedimento depositado no fundo do tubo correspondente após a centrifugação de 5 mL de hemolinfa. Após eletroforese o gel foi corado para ferroproteínas como em materiais e métodos. A seta indica a posição da proteína corada. (B) O mesmo gel mostrado em A, corado por azul de Coomassie.

4.5.1 - Caracterização da proteína de ligação de ferro da hemolinfa de *D. saccharalis*

Após detecção das ferroproteínas nas hemolinfas de *R. prolixus* e *D. saccharalis*, a próxima etapa foi a caracterização desta proteína. A proteína da hemolinfa de *D. saccharalis* foi a proteína utilizada já que a proteína da hemolinfa de *R. prolixus* se encontrava em quantidades muito baixas para os estudos de isolamento e caracterização. Usando então a proteína encontrada na hemolinfa de *D. saccharalis*, iniciamos os estudos de caracterização explorando uma característica intrínseca de proteínas de ligação de ferro tipo ferritina. A proteína (proveniente do sedimento após a ultracentrifugação) foi aplicada em um gel nativo e, após a corrida eletroforética, a banda correspondente à proteína, que durante o procedimento eletroforético migrou como uma banda com coloração marron, foi retirada do gel e submetida a um procedimento de tratamento térmico. Aquecemos a proteína extraída do gel durante 30 minutos a 75 °C. Após o tratamento térmico, a proteína foi novamente submetida a eletroforese em condições nativas. A figura 17 mostra que a proteína apresenta o mesmo padrão de migração que aquele apresentado anteriormente. Após coloração com ferricianeto de potássio 1% em HCl 0,1 N a presença de ferro foi ainda observada associada à proteína, mostrando que esta apresenta resistência a altas temperaturas. Após tratamento térmico a proteína foi submetida à eletroforese em condições desnaturante e redutora. Nessa nova situação a presença de duas subunidades majoritárias foi observada (figura 17C). Estas duas subunidades majoritárias foram submetidas ao sequenciamento automático parcial por degradação de Edman. Foram obtidos 19 resíduos de aminoácidos para cada subunidade e, quando comparadas estas seqüências com as já conhecidas para outros insetos, foi observada uma similaridade alta destas com as de outras ferritinas já descritas (figura 18A e 18B). Com as seqüências, foi possível confirmar que de fato esta proteína é uma ferritina.

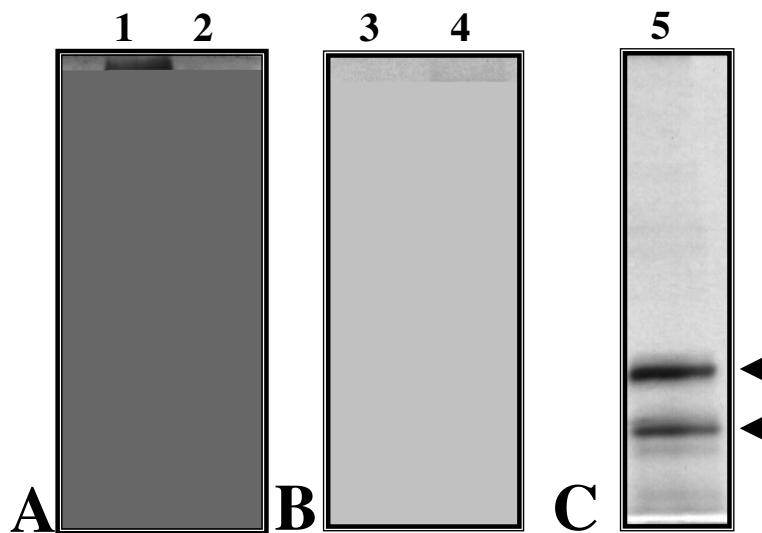


Figura 17 – Gel de poliacrilamida da ferritina isolada da hemolinfa de *D. saccharalis*. A: Gel nativo (7%) com a proteína extraída de um gel nativo e previamente tratada com calor, corado com azul de Coomassie. 1 – hemolinfa total; 2 – ferritina extraída do gel e submetida ao tratamento térmico a 75°C por 30 minutos. B: O mesmo gel mostrado em A, agora corado com ferricianeto de potássio 1% em HCl 0,1 N. 3 – hemolinfa total; 4 – ferritina, como em A, raia 2. C: Gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS corado por prata. Neste gel a ferritina foi extraída do gel nativo e submetida ao tratamento térmico como em B. 5 – ferritina como em A e B.

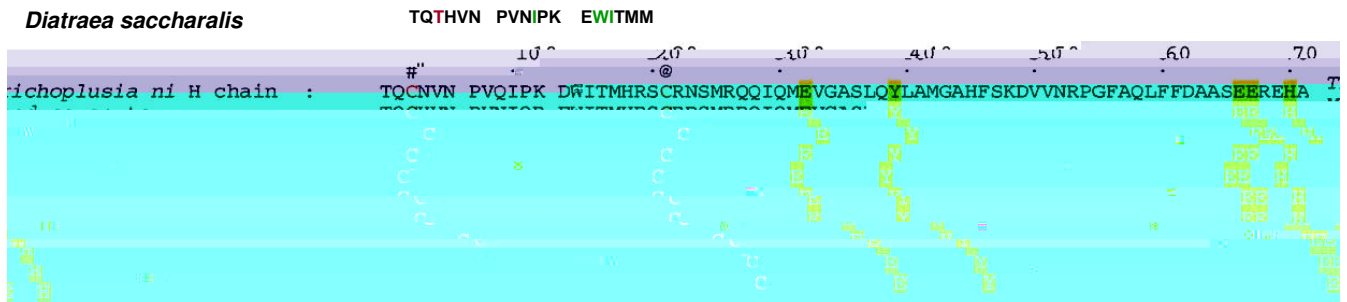


Figura 18A – Alinhamento de seqüência da subunidade de aproximadamente 32 kDa da ferritina de *D. saccharalis* com as subunidades da ferritina de *Trichoplusia ni* e de outros insetos.

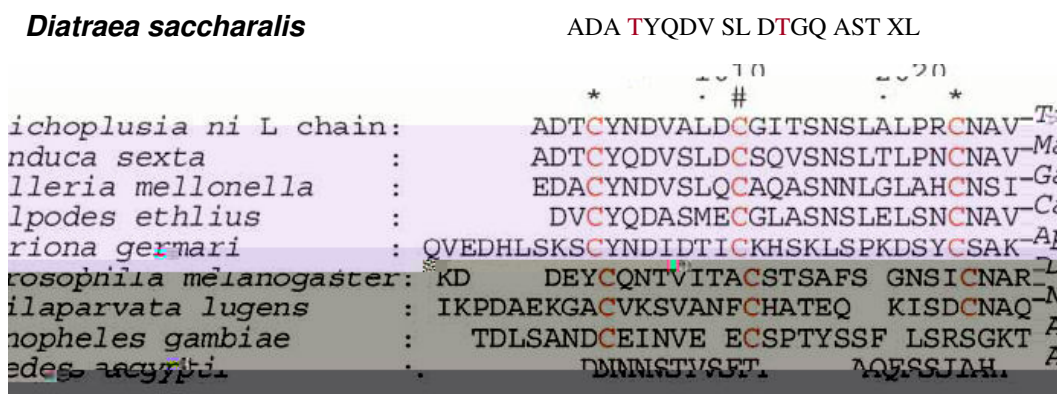


Figura 18B – Alinhamento de seqüência da subunidade de aproximadamente 26 kDa da ferritina de *D. saccharalis* com as subunidades da ferritina de *Trichoplusia ni* e de outros insetos.

4.5.2 - Purificação da ferritina de *D. saccharalis*

Após ultracentrifugação da hemolinfa de *D. saccharalis* em gradiente de KBR, o sedimento marron no fundo do tubo foi ressuspensão em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,4, aquecido a 75 °C por 30 minutos e dialisado contra o mesmo tampão. Esta amostra foi em seguida submetida à cromatografia de gel filtração em uma Superose 6B. A ferritina purificada foi obtida em um volume de retenção de 14 mL (figura 19). O gel de poli(acrilamida) (12%) em condições desnaturante e redutora revelou a presença das subunidades características da ferritina, mostrando que a ferritina se encontra em um grau satisfatório de purificação, como pode ser visto na figura 20.

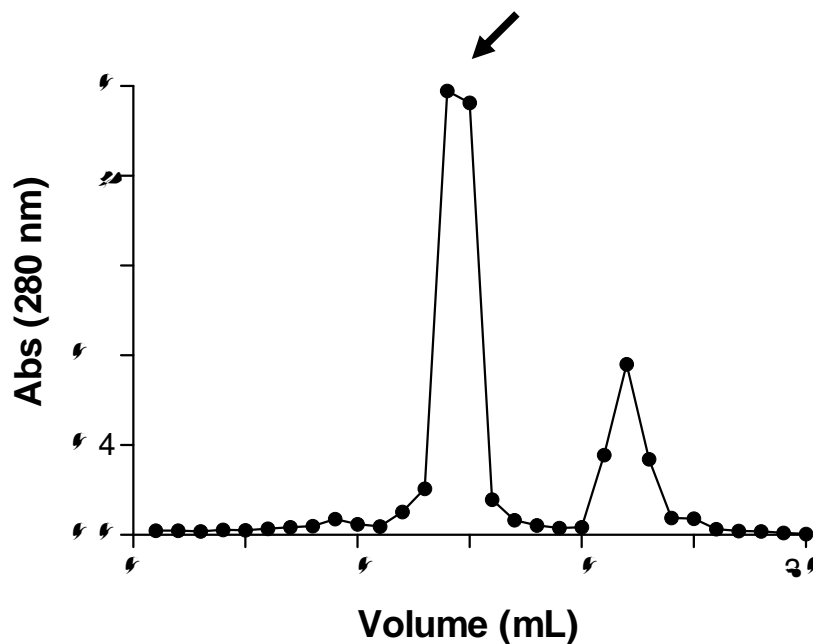


Figura 19 – Isolamento da ferritina através de cromatografia de gel filtração em Superose 6B (FPLC) após ultracentrifugação e tratamento térmico. A coluna foi eluída com tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 e o fluxo foi de 0,2 mL/minuto. A seta indica onde está sendo eluída a ferritina.

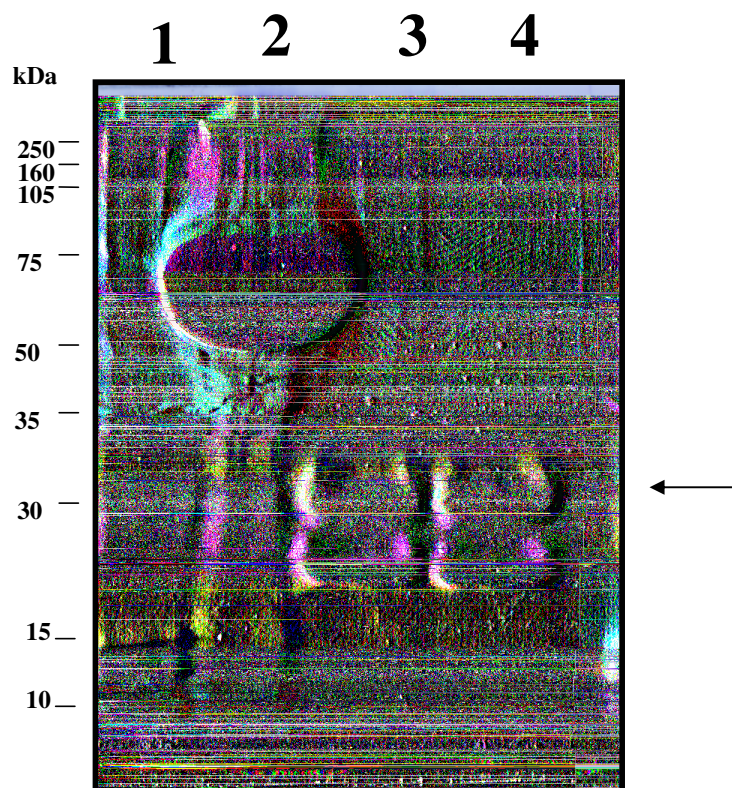


Figura 20 – Gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS da ferritina isolada da hemolinfa de *D. saccharalis*. 1 – Padrão de peso molecular; 2 – hemolinfa total; 3 – fração obtida do fundo do tubo após ultracentrifugação e aquecimento a 75°C por 30 minutos, seguida de centrifugação; 4 – Ferritina purificada a partir da hemolinfa de *D. saccharalis*, eluída da Superose 6. Em cada raia há o correspondente a 30 µg de proteína.

4.5.3 – Dosagem de ferro na ferritina purificada

Com a proteína purificada foi realizada a quantificação de ferro associado à molécula utilizando o espectrômetro de massa acoplado a fonte de plasma induzido (ICP-MS). Pudemos verificar que a ferritina de *D. saccharalis* carrega uma massa apreciável de ferro, onde a razão ferro/proteína alcança 0,296 (tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação de ferro na ferritina purificada. A massa de ferro é mostrada por massa de proteína. Os dados são representados como média e desvio padrão para 3 quantificações.

Ferritina ($\mu\text{g/mL}$)	Ferro ($\mu\text{g/mL}$)	Razão Ferro/Ferritina
777,43 \pm 22,02	230,51 \pm 15,88	0,296

4.5.4 - Focalização isoeletrica das subunidades da ferritina de *D. saccharalis*

Depois de chegarmos à homogeneidade da proteína, a proteína foi submetida a uma eletroforese bidimensional para determinação do ponto isoeletrico das subunidades da ferritina. O resultado mostrou que a ferritina estava homogênea pelos critérios analisados e os pontos isoeletricos das bandas observadas foram 6,44, 6,66 e 6,81 (figura 21). Foi observada ainda a presença de uma banda protéica na altura das subunidades de maior peso molecular da ferritina. Provavelmente isto se trata de uma isoforma da proteína ou subunidades que sejam expressas em menor quantidade.

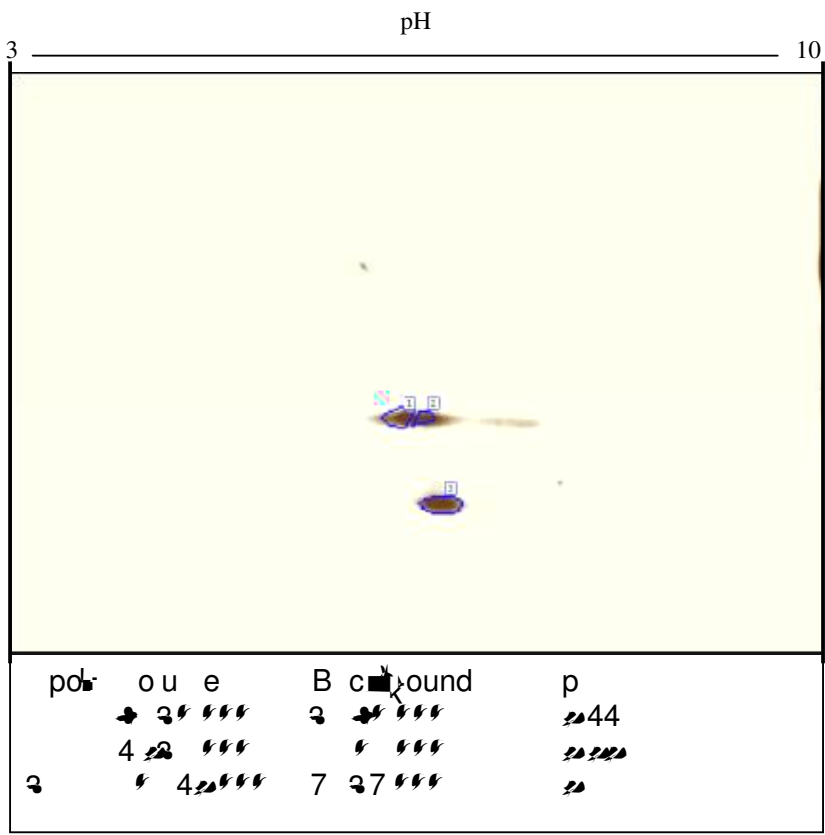


Figura 21 – Eletroforese bidimensional da ferritina de *D. saccharalis*. A faixa de pH foi de 3 a 10 (da esquerda para a direita). Os pontos estão numerados como 1, 2 e 3. O ponto de número 2 corresponde a uma banda que aparece discretamente na SDS-PAGE, da figura 20. Na caixa estão os respectivos valores de pI para cada spot.

4.6 - Incorporação de ferritina marcada com FITC por ovócitos de *D. saccharalis*

Após a purificação da proteína os esforços foram direcionados para o endereçamento da proteína na *D. saccharalis*. A proteína marcada com FITC foi injetada na hemocele do inseto. Após 6 horas e 30 minutos desde a injeção, os ovários destes insetos foram dissecados e lavados exaustivamente em solução salina (NaCl 0,15 M) gelada. Após lavagem, os ovócitos foram analisados por microscopia de fluorescência. A análise revelou a presença de ferritina marcada com FITC (ferritina-FITC) no interior dos ovócitos de *D. saccharalis* (figura 22). A ferritina-FITC foi então incubada com ovócitos utilizando-se como meio de incubação a própria hemolinfa do inseto. Após 5 minutos os ovócitos foram observados por microscopia de fluorescência. A figura 23 mostra que a proteína está inicialmente localizada periféricamente nos ovócitos.

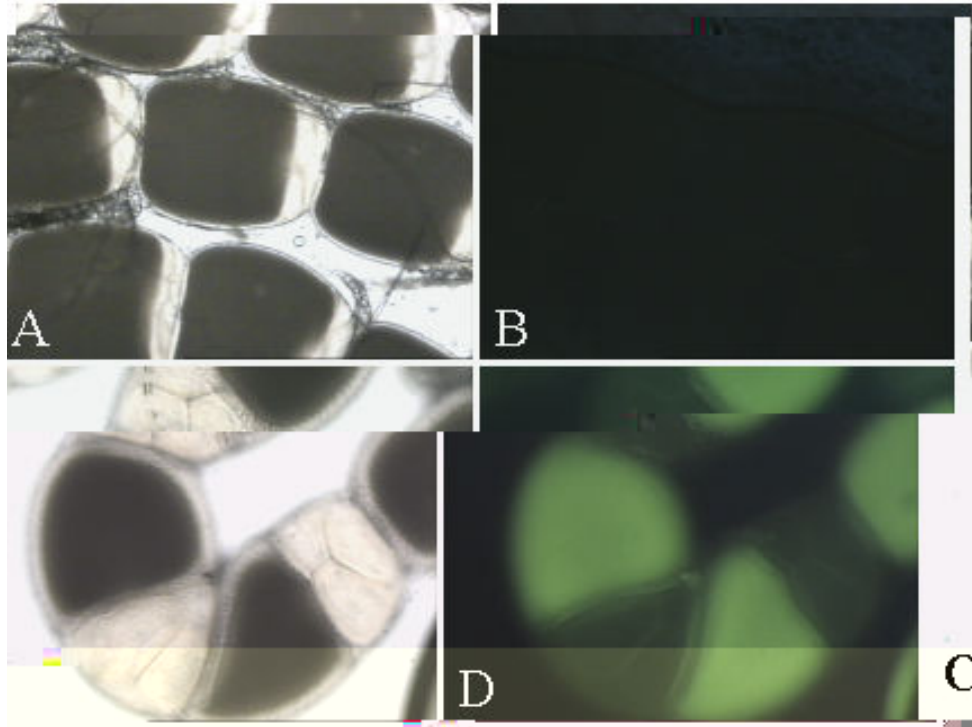


Figura 22 – Incorporação de ferritina pelos ovócitos de *D. saccharalis*. Fêmeas adultas foram injetadas com 10 μg de ferritina marcada com FITC e 6 horas e 30 minutos após a injeção seus ovários foram dissecados, lavados em PBS e observados no microscópio de fluorescência. A e B ovócitos controle, visto sob contraste interferencial (DIC) e fluorescência respectivamente; C e D, ovócitos de insetos injetados. DIC e fluorescência, respectivamente.

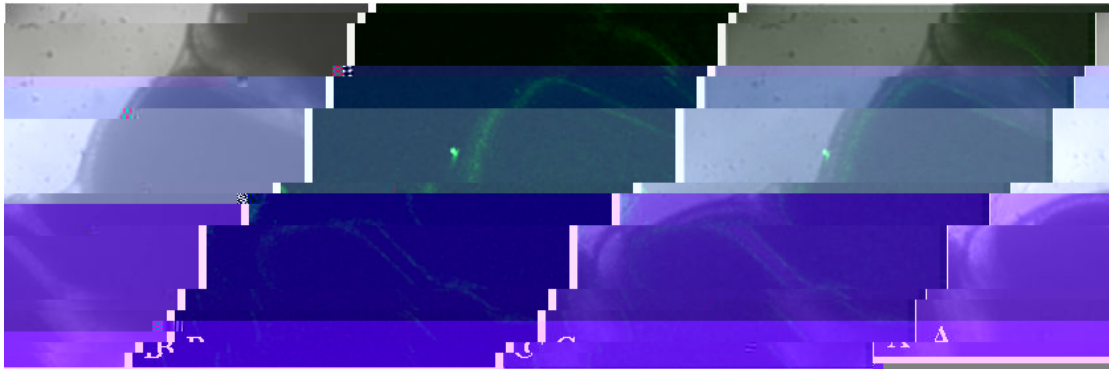


Figura 23 – Incorporação de ferritina marcada com FITC no tempo de 5 minutos após incubação *in vitro*. Os ovários de fêmeas adultas foram dissecados e incubados em hemolinfa fresca contendo ferritina marcada com FITC (10 μ g/300 μ L). Após 5 minutos os ovários foram lavados com PBS e observados no microscópio confocal a laser. A, DIC; B, fluorescência nos ovócitos marcados; C, sobreposição das imagens de A e B, mostrando a localização periférica da ferritina. No controle, incubado com ferritina sem FITC, assim como na microscopia de fluorescência, não houve a detecção de fluorescência na região especificada.

5 - Discussão

O *Rhodnius prolixus* se caracteriza pela ingestão de grandes quantidades de sangue em cada sessão alimentar. A ingestão desta grande quantidade de sangue resolveria um problema imediato de não precisar se expor por tantas vezes

Eles também mostram que a elevação da emissão em 545 nm ocorre na presença de lipídeos, ou de qualquer composto que diminua a participação da água na interação. Em nossos experimentos, verificamos aumentos na emissão nos comprimentos de onda citados, o que nos sugere a associação deste análogo do heme com proteínas e lipídeos. A associação com proteínas corrobora com os dados obtidos por Dansa-Petretski *et al.* (1995), citados anteriormente. Uma outra informação obtida com o experimento foi o aparecimento de um pico de emissão em torno de 630 nm. Ainda não temos explicação para este dado, mas pode sugerir uma forma adicional de associação do análogo do heme com componentes da hemolinfa de *R. prolixus*.

Sabendo que o heme atravessa o epitélio intestinal de *R. prolixus*, é possível se imaginar estruturas celulares que pudessem estocar o heme durante o momento em que este estiver atravessando as células epiteliais. Sendo assim, foi verificada a presença de estruturas que fossem candidatas ao papel de estoque de heme nas células epiteliais do intestino médio posterior. Essas células em insetos de 4 dias após a alimentação em sangue de coelho foram observadas através da microscopia eletrônica de transmissão, e a presença de numerosas estruturas eletrondensas foi observada. Estas estruturas são envoltas por membrana e se encontram distribuídas homoganeamente na célula epitelial. Quando foram analisados epitélios intestinais de insetos de 5 dias após a alimentação sem qualquer etapa de pós-fixação e contrastação, foi verificada ainda a presença de material eletrondenso no interior de estruturas como as citadas acima. A espectroscopia de perda de energia de elétrons e as imagens espectroscópicas revelaram a presença de ferro e oxigênio no interior destas estruturas, como pode ser visto na figura 9. Utilizando a diaminobenzidina, detectamos atividade peroxidásica associada ao anel porfirínico nas estruturas eletrondensas nas células epiteliais de insetos de 5 dias após a alimentação. Estes dados sugerem que o heme que atravessa as células do epitélio intestinal, no início do processo digestivo, é estocado em estruturas envoltas por membranas. Estruturas similares a estas foram descritas por Miyoshi *et al.* (1995), que realizaram um estudo similar utilizando mucosa duodenal de rato. Segundo os autores, estas estruturas poderiam estar funcionando como sítio de degradação de heme para reciclagem do ferro. Em outro modelo experimental, Lara *et al.* (2003) mostraram estruturas contendo heme nas células digestivas do intestino do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Estas estruturas foram chamadas de hemossomos e estocam heme proveniente da digestão sanguínea, funcionando assim como uma estrutura responsável por isolar uma grande

quantidade de heme das estruturas celulares no epitélio intestinal do carrapato. Em 2005, Lara *et al.* demonstraram a rota do heme nas células digestivas. O heme liberado da hemoglobina nas vesículas digestivas durante a digestão é transportado para os hemossomos. Os autores mostraram a presença de proteínas que podem estar envolvidas nesse transporte e armazenamento do heme.

Em *R. prolixus*, as estruturas encontradas nas células do epitélio intestinal além de apresentarem-se delimitadas por uma membrana, também podem se apresentar envoltas por retículo endoplasmático. Estas estruturas reticulares ao redor das estruturas contendo heme poderiam de alguma forma estar auxiliando em um mecanismo de detoxificação de heme, visto que em mamíferos as heme oxigenases, por exemplo, são enzimas microssomais (Tenhunen *et al.*, 1969).

Uma observação relevante foi a presença de estruturas contendo heme nas células epiteliais de insetos de 16 dias após a alimentação (figura 10), sugerindo que mesmo em momentos mais avançadas do ciclo alimentar ainda há estruturas contendo heme. A alteração no aspecto das estruturas eletrondensas em momentos do ciclo digestivo também foi observada durante nossos estudos. Células epiteliais do intestino de insetos de 18 dias após a alimentação também apresentam estruturas eletrondensas. Entretanto estas estruturas parecem sofrer mudanças em seu aspecto em momentos avançados do ciclo alimentar. A figura 11A mostra o aspecto menos compacto de algumas estruturas eletrondensas nas células epiteliais do intestino de insetos 18 dias após a alimentação em sangue de coelho. Tal observação sugere que estas estruturas possam ter algum papel no estoque transitório de heme para uso posterior no jejum, momento este em que a quantidade de nutrientes disponíveis para serem absorvidos se encontra baixa na luz do intestino e, visto que o inseto depende de heme para a ovogênese (Braz *et al.*, 2001). Nossos dados confirmaram essa hipótese quando os animais

Tomados em conjunto, os dados apresentados até aqui nos permitem sugerir a participação das estruturas eletrondensas contendo heme ou no estoque temporário para mobilização em momentos de jejum, ou a participação destas estruturas no estoque temporário para isolamento deste heme e posterior degradação. Cruz-Oliveira *et al.* (2002) demonstraram que tanto no epitélio do vaso dorsal, quanto no epitélio intestinal de *R. prolixus* ocorre a produção de biliverdina, um dos produtos gerados durante a degradação de heme, além de ferro e CO (monóxido de carbono) (Zhang *et al.*, 2004). Sendo assim, os níveis de ferro livre no epitélio intestinal de *R. prolixus* foram analisados nos dias após a alimentação. Os dados mostraram que a partir do 13º dia após a alimentação, existe uma elevação dos níveis de ferro associados ao epitélio intestinal. Coincidentemente, nos momentos mais avançados do ciclo alimentar o epitélio intestinal de *R. prolixus* se torna esverdeado, sugerindo uma maior produção de biliverdina. Como o ferro é também um dos produtos da degradação de heme, nossos dados indicam que pode estar havendo um aumento da degradação do heme nesta fase, com a elevação nos níveis de ferro (figura 12) e de biliverdina (dados não mostrados). Os aumentos nos níveis de ferro podem ser observados até o 20º dia após a alimentação. Grande parte do ferro gerado no epitélio intestinal pode se associar à ferritina. Entretanto, a metodologia usada para quantificação de ferro no presente trabalho pode estar subestimando os níveis reais de ferro neste tecido, visto que parte do ferro se encontra mineralizado no interior da molécula de ferritina (Nichol *et al.*, 2002). É possível que tanto a biliverdina quanto o excesso de ferro estocado nas células do intestino possa ser eliminado por descamação do epitélio, sendo eliminado nas fezes (Locke & Nichol, 1992).

No mosquito *Aedes aegypti*, a alimentação com dietas contendo ferro ou heme induz uma maior expressão das subunidades da ferritina (Geiser *et al.*, 2003). A ferritina nesse sistema funciona como um agente protetor contra a citotoxicidade promovida pelo excesso de ferro livre. O papel protetor da ferritina já foi mostrado em células endoteliais, onde a ação da heme oxigenase é complementada pela ação citoprotetora da ferritina (Balla *et al.*, 1992).

Na tentativa de buscarmos dados que nos mostrassem a participação das estruturas eletrondensas no processamento do heme estocado em seu interior, assim como a provável participação do retículo endoplasmático nesse sistema, resolvemos submeter o epitélio intestinal de insetos de 4 dias após a alimentação a um protocolo de obtenção de frações ricas em retículo, utilizando um gradiente descontínuo de sacarose. Como pudemos perceber, a atividade de degradação de heme se mostrou elevada nas frações onde a atividade da enzima

marcadora para retículo endoplasmático também se encontrou elevada. Yoshinaga *et al.* (1982) mostraram que a enzima citocromo c oxidoreductase tem a capacidade de degradar heme em experimentos com a enzima isolada. Este dado é relevante, pois podemos sugerir a participação desta enzima marcadora de retículo como uma enzima auxiliar no processo de detoxificação de heme intracelular em *R. prolixus*. Tomando os dados em conjunto, podemos sugerir a participação de retículo endoplasmático, através de ação de suas enzimas, no processamento de heme estocado nas estruturas eletrondensas. Isto nos ajuda a explicar as observações feitas nas micrografias, onde percebemos a presença de retículo ao redor de estruturas eletrondensas. No sistema utilizado para se averiguar a degradação de heme, constatamos que de fato o epitélio intestinal de *R. prolixus* pode degradar heme, visto que quando medimos a produção de ferro livre em um ensaio de degradação de heme na presença e na ausência de NADPH, verificamos que a produção de ferro livre ocorre em maior intensidade na presença de NADPH como fonte de poder redutor, como ocorre para a heme oxigenase de *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 2004) e outras (Tenhumen *et al.*, 1969; Yoshida & Migita, 2000). Verificamos ainda que as atividades registradas de degradação são relativamente baixas, como também foi mostrado em *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 2004). Podemos sugerir que as estruturas eletrondensas têm um papel importante no estoque do heme oriundo da digestão da hemoglobina do hospedeiro vertebrado. Assim passamos a chamá-la de hemoxissomo, já que pelo menos parte do heme parece sofrer degradação oxidativa nestas estruturas, provavelmente por enzimas (heme oxigenases) contidas nos retículos que estão ao redor das mesmas. É provável que o ferro que esteja sendo liberado durante a degradação do heme seja logo seqüestrado por ferritina, mantendo-o menos disponível, como foi mostrado por Balla *et al.* (1992), em endotélio. Uma outra interpretação relevante é que o retículo ao redor dos hemoxissomas pode também estar sintetizando proteínas para serem usadas para o transporte de heme ou do ferro. É possível que a reutilização deste ferro tenha um papel importante no metabolismo de *Rhodnius*, visto que ele apresenta uma rota de síntese de heme (Braz *et al.*, 1999), que tem o ferro como um componente essencial.

A próxima etapa do trabalho foi a identificação de proteínas de ligação de ferro na hemolinfa de *R. prolixus*. Usando hemolinfa de insetos de quatro dias após a alimentação, baseados na metodologia descrita por Capurro *et al.* (1996), não foi possível identificar qualquer proteína capaz de ligar ferro. A partir de cinco dias após a alimentação e,

aumentando o tempo e a velocidade de centrifugação foi então identificada uma proteína de ligação de ferro (16A). No entanto, a quantidade de proteína obtida sempre se mostrou muito baixa, mesmo quando usamos em torno de 10 mL de hemolinfa. Esta baixa concentração hemolinfática pode sugerir que seu papel principal seja desempenhado não na hemolinfa, mas nos tecidos onde ocorre a degradação de heme estocando este ferro para posterior eliminação ou utilização (Locke & Nichol, 1992). Sendo assim, é possível que os momentos em que ocorre a degradação de heme coincidam com momentos de maior síntese de proteínas de ligação de ferro, como ferritina, no epitélio do vaso dorsal e do intestino de *R. prolixus*. Isto representaria uma medida de evitar quantidades perigosas de ferro livre, como ocorre no mosquito *Aedes aegypti* (Geiser *et al.*, 2003), onde a expressão de genes que codificam subunidades da ferritina aumenta quando os mosquitos são alimentados com ferro ou heme. É possível que o teor de proteínas de ligação de ferro na hemolinfa de *R. prolixus* aumente em momentos mais avançados do ciclo alimentar. No entanto, a quantidade de hemolinfa nesses momentos é bastante reduzida, inviabilizando essa abordagem, já que seriam necessárias quantidades muito grandes de insetos para os experimentos. Sabe-se que a infecção bacteriana promove aumentos nos níveis de proteínas de ligação de ferro, como transferrina (Yoshiga *et al.*, 1997).

Nosso outro modelo experimental é a *Diatraea saccharalis*, a broca da cana-de-açúcar. Utilizando este modelo é possível obter grandes quantidades de hemolinfa, de onde se obtiveram quantidades apreciáveis de uma proteína que apresentava uma coloração marron. A caracterização da proteína através de tratamento térmico, estudos eletroforéticos e seqüenciamento amino-terminal, mostrou que esta é uma ferritina. Após centrifugação da hemolinfa de *D. saccharalis*, podem-se obter quantidades significativas de ferritina, o que possibilitou a continuidade do trabalho visando entender a participação desta proteína no metabolismo de ferro neste modelo. A ferritina encontrada em *D. saccharalis* é muito similar as já descritas para outros lepidópteros como *Manduca sexta* (Winzerling *et al.*, 1995b) e *Galleria mellonella* (Kim *et al.*, 2001). Esta proteína apresentou massa molecular, em condições nativas, de aproximadamente 440 kDa, apresentando subunidades com massas moleculares em torno de 32 e 26 kDa, também muito similares às descritas para *Manduca sexta* e *Galleria mellonella* (Winzerling *et al.*, 1995b; Kim *et al.*, 2001). Além disso, o seqüenciamento amino-terminal das subunidades desta proteína revelou que estas apresentam uma alta identidade com as subunidades de outras ferritinas descritas para outros insetos

(Hamburger *et al.*, 2005). A eletroforese bidimensional nos mostrou que a ferritina estava homogênea de acordo com os parâmetros de análise utilizados e os pontos isoelétricos das subunidades foram 6,44 e 6,81. Um terceiro spot foi registrado, aquele com ponto isoelétrico de 6,66, que pode corresponder a uma banda que aparece discretamente logo abaixo da banda de aproximadamente 32 kDa, muito similar ao já descrito em lepdópteras (Winzerling *et al.*, 1995b; Kim *et al.*, 2001). O aparecimento de uma terceira banda com estas mesmas características foi registrada em *Manduca sexta* durante os procedimentos de purificação (Winzerling *et al.*, 1995b). Podemos perceber ainda a presença de uma banda protéica na altura das subunidades de maior peso molecular. Provavelmente isto se trata de uma isoforma da proteína ou uma subunidade que seja expressa em menor quantidade, o que também é descrito para *Manduca sexta* (Winzerling *et al.*, 1995b).

Com a proteína purificada, resolvemos marcá-la com FITC para darmos início aos estudos sobre a participação desta proteína no metabolismo de ferro em *D. saccharalis*. A injeção da proteína marcada na hemolinfa de *D. saccharalis* e, posteriormente a análise dos ovários (6 horas e 30 minutos após) através da microscopia de fluorescência, mostrou a marcação com FITC no interior dos ovócitos (figura 22). Este dado mostra que a ferritina é incorporada pelos ovócitos.. Nos experimentos de incubação de ovócitos com a proteína marcada, utilizando como meio de incubação a própria hemolinfa pode-se perceber que após apenas 5 minutos de incubação com a proteína marcada, esta se encontra localizada perifericamente nos ovócitos (figura 23). Até onde sabemos, esta é a primeira demonstração de incorporação de ferritina pelos ovócitos em crescimento, o que caracteriza esta como mais uma proteína vitelogênica. Estes dados apontam para o fato de que a ferritina pode ser uma importante fonte de ferro para o embrião que se desenvolverá, assim como a RHBP pode ser uma potencial fonte de heme para o embrião nos ovos de *R. prolixus* (Braz *et al.*, 2001). A ferritina de *D. saccharalis* pode armazenar o equivalente uma apreciável quantidade de ferro. Nossos dados estão de acordo com as hipóteses por outros grupos que analisaram a razão

Ainda com a proteína purificada, geramos anticorpos policlonais contra a ferritina de *D. saccharalis*. Porém estes anticorpos se mostraram muito inespecíficos, sendo impróprios para a realização de experimentos como Western blot e imunolocalização. A baixa especificidade destes anticorpos pode ser devido a utilização da proteína nativa, que apresenta uma alta massa molecular. Uma proteína com alta massa molecular pode ser capaz de promover a produção de anticorpos contra vários epítomos conformacionais, que podem ser muito similares a várias outras proteínas presentes nos tecidos do inseto utilizado. Estes anticorpos seriam também utilizados em experimentos de imunomarcacão e Western blots tanto em *D. saccharalis* quanto em *R. prolixus*.

6 – Conclusões

Ao final dessa etapa de nosso trabalho, podemos concluir:

- Como o análogo do heme (paládio meso-porfirina) pode atravessar as células do epitélio intestinal de *R. prolixus*, é provável de o heme também possa atravessar, o que está em concordância com dados já publicados;
- As células do epitélio intestinal de *R. prolixus* apresentam estruturas envoltas por membranas que apresentam heme em seu interior. Estas estruturas apresentam modificações em seu aspecto em momentos mais avançados do processo digestivo;
- Ao redor das estruturas celulares contendo heme, neste trabalho designadas como hemoxissomos, estão estruturas como retículo endoplasmático;
- Ao final do processo de digestão, ocorre a disponibilização de ferro, um dos produtos de degradação de heme;
- Os hemoxissomos, juntamente com estruturas como retículo endoplasmático, desempenham um papel no processo de detoxificação de heme nas células do epitélio intestinal de *R. prolixus*. O retículo endoplasmático, que está em contato com os hemoxissomos, estão contribuindo com enzimas capazes de degradar pelo menos parte do heme contido em seu interior;
- A hemolinfa de *R. prolixus* apresenta uma provável proteína de ligação de ferro. Esta pôde ser detectada, porém em concentração extremamente baixa no momento analisado;
- A hemolinfa do nosso segundo modelo experimental, a broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*), apresenta uma ferritina com duas subunidades majoritárias. As seqüências amino-terminais das duas subunidades majoritárias apresentam um alto grau de identidade com subunidades de ferritinas de outros lepidópteras;
- Os ovócitos de *D. saccharalis* são capazes de captar ferritina da hemolinfa. Esta ferritina pode carregar aproximadamente 3 vezes a sua própria massa em ferro, o que aponta esta proteína como um excelente reservatório de ferro para organismos que necessitam de ferro.

7 - Referências

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287, 2185–2195 (2000).
- Aft, R. L. & Muller, G. C. Heme-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.**, 258, 12069-12072 (1983).
- Arese, P. & Schwarzzer, E. Malaria pigment (hemozoin): a very active "inert" substance. **Annu. Trop. Med. Parasitol.** 91(5): 501-516 (1997).
- Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J. Rosemberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J. W. & Vercellotti, G. M. Ferritin: A cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. **J. Biol. Chem.** 267 (25): 18148-18153 (1992).
- Barrett, F. M. Absorption of fluid from anterior midgut of *Rhodnius*. **J. Insect. Physiol.** 28: 335-341 (1982).
- Bartfeld, N & Law, J. H. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Sequence similarity to the vertebrate transferrins. **J. Biol. Chem.** (35): 21684-21691 (1990).
- Basilion, J.P., Kennedy, M.C., Beinert, H., Massinople, C.M., Klausner, R.D. & Rouault, T.A. Overexpression of iron-responsive element-binding protein and its analytical characterization as the RNA-binding form, devoid of an iron-sulfur cluster. **Arch. Biochem. Biophys.** 311 (2): 517-522 (1994).
- Billingsley, P. F. & Downe, A. E. R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). **Can. J. Zool.** 61: 2574-2586 (1983).

- Billingsley, P. F. & Downe, A. E. R. Ultrastructural localisation of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Int. J. Insect Morph. Embr.** 17: 295-302 (1988).
- Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insect. **Annu. Rev. Entomol.** 35: 219-248, (1990).
- Bohle, D. S., Dinnebier, R. E., Madsen, S. K. & Stephens, P. W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by x-ray diffraction. **J. Biol. Chem.** 272, 2: 713-716 (1997).
- Bradford M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254 (1976).
- Braz, G. R. C., Abreu, L., Masuda, H. & Oliveira, P. L. Heme biosynthesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Insect. Bioch. Mol. Biol.** 31: 359-364 (2001).
- Braz, G. R. C., Coelho, H. S., Masuda, H. & Oliveira, P. L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Curr. Biol.** 1;9(13):703-706 (1999).
- Buxton, P. A. Biology of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Trans. Ent. Soc. Lond.**, 78: 227-236 (1930).
- Capurro, M. L., Iughetti, P., Ribolla, P. E. M. & Bianchi, A. G. *Musca domestica* hemolymph ferritin. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 32: 197-207 (1996).
- Cruz-Oliveira, Paiva-Silva, G. O., Oliveira, P. L., Maya-Monteiro, C, Almeida, I. C. & Masuda, H. Novel biliverdin compound in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*: A new heme degradation pathway. SBBq, Caderno de resumos (2002).

- Dansa-Petretski, M., Ribeiro, J. M. C., Atella, G. C., Masuda, H. & Oliveira, P. L. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein: protection against heme-induced lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, 270 (18): 10893-10896 (1995).
- Davis, B. J. Disc electrophoresis II. Methods and application to serum proteins. **Ann. NY Acad. Sci.** 121: 404-427 (1964).
- Deterding, L. J., Ramirez, D. C., Dubin, J. R., Mason, R. P. & Tomer, K. B. Identification of free radicals on hemoglobin from its self peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidiny radical. **J. Biol. Chem.** 279, 11600-11607 (2004).
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., Zakhary, R., Hester, L. D., Guastella, D. & Snyder, S. H. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, 2445-2450 (1999).
- Dunkov, B. C., Georgieva, T., Yoshida, T., Hall, M. & Law, J. H. *Aedes aegypti* ferritin heavy chain homologue: feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. **J. Insect Sci.** (2002).
- Elangovan, N., Lee, Y.C. Tzeng, W.F. & Sin-Tak Chu, S.T. Delivery of ferric ion to mouse spermatozoa is mediated by lipocalin internalization. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 319: 1096–1104 (2004).
- Emmerson, K. C., Kim, K. C. & Price, R. D. Lice in parasites of laboratory animals, **R. J. Flynn**, (ed.). Ames, Iowa State University Press, (1973). In: Lehane, M. J. **Biology of blood-sucking insects**. School of Sciences, University of Wales, (1991).
- Ferreira, C., Ribeiro, A. F., Garcia E. S. & Terra, W. R. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. **Insect Biochem.** 18: 521-530 (1988).

- Friend, W. G. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stål. **Can. J. Zool.** 43:125-132 (1965).
- Gallagher, P. A., Schwegel, C. A., Wei, X. & Creed, J. T. Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection. **J. Environ. Monit.** 3 (4): 371-376 (2001).
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, S. S. CArvalho, R. P. L., Baptista, G. C., Filho, E. B., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A. & Alves, S. B. Manual de entomologia agrícola. ED: **Agronômica ceres.** São Paulo. 290-291 (1978).
- Garcia, E. S., Macarini, J. D., Garcia, M. L. M. & Ubatuba, F. B. Alimentação de *Rhodnius prolixus* no laboratório. **An. Acad. Brasil. Ciencias.**, 47: 539-545 (1975).
- Geiser, D.L, Chavez, C.A., Flores-Munguia, R., Winzerling, J.J. & Daphne Q.-D. Pham, D.Q.-D. *Aedes aegypti* ferritin: A cytotoxic protector against iron and oxidative challenge? **Eur. J. Biochem.** 270, 3667–3674 (2003).
- Georgieva, T, Dunkov, B. C., Harizanova, N., Ralchev, K. & Law, J. H. Iron availability dramatically alters the distribution of ferritin subunit messages in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 2716-2721 (1999).
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E, Raymond, K.N & Strong, R.K. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. **Mol. Cell.** 10: 1033–1043 (2002).
- Graça-Souza, A. V., Petretski, J. H., Demasi, M., Bechara, E. J. H. & Oliveira, P. L. Urato protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, 22: 209-214 (1997).
- Graham, J. M. & Rickwood, B. Subcellular fractionation. **Oxford University Press** (1997).
- Gutteridge, J. M. C. & Smith, A. J. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. **Biochemistry.**, 256: 861-865 (1988).

- Hamburger, A. E., West Jr, A. P., Hamburger, Z. A., Hamburger, P., & Bjorkman, P. J. Crystal Structure of a Secreted Insect Ferritin Reveals a Symmetrical Arrangement of Heavy and Light Chains. **J. Mol. Biol.**, 349: 558-569 (2005).
- Harano, T & Onura, T. Biogenesis of endoplasmic reticulum membrane in rat liver cells. II. Discharge of the nascent peptides of NADPH-cytochrome c reductase and cytochrome b5 on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum membrane. **J. Biochem.** 82 (6):1551-7 (1977).
- Hempsted, P.D., Hudson, A.J., Artymiuk, P.J., Andrews, S.C., Banfield, M.M.J., Guest, J.R. & Harrison, P.M. Direct observation of the iron binding sites in a ferritin. **FEBS Lett.** 350 258–262 (1994).
- Heubers, H.A., Huebers, E., Finch, C., Webb, B.A., Truman, J.W., Riddiford, L.M., Martin, A.W. & Massover, W.H. Iron binding proteins and their roles in the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L). **J. Comp. Physiol. Biochem.** 158: 291-300 (1988).
- Holloway, T.E., Haley, W.E., Loftin, U.C. & Heinrich, C. The sugar-cane borer in the United States. **USDA Tech. Bull.** 41. 77 pp (1928).
- Houseman, J. G. & Downe, A. E. R. Activity cycles and the control of four digestive proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera:Reduviidae). **Insect Physiol.** 29: 141-148 (1983).
- Jamroz, R. C., Gasdaska, J. R., Bradfield, J. Y. & Law, J. H. Transferrin in a cockroach: Molecular cloning, characterization, and suppression by juvenile hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 1320-1324 (1993).
- Kaplan, J. Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire. **Cell.** 111: 603-606 (2002).

Kim, B. S., Lee, C. S., Yun, C. Y., Yo, S. M., Park, W. M. & Kim, H. R. Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. **Comp. Biochem. Physiol. Part A.** 129: 501-509 (2001).

- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M, Vaz Jr, I. S., Masuda, A., Sorgine, M. H. F., Braz, G. R., Masuda, H. & Oliveira, P. L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32: 1805-1811 (2002).
- Maines, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **FASEB J.**, 2: 2557-2568 (1988)
- Miyoshi, H., Ashida, K., Hirata, I., Ohshiba, S. & Naitoh, T. Transferrin is not involved in initial uptake process of iron in rat duodenal mucosa: ultrastructural study by X-ray spectrometry. **Digest. Disease sci.** 40 (7): 1484-1490 (1995).
- Mohr, C. O. Cattle droppings as ecological units. **Ecological monographs** 13: 275-298 (1943).
- Nichol, H., Law, J. H. & Winzerling, J. J. Iron metabolism in insects. **Ann. Rev. Entomol.** 535-552 (2002).
- Oliveira, P. L, Kawooya, J. K., Ribeiro, J. M. C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E. W., Wajker, F. A., Machado, E. A., Nussenzveig, R. H, Padovan, G. J. & Masuda, H. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*: isolation and characterization. **J. Biol. Chem.** 270: 10897-10901 (1995).
- Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C. M. S., Masuda, H. & Oliveira, P. L. Haem detoxification by an insect. **Nature.** 400: 517-18 (1999).
- Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Braga, C. M. S., Masuda, H. & Oliveira, P. L. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **FEBS Lett.** 477: 95-97 (2000).

- Oliveira, M.F., Timm, B.L., Machado, E.A., Miranda, K., Attias, M., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M.A., Souza, W., Pinhal, N.M., Sousa, J.J.F., Vugman, N.V. & Oliveira, P.L. On the pro-oxidant effects of haemozoin. **FEBS Lett.** 512: 139-144 (2002).
- Padykula, H. A. Histochemistry and cytochemistry. In: **Cell and tissue biology**. Ed. Leon Weiss. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 6^o ed. 95, Pg. 111 (1988).
- Paes, M. C, Oliveira, M. B & Oliveira, P. L. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 48, 63-71 (2001).
- Pham, D. Q.-D. Molecular modeling of insect ferritins. **In silico Biol.** 2 (1): 531-544. (2002).
- Reimer, L. Energy-filtering transmission electron microscopy. **Adv. Electr. Phys.** 81, 43-126 (1991).
- Ridley, D. G., Dorn, A., Vippagunta, S. R. & Vennerstrom, J. L. haematin (haem) polymerization and its inhibition by chloroquine antimalarials. **AnnU. Trop. Med. Parasitol.** 91(5): 559-566 (1997).
- Roe, R.M. A bibliography of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius), 1887-1980. **USDA, ARS.** ARM-S 20. 101 pp (1981)
- Shibahara, S., Müller, R. M. & Taguchi, H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. **J. Biol. Chem.** 262, 12889-12892 (1987).
- Schmitt, T. H., Frezzatti, W. A., Schreier, S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. **Arch. Bioch. Biophys.** 307(1): 96-103 (1993).

- Silva, C. P., Ribeiro, A. F., Gulbenkian, S. & Terra, W. R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovilar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. **J. Insect. Physiol.** 41: 1093-1103 (1995).
- Silva, J. R. Associação das membranas perimicrovillares do intestino médio de *Rhodnius prolixus* com o processo de polimerização de heme. UENF, Tese de mestrado, Fevereiro (2001).
- Silva, C. P., Silva, J. R., Vasconcelos, F. F., Dansa-Petretski, M., DaMatta, R. A., Ribeiro, A. F. & Terra, W. R. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. **Arthr. Struct. Develop.** 33: 139-148 (2004).
- Slater, A. F. G., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, E., Cerami, A. & Henderson, G. B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 88, 325-329 (1991).
- Slater, A. F. Malaria pigment. **Exp. Parasit.**, 72:362-365 (1992).
- Slater, A. F. & Cerami. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature.** 355: 167-169 (1992).
- Stocker, R. & Peterhans, E. Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. **Free Radical Res. Commun.** 6, 57-66 (1989).
- Tappel, A. L. Unsaturated lipid oxidation by hematin compounds. **J. Biol. Chem.**, 271: 721-733 (1955).
- Teesdale, C. Studies on the bionomics of *Aedes aegypti* L. in its natural habitat in a coastal region of Kenya. **Bulletin of Entomological Research.** 46: 711-742 (1955). In:

- Lehane, M. J. **Biology of blood-sucking insects**. Harper Collin Academic, 77-85, Fulham Palace Road, Hammersmith, London, W6 8jB - UK (1991).
- Tenhunen, R., Marver, H.S. & Schmid, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **Biol. Chem.** 244, 6388–6394 (1969).
- Terra, W. R., Ferreira, C. & Garcia, E. S. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. **Insect Biochem.**, 18: 423-434 (1988).
- Valle, D., Lima Gomes, J. E. P., Goldemberg, S. & Garcia, E. S. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon the blood source. **J. Insect. Physiol.**, 33: 249-254 (1987).
- Van der Zee, J., Barr, D. P. & Mason, R. P. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. **Free Radical Biol. Med.** 20: 199-206 (1996).
- Vincent, S. H., Grady, R. W., Shaklai, N., Snider, J. M. & Muller- Eberhard, U. The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. **Arch. Biochem. Biophys.** 265: 539-550 (1988).
- Yoshida, T. & Migita, C.T. (2000) Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. **J. Inorg. Biochem.** 82, 33–41 (2000).
- Yoshiga, T., Hernandez, V. P., Fallon, A. M. & Law, J. H. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up regulated upon infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 12337-12342 (1997).
- Yoshinaga, T, Sassa, S. & Kappas, A. A comparative study of heme Degradation by NADPH-cytochrome *c* reductase alone and by the complete heme oxygenase system. **J. Biol. Chem.** 257 (13): 7794-7802 (1982).

Winzerling, J. J., Pham, D. Q. D., kunz, S., Samaraweera, P., Law, J. H. & Porath J. Purification of recombinant insect transferrin from large volumes of cell culture medium using high capacity Ni²⁺ Dipicolylamine gel. **Prot. Expr. Purif.** 7: 137-142 (1995)a.

Winzerling, J.J., Nez, P., Porath, J. & Law, J.H. Rapid and efficient isolation of transferrin and ferritin from *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 25, 217–224 (1995)b.

Zhang, D., Ferris, C., Gailer, J., Kohlhepp, P. & Winzerling, J. J. *Manduca Sexta* IRP1: Molecular characterization and *in vivo* response to iron. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32:85-86 (2001).

Zhang, X., Sato, M., Sasahara, M., Migita, C. T. & Yoshida, T. Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. **Eur. J. Biochem.** 271: 1713-1724 (2004).

8 - Anexo (Artigo aceito para publicação)

The haemoxisome: A haem-iron containing structure in the *Rhodnius prolixus* midgut cells

José Roberto Silva^a, Leonardo Gomes-Silva^a, Ulysses Casado Lins^c,
Nádia F.S. Nogueira^b, Marilene de Azevedo^a     



Fig. 1. TEM micrograph of a haemoxisome in a *Rhodnius prolixus* midgut cell. The structure is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. Scale bar = 1.5 μm.

Abstract The haemoxisome is a large, electron-dense, circular structure in the midgut cells of the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. It is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles. The structure is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles.

Keywords: Haemoxisome; *Rhodnius prolixus*; Midgut; Electron microscopy; Haem-iron

1. Introduction The haemoxisome is a large, electron-dense, circular structure in the midgut cells of the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. It is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles. The structure is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles.

2. Materials and Methods The midgut cells of *Rhodnius prolixus* were isolated and fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide. The fixed cells were then dehydrated and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were cut and stained with lead citrate and uranyl acetate. The sections were then examined by transmission electron microscopy (TEM).

3. Results The haemoxisome is a large, electron-dense, circular structure in the midgut cells of *Rhodnius prolixus*. It is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles. The structure is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles.

4. Discussion The haemoxisome is a large, electron-dense, circular structure in the midgut cells of *Rhodnius prolixus*. It is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles. The structure is approximately 1.5 μm in diameter and contains a dense, granular core. The structure is surrounded by a thin membrane and contains a dense, granular core. The surrounding cytoplasm is less dense and contains various organelles and small vesicles.

Haem (iron-protoporphyrin IX) is a potent catalyst of reactive oxygen species generated at 80 kV. The material for ESI was

Deterling et al., 2004; Schmitt et al., 1993; Vincent, 1989; Xu and Müller, 1983)

scope generates a highly oxidative environment. Haematophagous insects have developed anti-oxidant mechanisms to withstand this challenge. Some anti-oxidant mechanisms in the Triatomine *R. prolixus* have been described (Dansa-Petretski et al., 1995; Graça-Souza et al., 1997; Oliveira et al., 1999; Paes et al., 2001). Previously, we reported the absorption of haem by *R. prolixus* midgut (Dansa-Petretski et al., 1995) and the association of digestion-derived haem to a *Rhodnius* haem-binding haemolymph protein (RHBP) (Oliveira et al., 1995; Dansa-Petretski et al., 1995). RHBP inhibited haem-induced lipid peroxidation, suggesting that this protein has an anti-oxidant function in the *Rhodnius* haemolymph.

Since haem can cross midgut epithelial cells, it is reasonable to suggest the presence of specialized cell structures with which this haem could be associated during this process. In the present work, we have used transmission electron microscopy (TEM) and electron spectroscopic imaging (ESI) to

analysis system (SIS GmbH, Germany). The microscope was operated at 80 kV with an objective aperture of 2 eV and an energy selector aperture of approximately 675 eV. Elemental maps of iron and oxygen distribution were calculated using the three-window power law (Reimer, 1991). Two energy windows below 718 eV (O: 525 eV, 510 eV) and one after the 718 eV (Fe: 675 eV, 650 eV) of each element were used. Electron energy loss spectroscopy (EELS) was performed using a transmission electron microscope Zeiss EM 912 v with an objective aperture of 30 μ m and a selecting aperture of 2 eV, approximately. Electron energy losses were serially recorded in 10 eV intervals by a photomultiplier coupled to a multimeter connected to image analysis software (SIS GmbH, Germany).

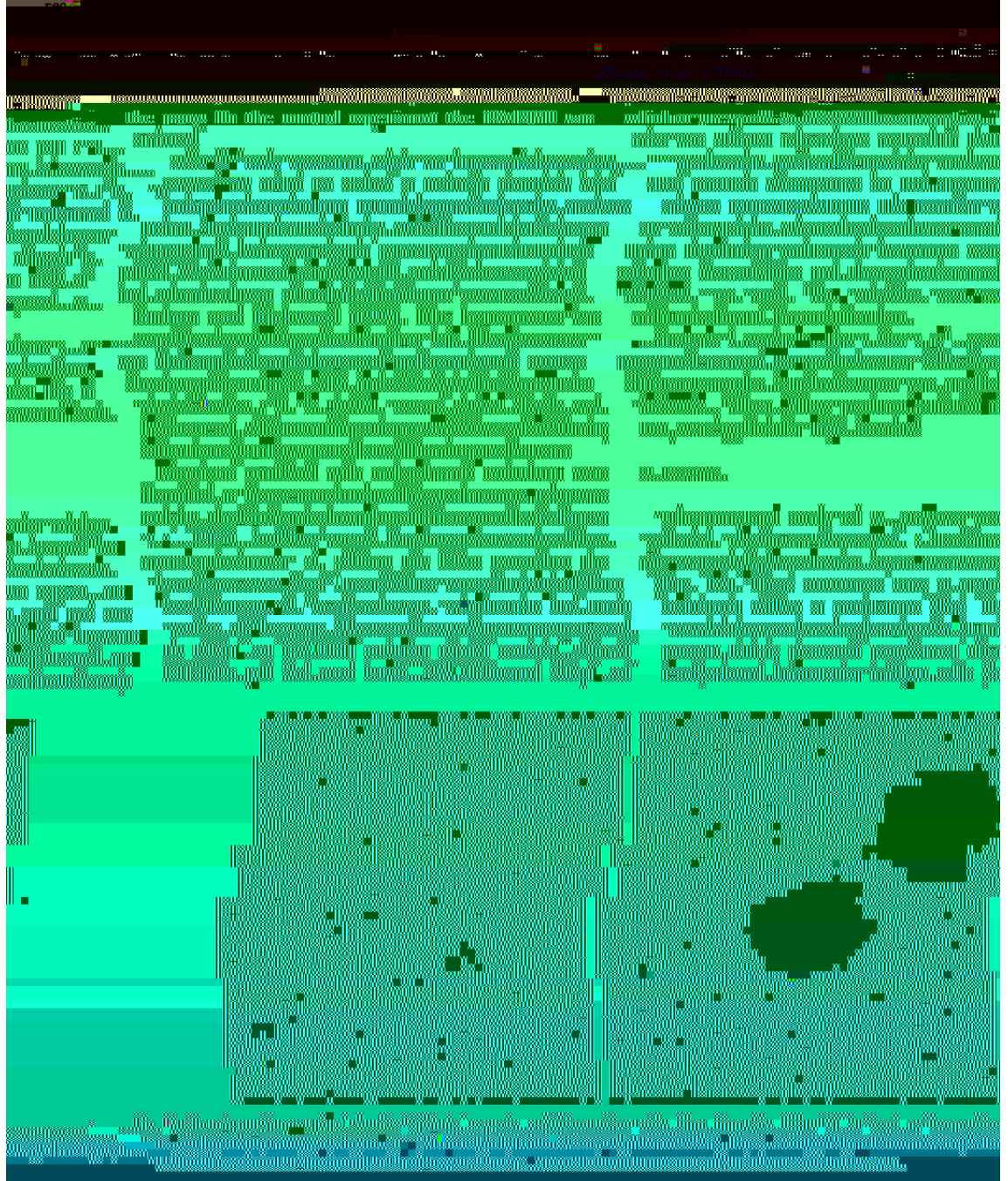
Haem peroxidase activity (Graham and Karnovsky, 1966) and electron spectroscopic imaging (ESI) were used to study the

midgut epithelial cells were incubated with 140 nmol/L hydroxyacetone and 20 μ M of staining reagent. The reaction mixture was incubated for 10 min, and the absorbance at 410 nm was used as standard.

(Yoshinaga et al., 1982)—Midgut epithelia of 10 insect meal were dissected and homogenized in 200 μ L of cold tetraoxide and 0.8% potassium ferrocyanide for 30 min and rinsed with 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The material was dehydrated in graded acetone at room temperature and embedded in Spurr resin for 12 h at 70 °C. Ultrathin sections were taken using an ultramicrotome (Reichert Ultracuts), collected on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. This material was observed in a Zeiss 900 transmission electron microscope. Surfactant and staining solution (12 mmol/L ferrozine) was incubated at 37 °C for 10 min and 360 nm was recorded. As standard.

Haem degradation assay—Midgut epithelia of 10 insect meal were dissected and

saline. Fifty microlitres of the homogenate were added to cytochrome c solution (0.6 M sorbitol, 50 mM KH₂PO₄, the reaction medium (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 2.6 mM EDTA, 100 μM of KCN and 1 μM of cytochrome c). The assay was performed at 30°C and the reaction mix (1.5 mL) was incubated at 30°C for 30 min. The assay was started by the addition of 30 μL of sample.



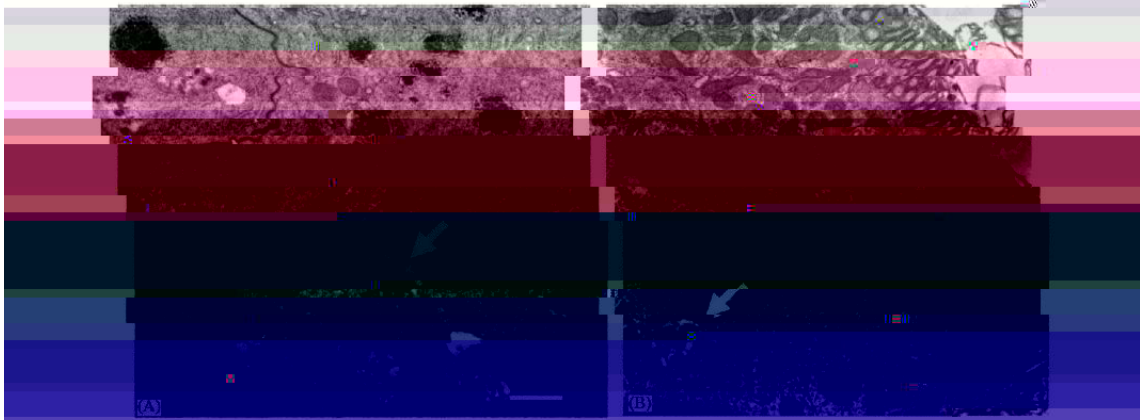


Fig. 2. Posterior midgut epithelial cell analysed by TEM. (A) Insects 18 days after a blood meal showing the haemoxisomes (black arrows); bar 0.7 μ m. Note the presence of structures with a less compact appearance close to less compact structures (white arrows). (B) Midgut epithelial cell 6 days after a blood meal showing a haemoxisome surrounded by rough endoplasmic reticulum (arrowhead); bar 0.5 μ m. Haemoxisomes with a less compact appearance very similar to those seen in (A) (white arrow) are present.

These structures are from now on referred to as haemoxisomes.

The appearance of some haemoxisomes changed several

Fig. 2

The generation of iron in the posterior portion of the midgut was measured on different days after a blood meal (Fig. 5). The iron content in this tissue did not vary greatly

When midgut epithelium surrounded by RER was more frequently observed when compared to blood-fed animals. The reticulum surrounding the haemoxisomes assumed a less dense form.

on the NADPH consumption and non-releasing (Fig. 5). When midgut epithelium extracts or insects from 5 days after a blood meal were used, it was observed that the release of iron was



Fig. 4. Haemoxisome formation in the midgut of *Culex quinquefasciatus* (A) control cell, (B) 5 days after a blood meal, and (C) 10 days after a blood meal. TEM, showing the positive haemoxisomes compared with the control without DAB (C); bars 0.7 μ m.

feeding insects are known as vectors of several diseases. These animals commonly complete their protein meal in just a few minutes. The association with the host is a rapid process, involving several biological and ecological adaptations. The midgut response to blood meal seem to involve the midgut

physiology, water excretion, haemolytic activity and proteinases activity (Barrett, 1982; Lehane, 1991). The digestion of great amounts of blood releases undesirable products such as haem, the prosthetic group of haemoglobin. Haem is a heme molecule and it participates in fundamental biological processes in all living organisms as the prosthetic group of essential molecules such as cytochromes and haemoglobin

discuss blood-sucking insects as vectors of diseases. rich blood feeding insects morphological adaptations

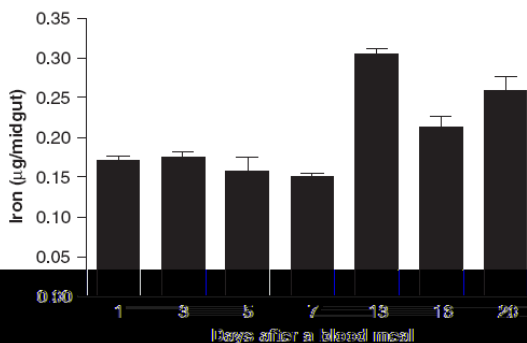


Fig. 5. Iron quantification in the posterior midgut epithelial following the days after a blood meal. The bars represent mean \pm 1 standard error (SE). Iron contents at days 13, 18 and 29 after a blood meal are significantly different from the other days ($p < 0.05$; ANOVA, post hoc Student Newman–Kuls).

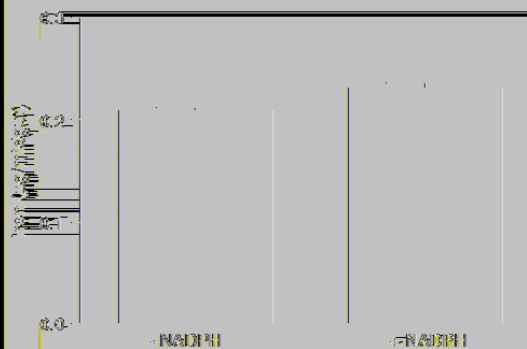


Fig. 6. Iron release in the posterior midgut epithelial cells in the presence and absence of NADPH. The assays were carried out in the presence and in the absence of NADPH. The differences are statistically significant ($p < 0.05$; Student's *t*-test).

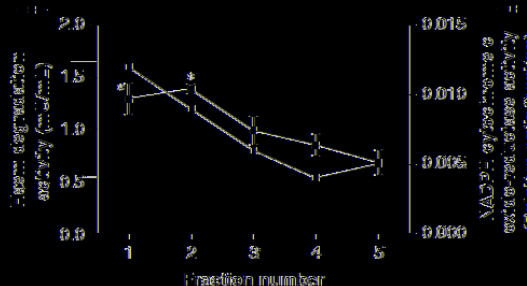


Fig. 7. Haem degradation activity in the presence of endoplasmic reticulum. Cytochrome *c* oxidase activity in fractions obtained from discontinuous sucrose density gradient ultracentrifugation of midgut epithelial extract (open squares). The assay is representative for three different samples; haem degradation activity in the fractions obtained from the gradient (filled squares). Fractions 1 and 2 (asterisks) are statistically different from fractions 4 and 5 ($p < 0.05$; ANOVA, post hoc Student Newman–Kuls) (* = 6).

However, haem is also a potent catalyst of oxygen radical reactions (Liu et al., 1985; Gutteridge and Smith, 1988), and the generation of free haem could be potentially dangerous to the haematophagous insects. Haem can also associate with phospholipids membranes, altering the bilayer structure which leads to cell disruption (Schmitt et al., 1993).

The midgut ultrastructure and physiology of *R. prolixus* has been studied by several authors (Lane and Harrison, 1979; Houseman and Downe, 1980, 1983; Billingsley and Downe, 1983, 1986, 1988; Dow, 1986; Lara et al., 1988; Billingsley, 1990; Leham, 1994; Guzman and Núñez, 1994), but little attention has been focused on the mechanism of haem utilization, excretion or processing in this site, including the antioxidant mechanism against haem generated during haemoglobin digestion. In a different organism, the rat tick *Hyalomma marginatum*, Lara et al. (2005) traced the fate of haemoglobin-derived haem in the digestive cells, pointing to the presence of proteins that are probably involved with the intracellular transport of haem. The mechanism described by this tick works as an efficient antioxidant defence against cellular haem toxicity. Paes et al. (2001) have shown some important antioxidant mechanisms in the *R. prolixus* midgut. Their results suggest that in this tissue catalase and glutathione-dependent mechanisms cooperate to control H_2O_2 concentration in the midgut cells and to prevent hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. These and other mechanisms could be important targets for the control of vectors.

In the present work, we describe the presence of electron dense structures in *Rhodnius* posterior midgut cells, which we have here named haemoxisomes. The haemoxisomes contain iron (Fig. 3B, D) and at least part of this iron is coupled to a porphyrin ring (Fig. 4A, B). The electron dense appearance of some structures observed in the early days after feeding (Fig. 1A) changes during starvation (Fig. 2A), and also in the midgut epithelial cells of animals fed on plasma (Fig. 3B), indicating a possible metabolism of haem when low nutritional elements in the midgut lumen are available for utilization. Before they were given a plasma meal, these insects were fed twice on blood. Thus, the haem present in the haemoxisomes of these insects was probably that derived from the previous blood meals. Aminopeptidase activity was found in electron dense structures like those in the *Rhodnius* midgut cells, which were described as stationary vacuoles (Billingsley and Downe, 1985). Localization of aminopeptidase activity and haemoxisomes could suggest that additional intracellular digestion of haemoglobin occurs in these structures. The possibility of the presence of haemoglobin inside the haemoxisomes was checked in the early days after feeding (days 1 and 5), but no labelling was observed (data not shown), suggesting that no haemoglobin is present in these structures. The haem present in these structures seems to come from the haem pool which is not aggregated into haemozoin and is available to cross the midgut epithelial cells.

Haemoxisomes seem to be associated with haem digestion process. The elevation of iron content at the end of the digestive process (13–20 days after hatching) is in concordance with the appearance of the haemoxisomes aspect during the period, perhaps as a consequence of haem degradation activity. We observed during dissection that the midgut epithelium becomes greenish in colour during the stages of the digestive cycle. This may be due to the presence of biliverdin. Zhang et al. (2004) have shown that *Drosophila* produces biliverdin as one of the degradation products.

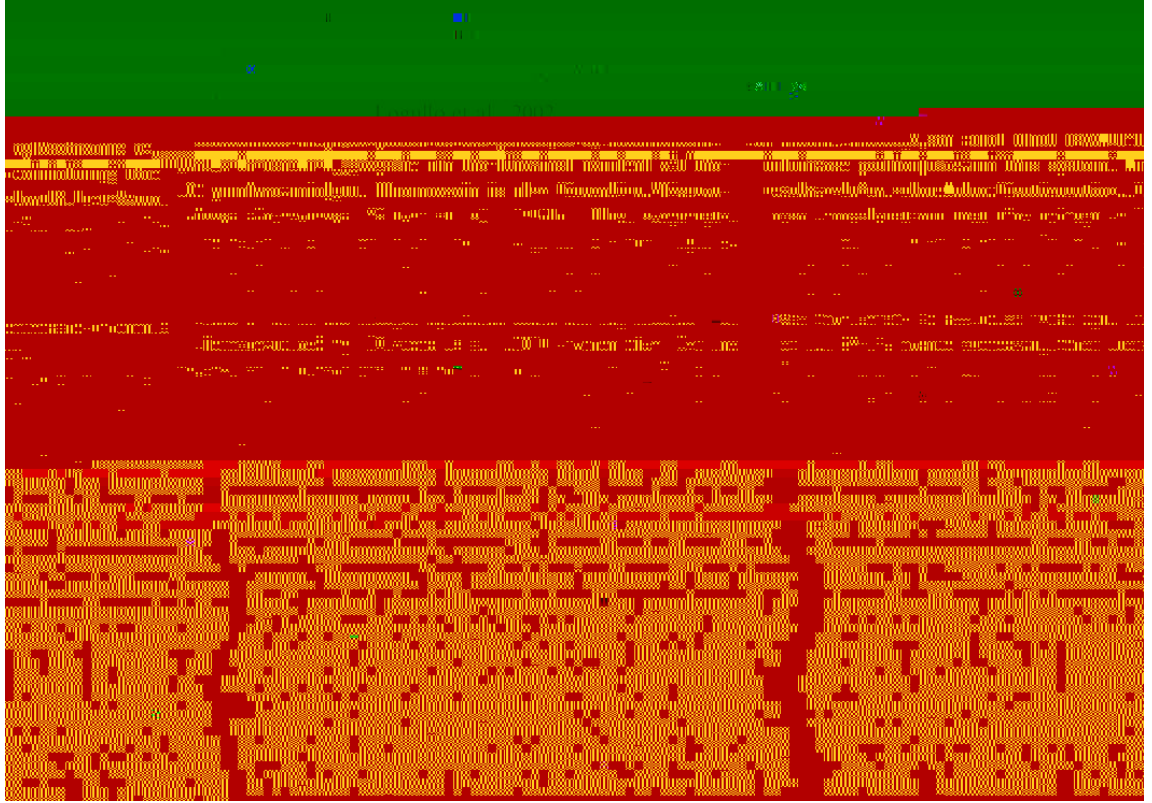
The presence in the midgut epithelial cells of ER surrounding the haemoxisomes (Fig. 1B) suggests the possibility of the involvement of ER in haem degradation. The greater ability of midgut cells to extract iron from haem in the presence of NADPH is in concordance with known haem degradation pathways (Zhang et al., 2004). Yoshimura et al. (1982) demonstrated that cytochrome c reductase degrades haem in addition to NADPH as well, but converts the heme-derived products. However, when haem was incubated with both NADPH and cytochrome c, the product was confirmed to be biliverdin IX α .

In the females obtained from the subcellular fractionation of the midgut epithelium, we observed the presence of haemoxisomes (Fig. 1C). These structures are similar to those reported by Lara et al. (2005) in the midgut epithelium of the rattle tick *R. microplus*. In this tick, the major haem-containing structures called haemosomes. These structures isolate huge amounts of haem that originate from haemoglobin digestion. Lara et al. (2005) showed that

the presence of haemoxisomes is in concordance with the appearance of the haemoxisomes aspect during the period, perhaps as a consequence of haem degradation activity. We observed during dissection that the midgut epithelium becomes greenish in colour during the stages of the digestive cycle. This may be due to the presence of biliverdin. Zhang et al. (2004) have shown that *Drosophila* produces biliverdin as one of the degradation products.

The presence in the midgut epithelial cells of ER surrounding the haemoxisomes (Fig. 1B) suggests the possibility of the involvement of ER in haem degradation. The greater ability of midgut cells to extract iron from haem in the presence of NADPH is in concordance with known haem degradation pathways (Zhang et al., 2004). Yoshimura et al. (1982) demonstrated that cytochrome c reductase degrades haem in addition to NADPH as well, but converts the heme-derived products. However, when haem was incubated with both NADPH and cytochrome c, the product was confirmed to be biliverdin IX α .

In the females obtained from the subcellular fractionation of the midgut epithelium, we observed the presence of haemoxisomes (Fig. 1C). These structures are similar to those reported by Lara et al. (2005) in the midgut epithelium of the rattle tick *R. microplus*. In this tick, the major haem-containing structures called haemosomes. These structures isolate huge amounts of haem that originate from haemoglobin digestion. Lara et al. (2005) showed that



insects, and the presence of some hemocytes at 18 days of age, a blood meal. The endoplasmic reticulum would be important either for the transport of retrieved iron to sites where haem synthesis is occurring or for the secretion of iron, excess into the gut lumen in order to be eliminated.

Acknowledgements

Ribeiro, Giovana Alves de Moraes, Noil Gomes de Freitas and Márcia Adriana Dutra for the technical assistance. This work was supported by grants from the International Foundation for Science (IFS—Sweden), CNPq, FAPES and FENORTE (Brazil).

References

Alf, R.L., Muller, G.C., 1983. Heme-mediated DNA strand scission. *Journal of Biological Chemistry* 258, 12069–12072.

Azamboni, J., Mouton, J.C., Dardas, J.N., et al., 1989. In vivo cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* nymphs to rat and mellitin towards different trypanosomids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22, 273–275.

Billingsley, P.F., 1999. Absorption of blood in the midgut of *Rhodnius*. *Journal of Insect Physiology* 28, 335–341.

Billingsley, P.F., 1999. The midgut ultrastructure of hematophagous insect. *Annual Review of Entomology* 35, 219–248.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1983. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology* 61, 2574–2586.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1985. Cellular localization of amino-oxylase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Cell and Tissue Research* 241, 421–428.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1986. Nondigestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 23, 212–216.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1988. Ultrastructural localisation of cathespin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 34, 109–114.

Braz, G.R.C., Azeiteiro, F.S.L., Almeida, H., Oliveira, P.L., 1999. A new metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology* 9, 987–996.

Braz, G.R.C., Abreu, L., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2001. Heme biosynthesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 399–404.

Damsa-Petretski, M., Ribeiro, A.F.C., Vieira, C.A., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1995. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein: protection against heme-induced lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 10893–10896.

Detring, L.J., Ramirez, D.C., Dubin, J.R., M...

Doyle, J.A.T., 1986. *Insect Nutrition*. *Advances of Insect Physiology* 19, 187–305.

Feldman, R.J., Bernstein, M., Scheckman, R., 1987. Product of SEC required for folding and glycosylation of secretory proteins in the lumen of the yeast endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 262, 9332–9339.

Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Garcia, E.S., Terra, W.R., 1988. Digestive enzymes trapped between and associated with the double membranes of *Rhodnius prolixus* midgut. *Journal of Insect Physiology* 34, 109–114.

Garcia, E.S., Terra, W.R., 1988. Alimentação de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Anais do Museu Nacional do Brasil* 47, 539–545.

Garcia, E.S., Terra, W.R., 1988. Alimentação de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Anais do Museu Nacional do Brasil* 47, 539–545.

Garcia, E.S., Terra, W.R., 1988. Alimentação de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Anais do Museu Nacional do Brasil* 47, 539–545.

Graça-Souza, A.V., Petretski, J.H., Demasi, M., Bechara, E., Oliveira, P.L., 1997. Urato protects a blood-sucking insect a hemin-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 209–214.

Graham, R.C., Karnovsky, M.H., 1966. The early stages of absorp injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 14, 791–800.

Crutcher, J.M.C., Smith, A.J., 1988. Antioxidant protection: haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem* 256, 861–865.

Housman, J.G., Downe, A.E.R., 1980. *Rhodnius prolixus* activity in posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 26, 861–865.

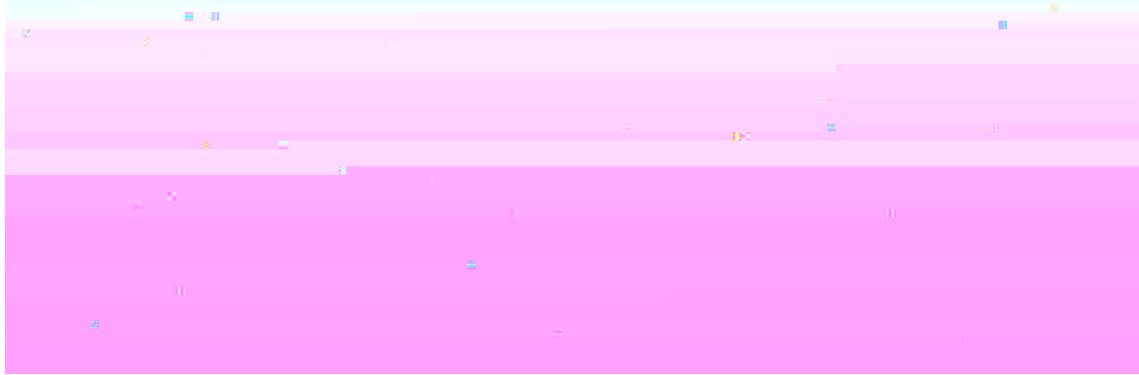
Housman, J.G., Downe, A.E.R., 1983. Activity cycles and the control of four digestive proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology* 29, 141–148.

Lane, N., Harrison, J.B., 1979. An unusual cell surface modified double plasma membrane. *Journal of Cell Science* 39, 355–372.

Lara, P.A., Lima, U., Ribeiro-Silva, G., Almeida, F.C., Braga, M., Magalhães, F.C., Oliveira, P.L., Damsa-Petretski, M., 2003. Intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle. *Journal of Experimental Biology* 206 (Pt 10), 1707–1714.

Logullo, C., Moraes, J., Damsa-Petretski, M., Vaz Jr, I.S., M...

- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C.M.S., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. Haem detoxification by an insect. *Nature* 400, 517–518.
- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Braga, C.M.S., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2000. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Letters* 473, 107–110.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S., 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry* 18, 423–434.



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](#)