

GISELLE DE ALMEIDA OLIVEIRA

**METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM INSETOS MACHOS:
INCORPORAÇÃO PELOS TESTÍCULOS E TRANSFERÊNCIA DE
LIPÍDIOS DURANTE A CÓPULA.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GISELLE DE ALMEIDA
OLIVEIRA

METABOLISMO DE LÍPIDIOS EM INSETOS
MACHOS: INCORPORAÇÃO PELOS
TESTÍCULOS E TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDIOS
DURANTE A CÓPULA

UFRJ
V. II

Giselle de Almeida Oliveira

Metabolismo de lipídios em insetos machos: incorporação pelos testículos e
transferência de lipídios durante a cópula.

Volume I

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química Biológica do Instituto de
Bioquímica Médica, Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências
(Química Biológica).

Orientador: Geórgia Correa Atella

Rio de Janeiro

2007

Oliveira, Giselle de Almeida.

Metabolismo de lipídios em insetos machos: incorporação pelos testículos e transferência de lipídios durante a cópula / Giselle de Almeida Oliveira. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM 2007.

xx , 188 f.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2007.

Orientador: Geórgia Correa Atella

1. *Rhodnius prolixus* 2. *Locusta migratoria* 3. Lipoforina 4. Testículos – Teses. I. Atella, Geórgia Correa (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Giselle de Almeida Oliveira

Metabolismo de lipídios em insetos machos: incorporação pelos testículos e transferência de lipídios durante a cópula.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Rio de Janeiro,.....de..... de 2.....

Geórgia Correa Atella, Professor Adjunto, Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ.

Orientadora

Sirlei Daffre, Professor Associado, Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

Mécia Maria de Oliveira, Professor Visitante, Departamento de Bioquímica – UERJ.

Luís Felipe Ribeiro Pinto, Professor Adjunto, Departamento de Bioquímica – UERJ.

Robson Queiroz Monteiro, Professor Adjunto, Instituto de Bioquímica Médica –

UFRJ.

(Revisor e suplente)

Ednildo de Alcântara Machado, Professor Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos

Chagas Filho – UFRJ.

(Suplente externo)

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica de Lipídios do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da professora Geórgia Correa Atella, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

AGRADECIMENTOS

Eu sei que nesta vida nunca alcançamos algo sem a ajuda direta ou indireta de alguém. No doutorado, não seria diferente. Por isso quero dedicar esta parte da tese a lembrar de pessoas que de alguma forma contribuíram com este trabalho. Apesar do meu jeito anti-social, grosseiro e intimidador; eu aprendi muito com todos vocês e espero que me perdoem, pois não lembrarei dos nomes de todos.

OBRIGADO!

- a Geórgia, minha orientadora desde a Iniciação Científica. Obrigado por você ter me dado a oportunidade de ingressar na pesquisa. Isso realmente fez diferença em minha vida. Obrigado por você tolerar minhas ausências e o meu jeito introvertido de ser. Eu te agradeço pelo seu carinho especialmente quando eu estive fora do país. Muito obrigado!

- aos professores Mário, Kátia, Masuda e Pedro que sempre têm algo a nos ensinar.
 - ao Prof. Horácio que montou o túnel de vento (ou aparelho de tortura de barbeiros) e possibilitou todos os experimentos de vôo. Obrigado por você sempre estar disponível para qualquer dúvida e pelos seus papos meio “loucos”. Saiba que eu gosto muito de você.
 - ao Prof. Robson Monteiro por ser o revisor desta tese. Obrigado pela sua compreensão em fazer meu parecer à distância.

- a Aline, que ajuda a todos (os ICs e os colaboradores que a Geórgia arruma) com esse jeitinho paciente e meigo de ser. Gostei de te ver dar a volta por cima. Presta atenção: não se esqueça da sua própria tese, hein?!

- aos demais membros do grupo da Gê, ou melhor, do “LBLL” (Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas): Paulinha, Nuccia, Nicole, Karla (por seus conselhos profissionais sempre úteis), Livia (e seu bom humor constante), Michele, Juliana e o bendito fruto Alessandro. Obrigado pela hemolinfa que retiraram para mim. Valeu gente!

- ao Daniel e a Evelize que se foram, mas deixaram seus ensinamentos comigo. Depois que entrei no doutorado, eu passei a entendê-los muito melhor. Obrigado!

- a Raquel que foi minha “orientadora” nos experimentos de fosforilação durante a cópula. Infelizmente, eu não consegui continuá-los; mas espero que esta idéia não seja esquecida. Desculpe se não te ajudei mais com o insetário e o biotério. Eu sei que o tempo que você investiu neles prejudicou o andamento da sua tese. Saiba que eu torço muito por você. Espero que o seu grupo te valorize mais.

- Ah, e ao Alan Barbosa que sempre diz NÃO, bate o pezinho, chuta com a botinha, mas, no fim das contas, ajuda.

- aos demais membros do Laboratório do Prof. Mário: Alan Brito, Felipe (minha primeira banca), Ricardo Goiaba, André e Dona Cleusa.

- a Lize, minha companheira de 696. Obrigado pelas conversas, conselhos e opiniões (afinal, descobri que você tem opinião para tudo). Você trouxe mais alegria aos nossos laboratórios com esse seu humor fantástico, cheio de histórias malucas e desdobramentos incríveis baseados somente na sua criatividade. Você nos leva a viajar nesta sua maluquice também. Não se esqueça dos amigos quando abrir o BTC (*Brazilian traditional center*) em Cronulla.

- a Denise, pela sua bondade e generosidade. Dedê, eu espero que os experimentos com as glândulas tenham futuro.
- a Lílian e Heloísa, que são pacientes com nossos pedidos e nossas bagunças. Obrigado por todo suporte técnico e psicológico (porque não?!) que possibilitam o andamento de nossos projetos.
- ao Júnior e a Litiane que cuidam da colônia de *Rhodnius* e, por um tempo, me aturaram também no insetário de *Aedes*. Eu agradeço pelas nossas conversas animadas sobre o BBB, novelas, o pai da Litiane, e tudo mais. Obrigado meninos!
- aos demais membros do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Paula, Anne, Renata, Roberto, Márcia e Maya.

- ao Petter e seu humor venenoso, cheio de boas sacadas, mas com a elegância de um lorde inglês (apesar de ser do clã von Entringer).
- a Rachelzinha, sempre choramingando, pelo seu jeitinho único de ser, que é sempre alvo das nossas brincadeiras.
- aos demais integrantes do grupo da Prof^a. Kátia (atuais ou não): Luciano, David, Bob, Felipe Saraiva, Michele e Dimitri.

- a **toda turma dos que odeiam quem nasceu na década de 80**, por todas as trapalhadas que nós somos capazes de fazer. Agora, somos da pasta velha.

- a todos dos laboratórios dos professores Pedro, Marcos Sorgine, Gabriela, Marcus e Aurélio: Cristine, Maria Clara, Zé, Renatinha, Angélica; e todos aqueles que eu não lembro ou não sei o nome.
- a Prof^a. Suzete Bresan que me ajudou com a contagem dos espermatozoides.
- a Dona Joana que organiza com carinho todo ano o melhor churrasco de fim de ano do Instituto. Obrigado pelo seu sorriso e por cuidar de nossas vidrarias.

- as minhas amigas da Uned-Nilópolis, atual CEFETEq, que não se esquecem de mim e torcem pelo meu sucesso: Érika, Priscilla, Aline e Renata.
- aos meus amigos da graduação. De vez em quando, nós nos esbarramos nos corredores do CCS, cada um cuidando de sua vida, mas sempre desejando o melhor para os amigos da biologia: Lucimar (que também enfrentou o PDEE), Viviane, Igor, Vivian e Luciana.
- a Martinha, minha amiga de longa data. Obrigado pela sua torcida!

- aos meus irmãos: Jorge Luís, Kátia e Eduardo.
- ao meu tio José Carlos, ou Luca, que cuidou da minha avó e me permitiu escrever esta tese. Mais sorte ao Botafogo!
- a minha avó Olga com quem esta tese compartilhou a minha atenção. Que Deus sempre te proteja. E... Cala a boca, fera da Penha!
- ao meu pai Mauro, que cuidou muito bem dos meus filhinhos durante a minha viagem. Obrigado, pai, você sabe o quanto eles são preciosos para mim.
- a minha mãe Jurema que sempre me ajuda, apóia, não entende, mas apóia mesmo assim. A pessoa mais presente em minha vida, companheira de viagens, agora internacionais, que chique! Obrigado mãe por você ser uma heroína em minha vida. Agradeço a Deus por que te fez....
- aos meus passarinhos Quin-quin e Tati que infelizmente se foram enquanto estive fora. Não esquecerei de vocês.

- aos meus filhinhos, Duque e Nina, que são as alegrias de minha vida. Como eu senti saudades de vocês enquanto estive fora. Oro a Deus para que me dê os meios para cuidá-los. Obrigado pelas infinitas apresentações de bichinhos, latidos e balançadas de rabinhos de todo santo dia. Mamãe ama vocês!

- a Deus que me deu forças para continuar.

I would like to thank all people in Netherlands for the support during my stay in this country. Thanks:

- Dick, for the opportunity to work in your lab. Thanks you very much for all your kindness and understanding.

- Kees, cara valente. I know that we didn't start on the right foot but we managed it very well. Thanks for your supervision and attention. I enjoyed our chats about dutch and brazilian history.

- Wil, mi amigo de español. Gracias por su amistad e cariño. Tu es muy simpático. Me gustó conocerte.

- Jan who was always teasing me. Thanks for all help with HDLp purification. Your amazing sense of humor made my staying in *stofw* much more pleasant. Tea time!

- Marcelle, thanks for all your support in the lab. I know that you and Jan, in some way, took care of me. I will never forget Keukenhof.

- Marcel, Masja, Yvonne, Sigrid, Jana, Anne, Mirna and Linda.

- Cor, Henk and Ko for the insect care and good chats.

- All people from Endocrinology.

- Miriam van Hattum for all your help and patience. Thanks a lot!

- All people from Augustinuskerk: Wilson, Angie, Rosa, Eric, Esther, Phil, Tereza, the Mexican boys, Vanessa and Carlos. You are in my heart, guys.

- aos meus amigos brasileiros de Uithof que me ajudaram tanto: Fernanda, Fernando e Marcelo. Que saudade de vocês!

- All people from Grote: Steph, Miriam, Moreno, Gregory, Adam, Elephtheria, Yann, Liu Ping, the girls from Taiwan, Lan, Charlie, Xavier, Patrick and Martin.

- Vini for Maastricht.

- Alessandra, Márcia e Gabi. Não esquecerei o fim de ano que passamos juntas.

- Eunice, Sueli, Nancy, Juliana e Junior que tanto me ajudaram em Amsterdam. Obrigado pela generosidade de vocês.

DANK U WEL!

RESUMO

Esta tese aborda o papel da lipoforina (Lf) no metabolismo de lipídios em machos e durante a cópula de insetos. Os resultados obtidos com a injeção de lipoforina marcada radioativamente nos lipídios (^{32}P -Lf, ^3H -Lf) ou na parte protéica (^{125}I -Lf) em machos de *Rhodnius prolixus* mostraram que a partícula inteira de lipoforina é internalizada pelos testículos em diferentes cinéticas. A presença das apolipoforinas em homogenatos de testículos foi detectada por *Western Blotting*. Experimentos de microscopia de epifluorescência revelaram a localização da lipoforina e seus lipídios nos testículos. O isolamento dos espermatozoides de testículos de machos injetados com ^3H -Lf mostrou a utilização de ^3H -lipídios neutros na espermatogênese. A inibição da internalização da ^{125}I -Lf a 4°C e a competição entre a ^{32}P -Lf e um excesso de lipoforina não-marcada pela ligação aos testículos indicam que a incorporação da lipoforina por este órgão é um processo dependente de energia e que envolve um receptor específico. Em um projeto de colaboração, a presença de um receptor de lipoforina, o LpR, em testículos de *Locusta migratoria* foi detectada. Experimentos de microscopia indicam que os testículos deste inseto são capazes de endocitar a lipoforina nas fases do desenvolvimento em que o LpR é expresso.

Também avaliamos a transferência de lipídios dos machos às fêmeas durante a cópula de *R. prolixus* que foi estudada através da injeção da ^3H -Lf em machos e posterior cópula com fêmeas virgens não-radioativas. Os ^3H -lipídios neutros foram encontrados nas espermatecas das fêmeas. Porém nenhuma transferência de radioatividade ocorreu quando ^{32}P -Lf ou ^{125}I -Lf foram injetadas. Adicionalmente, após injeção da ^3H -Lf em machos e posterior cópula, encontrou-se radioatividade na hemolinfa das fêmeas e em ovos postos confirmando a utilização dos lipídios provenientes da lipoforina na espermatogênese. O vôo reduziu a incorporação de lipídios pelas gônadas em machos e fêmeas e, por conseguinte, aumentou a transferência lipídica aos músculos de vôo. Além disso, o vôo de machos diminuiu a transferência de lipídios e espermatozoides dos machos para as fêmeas durante a cópula. Este conjunto de eventos induzidos pelo vôo levou a uma diminuição da oviposição.

Esse estudo é uma contribuição para o entendimento da bioquímica e fisiologia envolvidas na espermatogênese e cópula em insetos.

ABSTRACT

In the present work, we studied the role of lipophorin (Lf) in the lipid metabolism of insect males and during mating. The injection of a lipophorin labeled radioactively in the lipid amount (^{32}P -Lf, ^3H -Lf) or in the protein amount (^{125}I -Lf) into adult males of *Rhodnius prolixus* showed that the entire lipophorin particle is internalized by testis in different rates. Western blotting of testes total homogenates revealed the presence of apolipophorin I (apoLp-I) and apolipophorin II (apoLp-II) inside the tissue. Using double fluorescently labeled Lp, we observed a co-localization of the imported Lp and its lipids in testes. The isolation of spermatozoa from males injected with ^3H -Lf showed the utilization of lipids from lipophorin in spermatogenesis. The internalization of ^{125}I -Lf internalization by testes was blocked at 4°C . Besides, lipophorin uptake by testes was also inhibited by an excess of unlabeled Lp, but not by bovine serum albumin. Together these findings indicate that lipophorin uptake by testes is an energy-dependent process and involves the participation of a specific receptor. Through a collaboration project, the presence of a lipophorin receptor, LpR, was detected in *Locusta migratoria* testis. Microscopy experiments indicate that lipophorin endocytic uptake only takes place in testes from development stages which LpR is expressed.

In a further investigation, the transfer of lipids during *Rhodnius prolixus* mating was studied by means of the injection of ^3H -Lf into adult males followed by mating assays. ^3H -neutral lipids were found in female spermatheca. However no transfer was observed when ^{125}I -Lf or ^{32}P -Lf was injected. Furthermore, after the injection of ^3H -Lf into males and mating, radioactivity was detected in female hemolymph and laid eggs. These evidences confirm the utilization of lipophorin derived lipids in spermatozoa production. Flight activity was able to diminish the lipid transfer to testes and ovaries. An increase of lipid delivery to flight muscles was observed during the exercise. Moreover, flight activity of males decreased the transfer of lipids and spermatozoa from males to females during mating. Consequently, a decrease of oviposition was verified.

This dissertation is a further contribution to the understanding of the biochemistry of physiological process such as spermatogenesis and mating in insects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado do transporte lipídico mediado por lipoproteínas em mamíferos.....	3
Figura 2 – Esquema simplificado da transferência de lipídios durante o vôo.....	8
Figura 3 – Esquema dos receptores LDLR e LpR.....	11
Figura 4 – Esquema dos aparelhos reprodutores de <i>R. prolixus</i>	28
Figura 5 – Incorporação de ³² P-fosfolipídios da ³² P-Lf por diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i>	38
Figura 6 - Incorporação de ³² P-fosfolipídios da ³² P-Lf pelos testículos em diferentes dias após a alimentação.....	39
Figura 7 – Cinética de incorporação de ³² P-fosfolipídios pelos testículos.....	41
Figura 8 – Cinética de incorporação de ³ H-lipídios neutros pelos testículos.....	42
Figura 9 - Cinética de incorporação de ¹²⁵ I-Lf pelos testículos.....	44
Figura 10 – Detecção da Lf nos testículos por <i>Western Blotting</i>	45
Figura 11 – Composição dos lipídios da Lf incorporados pelos testículos.....	47
Figura 12 – Ensaio de ligação da ³² P-Lf aos testículos.....	48
Figura 13 – Localização da Lf fluorescente (FITC-Lf) e da fosfatidiletanolamina (Texas Red-FE) nos testículos.....	51
Figura 14 – Localização da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) e do ácido palmítico (AG-BODIPY) nos testículos.....	52
Figura 15 – Localização da Lf fluorescente (Texas Red-Lf) e da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) nas vesículas seminais.....	53
Figura 16 – Incorporação dos lipídios provenientes da ³ H-Lf nas frações de espermatozóides (A) e fluido seminal (B) dos testículos de <i>R. prolixus</i>	54

Figura 17 – Presença do receptor LpR em testículos de <i>L. migratoria</i> por <i>Western Blotting</i> – condições desnaturantes.....	58
Figura 18 – Presença do receptor LpR em testículos de <i>L. migratoria</i> por <i>Western Blotting</i> – condições não-desnaturantes.....	59
Figura 19 – Presença do receptor LpR em testículos de <i>L. migratoria</i> ao longo dos dias após a muda.....	60
Figura 20 – Endocitose da HDLp fluorescente nos testículos de jovens adultos no 1º dia após a muda.....	62
Figura 21 – Endocitose da HDLp fluorescente nos testículos de jovens adultos no 10º dia após a muda.....	64
Figura 22 – Endocitose da HDLp fluorescente pelos testículos de <i>L. migratoria</i> com tratamento com tripsina.....	68
Figura 23 – Incubação dos testículos de <i>L. migratoria</i> com LDLp fluorescente.....	69
Figura 24 – Ensaio de ligação e endocitose da OG-HDLp pelos testículos de <i>L. migratoria</i>	71
Figura 25 - Ensaio de ligação e endocitose da Dil-HDLp pelos testículos de <i>L. migratoria</i>	73
Figura 26 – Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp pelos testículos de <i>L. migratoria</i> por competição com HDLp não-marcada de <i>L. migratoria</i> , de <i>R. prolixus</i> ou albumina.....	75
Figura 27 – Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp por cloreto de amônio..	78
Figura 28 – Ensaio de inibição da endocitose da Dil-HDLp por cloreto de amônio...	80
Figura 29 – Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp por suramina.....	82
Figura 30 – Transferência de ³² P-fosfolipídios provenientes da ³² P-Lf após a cópula de <i>R. prolixus</i>	85

Figura 31 – Transferência de ^3H -lipídios neutros provenientes da ^3H -Lf após a cópula de <i>R. prolixus</i>	86
Figura 32 – Transferência de ^{125}I -Lf após a cópula de <i>R. prolixus</i>	87
Figura 33 – Localização da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) e da Lf fluorescente (Texas Red-Lf) na espermateca após a cópula.....	89
Figura 34 – Localização do ácido palmítico (AG-BODIPY) e da fosfatidiletanolamina (Texas Red-FE) na espermateca após a cópula.....	90
Figura 35 – Capacidade de síntese de fosfolipídios pelas espermatecas a partir de precursores radioativos.....	93
Figura 36 – Composição dos lipídios transferidos durante a cópula e presentes na espermateca da fêmea.....	94
Figura 37 – Contagem de espermatozoides transferidos às espermatecas durante a cópula ao longo dos dias de reunião dos casais.....	95
Figura 38 – Presença de ^3H -lipídios neutros em fêmeas de <i>R. prolixus</i> após a cópula.....	96
Figura 39 – Produção de espermatozoides pelos testículos e a capacidade de vôo de machos adultos de <i>R. prolixus</i> ao longo dos dias após a alimentação.....	101
Figura 40 – Efeito do vôo de machos na transferência de ^{32}P -fosfolipídios (A) e ^3H -lipídios neutros (B) para os testículos e músculos de vôo.....	102
Figura 41 - Efeito do vôo de fêmeas na transferência de ^{32}P -fosfolipídios (A) e ^3H -lipídios neutros (B) para os ovários e músculos de vôo.....	103
Figura 42 – Produção de espermatozoides pelos testículos após o vôo exaustivo de machos adultos de <i>R. prolixus</i>	105
Figura 43 – Influência do vôo dos machos na transferência de lipídios às fêmeas durante a cópula.....	106

Figura 44 – Influência do vôo dos machos na transferência de espermatozoides às espermatecas das fêmeas durante a cópula.....	107
Figura 45 – Efeito do vôo dos machos na oviposição.....	108
Figura 46 – Efeito do vôo das fêmeas na oviposição.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil lipídico de ovários e músculos de vôo após o vôo.....	104
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

Acp – proteína das glândulas acessórias
AG-BODIPY – ácido graxo conjugado ao BODIPY
AKH – hormônio adipocinético
ApoLf-I – apolipoproteína I
ApoLf-II – apolipoproteína II
ApoLf-III – apolipoproteína III
CETP – proteína transferidora de ésteres de colesterol
CHAPS – 3-((3-colamidopropil) dimetilamônio) -1-propanosulfonato
cpm – contagens por minuto
DAPI – 4',6-diamidina-2-fenilindol
Dil – 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina percolato
DMSO – dimetilsulfóxido
DP – desvio padrão
dpm – desintegrações por minuto
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EGFD – domínio EGF: fator de crescimento epidermal
ERC – compartimento de reciclagem de endocitose
FABP – proteína ligadora de ácidos graxos
FC-AG-BODIPY – fosfatidilcolina com ácido graxo conjugado ao BODIPY
FITC – fluoresceína
HDL – lipoproteína de alta densidade
HDLp – lipoproteína de alta densidade
ICD – cauda citoplasmática intracelular
IDL – lipoproteína de densidade intermediária
LBD – domínio de ligação
LBTI – inibidor de tripsina de feijão manteiga
L5 – larvas de 5º estágio de *Locusta migratoria*
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LDLp – lipoproteína de baixa densidade
LDLR – receptor de LDL
Lf – lipoproteína

^3H -Lf – lipoforina marcada com ^3H -ácido palmítico nos lipídios neutros
 ^{125}I -Lf – lipoforina marcada com ^{125}I -iodeto de sódio na porção protéica
 ^{32}P -Lf – lipoforina marcada com fosfato inorgânico ^{32}P nos fosfolípidios
LpR – receptor de lipoforina
LTP – proteína transferidora de lipídios
OG – *Oregon Green* 488 conjugado ao ácido carboxílico
OLGD – domínio de glicosilação
PBS – tampão fosfato de sódio
PVDF – membrana de polivinil fluoreto
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SBTI – inibidor de tripsina de soja
SDS – dodecil sulfato de sódio
TBS – tampão tris
TLC – cromatografia em camada fina
TMD – domínio transmembrana
Texas Red-FE – fosfatidiletanolamina conjugada a Texas Red
Texas Red-Lf – lipoforina marcada na porção protéica com Texas Red
VHDLp – lipoforina de muito alta densidade
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Transporte de lipídios em mamíferos.....	1
1.2 Transporte de lipídios em insetos.....	5
1.3 Receptores da lipoforina.....	9
1.4 A espermatogênese.....	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 METODOLOGIA	17
- Experimentos utilizando <i>Rhodnius prolixus</i>	
3.1 Insetos.....	18
3.2 Monitoramento do voo em laboratório.....	18
3.3 Purificação da Lf de <i>R. prolixus</i>	18
3.4 Purificação do fosfato inorgânico radioativo.....	19
3.5 Preparação da ³² P-Lipoforina (³² P-Lf).....	19
3.6 Preparação da ³ H-Lipoforina (³ H-Lf).....	20
3.7 Preparação da ¹²⁵ I-Lipoforina (¹²⁵ I-Lf).....	20
3.8 Preparação da Lf marcada com fluorescência.....	20
3.8.1 Marcação com Texas Red e fluoresceína (FITC) na parte protéica.....	20
3.8.2 Marcação fluorescente da Lf na porção lipídica.....	21
3.9 Dosagem de proteína.....	21
3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	21
3.11 Extração de lipídios e cromatografia em camada fina (TLC).....	22
3.12 Microscopia de epifluorescência.....	22
3.13 Incorporação de ³² P-fosfolipídios por diferentes órgãos e ao longo dos dias após a alimentação.....	23

3.14 Cinética de incorporação de ^{32}P -fosfolipídios, ^3H -lipídios neutros, ^{125}I -Lf peolos testículos.....	23
3.15 Ensaio de ligação.....	24
3.16 Detecção da Lf por <i>Western Blotting</i>	24
3.17 Composição dos lipídios da Lf incorporados pelos testículos.....	25
3.18 Visualização da Lf e lipídios fluorescentes nos testículos.....	25
3.19 Isolamento dos espermatozóides.....	25
3.20 Transferência de lipídios durante a cópula.....	26
3.21 Capacidade de síntese de fosfolipídios pelas espermatecas a partir de precursores radioativos.....	27
3.22 Composição dos lipídios transferidos às espermatecas durante a cópula.....	27
3.23 Capacidade de vôo de machos de <i>R. prolixus</i>	28
3.24 Influência do vôo na transferência de lipídios da Lf aos testículos/ovários e músculos de vôo.....	28
3.25 Produção de espermatozóides e a influência do vôo.....	29
3.26 Influência do vôo na transferência de espermatozóides durante a cópula e na oviposição.....	29
3.27 Influência do vôo na transferência de espermatozóides durante a cópula e na oviposição.....	30

- Experimentos utilizando *Locusta migratoria*

3.28 Os insetos.....	30
3.29 Purificação de HDLp e LDLp.....	30
3.30 Marcação de HDLp e LDLp.....	31
3.31 Ensaio de endocitose e microscopia de fluorescência.....	31
3.32 Preparação das frações de membrana.....	31
3.33 Detecção do LpR por <i>Western Blotting</i>	32
3.34 Ensaio de ligação e endocitose.....	33
3.35 Ensaio de inibição da endocitose por competição.....	34
3.36 Ensaio de inibição da endocitose com suramina e cloreto de amônio.....	34
3.37 Ensaio de endocitose com tripsina.....	35

4 RESULTADOS	36
Parte I.....	36
Parte II.....	55
Parte III.....	83
Parte IV.....	97
5 DISCUSSÃO	110
6 REFERÊNCIAS	125
7 ANEXOS	136
7.1 Artigo I.....	137
7.2 Artigo II.....	150
7.3 <i>Curriculum vitae</i>	184

INTRODUÇÃO



1- INTRODUÇÃO

1.1 TRANSPORTE DE LIPÍDIOS EM MAMÍFEROS

A transferência de lipídios é um processo de grande importância à sobrevivência dos organismos vivos. Isto porque os lipídios são moléculas que estão relacionadas às reservas de energia, formação de membranas biológicas, produção de hormônios e sinalização celular. Uma vez que os lipídios são sintetizados e absorvidos em sítios distintos dos sítios de estoque e utilização, torna-se necessário a mobilização destas moléculas de caráter hidrofóbico em meio aquoso. Em animais, as moléculas responsáveis pelo transporte lipídico são as lipoproteínas. Estas vêm sendo estudadas principalmente em vertebrados no que diz respeito ao transporte de colesterol, triacilglicerol e fosfolipídios (WIRTZ, 1991).

Os mamíferos possuem uma variedade de lipoproteínas que apresentam composições e funções distintas (FRAYN, 1996; GANONG, 2001; JONAS, 2002; VANCE, 2002). Os lipídios derivados da dieta são incorporados pelos quilomícrons produzidos pelos enterócitos. Os quilomícrons apresentam densidade menor que 0,94 g/mL, e são compostos de uma única cópia da apolipoproteína livre B-48 (apoB-48), várias cópias de apoA, apoC e apoE (também apolipoproteínas livres) e triacilglicerol como componente lipídico majoritário. Os quilomícrons são transportados para o tecido adiposo, onde ocorre a hidrólise de triacilglicerol no meio extracelular pela ação da lipoproteína lipase (FIELDING & FIELDING, 2002). Os ácidos graxos livres resultantes são incorporados pelos adipócitos e estocados novamente na forma de triacilglicerol (Figura 1).

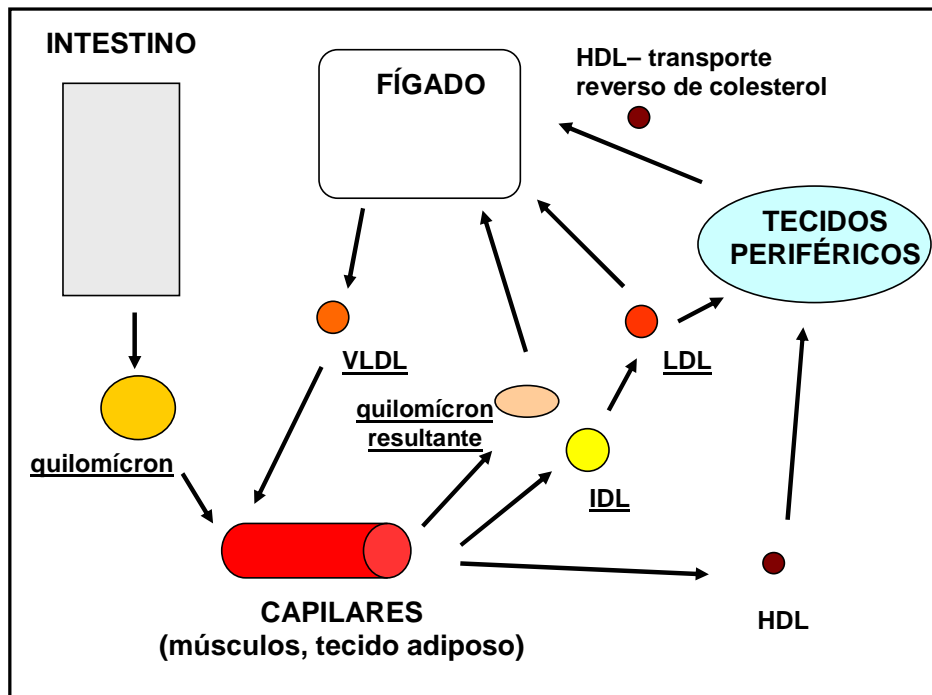


Figura 1 – Esquema simplificado do transporte lipídico mediado por lipoproteínas em mamíferos. Quilomícrons e VLDL são produzidos no intestino e fígado, respectivamente. Ambos são convertidos em partículas de maior densidade após hidrólise extracelular mediada pela lipoproteína lipase no tecido adiposo. Durante este processo, a HDL incorpora as apolipoproteínas livres e via ação da CETP, se torna rica em ésteres de colesterol. O fígado incorpora e degrada os quilomícrons resultantes e a LDL, sendo esta também capaz de ser endocitada nos tecidos periféricos (Adaptado de RODENBURG & VAN DER HORST, 2005). HDL: *high density lipoprotein*; IDL: *intermediate density lipoprotein*; LDL: *low density lipoprotein*; VLDL: *very low density lipoprotein*.

Durante este processo de entrega seletiva de lipídios, as apolipoproteínas livres e algumas classes de lipídios se desassociam dos quilomícrons e são incorporados por outra lipoproteína, a HDL (*high density lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade: 1,063- 1,21 g/mL). Os quilomícrons resultantes, somente com a apoB-48, incorporam ésteres de colesterol, provenientes da transferência mediada por HDL, e são transportados até o fígado onde são degradados (FIELDING & FIELDING, 2002).

O fígado produz a lipoproteína de muito baixa densidade, a VLDL (*very low density lipoprotein*), uma partícula que compreende uma única cópia de apoB-100, uma apolipoproteína fixa à partícula, e múltiplas apolipoproteínas livres incluindo apoE (SHELNESS & SELLERS, 2001). A VLDL apresenta uma densidade de 0,94-1,006 g/mL e contém principalmente triacilglicerol mas também colesterol, ésteres de colesterol e fosfolipídios (JONAS, 2002).

A VLDL também entrega seletivamente seus lipídios ao tecido adiposo em um processo em que a HDL também incorpora as apolipoproteínas livres e lipídios. A partícula resultante é a lipoproteína de densidade intermediária (IDL – *intermediate density lipoprotein*), que posteriormente é convertida em lipoproteína de baixa densidade (LDL – *low density lipoprotein*) com densidade de 1,006 a 1,063 g/mL. Tanto na conversão de quilomícrons a VLDLs, como na conversão de IDL em LDL, a HDL recebe lipídios e apolipoproteínas se tornando então rica em ésteres de colesterol. Estas partículas de HDL são direcionadas ao fígado onde serão degradadas (SCHNEIDER, 2002).

Através da ação de uma enzima transferidora de ésteres de colesterol (CETP – *cholesterol ester transfer protein*), estes são transferidos à IDL e, conseqüentemente, à LDL que, desta forma, apresenta um alto teor destes lipídios.

Cerca de 70% do colesterol plasmático circula associado à LDL. O único componente protéico da LDL é a apolipoproteína apoB-100 que é capaz de interagir com o receptor de LDL (LDLR) nos tecidos periféricos e hepatócitos. O LDLR medeia a endocitose das partículas de LDL nas células e leva à degradação destas moléculas via ação lisossomal (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; FIELDING & FIELDING, 2002; RODENBURG & VAN DER HORST, 2005).

1.2 TRANSPORTE DE LIPÍDIOS EM INSETOS

Nos insetos, o transporte de lipídios é mediado pela lipoproteína majoritária da hemolinfa: a lipoforina (Lf). Esta lipoproteína é responsável pelo transporte de várias classes de lipídios entre os tecidos envolvidos na sua absorção, estocagem e utilização (BEENAKKERS e cols., 1985; CHINO, 1985; SHAPIRO e cols., 1988).

Nas espécies de insetos já estudadas, a Lf é sintetizada e secretada pelo corpo gorduroso (PRASAD e cols., 1986a; WEERS e cols., 1992) sendo composta por duas apoproteínas: apolipoforina I (apoLf-I) de 250 kDa e apolipoforina II (apoLf-II) de 80 kDa. Juntas estas apolipoproteínas compreendem cerca de 60% do peso total da partícula, estando normalmente na proporção de 1:1 (CHINO, 1985). Uma terceira apolipoproteína, a apolipoforina III (apoLf-III, 18 kDa), pode estar presente em adultos de algumas espécies, incluindo *R. prolixus* (GONDIM, 1989), cuja proporção na partícula de Lf depende do estado fisiológico do inseto (KAWOOYA e cols., 1984; Weers & Ryan, 2003).

Os principais lipídios presentes na Lf são: diacilglicerol, colesterol, hidrocarbonetos e fosfolipídios (CHINO & KITAZAWA, 1968; PATTNAIK e cols., 1979; CHINO e cols., 1981b, GONDIM e cols., 1989, ATELLA e cols., 1992, ATELLA e cols., 1995). Entretanto, a Lf também é capaz de transportar carotenóides,

precursores do hormônio juvenil e ácidos graxos livres (DE KORT & KOOPMANSCHAP, 1987; SOULAGES & WELLS, 1994, ATELLA e cols., 2000).

A Lf apresenta uma estrutura similar à encontrada nas lipoproteínas de mamíferos. Ela consiste basicamente de um núcleo composto por lipídios apolares como colesterol, hidrocarbonetos e diacilglicerol; envolvido por uma camada de fosfolipídios e apolipoforinas. Além disso, a hemolinfa dos insetos apresenta diversos tipos de Lf que diferem no seu conteúdo lipídico e, em alguns casos, no conteúdo das apolipoforinas associadas. Acredita-se que uma partícula de Lf básica contenha as apolipoforinas e um pequeno conteúdo de fosfolipídios é capaz de receber ou doar quantidades variadas de lipídios resultando em diferentes subespécies de Lf. Entre elas, estão a HDLp (lipoforina de alta densidade - *high density lipophorin*), presente em adultos em repouso, e a VHDLp (lipoforina de muito alta densidade - *very high density lipophorin*) observada em larvas de *Manduca sexta* (PRASAD e cols., 1986; BLACKLOCK & RYAN, 1994).

O papel da Lf durante o vôo de insetos vem sendo muito estudado, uma vez que muitas espécies, como *Manduca sexta* e *Locusta migratoria*, são capazes de realizar vôos prolongados (Figura 3). Conseqüentemente, tornam-se necessários a mobilização e o transporte de fontes de energia para os músculos de vôo de modo a prover o exercício. Os carboidratos são usados nos primeiros 30 minutos de vôo. Após este período, os lipídios se tornam o principal combustível para a atividade de vôo (BEENAKKERS e cols., 1984; BLACKLOCK & RYAN, 1994).

A mobilização dos estoques lipídicos é sinalizada pela liberação de um peptídeo: o hormônio adipocinético (AKH) produzido pela *corpora cardiaca* (BEENAKKERS e cols., 1985). A *corpora cardiaca* é composta por um par de órgãos neurohemais ligados ao cérebro do inseto. Além da função neuronal, esta estrutura

possui células neurosecretoras capazes de sintetizar e estocar o AKH (DIEDEREN e cols., 1987; ZIEGLER e cols., 1991; O'SHEA & RAYNE, 1992). Os peptídeos da família dos AKHs controlam a mobilização de reservas energéticas em situações de necessidade metabólica como o vôo e a muda (OUDEJANS e cols., 1996; ZIEGLER e cols., 1995).

Durante o vôo de insetos, o AKH se liga no corpo gorduroso, a um receptor acoplado à enzima adenilato ciclase induzindo a conversão de ATP em AMP cíclico. O aumento nos níveis de AMP cíclico ativa uma lipase que converte triacilglicerol em diacilglicerol. Estes últimos são transferidos então para a HDLp na superfície do corpo gorduroso num processo facilitado pela LTP (partícula transferidora de lipídios - *lipid transfer particle*) (RYAN & VAN DER HORST, 2000). A LTP é uma lipoproteína de alta densidade que é capaz de mediar a transferência de lipídios do corpo gorduroso à Lf, da Lf para os tecidos e entre duas Lfs de diferentes densidades (RYAN e cols., 1988; VAN HEUSDEN e LAW, 1989; GOLODNE e cols., 2001).

Simultaneamente, moléculas de apoLf-III se associam a esta partícula. Como resultado, forma-se uma partícula maior e menos densa chamada LDLp (lipoforina de baixa densidade - *low density lipophorin*) que apresenta grande capacidade de transportar diacilglicerol para os músculos de vôo (BEENAKKERS e cols., 1981).

Nos músculos de vôo, o diacilglicerol é hidrolisado por uma lipase e os ácidos graxos livres são liberados e se associam a FABP (proteína ligadora de ácidos graxos - *fatty acid binding protein*). Esta proteína leva os ácidos graxos livres até as fibras musculares onde serão utilizados como fonte de energia para a contração muscular via β -oxidação. Com a remoção do diacilglicerol da LDLp, esta é convertida em HDLp liberando as moléculas de apoLf-III. A HDLp pode então retornar ao corpo gorduroso e ser reabastecida com mais diacilglicerol. Portanto, a Lf atua como uma

transportadora reutilizável de lipídios (VAN HEUSDEN e cols., 1987; SURHOLT e cols., 1991; VAN HORST e cols., 2002) (Figura 2).

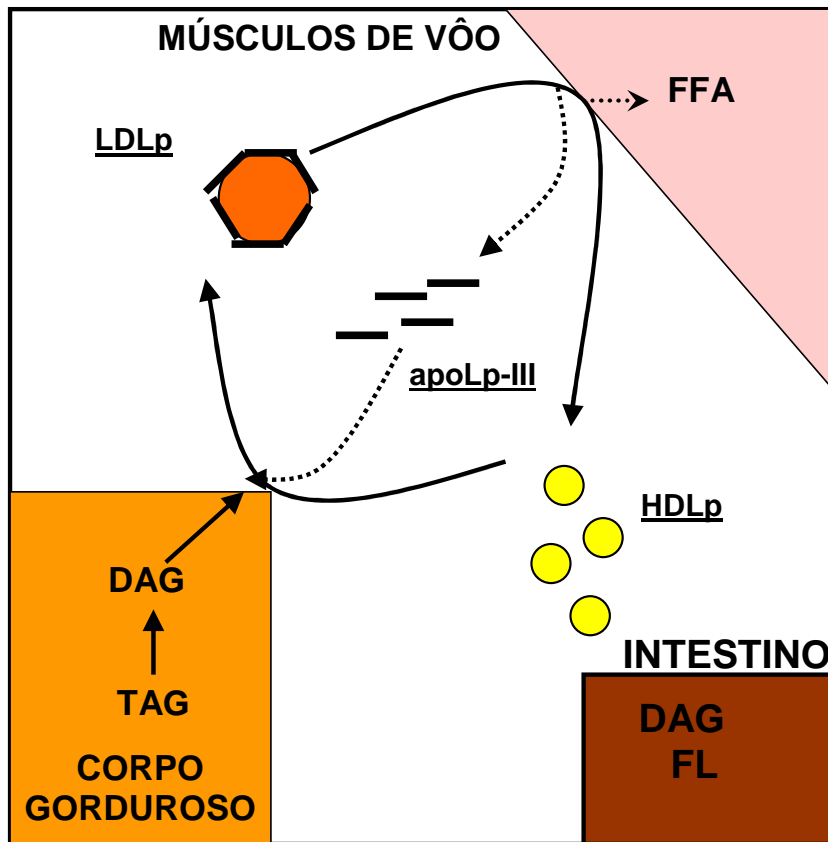


Figura 2 – Esquema simplificado da transferência de lipídios durante o vôo.

A HDLp circulante incorpora DAG provenientes a quebra de triacilglicerol (TAG) no corpo gorduroso e da digestão no intestino. Durante este processo, várias cópias da apoLp-III se associam a partícula, desta forma a HDLp se converte em LDLp. A LDLp transfere diacilglicerol (DAG) seletivamente aos músculos de vôo. Neste órgão, o DAG é hidrolisado no meio extracelular, liberando ácidos graxos livres (FFA) às células e; partículas de apoLp-III e HDLp à hemolinfa (Adaptado de VAN DER HORST e cols., 2002).

Outro importante processo fisiológico dos insetos em que a Lf desempenha um papel fundamental é a ovogênese. Em *Manduca sexta*, os lipídios correspondem a cerca de 40% do conteúdo lipídico do ovo e boa parte destes lipídios é captada pelos ovócitos em desenvolvimento via lipoproteínas hemolinfáticas como a vitelogenina e a Lf. (KAWOOYA & LAW, 1988). Estes autores demonstraram que a LDLp era capaz de transferir seletivamente diacilglicerol aos ovócitos sem internalização das apolipoporinas.

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a Lf de *R. prolixus*, um hemíptero hematófago, entrega fosfolipídios aos ovários durante a ovogênese sem internalização da partícula (GONDIM e cols., 1989). Esta lipoproteína pode então ser reabastecida no corpo gorduroso e intestino médio (ATELLA e cols., 1992; ATELLA e cols., 1995; MACHADO e cols., 1996). Estes trabalhos sugerem que a Lf pode atuar como um transportador reutilizável destes lipídios aos ovários, à semelhança do transporte de diacilglicerol aos músculos de vôo.

1.3 RECEPTORES DA LIPOFORINA

Uma das características principais da Lf é o seu funcionamento como um veículo reutilizável tanto no repouso como no vôo. A HDLp circulante na hemolinfa é capaz de se abastecer dos lipídios liberados pelo corpo gorduroso e seletivamente entregar este conteúdo lipídico para tecidos alvos sem endocitose e degradação por lisossoma (VAN DER HORST e cols., 1993; SOULAGES e cols., 1994; RYAN & VAN DER HORST, 2000; VAN DER HORST, 2002). Em aparente contraste com este conceito de absorção seletiva de lipídios, entretanto, durante o desenvolvimento larval e em jovens adultos de locustas, a endocitose da HDLp mediada por receptor em células do corpo gorduroso foi demonstrada (DANTUMA e cols., 1997).

Endocitose mediada por receptor tem sido proposta tanto em mamíferos como insetos (BROWN e cols., 1997; RODENBURG & VAN DER HORST, 2005). Em mamíferos, a LDL é internalizada via interação com seu receptor (LDLR), sendo posteriormente liberada em endossomas iniciais que se desenvolvem a lisossomas onde a LDL é degradada (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; STOOORVOGEL e cols., 1991, HUSSAIN e cols., 1999). Recentemente, genes para receptores de Lf foram clonados em várias espécies como *Locusta migratoria* (DANTUMA e cols., 1999), *Galleria mellonella* (LEE e cols., 2003) e *Aedes aegypti* (CHEON e cols., 2001; SEO e cols., 2003); e identificados como membros da família de receptores da LDL. Em *L. migratoria*, este receptor foi denominado LpR (*lipophorin receptor*) (DANTUMA e cols., 1999). O LpR apresenta a composição de seus domínios estruturais idêntica a do receptor em mamíferos da VLDL (*very low density lipoprotein*), e ambos os receptores possuem oito repetições consecutivas dos domínios de ligação (VAN HOOFF e cols., 2003) (Figura 3).

Porém, diferente dos outros receptores desta família, o LpR é capaz de reciclar o seu ligante após a internalização. Van Hoof e colaboradores (2002) mostraram por microscopia de confocal que em células de mamíferos que expressam normalmente o receptor para LDL transfectadas com o cDNA do LpR, os destinos da HDLp e da LDL, marcadas fluorescentemente nas porções protéicas, após a internalização são distintos.

Enquanto que a LDL é degradada por ação lisossomal após desligar-se de seu receptor; ambos HDLp e o LpR convergem para um compartimento não-lisossomal do tipo ERC (*endocytosis recycling compartment*) seguindo um caminho de reciclagem tipo transferrina. A transferrina após a dissociação de seus íons ferro é acumulada em grandes vacúolos e re-secretada com $t_{1/2}$ de 7 minutos (MAYOR e

cols., 1993; GHOSH e cols., 1994). No caso da HDLp, com uma $t_{1/2}$ de 13 minutos, a molécula é re-secretada e o LpR retorna a superfície celular. O mesmo fenômeno de reciclagem da HDLp foi observado em experimentos com corpos gordurosos dissecados de *Locusta migratoria* em que o LpR é expresso normalmente (Van Hoof e cols., 2005).

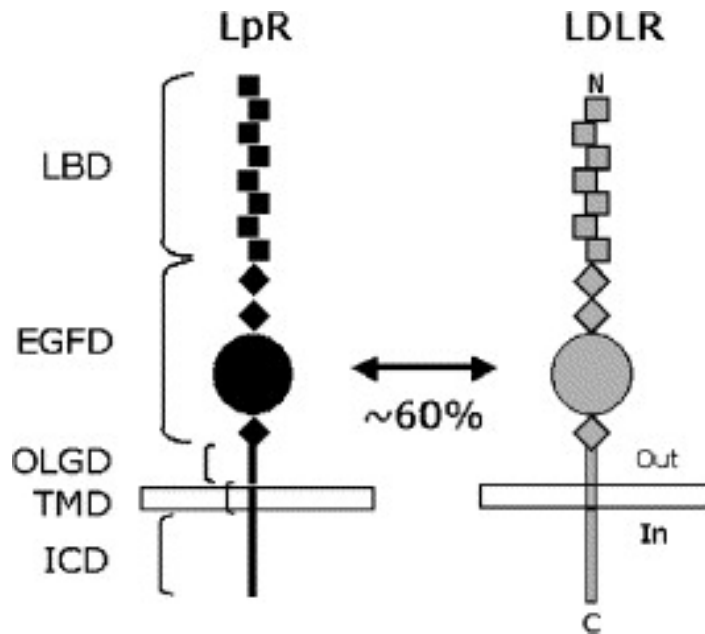


Figura 3 – Esquema dos receptores LDLR e LpR.

Estes receptores apresentam cerca de 60% de similaridade entre as seqüências de aminoácidos.

(C) porção C-terminal; (EGFD) domínio homólogo ao fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*); (ICD) domínio intracelular (*intracellular domain*); (*In*) citoplasma; (LBD) domínio de ligação (*ligand binding domain*); (OLGD) domínio de glicosilação (O-linked glycosylation domain); (*Out*) meio extracelular; (N) porção N-terminal; (TMD) domínio transmembrana (*transmembrane domain*).

1.4 A ESPERMATOGÊNESE E A CÓPULA

Os lipídios são componentes básicos do sêmen contribuindo com a formação das membranas nos espermatozóides e com o metabolismo das células dos testículos (DUMSER, 1980).

Em mamíferos, mostrou-se que a HDL é capaz de transferir ésteres de colesterol às células testiculares para a síntese de testosterona e produção de membranas plasmáticas de espermatócitos (LEVALLET e cols., 1998; FOFANA e cols., 2000; REAVEN e cols., 2000). Esta transferência de lipídios aos testículos é fundamental para o sucesso reprodutivo visto que a composição lipídica dos espermatozóides é um importante fator no sucesso da cópula. Os lipídios das membranas plasmáticas dos espermatozóides são responsáveis pela flexibilidade, mobilidade e propriedades fusogênicas de membrana associadas com a reação do acrossomo e a fertilização (FLESCH & GADELLA, 2000).

Em insetos, os lipídios podem desempenhar diferentes papéis no sistema reprodutivo dos machos. Stanley-Samuelson e colaboradores (1986) demonstraram que ácidos graxos livres podem ser incorporados pelos testículos e convertidos em prostaglandinas no grilo australiano, *Teleogryllus commodus*. Além disso, ácidos graxos livres podem estar envolvidos na síntese de espermatóforos em machos de *Bombus terrestris* L (BAER e cols., 2001). Os espermatóforos são sintetizados por diferentes espécies de insetos incluindo *R. prolixus* (KHALIFA, 1950a) e são receptáculos do sêmen produzido pelos machos a serem deixados no aparelho reprodutor das fêmeas após a cópula. Entre diversas funções, os espermatóforos são utilizados pelos machos, após a transferência do esperma e do líquido seminal durante o acasalamento, para impedir uma nova cópula e assegurar a prole e pelas fêmeas como uma fonte nutricional. Outra função dos lipídios em machos é a de

potenciais reguladores das interações dos componentes do citoesqueleto em espermatócitos (SAUL e cols., 2004). Portanto, o transporte lipídico via Lf pode ser postulado uma vez que há uma demanda lipídica nos testículos.

Durante a cópula, juntamente com o esperma, uma série de moléculas é transferida dos machos para as fêmeas. Estas moléculas usualmente são sintetizadas pelas glândulas acessórias dos machos e desempenham diferentes funções na fêmea (QAZI e cols., 2003). Osanai e Nagaoka (1992) demonstraram a transferência de ATP, ADP e AMP cíclico das glândulas acessórias durante a cópula, e que estes atuam como fontes de energia. Outros trabalhos indicaram a presença de aminoácidos livres e açúcares como a trealose no líquido seminal de *Cimex lectularius* (Rao, 1974) que também atuam como substratos energéticos para os espermatozoides.

Neste contexto, o modelo mais bem estudado é a síntese e transferência das Acps (proteínas das glândulas acessórias – *accessory glands proteins*) em *Drosophila melanogaster*. Estudos moleculares sugerem a presença de 83 genes diferentes para Acps no genoma de *D.melanogaster* que resultariam na transcrição de uma variedade de proteínas como lípases, proteases, glicoproteínas, precursores de hormônios e peptídeos (WOLFNER, 2002). As Acps desempenham diversas funções na fêmea, seja na espermateca (órgão responsável pela estocagem do sêmen), ovários e sistema neuro-endócrino; como estimularem a postura de ovos, melhorarem a estocagem e viabilidade dos espermatozoides, diminuir a atração sexual por outro macho, entre outras (QAZI e cols., 2003).

Neste contexto, não existem relatos na literatura sobre a transferência de lipídios durante a cópula em insetos, ou mesmo sobre o papel de uma lipoproteína no abastecimento lipídico aos testículos durante a espermatogênese de

invertebrados. Esta tese vem então abordar o transporte de lipídios mediado pela Lf aos testículos em insetos a fim de esclarecer a importância dos lipídios na espermatogênese destes organismos e como o vôo pode influenciar este processo.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esta tese tem como objetivo geral o estudo do metabolismo de lipídios em insetos machos através do transporte lipídico mediado pela lipoforina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Parte I:

- a) Caracterizar o transporte de lipídios da Lf aos testículos de *R. prolixus*.
- b) Verificar se os lipídios provenientes da Lf são usados pelos testículos na produção de espermatozóides.

Parte II:

- a) Verificar a presença do receptor LpR em testículos de *L. migratoria*.
- b) Estudar a endocitose de HDLp por este órgão.

Parte III:

- a) Estudar a transferência de lipídios da Lf dos machos às fêmeas durante a cópula em *R. prolixus*.

Parte IV

- a) Analisar a influência do voo de *R. prolixus* no transporte de lipídios aos testículos.
- b) Analisar a influência do voo na produção de espermatozóides pelos testículos.
- c) Verificar a influência do voo na transferência de lipídios durante a cópula.

METODOLOGIA



3- METODOLOGIA

- **EXPERIMENTOS UTILIZANDO *Rhodnius prolixus***

3.1 Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram adultos de uma colônia de *R. prolixus* mantida a 28 °C, com umidade relativa entre 70 e 80% e alimentadas com sangue de coelho em intervalos de 3 semanas.

3.2 Monitoramento do vôo em laboratório

Para tanto, foi construído um túnel de vento baseado no modelo descrito por WEIS-FOGH (1956), composto por uma ventoinha Dayton modelo 1C 180, 115 V, 36 W e 3.030 rpm regulado por um reostato. Foram acoplados a esta ventoinha dois tubos plásticos contendo uma colméia em seu interior de modo a transformar o vento turbulento em laminar. Os insetos foram presos a um fio de aço inoxidável de 1,5 mm e mantidos sob fluxo de ar constante até a exaustão, isto é, até que estes não sejam mais capazes de retomar o vôo contínuo mesmo sendo estimulados; ou por tempos determinados.

3.3 Purificação da Lf de *R. prolixus*

A hemolinfa foi coletada na presença de cristais de feniltiouréia, EDTA 5 mM e uma mistura de inibidores de proteases preparada em NaCl 0,15 M : SBTI (*soybean trypsin inhibitor*) 0,05 mg/mL, LBTI (*lima bean trypsin inhibitor*) 0,05 mg/mL, benzamidina 1 mM e antipaína 0,05 mg/mL (concentrações finais após diluição com hemolinfa). A hemolinfa foi então centrifugada por 5 minutos a 13.000 g. O sobrenadante foi diluído até 7 mL com NaCl 0,15 M num tubo onde foram adicionados previamente 1,75 g de KBr. O material foi centrifugado a 45.000 rpm, a

4°C, por 20 horas num rotor Beckman (Beckman, USA) tipo 70.1 Ti. Ao fim da centrifugação, o gradiente foi fracionado com um tubo capilar ligado a uma bomba peristáltica a partir do topo do tubo. As cinco primeiras frações do gradiente, correspondentes a Lf, foram dialisadas contra PBS (fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) e estocadas em nitrogênio líquido para uso posterior. A preparação assim obtida era monitorada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE) de acordo com LAEMMLI (1970).

3.4 Purificação do fosfato inorgânico radioativo

O fosfato inorgânico radioativo ($^{32}\text{P}_i$) foi obtido da Comissão Nacional de Energia Nuclear (São Paulo, SP) e purificado por meio de uma coluna Dowex 1x-10 (DE MEIS & MASUDA, 1974).

3.5 Preparação da ^{32}P -Lipoforina (^{32}P -Lf)

Insetos adultos foram alimentados com sangue de coelho enriquecido com $^{32}\text{P}_i$ (GONDIM e cols., 1989) em comedouros artificiais (GARCIA e cols., 1975). No terceiro dia após alimentação, a hemolinfa foi coletada e a Lf foi purificada conforme descrito anteriormente. Cintilação líquida foi usada para a determinação da radioatividade das frações contendo Lf.

3.6 Preparação da ^3H -Lipoforina (^3H -Lf)

Ácido palmítico (10 μL , 10 μCi ; atividade específica: 1 mCi/mL, Perkin Elmer, USA) foi injetado com o auxílio de uma seringa Hamilton® em adultos no terceiro dia após alimentação. Após 2 horas, a hemolinfa foi coletada e a Lf purificada conforme descrito anteriormente. Rotineiramente, a ^3H -Lf foi submetida a uma extração de lipídios e análise por cromatografia em camada fina (TLC). As manchas correspondentes a cada lipídio foram extraídas e a radioatividade foi estimada por cintilação líquida. O principal lipídio marcado presente na ^3H -Lf foi o diacilglicerol

(OLIVEIRA e cols., 2006). Nas amostras com ^3H , para o cálculo de conversão de cpm para dpm, foi realizada uma curva padrão de *quenching*.

3.7 Preparação da ^{125}I -Lipoforina (^{125}I -Lf)

Lf purificada foi iodada com ^{125}I -iodeto de sódio (Comissão Nacional de Energia Nuclear), na proporção de 200 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ de proteína, usando Iodo-gen (Sigma Chemical Co, USA) (100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) seguindo as instruções do fabricante. Para remover o iodeto livre, a mistura reacional foi passada em 3 colunas de penefsky (PENEFSKY, 1977) usando Sephadex G-50 (Sigma Chemical Co, USA). A atividade específica da ^{125}I -Lf foi determinada por contador gamma.

3.8 Preparação da Lf marcada com fluorescência

3.8.1 Marcação com Texas Red e fluoresceína (FITC) na parte protéica

Lf purificada foi marcada na parte proteína com o fluoróforo Texas Red (Texas Red-Lf) (Molecular Probes, USA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A Lf foi seca por centrifugação a vácuo e suspensa em 0,15 mL de NaHCO_3 , 0,1 M, pH 9,0; atingindo a concentração final de 10 mg/mL. Adicionou-se a esta solução 70 μL de uma solução de Texas Red 10mg/mL em dimetilformamida. O material foi mantido sob agitação por 18 horas a 4 °C. Após isto, a mistura reacional foi passada em 2 colunas de gel filtração Sephadex G-50 (PENEFSKY, 1977).

A marcação da Lf com FITC (FITC-Lf) (Sigma Chemical Co, USA) foi realizada conforme descrito a seguir.. Cerca de 1 mg de Lf (100-200 μL) foram incubados por 1 hora com 10 μL de uma solução de FITC diluída em DMSO (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e mais 10% do volume total de NaHCO_3 , 1 M, pH 8,3. Posteriormente, a reação foi interrompida com 7 μL de uma solução de hidroxilamina 50 mM sob agitação por 30 minutos. Após isto, a Lf foi separada por gel filtração em penefsky

(PENEFSKY, 1977). A marcação da Lf foi monitorada através de SDS-PAGE observado sob a luz ultravioleta.

3.8.2 Marcação fluorescente da Lf na porção lipídica

Lf purificada foi marcada com Texas Red conjugado a fosfatidiletanolamina, Texas Red (Texas Red-FE) ou fosfatidilcolina conjugada a ácido graxo BODIPY (FC-AG-BODIPY) ou ácido palmítico-BODIPY (AG-BODIPY) (Molecular Probes, USA) como descrito por Martin-Nizard (1987). *Glass beads* contendo 0,1 mg de cada fluoróforo foram incubadas com 1 mg de Lf purificada por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após este período, a mistura foi aplicada em 2 colunas de gel filtração seguidas (PENEFSKY, 1977) para re-isolar a Lf.

3.9 Dosagem de proteína

As concentrações de proteína das preparações foram determinadas pelo método de Lowry e cols. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida (gradiente linear de concentração de 6 a 22,5%) foram realizadas na presença de SDS conforme o método de Laemmli (1970). Os géis foram corados em *Coomassie Brilliant Blue G* 0,3% em metanol 46% e ácido acético 9%; e descorados em ácido acético 7,5% e metanol 5%. Alternativamente, os géis foram corados em *Amido Black* 0,1% em isopropanol 25% e ácido acético 10%; e descorados em ácido acético 7,5% e metanol 5%.

3.11 Extração de lipídios e cromatografia em camada fina (TLC)

Os órgãos coletados foram submetidos à extração de lipídios adicionando-se uma mistura de metanol: clorofórmio: água (2:1:0,8) (BLIGH & DYER, 1959). Após agitação contínua por cerca de 2 horas, a mistura foi centrifugada por 10 minutos em uma centrífuga clínica e o sobrenadante foi coletado. Uma segunda extração foi feita com a mesma mistura, agitando-se por 1 hora, seguida de nova centrifugação. O segundo sobrenadante foi adicionado ao anterior e então 1,0 ml de água destilada e 1,0 ml de clorofórmio foram adicionados. O material foi energicamente agitado e centrifugado por 15 minutos. A fase orgânica (inferior) que continha os lipídios foi então separada com auxílio de uma pipeta Pasteur e seca por arraste em N₂.

Os fosfolipídios foram identificados por cromatografia em camada fina (TLC) pelo sistema de solventes de Horwitz and Perlman, 1977. Já os lipídios neutros foram analisados utilizando-se uma mistura de hexano-éter etílico-ácido acético (60:40:1) como solvente (KAWOOYA & LAW, 1988). As placas foram coradas com vapores de iodo ou com ácido fosfórico como descrito por Ruiz e Ochoa (1997) e analisadas por densitometria (Image Total Lab software, USA). No caso de amostras radioativas, as manchas na placa correspondentes a cada lipídio foram extraídas e a radioatividade foi estimada por cintilação líquida.

3.12 Microscopia de epifluorescência

Os tecidos a serem observados foram dissecados no gelo e lavados com NaCl 0,15 M sempre protegidos da luz. Os tecidos foram postos em lâminas e circundados por um *O-ring* a fim de não serem danificados pela lamínula. Estas lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência (Axiovision, Carl Zeiss, USA) utilizando-se filtros apropriados para cada tipo de fluorescência: Bodipy

e Fluoresceína (excitação a 505 nm e emissão a 515 nm) e Texas-Red (excitação a 582 nm e emissão a 601 nm).

3.13 Incorporação de ^{32}P -fosfolipídios por diferentes órgãos e ao longo dos dias após a alimentação

^{32}P -Lf (2×10^4 cpm) foi injetada em machos adultos de 1ª alimentação ($n=4$) em diferentes dias após a alimentação. Cerca de 24 horas após cada injeção, os testículos foram dissecados em solução de *Ringer* (MADRELL, 1969); e homogeneizados em NaCl 0,15 M. A radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida. Para verificar a incorporação de fosfolipídios por diferentes órgãos em machos, ^{32}P -Lf (1×10^4 cpm) foi injetada em machos adultos de 1ª alimentação ($n=10$). Após 24 horas, os órgãos foram dissecados, homogeneizados e a radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida.

3.14 Cinética de incorporação de ^{32}P -fosfolipídios, ^3H -lipídios neutros e ^{125}I -Lf pelos testículos

^{32}P -Lf (10×10^4 cpm), ^3H -Lf (5×10^4 dpm) ou ^{125}I -Lf (3×10^5 cpm) foram injetadas em machos adultos de 1ª alimentação ($n=5$) no 2º dia após a alimentação a 28 °C. Um grupo controle com animais mantidos a 4 °C também foi realizado. Após diferentes tempos, os testículos foram dissecados, lavados em solução fisiológica (MADRELL, 1969) e, adicionalmente, a hemolinfa foi coletada. Os testículos foram homogeneizados em NaCl 0,15 M e a radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida, no caso das amostras marcadas com ^{32}P e ^3H , e por contador gamma no caso das amostras marcadas com ^{125}I .

3.15 Ensaio de ligação

Testículos não-radioativos (n=5) foram dissecados e incubados em meio Sigma 199 por diferentes tempos a 4 °C em três diferentes condições experimentais: na presença de ^{32}P -Lf (0,5 mg/mL); com ^{32}P -Lf na presença de Lf não-radioativa, 70 mg/mL; ou na presença de albumina bovina sérica, 70 mg/mL. Após a incubação, os órgãos foram lavados em 1 mL solução fisiológica (MADRELL, 1969) por 30 minutos a 28°C; e homogeneizados em NaCl, 0.15 M. A radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

3.16 Detecção da Lf por *Western Blotting*

Lf purificada (40 µg) foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação (n=5). Isto foi realizado para que os insetos deste experimento também foram submetidos ao estresse metabólico causado pela injeção, como no caso dos experimentos anteriores em que a Lf radioativa foi injetada. Após diferentes tempos, os testículos foram dissecados e homogeneizados em coquetel de inibidores. O homogenato total de cada tempo (30 µg) foi separado por SDS-PAGE. O padrão de peso molecular Fermentas (Fermentas Life Sciences, USA) foi utilizado. *Western blotting* foi realizado conforme descrito a seguir: os géis foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose a 190 mA por 90 minutos. As membranas foram bloqueadas por 1 hora em TBS-Tween-Albumina (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%; albumina 2%) e esta foi incubada com anticorpo primário anti-Lf feito em coelho (1:10000) (ATELLA e cols., dados não-publicados) por 2 horas e posteriormente com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:10000) anti-coelho feito em burro por 1 hora. A membrana foi revelada utilizando um kit ECL (Amersham Pharmacia Biochem, USA) conforme instruções do fabricante.

3.17 Composição dos lipídios da Lf incorporados pelos testículos

A ^3H -Lf (5×10^4 dpm) ou ^{32}P -Lf (10×10^4 cpm) foram injetadas separadamente em machos adultos no 2º dia após a alimentação (n=10). Após 24 horas, os testículos foram isolados, lavados com NaCl 0,15 M e submetidos a uma extração lipídica. Os lipídios totais extraídos foram separados por TLC para lipídios neutros ou para fosfolipídios conforme descrito anteriormente. As manchas na placa correspondentes a cada lipídio foram extraídas e a radioatividade foi estimada por cintilação líquida. A radioatividade foi quantificada e expressa como dpm/cpm do lipídio por dpm/cpm totais (todos os lipídios = 100%).

3.18 Visualização da Lf e lipídios fluorescentes nos testículos

A Lf marcada tanto na porção proteica com FITC como na porção lipídica com Texas Red-FE (25 µg) ou; somente na porção lipídica com FC-AG-BODIPY ou AG-BODIPY (25 µg) foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação (n=4). Após 24 horas, os testículos e as vesículas seminais foram isolados, lavados com NaCl 0,15M e processados para análise por microscopia de epifluorescência conforme descrito anteriormente.

3.19 Isolamento dos espermatozóides

^3H -Lf (5×10^4 dpm) foi injetada em machos adultos no segundo dia após a alimentação (n=20). Após 24 horas, os testículos foram dissecados e lavados em solução fisiológica (MADRELL,1969). O isolamento dos espermatozóides foi realizado segundo Cerroli e cols. (1997) com algumas modificações. Os tecidos foram gentilmente homogeneizados em PBS 1% sacarose e centrifugados a

temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi coletado e o mesmo volume de PBS 1% sacarose foi adicionado. A mistura foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 2500 rpm para separar espermatozóides (precipitado) do plasma seminal (sobrenadante). O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado com PBS contendo 1% sacarose e centrifugado novamente nas mesmas condições. Os dois sobrenadantes e os dois precipitados foram reunidos separadamente e submetidos a uma extração lipídica. Os lipídios foram analisados por TLC como descrito anteriormente.

Em alguns experimentos foram feitas contagens de espermatozóides da seguinte forma: os testículos ou espermatecas de insetos de diferentes dias após a alimentação ou reunião foram gentilmente homogeneizados em solução fisiológica de *Ringer* (MADRELL,1969) a temperatura ambiente. Colocou-se 20 µL deste homogenato em uma câmara de Neubauer e contaram-se os espermatozóides.

3.20 Transferência de lipídios durante a cópula

Fêmeas e machos de 5º estágio foram separados individualmente em vials 2 semanas após a alimentação como 5º estágio mas antes da muda. Após 3 semanas, estes insetos (n=5) foram alimentados e, 2 dias após este repasto, cada macho foi injetado com a Lf marcada radioativamente (6×10^4 cpm/dpm) e posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 5 dias. Após este período, os testículos, glândulas acessórias e vesículas seminais do macho; e as espermatecas da fêmea (ver figura 4) foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15 M. A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida ou contador gamma. Alternativamente, a hemolinfa de fêmeas que copularam com machos previamente injetados com $^3\text{H-Lf}$ (n=10) foi coletada e a radioatividade foi

mensurada. Em alguns experimentos, esperou-se até a postura de ovos e a radioatividade destes foi determinada.

Para os experimentos com fluorescência, os casais (n=4) foram alimentados e, 2 dias após este repasto, cada macho foi injetado com a Lf duplamente marcada na porção protéica com Texas Red e na porção lipídica com FC-AG-BODIPY; ou na porção lipídica com AG-BODIPY e Texas Red-FE, e posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 24 horas. Os órgãos foram dissecados em solução fisiológica (MADRELL,1969) e foi feita a análise por microscopia de fluorescência como descrito anteriormente.

3.21 Capacidade de síntese de fosfolipídios pelas espermatecas a partir de precursores radioativos

As espermatecas de fêmeas adultas (4 espermatecas reunidas por ponto/tempo; n=2) foram dissecadas e incubadas em meio Sigma 199 na presença de fosfato inorgânico radioativo, ^{32}Pi (0,5 μCi) ou com ácido palmítico radioativo ^3H (0,5 μCi) por diferentes tempos. Após os tempos desejados, as espermatecas foram lavadas e, homogeneizadas em NaCl 0,15 M. Os órgãos foram submetidos a uma extração de lipídios e, os lipídios foram separados por TLC para lipídios neutros. As manchas correspondentes aos fosfolipídios foram raspadas das placas e a radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida.

3.22 Composição dos lipídios transferidos às espermatecas durante a cópula

A ^3H -Lf (5×10^4 dpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação (n=10). Estes machos foram reunidos à fêmeas não-injetadas por 5 dias. Após este período, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas, lavadas com NaCl 0,15 M e submetidos a uma extração lipídica. Os lipídios totais extraídos foram separados por TLC para lipídios neutros conforme descrito

anteriormente. As manchas na placa correspondentes a cada lipídio foram extraídas e a radioatividade foi estimada por cintilação líquida. A radioatividade foi quantificada e expressa como dpm do lipídio por dpm totais (todos os lipídios = 100%).

3.23 Capacidade de vôo de machos de *R. prolixus*

Machos de 1ª alimentação (n=10) foram submetidos ao vôo até a exaustão por diferentes dias após a alimentação. O tempo de vôo foi contado em cada dia e expresso em um gráfico.

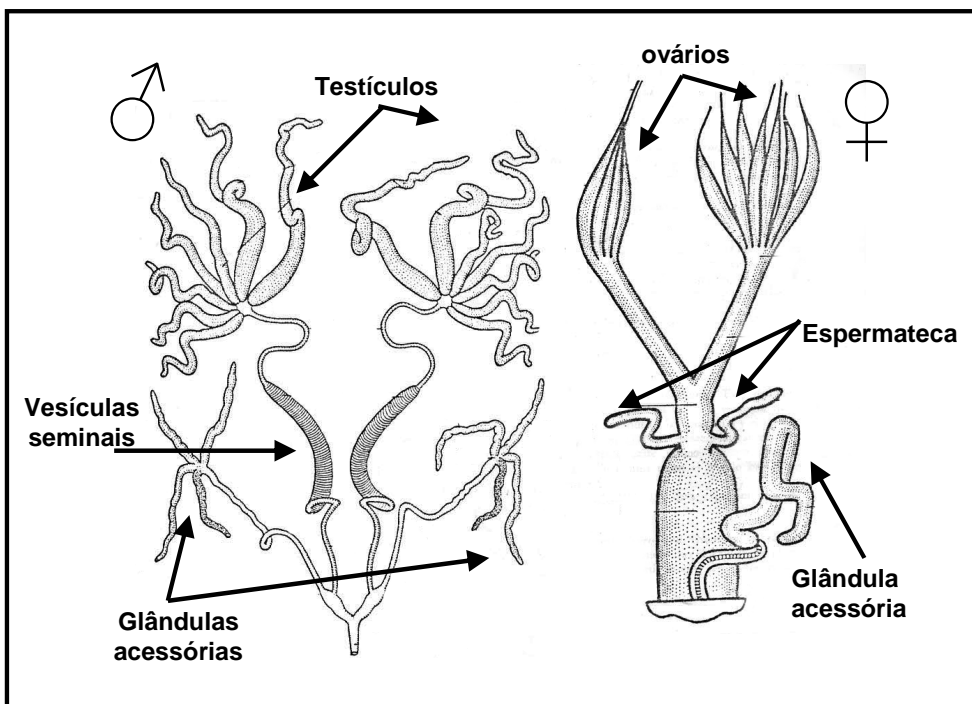


Figura 4 – Esquema dos aparelhos reprodutores de *R. prolixus*.
(Adaptado de PÉREZ, 1969).

3.24 Influência do vôo na transferência de lipídios da Lf aos testículos/ovários e músculos de vôo

Machos ou fêmeas de *R. prolixus* (n=5) submetidos ao vôo por diferentes tempos foram injetados com ^{32}P -Lf ou ^3H -Lf (5×10^4 cpm / dpm). Após 24 horas, os testículos no caso de machos, os ovários no caso das fêmeas além dos músculos de vôo foram dissecados e a radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida.

Para se identificar o perfil lipídico dos ovários e músculos de vôo após o vôo, fêmeas voaram por uma hora (n=5). Após isto, os ovários e músculos de vôo foram dissecados e lavados em solução fisiológica (MADRELL, 1969). Os órgãos foram homogeneizados em NaCl 0,15 M e submetidos à extração de lipídios. Os lipídios foram separados por TLC conforme descrito anteriormente. As placas foram coradas com ácido fosfórico e analisadas por densitometria. Uma curva de massa de lipídios foi feita utilizando amostras de 50, 100 e 200 µg de padrão de colesterol (Sigma).

3.25 Produção de espermatozoides e a influência do vôo

Em diferentes dias após alimentação com sangue, os testículos dos machos foram dissecados e realizou-se a contagem de espermatozoides conforme descrito anteriormente (n=5). Para se verificar a influência do vôo na produção de espermatozoides pelos testículos, machos de *R. prolixus* voaram até a exaustão ou por tempos determinados no 2º dia após a alimentação (n=5). Após isto, os testículos foram dissecados e os espermatozoides contados como descrito anteriormente.

3.26 Influência do vôo na transferência de lipídios durante a cópula

Machos de *R. prolixus* voaram até a exaustão ou por tempos determinados no 2º dia após a alimentação (n=5). Após isto, cada macho foi injetado com a ^3H -Lf ($5 \times$

10^4 dpm) e posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 4 dias. Após este período, os testículos e músculos de vôo dos machos; e as espermatecas das fêmeas foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15M. A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida.

3.27 Influência do vôo na transferência de espermatozoides durante a cópula e na oviposição

Machos de *R. prolixus* voaram até a exaustão no 2º dia após a alimentação (n=10). Após isto, os machos reunidos às fêmeas virgens não-injetadas por 4 dias. Após isto, as espermatecas foram dissecadas e os espermatozoides contados como descrito anteriormente. Adicionalmente, esperou-se até a postura de ovos das fêmeas que copularam tanto com machos em repouso tanto com machos que voaram. Os ovos foram contados e o resultado expresso em um gráfico. O mesmo experimento foi feito submetendo-se fêmeas ao vôo exaustivo. Um grupo com fêmeas mantidas em repouso também foi realizado. Após o vôo, esperou-se até a postura de ovos e o número de ovos foi contado.

- **EXPERIMENTOS UTILIZANDO *Locusta migratoria***

3.28 Os Insetos

Os insetos foram mantidos em condições gregárias a 30 °C , com umidade de 40% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os insetos foram alimentados diariamente com uma mistura de gramíneas. Os insetos pertencem à colônia do Departamento de Fisiologia Bioquímica da Universidade de Utrecht, Holanda.

3.29 Purificação de HDLp e LDLp

A hemolinfa foi retirada de adultos 12-15 dias após a muda com o auxílio de uma seringa Hamilton de 50 µL. A hemolinfa era diretamente diluída em tampão de

diluição (tampão PBS, EDTA 10 mM, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1mg/mL em NaN_3 0,02%). A diluição final de hemolinfa e tampão de diluição era de 0,8:1. Em um tubo de centrifuga de 35 mL foram misturados cuidadosamente 15 mL de solução de KBr (densidade 1,300g/mL) e 2 a 3 mL de hemolinfa diluída. Após isto, foi adicionado até o início do tubo, solução de NaCl 0,9%. O material foi centrifugado a 49.000 rpm a 4 °C por 4 horas num rotor vertical Sorvall Pro (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Após a centrifugação, o gradiente foi fracionado e as frações correspondentes a HDLp estocadas em KBr a 4 °C.

A purificação de LDLp foi realizada mediante injeção de AKH (10 μL / animal, solução de 10pM/ μL). Após 2 horas, a hemolinfa foi coletada e a LDLp purificada conforme descrito acima para HDLp.

3.30 Marcação da HDLp e LDLp

A HDLp foi marcada fluorescentemente segundo Van Hoof e cols., 2003. HDLp previamente purificada (1 mg/mL) foi marcada com fluorescência na porção lipídica em PBS pH 7,4 com 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Dil ($\text{C}_{18}(3)$) (1,1' – dioctadecyl-3,3,3',3' – tetramethylindocarbocyanine percholate) (Molecular Probes, USA) in DMSO (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a 37°C sob agitação constante por 2 horas. A HDLp (1 mg/mL) também foi marcada na porção protéica com 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OG (Oregon Green 488 carboxylic acid) (Molecular Probes, USA) em DMSO (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), à temperatura ambiente, agitando constantemente por 30 minutos segundo instruções do fabricante. Dil e OG-HDLp foram aplicadas numa coluna de gel filtração Sephadex G-25 PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech, USA) para separar a proteína marcada do excesso de fluoróforo livre e substituir o PBS pelo tampão de incubação (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM CaCl_2 , 2 mM MgSO_4 , pH 7,4). A LDLp foi marcada conforme descrito anteriormente para HDLp.

3.31 Ensaio de endocitose e microscopia de fluorescência

Os testículos em diferentes dias após a muda foram dissecados em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1 mM CaCl_2 , pH 7,4), lavados em tampão de incubação e incubados com Dil-HDLp, 10 $\mu\text{g/mL}$, ou com OG-HDLp, 150 $\mu\text{g/mL}$, ou OG-LDLp, 150 $\mu\text{g/mL}$ por 20 minutos a 27°C. Os testículos foram lavados extensivamente em PBS e fixados em 4% de paraformaldeído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Para a observação dos núcleos das células, os tecidos já fixados foram posteriormente incubados em DAPI 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (Roche Diagnostics, USA) em PBS por mais 20 minutos à temperatura ambiente. A marcação fluorescente das amostras foi analisada no microscópio de epifluorescência Axioscop (Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens foram tratadas utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

3.32 Preparação das frações de membrana

Os tecidos foram parcialmente homogeneizados em tampão de incubação com um coquetel de inibidores de proteases (benzamidina, 0,1 mM, leupeptina, 1 $\mu\text{g/mL}$, aprotinina, 1 $\mu\text{g/mL}$) com o auxílio de uma ponteira para tip cortada na ponta e incubados a 4°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso no mesmo tampão de homogeneização adicionado com CHAPS 1%. A suspensão foi incubada a 4°C por 10 minutos e centrifugada novamente a 10.000 g. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 10.000 g novamente. O sobrenadante final contendo as membranas foi usado prontamente.

3.33 Detecção do LpR por *Western Blotting*

A fração de membrana dos testículos foi colocada em um tubo eppendorf (Eppendorf, Germany) e aquecida por 5 minutos a 95°C em tampão de amostra Laemmli modificado (Laemmli, 1970) ou diretamente dissolvida no tampão Laemmli modificado sem aquecimento (SDS 0,025% e nenhum agente desnaturante). As proteínas então foram separadas por SDS-PAGE (gel 7,5%). As proteínas de membrana separadas foram transferidas para uma membrana de polivinil fluoreto (PVDF, Millipore, USA) e incubadas com tampão de bloqueio (TBS, 0,1% Tween, 5% de leite) por 1 hora. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário feito em coelho anti-LpR 2189/90 (1:200) (VAN HOOFF e cols., 2002) por 2 horas e com anticorpo secundário anti-coelho feito em bode conjugado a fosfatase alcalina 1:5000 por 1 hora (Molecular Probes, USA). O anticorpo secundário ligado foi visualizado incubando a membrana em tampão contendo Tris-HCl, 100 mM, NaCl, 100 mM, MgAc₂, 10 mM, p-nitro azul cloreto de tetrazolium (NBT; Boehringer Mannheim, Germany), 50 µg/mL, 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato p-toluidina (BCIP; Roche Diagnostics, USA), 25 µg/mL, pH 9,0. Alternativamente, o método de revelação usado foi o ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA), nestas condições, foi usado o anticorpo secundário feito em bode anti-coelho conjugado a peroxidase 1:20000 (Molecular Probes, USA). Para visualização das proteínas transferidas à membrana de PVDF, ao final do experimento, estas foram coradas com *Ponceau Red* 0,2% em metanol 1% (vindo da seguinte solução estoque do corante: *Ponceau Red* 2% em ácido tricloroacético 30% (p/v) e ácido sulfosalicílico 30 % (p/v); 1:10 em metanol 1% (p/v)).

3.34 Ensaio de ligação e endocitose

Os testículos foram dissecados em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1 mM CaCl₂, pH 7,4), lavados em tampão de incubação e incubados com Dil-HDLp, 10 µg/mL ou com OG-HDLp, 150 µg/mL por 20 minutos a 4°C. Os testículos foram gentilmente lavados em PBS e incubados em tampão de incubação sem a HDLp por 20 minutos a 27 °C. Após isto, os órgãos foram lavados em PBS e tratados para microscopia como descrito anteriormente.

3.35 Ensaio de inibição da endocitose por competição

Os testículos foram dissecados em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1 mM CaCl₂, pH 7,4), lavados em tampão de incubação e incubados com OG-HDLp, 150 µg/µL mais um excesso de HDLp não-marcada de *L. migratoria*, ou de HDLp não-marcada de *R. prolixus* ou albumina sérica bovina (5 vezes) por 20 minutos a 27 °C. Após isto, os órgãos foram lavados em PBS e tratados para microscopia como descrito anteriormente.

3.36 Ensaio de inibição da endocitose com suramina e cloreto de amônio

Os testículos foram dissecados em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1mM CaCl₂, pH 7,4), lavados em tampão de incubação e pré-incubados com NH₄Cl, 20mM ou suramina, 5 mM por 20 minutos a 4°C. Os testículos foram gentilmente lavados extensivamente em PBS e incubados em tampão de incubação com OG-HDLp, 150 µg/mL ou Dil-HDLp, 10 µg/mL por 20 minutos a 27 °C. Após isto, os órgãos foram lavados em PBS e tratados para microscopia como descrito anteriormente.

3.37 Ensaio de endocitose com tripsina

Os testículos foram dissecados em TBS (Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, 1mM CaCl₂, pH 7,4), lavados em tampão de incubação e incubados com OG-HDLp, 150ug/mL por 20 minutos a 27°C. Após isto, os tecidos foram transferidos para um meio contendo tripsina 5% e EDTA 0,53 mM à temperatura ambiente por 5 minutos. Após isto, os órgãos foram lavados em PBS e tratados para microscopia como descrito anteriormente.

RESULTADOS – PARTE I



4- RESULTADOS - PARTE I: TRANSPORTE DE LIPÍDIOS MEDIADO PELA LIPOFORINA AOS TESTÍCULOS DE *Rhodnius prolixus*

Com objetivo de se verificar a entrega de lipídios pela Lf a diferentes órgãos de machos de *R. prolixus*, a Lf marcada radioativamente nos fosfolipídios com fosfato inorgânico, ^{32}P -Lf, foi injetada em machos adultos de 1ª alimentação. Após 24 horas, os órgãos foram isolados e a incorporação de ^{32}P -fosfolipídios foi mensurada por cintilação líquida. Como esperado, o corpo gorduroso, órgão em insetos que reúne as funções do tecido adiposo e fígado de vertebrados, foi capaz de incorporar intensamente os fosfolipídios provenientes da Lf (Figura 5). Além disso, verificou-se que a Lf entregou uma grande quantidade de ^{32}P -fosfolipídios aos testículos. Coração, cujo tamanho é proporcionalmente muito menor do que os outros órgãos usados, e intestino médio apresentaram valores basais de incorporação de radioatividade associada aos fosfolipídios.

Em insetos hematófagos, a alimentação sanguínea regula uma série de processos metabólicos. Por isso, investigou-se a capacidade de entrega lipídica da Lf aos testículos nos diferentes dias após o repasto sanguíneo. A ^{32}P -Lf foi injetada em machos em diferentes dias após a alimentação. Estes insetos foram dissecados 24 horas após cada dia de injeção selecionado e a radioatividade associada aos testículos foi determinada. No 2º dia após a alimentação, a Lf apresentou sua capacidade máxima de entrega de lipídios aos testículos (Figura 6). Esta capacidade de entrega decresceu após o 3º e 4º dias e, em seguida, se manteve constante até o 15º dia. Este resultado indica que o abastecimento de lipídios aos testículos pela Lf é constante.

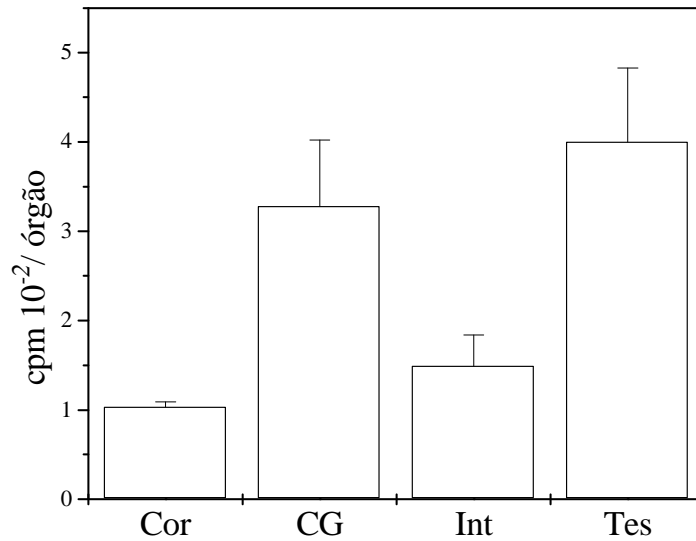


Figura 5 - Incorporação de ³²P-fosfolipídios provenientes da ³²P-Lf por diferentes órgãos de *R. prolixus*.

A Lf marcada radioativamente nos fosfolipídios com ³²Pi (1×10^4 cpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação. Após 24 horas, coração (**Cor**), corpo gorduroso (**CG**), intestino médio (**Int**) e testículos (**Tes**) foram dissecados. A radioatividade associada a cada órgão, indicando a incorporação de fosfolipídios radioativos vindos da ³²P-Lf, foi estimada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

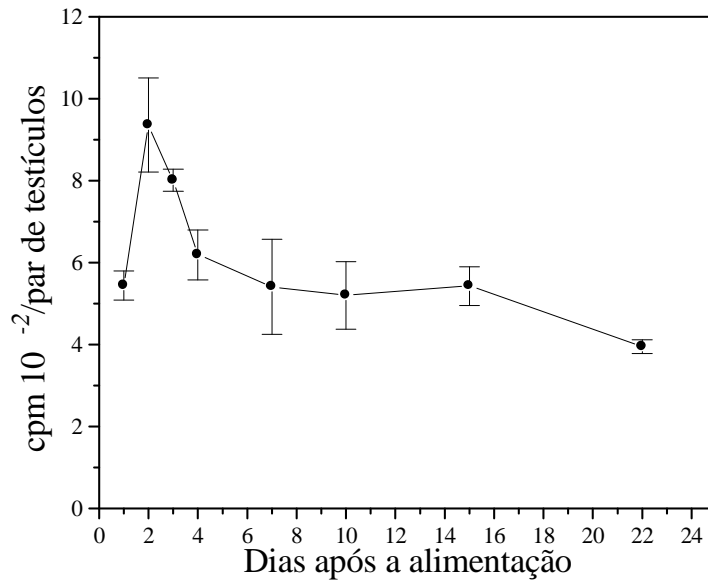


Figura 6 - Incorporação de ^{32}P -fosfolipídios provenientes da ^{32}P -Lf pelos testículos em diferentes dias após a alimentação.

A Lf marcada radioativamente na porção fosfolipídica com ^{32}P i (2×10^4 cpm) foi injetada em machos de *R. prolixus* em diferentes dias após a alimentação. Os testículos foram dissecados em 24 horas após cada injeção. A incorporação dos ^{32}P -fosfolipídios pelos testículos em cada dia escolhido foi determinada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

A fim de se entender a dinâmica de entrega de diferentes classes de lipídios pela Lf aos testículos ao longo do tempo, foi realizado um curso temporal utilizando Lf marcada radioativamente nos fosfolipídios, ^{32}P -Lf, ou nos lipídios neutros principalmente no DAG, a ^3H -Lf.

No 2º dia após a alimentação, a ^{32}P -Lf foi injetada na hemocele de machos adultos, e após diversos tempos, os testículos foram dissecados e a radioatividade foi determinada. O resultado apresentado na Figura 7 mostra que a incorporação de ^{32}P -fosfolipídios pelos testículos foi linear até cerca de 30 horas após a injeção; após isto, ela começou a decair. Paralelamente, observou-se que a radioatividade presente na hemolinfa (local onde a Lf se encontrava inicialmente) diminuiu ao longo dos tempos analisados demonstrando que houve captação da radioatividade pelos órgãos do inseto, entre eles, os testículos. Ensaios realizados a 4°C demonstraram uma baixa incorporação de ^{32}P -fosfolipídios pelo órgão, provavelmente devido somente, à simples associação da lipoproteína aos seus sítios de ligação no testículo.

A incorporação de lipídios neutros pelos testículos provenientes da ^3H -Lf é demonstrada na Figura 8. Constatou-se que os testículos mais rapidamente assimilaram ^3H -lipídios neutros da Lf; se comparado aos ^{32}P -fosfolipídios (Figura 7). A incorporação ocorreu de forma linear até cerca de 8 horas após a injeção, diminuindo após isto. Paralelamente, a radioatividade presente na hemolinfa decaiu ao longo do curso temporal. Nenhuma incorporação de ^3H -lipídios neutros pelos testículos a 4°C foi observada.

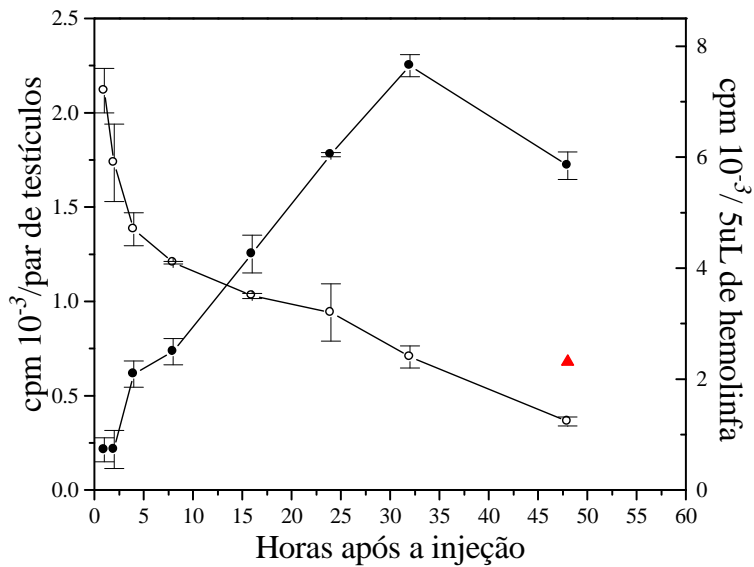


Figura 7 – Cinética de incorporação de ^{32}P -fosfolipídios pelos testículos.

Para se verificar a incorporação de fosfolipídios vindos da Lf pelos testículos em um curso temporal, machos adultos foram injetados com ^{32}P -Lf (10×10^4 cpm) a 28°C no 2º dia após a alimentação. Em diferentes tempos após a injeção, os testículos foram dissecados e a hemolinfa foi coletada. A radioatividade associada aos testículos (●) e à hemolinfa (○) foi estimada por cintilação líquida, para quatro determinações. A ligação da ^{32}P -Lf aos testículos a 4°C também foi determinada (▲).

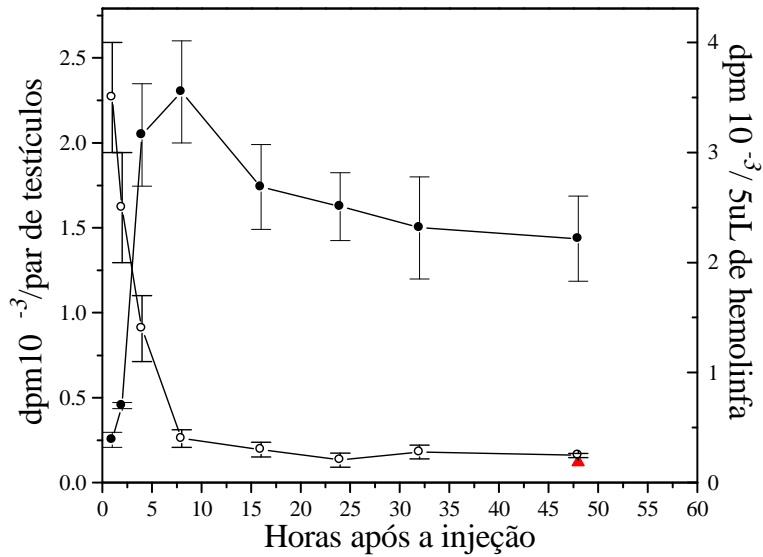


Figura 8 - Cinética de incorporação de ^3H -lipídios neutros pelos testículos.

Para se verificar a incorporação de lipídios neutros, principalmente DAG, vindos da Lf pelos testículos em um curso temporal, machos adultos foram injetados com ^3H -Lf (5×10^4 dpm) a 28°C no 2º dia após a alimentação. Em diferentes tempos após a injeção, os testículos foram dissecados e a hemolinfa foi coletada. A radioatividade associada aos testículos (●) e à hemolinfa (○) foi estimada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para quatro determinações. A ligação da ^3H -Lf aos testículos a 4°C também foi determinada (▲).

Para se analisar se as apolipoproteínas eram incorporadas pelos testículos durante o processo de entrega de lipídios, procedeu-se um curso temporal a 28°C e 4°C com ^{125}I -Lf (Figura 9). A 28°C, a incorporação da ^{125}I -Lf foi linear até 30 horas e depois decaiu; padrão similar ao observado para a cinética de fosfolipídios. Por outro lado, nenhuma incorporação de lipoproteína marcada pelos testículos foi observada a 4°C. Este dado aponta para a hipótese de que a internalização da Lf pelos testículos é um processo dependente de energia. Verificou-se que, semelhante à cinética com os lipídios marcados na Lf, houve uma diminuição da radioatividade presente na hemolinfa indicando captação da Lf pelos órgãos dos machos de *R. prolixus*, entre eles, os testículos. Quando o sinal radioativo foi acompanhado na hemolinfa até 5 dias após a injeção, nenhum pico de radioatividade foi encontrado. Isto indica que não há nenhum retorno das ^{125}I -apolipoproteínas anteriormente captadas pelos testículos à hemolinfa.

A fim de confirmar a observação que a Lf é realmente captada pelos testículos e permanece no interior das células deste órgão, um *western blotting* utilizando um anticorpo anti-Lf foi realizado. Os insetos foram injetados com Lf não-radioativa e, após diferentes tempos, os testículos foram isolados, homogeneizados e as proteínas destes homogenatos foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Na Figura 10, pode-se detectar as apoLf-I e apoLf-II nos homogenatos de até 3 dias após a injeção. Já no 5º dia após a injeção da Lf, percebe-se que o desaparecimento do sinal da apoLf-II o que indicaria a degradação da apolipoproteína pelos testículos.

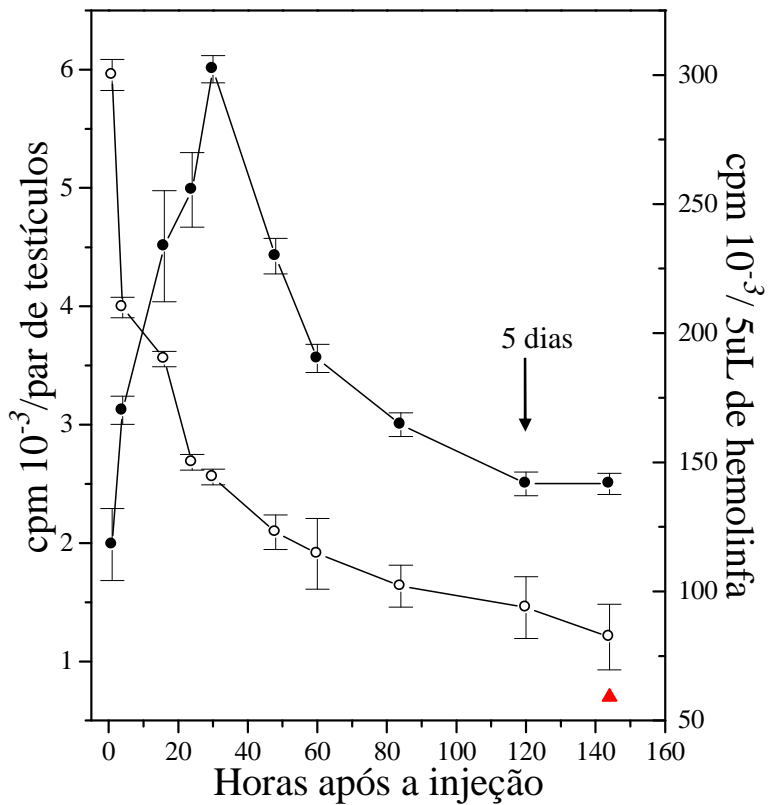


Figura 9 - Cinética de incorporação da ¹²⁵I-Lf pelos testículos.

Um curso temporal para se verificar se a partícula inteira de Lf era incorporada durante o transporte de lipídios aos testículos foi realizado utilizando-se uma Lf marcada na parte protéica com ¹²⁵I. Machos adultos foram injetados com ¹²⁵I-Lf (3×10^5 cpm) a 28 °C no 2º dia após a alimentação. Em diferentes tempos de injeção, os testículos foram dissecados e a hemolinfa foi coletada. A radioatividade associada aos testículos (●) e à hemolinfa (○) foi estimada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para quatro determinações. A seta preta indica os pontos no gráfico para 5 dias após a injeção. A ligação da ¹²⁵I-Lf aos testículos a 4 °C também foi determinada (▲).

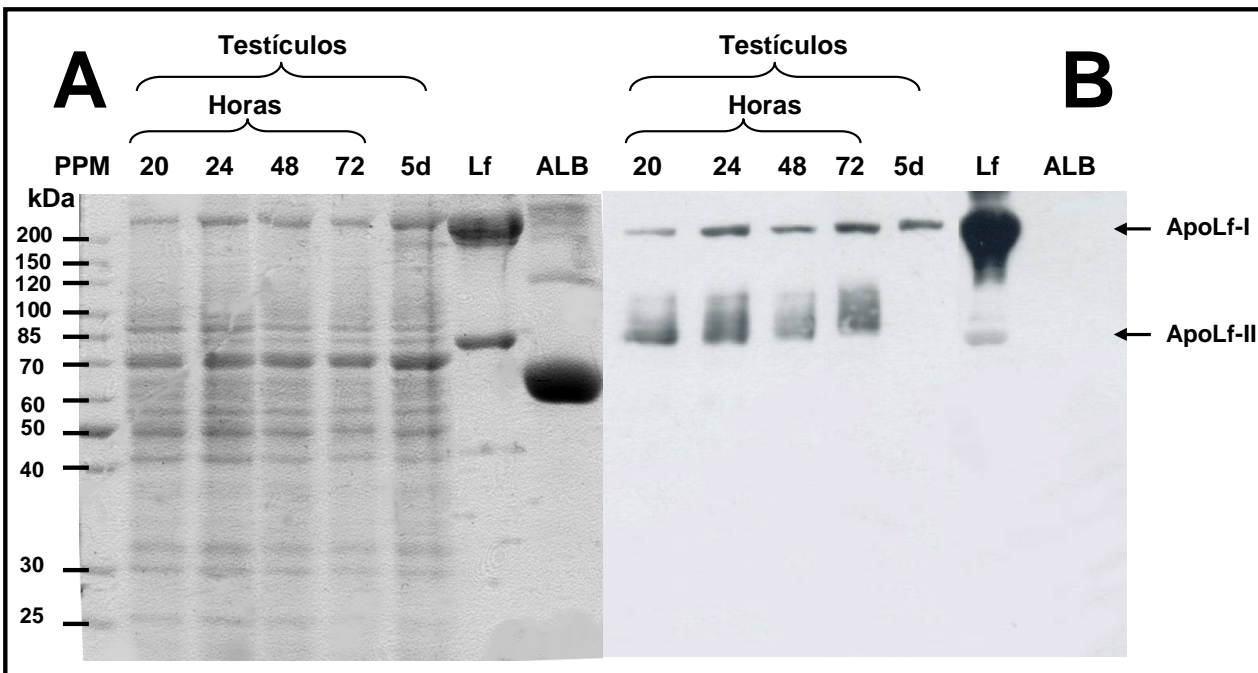


Figura 10 - Detecção da Lf nos testículos por *Western Blotting*

No 2º dia após a alimentação, Lf purificada (40 µg) foi injetada em machos adultos e em diferentes tempos após a injeção, os testículos foram isolados e homogeneizados em coquetel de inibidores de proteases. As proteínas de cada homogenato (30 µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE e o gel corado por *Amido Black* (A). A fim de se detectar a presença de Lf por *Western blotting*, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, e esta foi incubada com anticorpo primário anti-Lf. A membrana foi revelada por ECL conforme descrito no item 3.16 de METODOLOGIA. Lf purificada e albumina bovina sérica (30 µg/cada) foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

ALB: albumina bovina sérica; PPM: padrão de peso molecular; 5d: 5 dias. As setas pretas no Painel B indicam a presença das apolipoproteínas apoLf-I e apoLf-II nas amostras analisadas.

Com o objetivo de conhecer a composição dos lipídios incorporados pelos testículos durante o processo de captação da Lf, machos adultos foram injetados com ^3H -Lf ou ^{32}P -Lf no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram coletados e submetidos a uma extração de lipídios. Os lipídios obtidos foram separados e analisados por cromatografia em camada fina (TLC). Fosfolipídios, diacilglicerol e triacilglicerol foram os principais lipídios marcados encontrados nos testículos (Figura 11A). Dentre os fosfolipídios, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina foram os lipídios marcados majoritariamente encontrados nos testículos (Figura 11B).

Para testar a hipótese da captação da Lf pelos testículos se tratar de um processo mediado por receptor, foi realizado um ensaio de competição. Testículos não-radioativos foram incubados com ^{32}P -Lf a 4°C com ou sem um excesso de Lf não-radioativa (Figura 12). Uma incubação com um excesso de albumina bovina sérica (uma proteína não-específica no processo de ligação da Lf aos testículos) foi utilizada como controle.

Os resultados obtidos mostram que, na presença da Lf não-radioativa, a ligação da ^{32}P -Lf aos testículos foi inibida ao longo do tempo de incubação. Portanto, há uma competição entre a Lf não-marcada e a ^{32}P -Lf pelos sítios de ligação nos testículos. Além disso, nenhuma inibição foi observada utilizando-se a albumina não-marcada. Este conjunto de dados sugere que a captação da Lf pelos testículos está relacionada a um processo mediado por receptor e, provavelmente inclui a participação de um receptor específico.

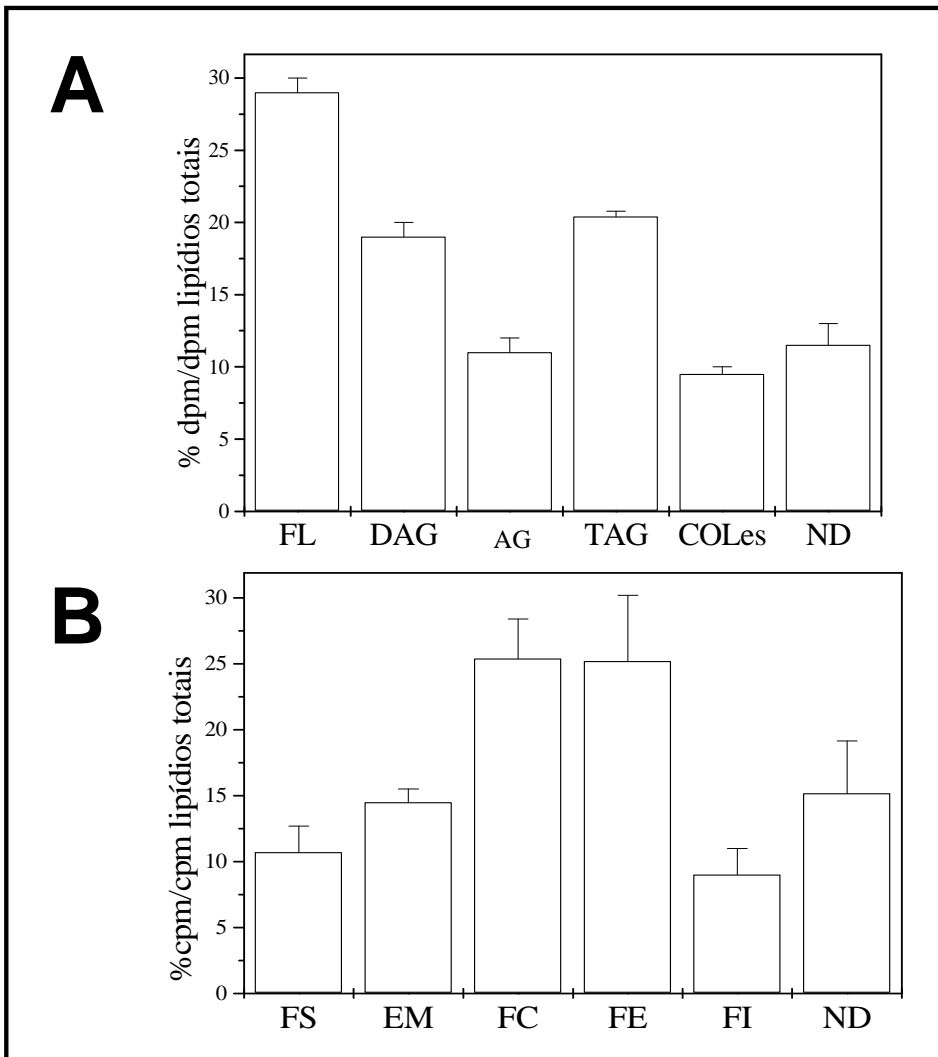


Figura 11 – Composição dos lipídios da Lf incorporados pelos testículos.

A ^3H -Lf (5×10^4 dpm) (A) ou ^{32}P -Lf (10×10^4 cpm) (B) foi injetada em machos adultos. Após 24 horas, os testículos foram isolados; e os lipídios totais extraídos e analisados por TLC. A radioatividade associada a cada classe de lipídio foi quantificada e expressa como dpm/cpm do lipídio por dpm/cpm totais (todos os lipídios = 100%) média \pm erro padrão para três experimentos independentes. Paineis A: lipídios neutros. COLes: colesterol esterificado; DAG: diacilglicerol; AG: ácidos graxos livres; FL: fosfolipídios; ND: não-determinado; TAG: triacilglicerol. Paineis B: fosfolipídios. EM: esfingomielina; FC: fosfatidilcolina; FE: fosfatidiletanolamina; FI: fosfatidilinositol; FS: fosfatidilserina; ND: não-determinado.

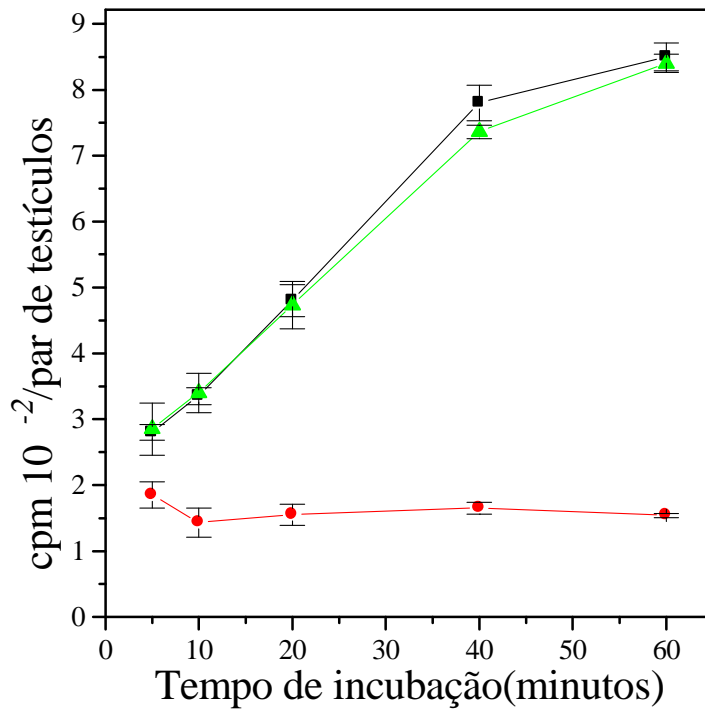


Figura 12 – Ensaio de ligação da ^{32}P -Lf aos testículos.

Testículos não-radioativos foram dissecados de machos adultos no 2º dia após a alimentação. A ligação da ^{32}P -Lf (0,5 mg/mL) aos testículos foi determinada a 4 °C em diferentes tempos de incubação e em três diferentes condições experimentais: somente na presença de ^{32}P -Lf (■); com ^{32}P -Lf e um excesso de Lf não-radioativa (70 mg/mL) (●); ou com ^{32}P -Lf e um excesso de albumina bovina sérica (70 mg/mL) (▲). A radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida. Os resultados são médias \pm DP de três determinações.

A fim de se visualizar a internalização da Lf nos testículos, uma Lf duplamente marcada na porção protéica com fluoresceína (FITC) e, na porção lipídica com fosfatidiletanolamina marcada com Texas Red (Texas Red-FE) foi injetada em machos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram isolados e a localização da Lf analisada por microscopia de fluorescência (Figura 13). Alternativamente, uma Lf marcada na porção lipídica com fosfatidilcolina marcada nos ácidos graxos com BODIPY (FC-AG-BODIPY) ou somente com ácido graxo marcada com BODIPY (AG-BODIPY) foi utilizada (Figura 14).

Na Figura 13, observa-se uma co-localização das apolipoproteínas e dos fosfolípidios marcados no interior do tecido principalmente próxima de junções testiculares. Esta observação corrobora com o fato que a partícula inteira da Lf é internalizada de forma similar pelos testículos (Figuras 7 e 9). A localização da fosfatidilcolina e do ácido graxo marcados com BODIPY nos testículos é mostrada na Figura 14.

As vesículas seminais recebem o esperma produzido pelos testículos e secreções das glândulas acessórias para a formação do sêmen. Sabe-se que a incorporação de fosfolípidios e lipídios neutros radioativos da Lf pelas vesículas seminais de *R. prolixus* é muito baixa (OLIVEIRA e cols, dado não-mostrado). Desta forma, avaliou-se a possibilidade de se encontrar marcação fluorescente de lipídios da Lf neste órgão provenientes do esperma ou do fluido seminal liberados pelos testículos. Para isto utilizou-se uma Lf duplamente marcada na porção protéica com Texas Red e na porção lipídica com fosfatidilcolina marcada nos ácidos graxos com BODIPY (FC-AG-BODIPY). Esta Lf foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram isolados e a localização da Lf analisada por microscopia de fluorescência. Pode-se verificar a presença da

fosfatidilcolina marcada nas vesículas seminais (Figura 15). Entretanto, nenhuma marcação da Lf na parte protéica foi vista neste órgão. Estas evidências sugerem que parte dos lipídios incorporados pelos testículos no processo de internalização da Lf pode, em algum momento, ser transferida para as vesículas seminais e, posteriormente às fêmeas durante a cópula. E, aparentemente, isto não ocorreria com a parte protéica da Lf. Esta possível transferência de lipídios durante a cópula e o papel da Lf neste processo serão melhor abordados em RESULTADOS parte III.

Os testículos são responsáveis pela espermatogênese que é um processo metabólico que requer um grande suprimento de lipídios (DUMSER, 1980). Com o objetivo de examinar se os lipídios da Lf poderiam estar associados às frações de espermatozóides e fluido seminal; a ^3H -Lf foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram dissecados, gentilmente homogeneizados e os espermatozóides e o fluido seminal foram isolados. Ambos foram submetidos a uma extração de lipídios e posterior análise por TLC. A Figura 16A mostra que, dentre os lipídios radioativos encontrados nos espermatozóides, 54% eram fosfolipídios. Por outro lado, triacilglicerol, diacilglicerol e fosfolipídios foram os principais lipídios do fluido seminal em que se encontrou marcação radioativa (Figura 16B).

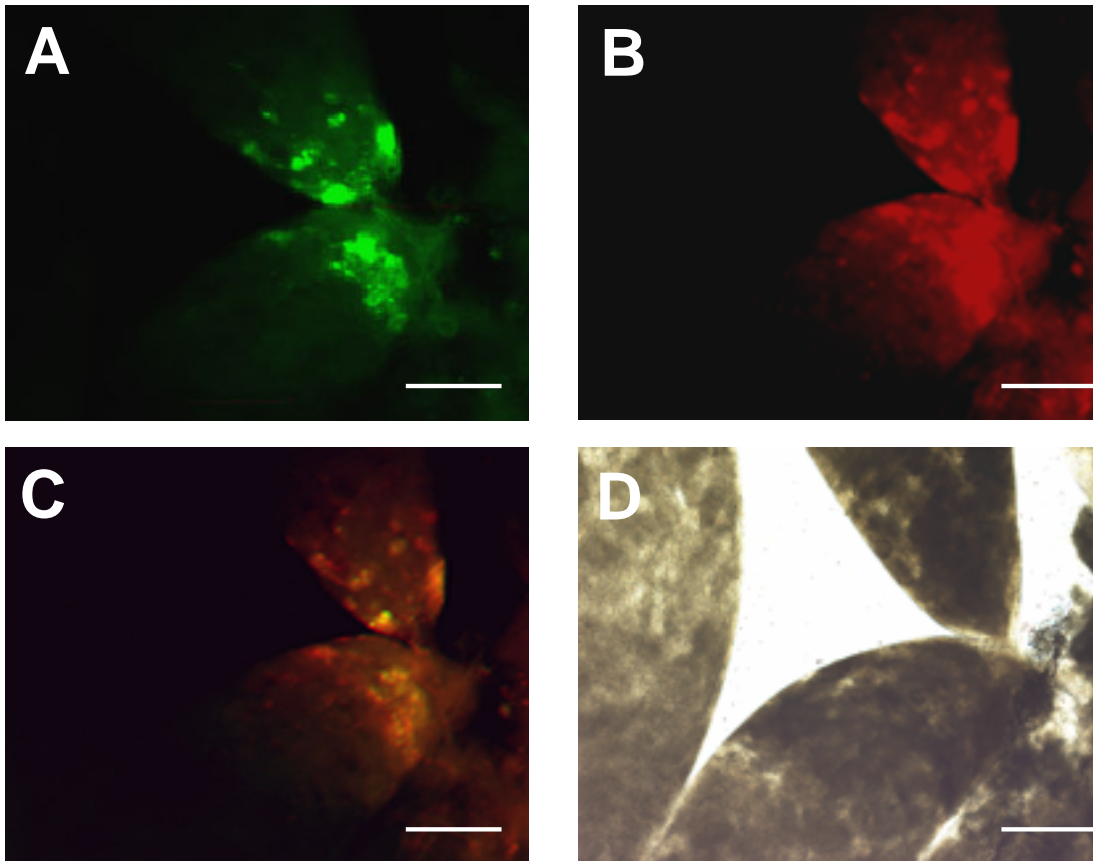


Figura 13 – Localização da Lf fluorescente (FITC-Lf) e da fosfatidiletanolamina (Texas Red-FE) nos testículos.

A Lf duplamente marcada na porção protéica com FITC e na porção lipídica com Texas Red-FE foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram isolados e a fluorescência observada por microscopia de epifluorescência. Barra de tamanho em branco: 100 μm . (A) Localização da Lf marcada com FITC; (B) Localização da Texas Red-FE; (C) Imagens A e B sobrepostas; (D) Imagem de fase contraste as imagens A e B.

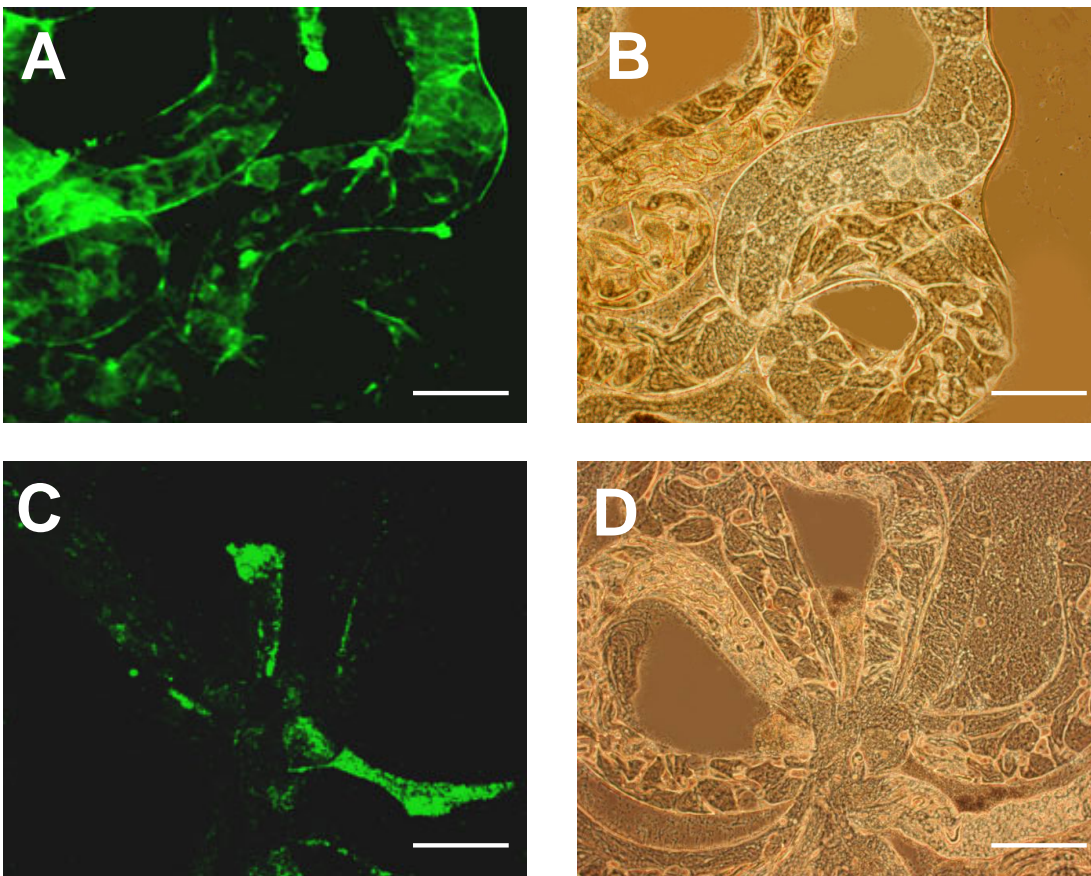


Figura 14 – Localização da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) e do ácido palmítico (AG-BODIPY) nos testículos.

A Lf marcada na porção lipídica com FC-AG-BODIPY ou com AG-BODIPY foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram isolados e a fluorescência observada por microscopia de epifluorescência. Barra de tamanho em branco: 100 μm . (A) Localização da FC-AG-BODIPY; (B) Imagem de fase contraste de A; (C) Localização do AG-BODIPY; (D) Imagem de fase contraste de C.

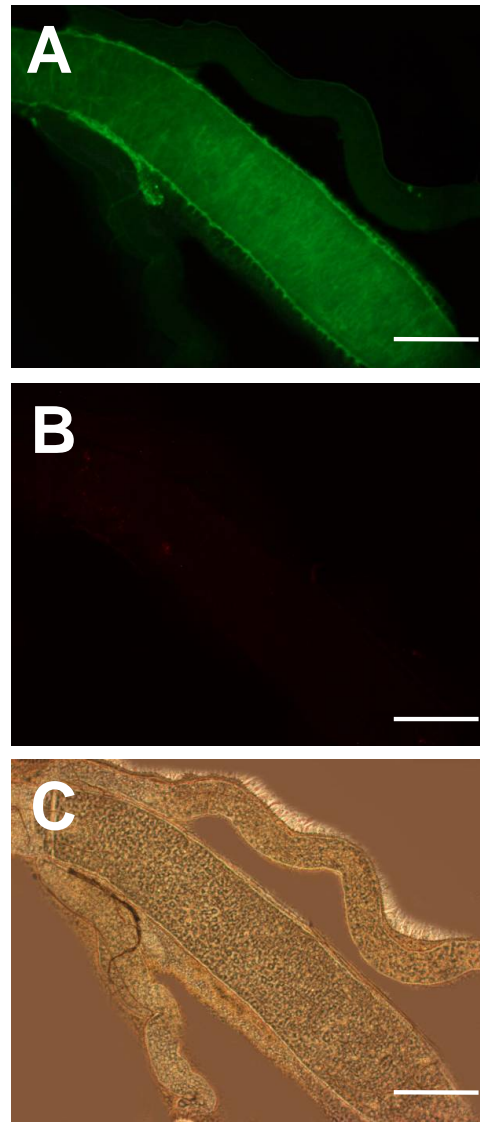


Figura 15 – Localização da Lf fluorescente (Texas Red-Lf) e da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) nas vesículas seminais.

A Lf duplamente marcada na porção protéica com Texas Red e na porção lipídica com FC-AG-BODIPY foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, as vesículas seminais foram isoladas e a fluorescência observada por microscopia de epifluorescência. Barra de tamanho em branco: 100 μm . (A) Localização da Lf marcada com FC-AG-BODIPY; (B) Localização da Texas Red-Lf; (C) Imagem de fase contraste de A e B.

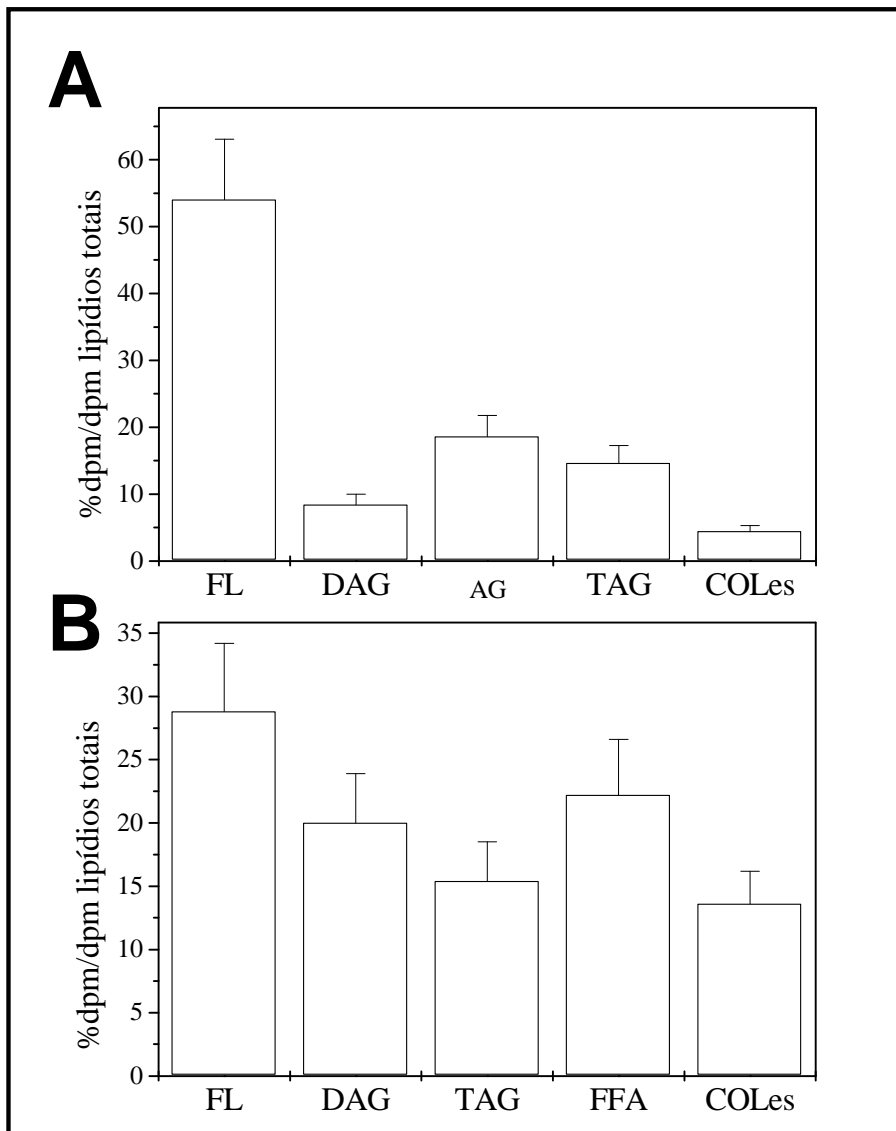


Figura 16 – Incorporação dos lipídios provenientes da $^3\text{H-Lf}$ nas frações de espermatozoides (A) e fluido seminal (B) pelos testículos de *R. prolixus*.

A $^3\text{H-Lf}$ (5×10^4 dpm) foi injetada em machos no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos foram dissecados e os espermatozoides e o fluido seminal foram isolados. Ambos foram submetidos a uma extração de lipídios e posterior análise por TLC. A radioatividade associada a cada classe de lipídio foi quantificada e expressa como dpm do lipídio por dpm totais (todos os lipídios = 100%) média \pm erro padrão para três experimentos independentes. Painel A: lipídios-espermatozoides. Painel B: lipídios-fluido seminal. COLes: colesterol esterificado; DAG: diacilglicerol; AG: ácidos graxos livres; FL: fosfolipídios; TAG: triacilglicerol.

RESULTADOS – PARTE II



4- RESULTADOS - PARTE II: CAPTAÇÃO DA HDLp PELOS TESTÍCULOS DE *Locusta migratoria*: ENDOCITOSE MEDIADA POR RECEPTOR

A 1ª parte de RESULTADOS mostrou que a Lf é internalizada pelos testículos de *R. prolixus* durante o transporte de lipídios a este órgão. Além disso, foram mostradas evidências que a Lf interage com os testículos provavelmente via um receptor específico. Entretanto, até o momento, nenhum receptor de Lf em testículos de insetos, incluindo o *Rhodnius*, foi clonado ou seqüenciado.

O grupo de pesquisa do Prof. Dick J. van der Horst da Universidade de Utrecht na Holanda identificou um receptor de Lf, da família de receptores para LDL, presente no corpo gorduroso de *L. migratoria* (DANTUMA e cols., 1999). Este receptor, o LpR, é capaz de mediar a endocitose de HDLp no corpo gorduroso e em células de mamíferos transfectados com o LpR (RODENBURG & VAN DER HORST, 2005). Para verificar se testículos de outras espécies de insetos são capazes de internalizar a Lf e, se este processo é mediado por um receptor específico, um projeto em colaboração com o grupo do Prof. van der Horst foi realizado.

Com o objetivo de se detectar a presença do LpR nos testículos de *L. migratoria*, preparações de membrana de testículos de adultos do 1º dia após a alimentação e também larvas de 5º estágio (L5) foram submetidas a um SDS-PAGE em condições desnaturantes e as proteínas foram transferidas posteriormente para uma membrana de PVDF. A presença do receptor foi detectada, através de um *western blotting*, utilizando um anticorpo anti-LpR que se liga a 20 aminoácidos da 1ª região de repetição de cisteínas do domínio de ligação (porção N-terminal) do LpR de corpo gorduroso de *L. migratoria*. Este anticorpo foi capaz de identificar uma proteína de cerca de 150 kDa nas preparações de testículos de larvas de 5º estágio

(L5) e adultos de 1º dia após a muda de *L. migratoria* (Figura 17). Como esperado, o LpR foi encontrado no corpo gorduroso mas não nos músculos de vôo, órgão em que o LpR não é expresso (DANTUMA e cols., 1999). Em condições não desnaturantes (Figura 18), observa-se que o LpR dos testículos se mostrou um pouco menor se comparado ao gel em condições desnaturantes, cerca de 130 kDa. Este receptor foi encontrado em larvas L5 e jovens adultos, porém, estava ausente ou pouco expresso em testículos de machos adultos mais velhos (Figura 19).

Para investigar se a HDLp, lipoporfina de alta densidade, era captada pelos testículos assim como ocorre em corpos gordurosos de insetos jovens que expressam o LpR (VAN HOOFF e cols., 2003), esta lipoproteína foi marcada na porção protéica com *Oregon Green*, OG-HDLp (Figura 20A), ou na porção lipídica com Dil, Dil-HDLp (Figura 20B). Testículos de adultos de 1º dia após a muda incubados com OG-HDLp ou Dil-HDLp em tampão de incubação HEPES apresentaram uma marcação fluorescente pontuada de pequenas vesículas característica de processos endocíticos (VAN HOOFF e cols., 2003). Estes resultados demonstraram que este órgão é capaz de captar tanto os lipídios com as apolipoforinas da HDLp.

Como mostrado na Figura 19, o receptor LpR não está presente em testículos de animais mais velhos, somente em jovens adultos. A fim de verificar se a capacidade de captar a HDLp por este órgão também variava ao longo da fase adulta, testículos de adultos do 10º dia após a muda foram incubados com OG-HDLp (Figura 21A) ou Dil-HDLp (Figura 21B). Diferente do que foi observado para testículos de 1º dia, nenhum padrão de vesículas endocíticas foi verificado para testículos de insetos do 10º dia após a muda.

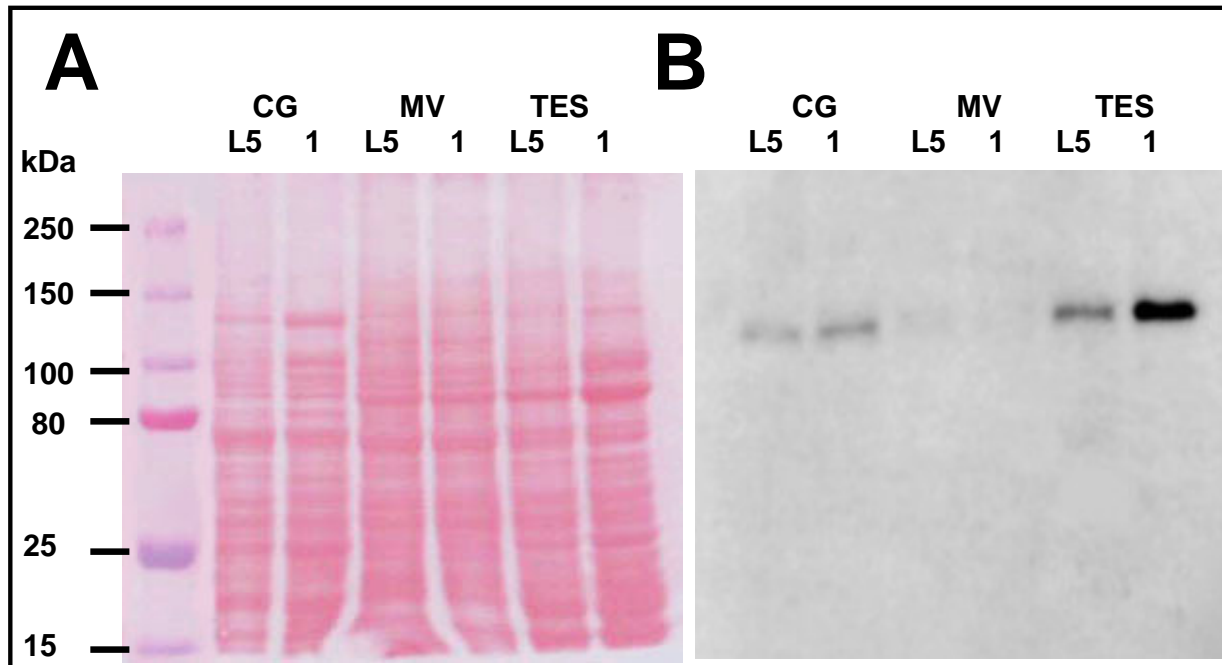


Figure 17 – Presença do receptor LpR em testículos de *L. migratoria* por *Western blotting* – condições desnaturantes.

Os testículos (TES), corpo gorduroso (CG) e músculos de vôo (MV) foram isolados de machos de 5^o estágio (L5) e adultos do 1^o dia após a muda. Obtiveram-se as preparações de membrana de cada tipo de órgão. Estas foram dissolvidas em tampão de amostra em condições desnaturantes. As proteínas destas frações foram então separadas por SDS-PAGE (20µg cada). O gel foi transferido para uma membrana de PVDF (A, corada com *Ponceau Red*) e esta foi incubada com anticorpo primário anti-LpR conforme descrito no item 3.29 de METODOLOGIA. A membrana foi revelada por ECL (B). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda do painel.

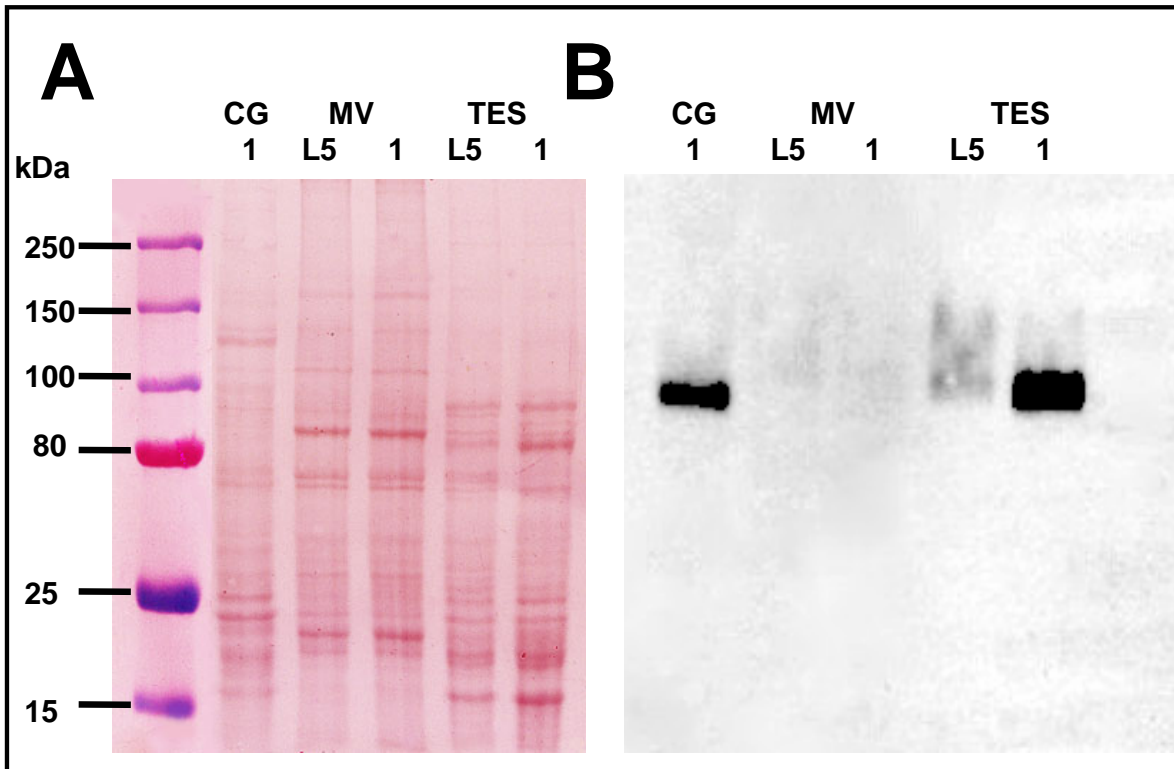


Figure 18 – Presença do receptor LpR em testículos de *L. migratoria* por *Western blotting* – condições não-desnaturantes.

Os testículos (TES), corpo gorduroso (CG) e músculos de vô (MV) foram isolados de machos de 5^o estágio (L5) e adultos do 1^o dia após a muda. Obtiveram-se as preparações de membrana de cada tipo de órgão. Estas foram dissolvidas em tampão de amostra sem agentes desnaturantes. As proteínas destas frações foram então separadas por SDS-PAGE (20µg cada). O gel foi transferido para uma membrana de PVDF (A, corada com *Ponceau Red*), e esta foi incubada com anticorpo primário anti-LpR conforme descrito no item 3.29 de METODOLOGIA. A membrana foi revelada por ECL (B). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda do painel.

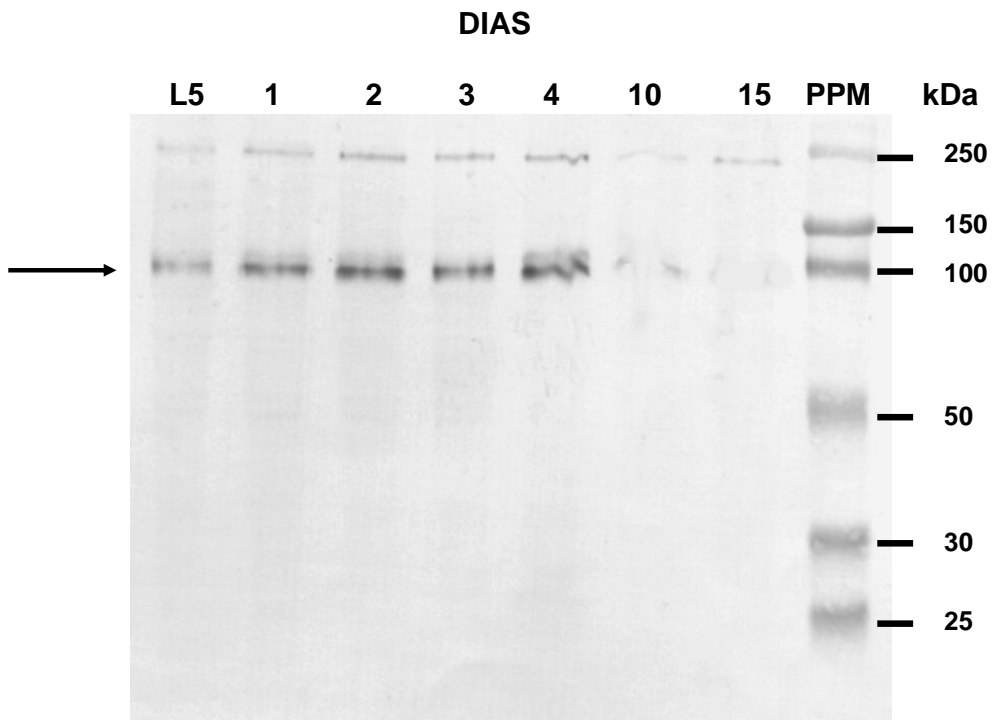


Figure 19 – Presença do receptor LpR em testículos de *L. migratoria* ao longo dos dias após a muda.

Os testículos foram isolados de machos de *L. migratoria* em diferentes dias após a ecdise e obtiveram-se preparações de membrana para cada dia analisado. Estas foram dissolvidas em tampão de amostra sem agentes desnaturantes. As proteínas destas frações foram então separadas por SDS-PAGE (20 µg cada). O gel foi transferido para uma membrana de PVDF, e esta foi incubada com anticorpo primário anti-LpR conforme descrito no item 3.29 de METODOLOGIA. A membrana foi revelada por fosfatase alcalina. Os marcadores de peso molecular estão indicados à direita do painel. A seta mostra a localização do LpR.

Figure 20: Endocitose da HDLp fluorescente nos testículos de jovens adultos no 1º dia após a muda.

A HDLp purificada foi marcada na porção protéica com Oregon Green 488 (OG-HDLp) ou na porção lipídica com Dil (Dil-HDLp). Os testículos foram dissecados de jovens adultos no 1º dia após alimentação e incubados com (A) OG-HDLp (150 µg/mL) ou com (B) Dil-HDLp (10 µg/mL) a 27°C por 20 minutos em meio de incubação. Os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A: em verde, OG-HDLp, em azul DAPI; B: em vermelho, Dil-HDLp, em azul, DAPI.
Barra de tamanho: 25 µm.

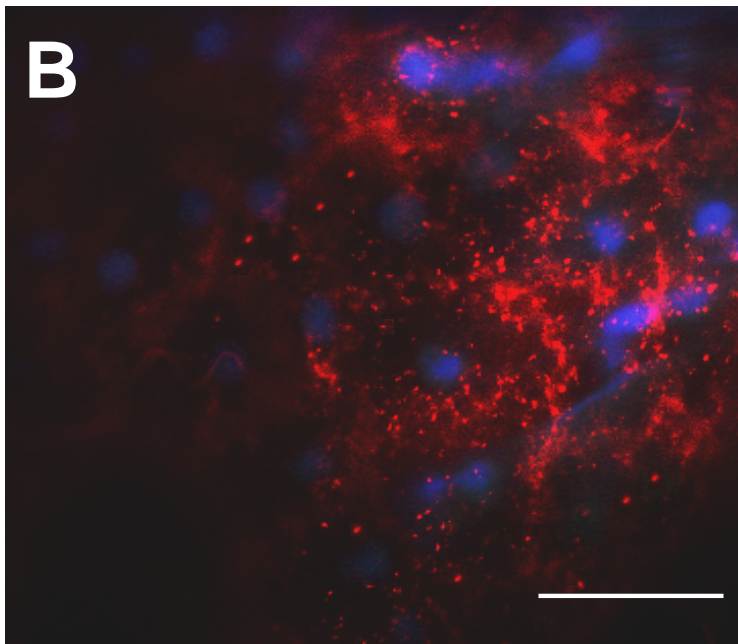
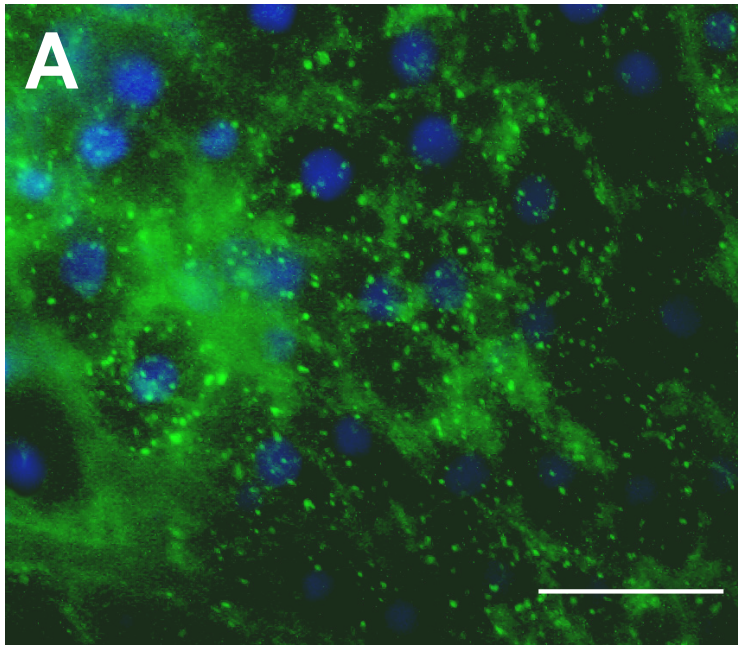
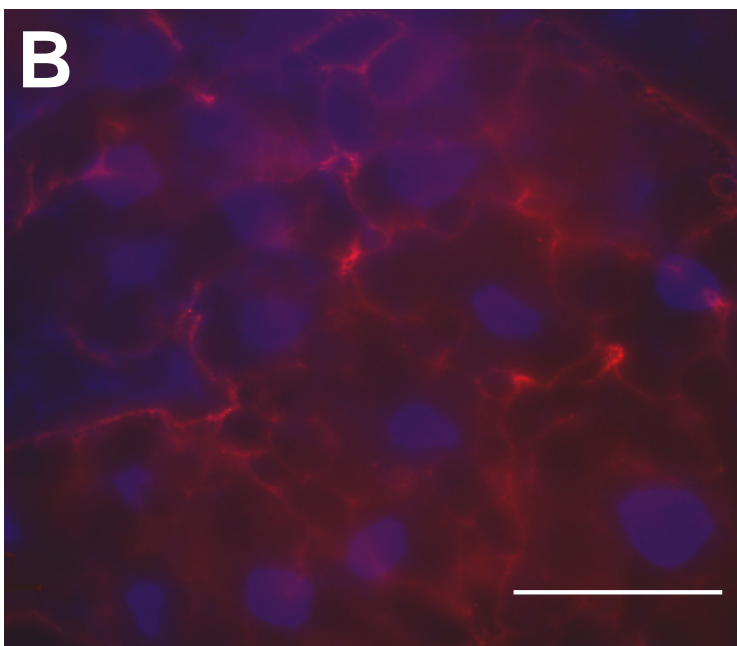
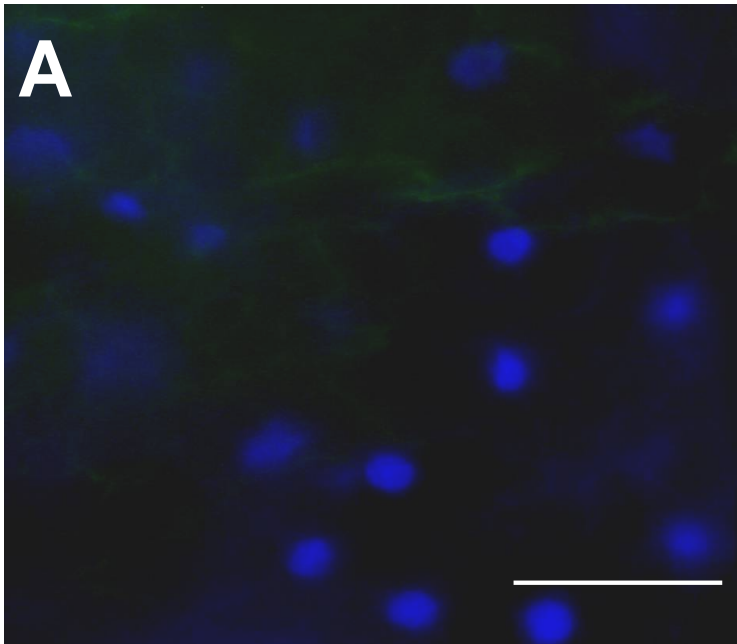


Figure 21: Endocitose da HDLp fluorescente nos testículos de jovens adultos no 10º dia após a muda.

A HDLp purificada foi marcada com fluorescência na porção proteica com Oregon Green 488 (OG-HDLp) ou na porção lipídica com Dil (Dil-HDLp). Os testículos foram dissecados de jovens adultos no 10º dia após alimentação e incubados com (A) OG-HDLp (150 µg/mL) ou (B) com Dil-HDLp (10 µg/mL) a 27°C por 20 minutos em meio de incubação. Os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A: em verde, OG-HDLp, em azul DAPI; B: em vermelho, Dil-HDLp, em azul, DAPI.
Barra de tamanho: 25 µm.



Com o objetivo de se certificar que a marcação fluorescente observada nos testículos de 1º dia após a muda era realmente devido à captação da HDLp pelo órgão e não a uma ligação inespecífica, um tratamento com tripsina foi realizado após a incubação com OG-HDLp (Figura 22). Nestas condições, a mesma marcação fluorescente com vesículas endocíticas, vista na Figura 20, foi observada nos testículos.

A lipoforina de baixa densidade, LDLp, presente na hemolinfa dos insetos durante o vôo, tem a capacidade de entregar lipídios aos ovários de *Manduca sexta* conforme descrito por KAWOOYA e colaboradores (1988). Entretanto, resultados prévios do grupo do Prof. van der Horst demonstraram que esta partícula não era capaz de ser endocitada pelo corpo gorduroso de *L. migratoria*, no período em que o receptor LpR é expresso (VAN HOOFF e cols., comunicação pessoal). Para verificar se o mesmo ocorria em relação aos testículos, a LDLp foi marcada na porção protéica com *Oregon Green* (OG-LDLp) e incubada com os testículos. Nenhum padrão de vesículas endocíticas foi observado (Figura 23).

Para verificar se a captação de HDLp pelos testículos envolvia a ligação (*binding*) desta ao seu receptor no testículos e posterior endocitose pelo órgão, testículos provenientes de adultos de 1º dia após a muda foram incubados com a OG-HDLp a 4 °C por 20 minutos (Figura 24A). Após isto, os tecidos foram lavados e incubados num meio sem a proteína fluorescente a 27 °C por mais 20 minutos (Figura 24B). Os resultados obtidos demonstraram que a 4 °C, nenhum padrão de endocitose foi observado nos tecidos, somente uma forte marcação nas membranas das células. Entretanto, quando os tecidos foram transferidos para um meio sem a OG-HDLp a 27 °C, verificou-se novamente a presença de várias vesículas endocíticas no interior das células. O mesmo ensaio foi realizado utilizando a Dil-

HDLp para verificar se a captação lipídica pelos testículos estava atrelada a endocitose da partícula inteira (OG-HDLp). A Figura 25 demonstra que a 4 °C, nenhum padrão de endocitose foi observado nas células; já a 27 °C, observou-se a endocitose da Dil-HDLp.

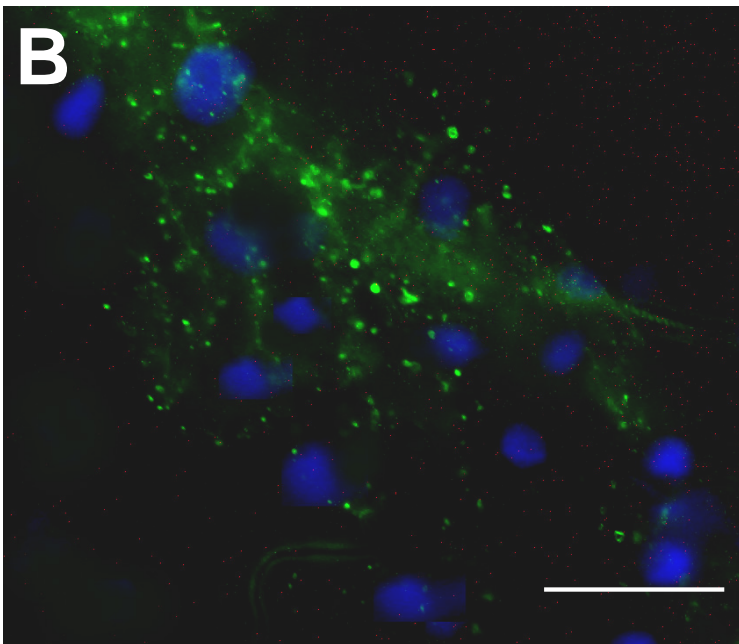
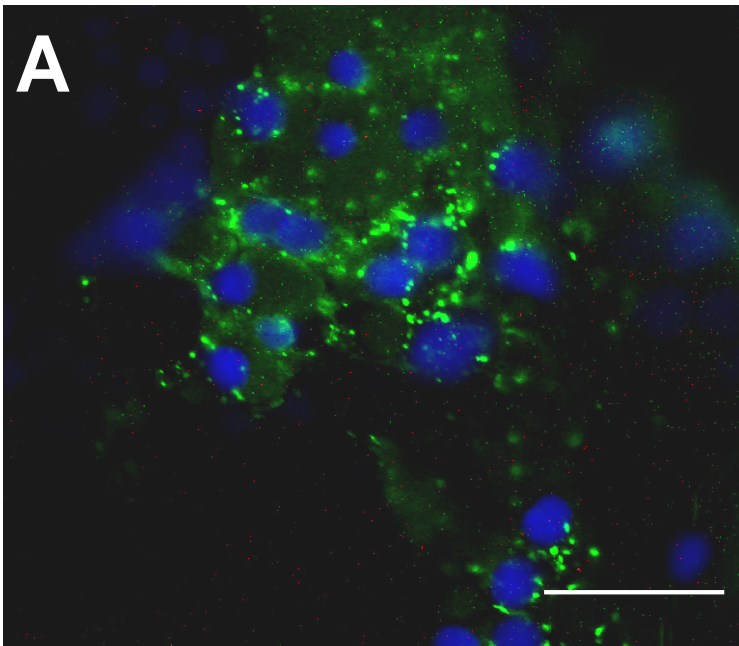
A fim de se obter mais evidências de que a captação de HDLp pelos testículos tratava-se de um processo envolvendo um receptor específico, testículos dissecados de adultos de 1º dia após a muda foram incubados com a OG-HDLp na ausência (Figura 26A) ou presença de um excesso de HDLp não-fluorescente (Figura 26B). Alternativamente, uma incubação contendo a OG-HDLp e um excesso de albumina bovina sérica (BSA) não fluorescente também foi realizada (Figura 26D). Foi mostrado que um excesso de HDLp é capaz de inibir a endocitose de OG_HDLp pelos testículos uma vez que, ocorre competição entre a OG-HDLp e a HDLp não-marcada pelos sítios de ligação neste órgão. O mesmo não se observa na incubação dos testículos com um excesso de albumina não marcada, mostrando que o processo endocítico da HDLp nos testículos envolve um receptor específico.

A fim de verificar se a HDLp de *R. prolixus* também era capaz de competir com a OG-HDLp de *L. migratoria* pelos sítios de ligação nos testículos deste inseto, estes foram incubados com a OG-HDLp de *L. migratoria* na presença de um excesso de HDLp não-fluorescente (Figura 26C). Nestas condições, a endocitose não foi detectada.

Figure 22: Endocitose da HDLp fluorescente pelos testículos de *L. migratoria* com tratamento com tripsina.

Os testículos foram dissecados e incubados com OG-HDLp (150 µg/mL) a 27°C. Após 20 minutos, os testículos foram transferidos para um meio de incubação contendo tripsina 0,05 % e EDTA 0,5 mM; e deixados neste meio por 5 minutos à temperatura ambiente. Após isto, os testículos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A: sem tratamento com tripsina; B: sob tratamento com tripsina. A e B: em verde, OG-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 µm.



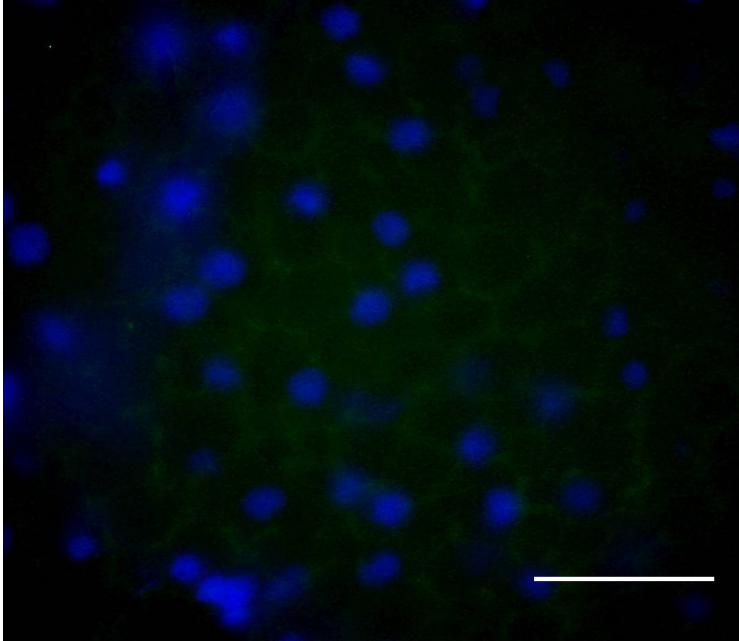


Figure 23: Incubação dos testículos de *L. migratoria* com LDLp fluorescente.

Os testículos foram dissecados e incubados com OG-LDLp (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 27°C, por 20 minutos em meio de incubação. Os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência. Na imagem, em verde, OG-LDLp, em azul DAPI. Barra de tamanho: 25 μm .

Figure 24: Ensaio de ligação e endocitose da OG-HDLp pelos testículos de *L. migratoria*.

Os testículos foram dissecados e incubados com OG-HDLp (150 µg/mL) a 4°C (A). Após 20 minutos, os testículos foram lavados, transferidos para um meio de incubação sem a HDLp marcada e deixados neste meio por mais 20 minutos a 27°C (B). Após isto, os testículos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A e B: em verde, OG-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 µm.

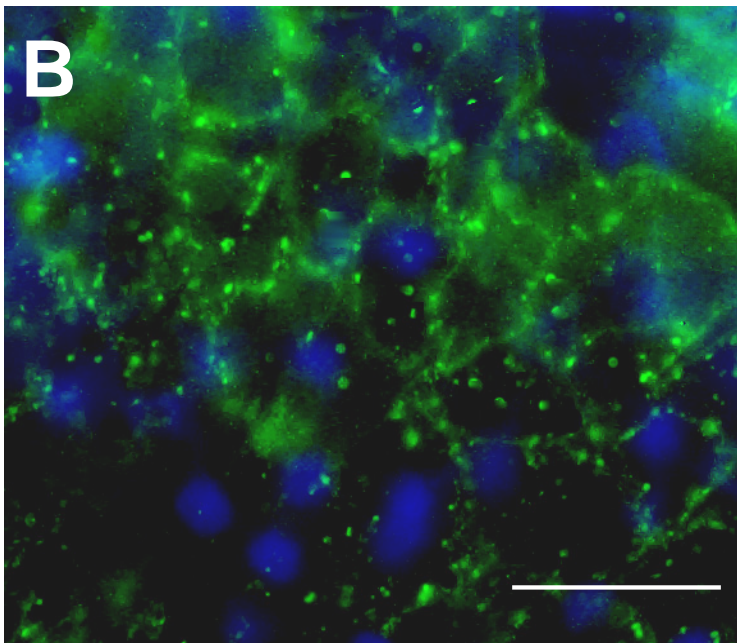
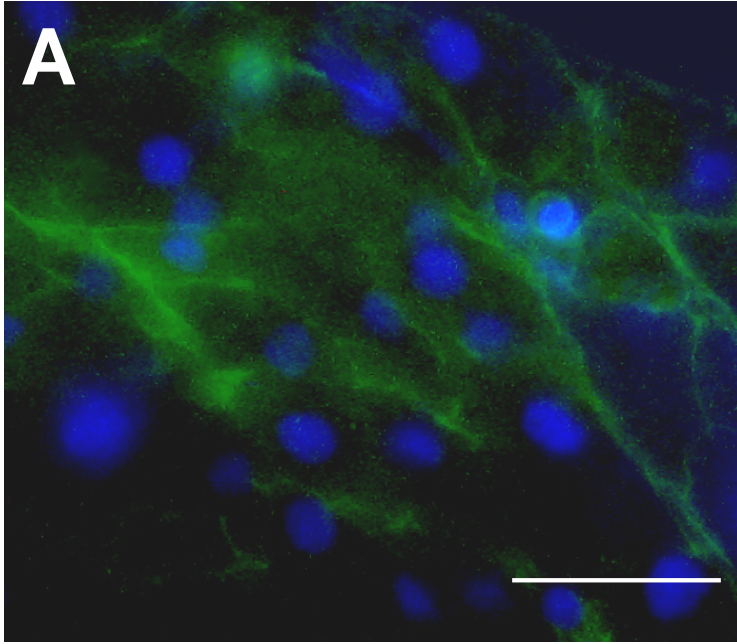


Figure 25: Ensaio de ligação e endocitose da Dil-HDLp pelos testículos de *L. migratoria*.

Os testículos foram dissecados e incubados com Dil-HDLp (10 µg/mL) a 4°C (A). Após 20 minutos, os testículos foram lavados, transferidos para um meio de incubação sem a HDLp marcada e deixados neste meio por mais 20 minutos a 27°C (B). Após isto, os testículos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A e B: em vermelho, Dil-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 µm.

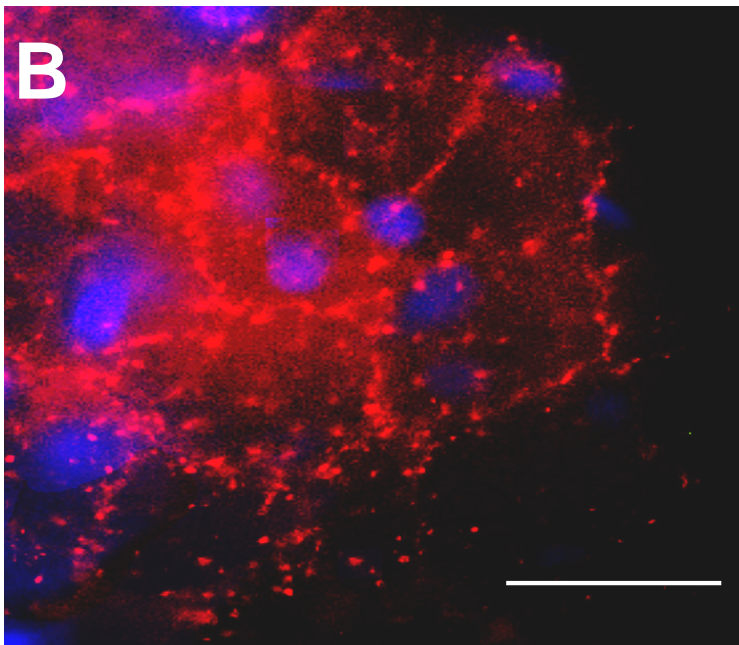
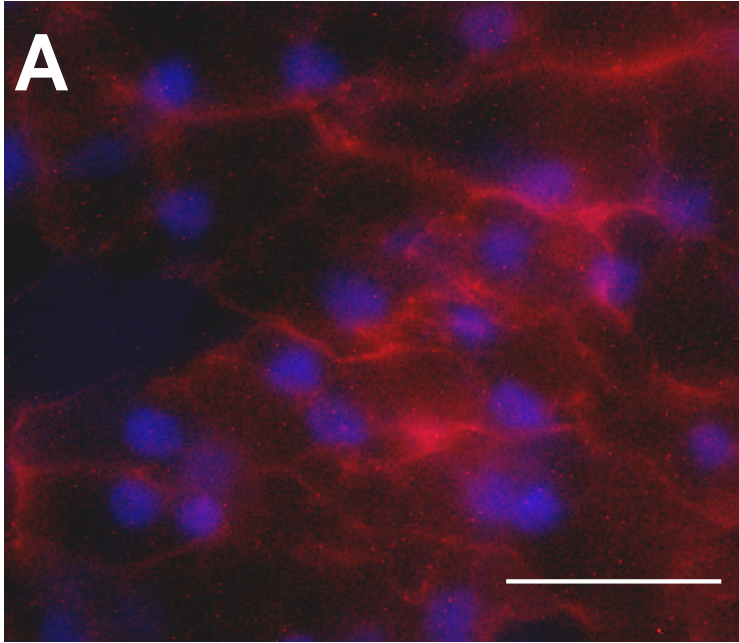
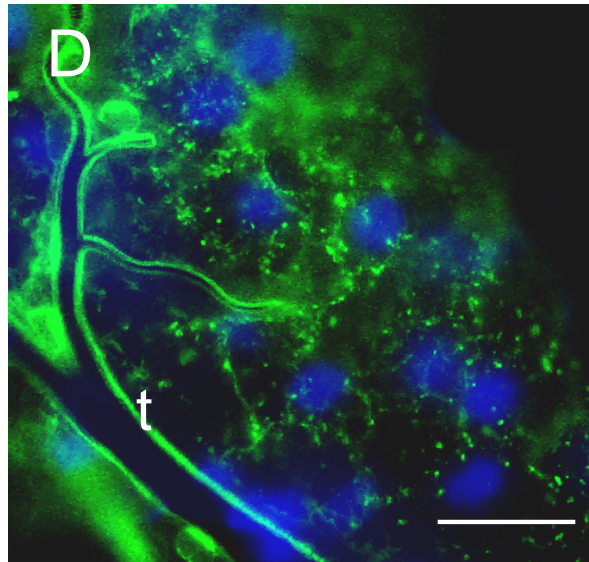
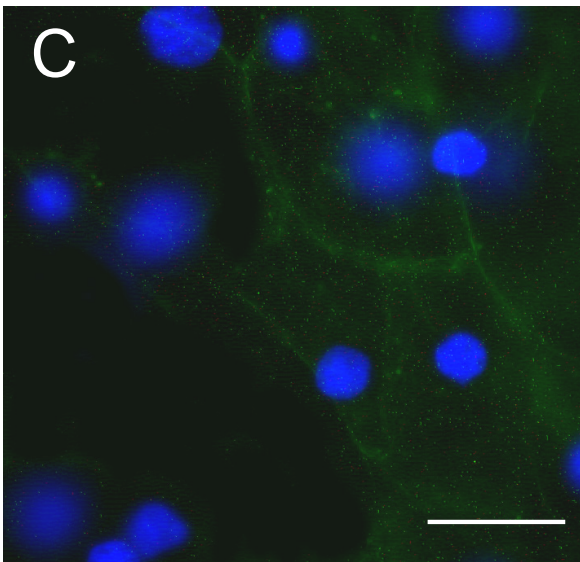
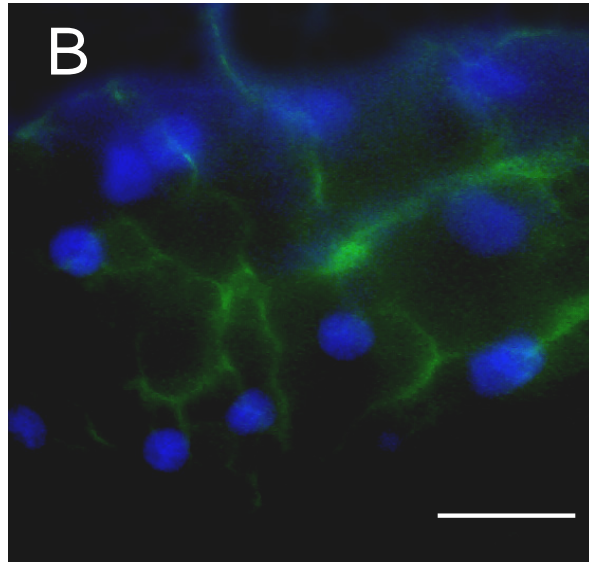
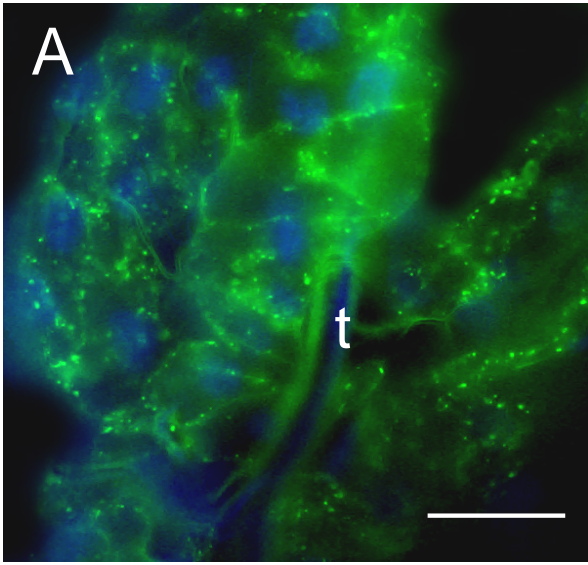


Figure 26: Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp pelos testículos por competição com HDLp não-marcada de *L. migratoria*, de *R. prolixus*, ou albumina.

Os testículos foram dissecados e incubados a 27°C por 20 minutos em quatro diferentes condições experimentais: somente na presença de OG-HDLp (150 µg/mL) (A), com OG-HDLp na presença de um excesso (5 vezes) de HDLp não-marcada de *L. migratoria* (B); de HDLp não-marcada de *R. prolixus* (C); ou de albumina sérica bovina (D). Após isto, os testículos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A-D: em verde, OG-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 µm.

t: traquéia.



Com o intuito de realmente demonstrar que a captação de HDLp pelos testículos de *Locusta migratoria* tratava-se de um processo endocítico, foram utilizados dois inibidores clássicos de endocitose: o cloreto de amônio (NH_4Cl) e a suramina. O NH_4Cl é classicamente descrito como um inibidor da acidificação de comportamentos endosomais e lisosomais em muitos modelos (MELLMAN e cols., 1986). Sendo assim, os testículos de adultos de 1º dia após a muda foram pré-incubados com NH_4Cl e posteriormente com a OG-HDLp (Figura 27) ou com a Dil-HDLp (Figura 28). Os resultados mostraram a endocitose da HDLp foi inibida pelo NH_4Cl .

A suramina é um hidrocarboneto policíclico polisulfatado que é capaz de inibir a ligação de lipoproteína a seus receptores (SCHNEIDER e cols., 1982). Esta droga também foi testada via pré-incubação da mesma com os testículos e posterior incubação com a OG-HDLp (Figura 29). Os resultados obtidos demonstraram que a endocitose da lipoproteína pelos testículos foi prevenida pela pré-incubação com suramina.

Figure 27: Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp por cloreto de amônio.

Os testículos foram dissecados e pré-incubados em meio contendo NH_4Cl , 20 mM (B) ou em PBS pH 7,4 (A) a 27°C por 20 minutos. Após isto, os testículos foram gentilmente lavados e transferidos para o meio de incubação contendo OG-HDLp (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, deixados neste meio por mais 20 minutos a 27°C . Após este período, os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A e B: em verde, OG-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 μm .

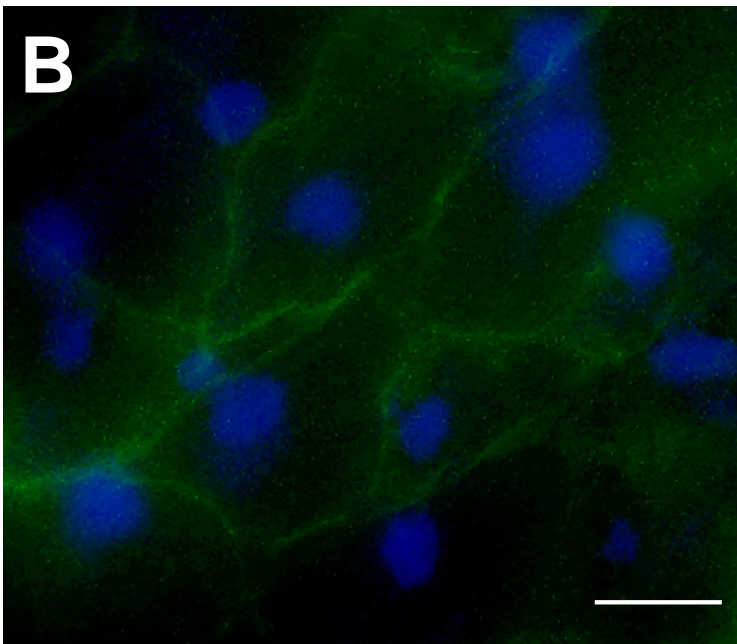
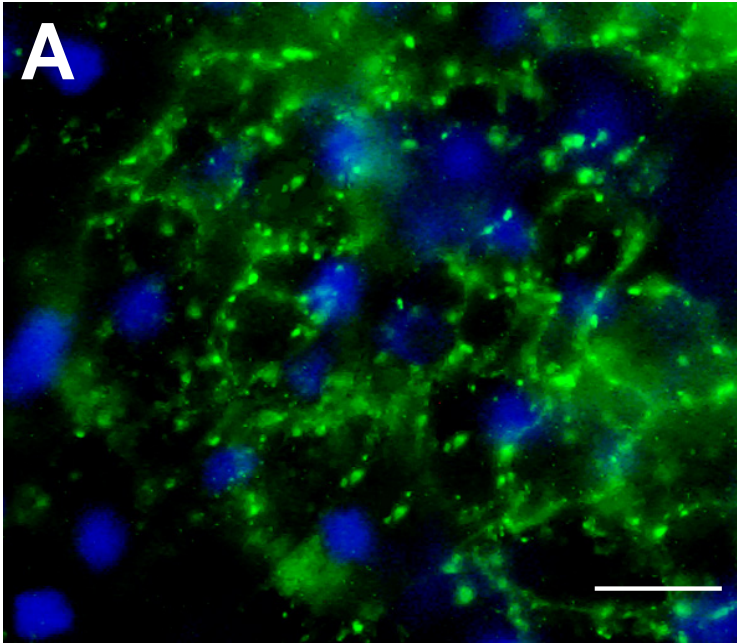


Figure 28: Ensaio de inibição da endocitose da Dil-HDLp por cloreto de amônio.

Os testículos foram dissecados e pré-incubados em meio contendo NH_4Cl , 20 mM (B) ou em PBS pH 7,4 (A) a 27°C por 20 minutos. Após isto, os testículos foram gentilmente lavados e transferidos para o meio de incubação contendo Dil-HDLp (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, deixados neste meio por mais 20 minutos a 27°C . Após este período, os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A e B: em vermelho, Dil-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 μm .

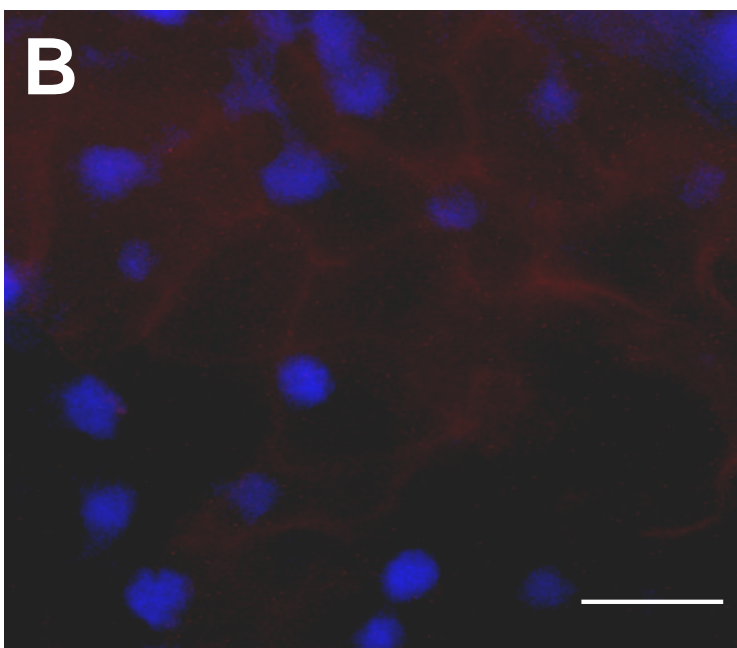
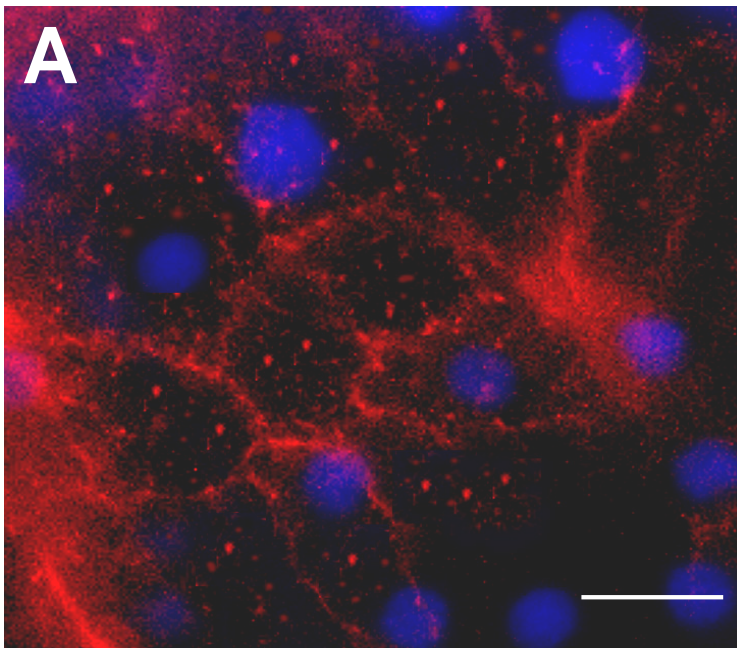
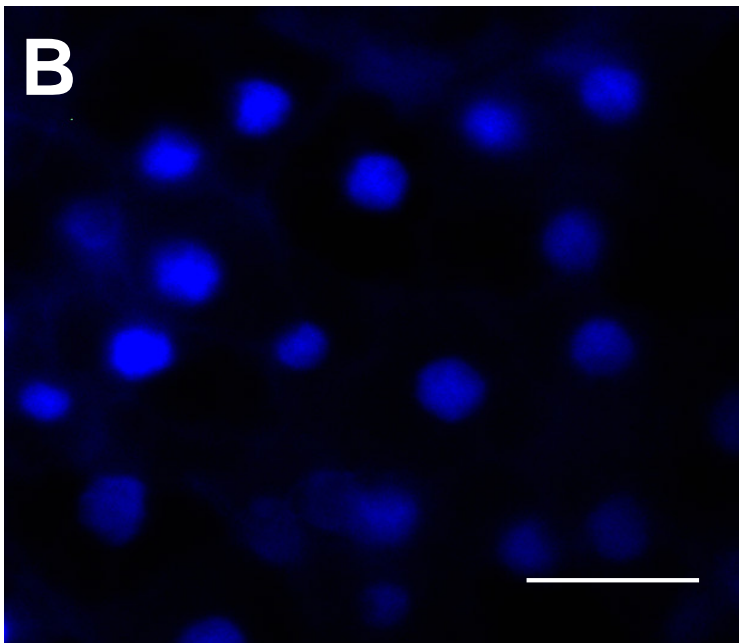
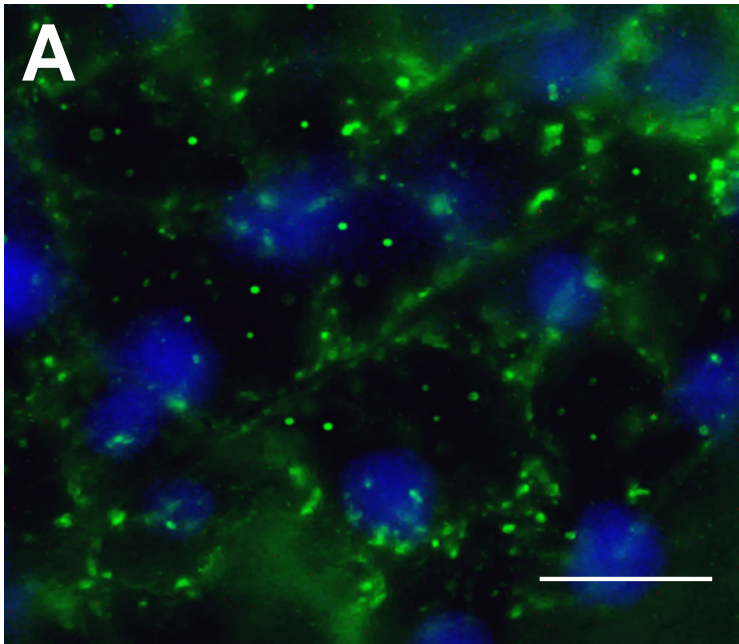


Figure 29: Ensaio de inibição da endocitose da OG-HDLp por suramina.

Os testículos foram dissecados e pré-incubados em meio contendo suramina, 5 mM (B) ou em PBS pH 7,4 (A) a 27°C por 20 minutos. Após isto, os testículos foram gentilmente lavados e transferidos para o meio de incubação contendo OG-HDLp (150 µg/mL) e, deixados neste meio por mais 20 minutos a 27°C. Após este período, os órgãos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com DAPI (0,125 µg/mL) para visualização dos núcleos das células. A visualização da endocitose foi realizada por microscopia de fluorescência.

A e B: em verde, OG-HDLp, em azul, DAPI. Barra de tamanho: 25 µm.



RESULTADOS – PARTE III



4- RESULTADOS - PARTE III: O PAPEL DA Lf NA TRANSFERÊNCIA DE LIPÍDIOS DURANTE A CÓPULA DE *Rhodnius prolixus*

Conforme foi descrito anteriormente em RESULTADOS – PARTE I, os lipídios provenientes da Lf e incorporados pelos testículos de *R. prolixus* são utilizados por este órgão na produção de espermatozóides e estão presentes no fluido seminal (Figura 16). Devido a isto, decidiu-se investigar a transferência dos lipídios provenientes da Lf dos machos às fêmeas durante a cópula.

A Lf foi marcada nos fosfolipídios com ^{32}P i, ^{32}P -Lf, e injetada em machos no 2º dia após a alimentação. Estes machos foram deixados para copular com fêmeas virgens por 5 dias. Após isto, os testículos, glândulas acessórias e vesículas seminais dos machos e; as espermatecas (órgão da fêmea responsável pela armazenagem do sêmen vindo dos machos) das fêmeas foram dissecados. A Figura 30 demonstra que a presença de ^{32}P -fosfolipídios nos testículos, porém, nenhuma radioatividade foi encontrada nas fêmeas após a cópula. O mesmo ensaio de cópula foi realizado com a Lf marcada nos lipídios neutros, ^3H -Lf. Neste caso, após 5 dias de cópula, os ^3H -lipídios neutros foram encontrados nas espermatecas da fêmeas (Figura 31).

Para verificar se toda a partícula da Lf, lipídios e apolipoproteínas, era transferida às fêmeas durante a cópula, utilizou-se a Lf iodada, ^{125}I -Lf, em que a marcação radioativa encontra-se na parte protéica. Os resultados apresentados na Figura 32 mostram que a parte protéica da Lf não é transferida dos machos às fêmeas durante a cópula em *R. prolixus*.

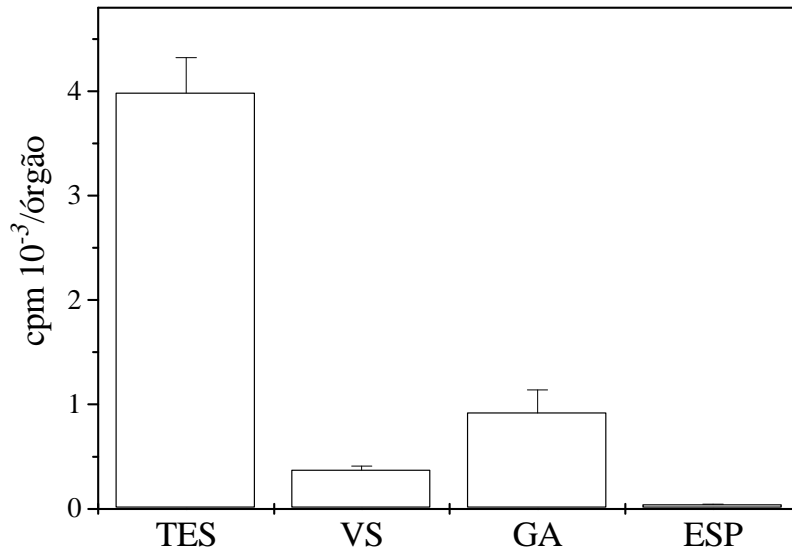


Figura 30 – Transferência de ³²P-fosfolípidios provenientes da ³²P-Lf após a cópula de *R. prolixus*.

A Lf marcada radioativamente nos fosfolípidios com ³²Pi (6×10^4 cpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 5 dias. Após este período, os testículos (**TES**), glândulas acessórias (**GA**), vesículas seminais (**VS**) e espermatecas (**ESP**) foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15M. A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

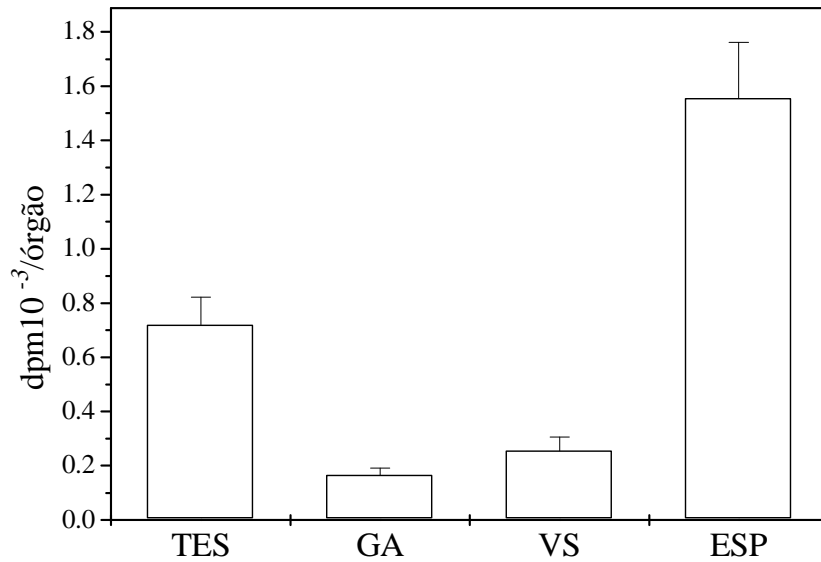


Figura 31 – Transferência de ³H-lipídios neutros provenientes da ³H-Lf após a cópula de *R. prolixus*.

A ³H-Lf (6×10^4 dpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 5 dias. Após este período, os testículos (**TES**), glândulas acessórias (**GA**), vesículas seminais (**VS**) e espermatecas (**ESP**) foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15M. A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

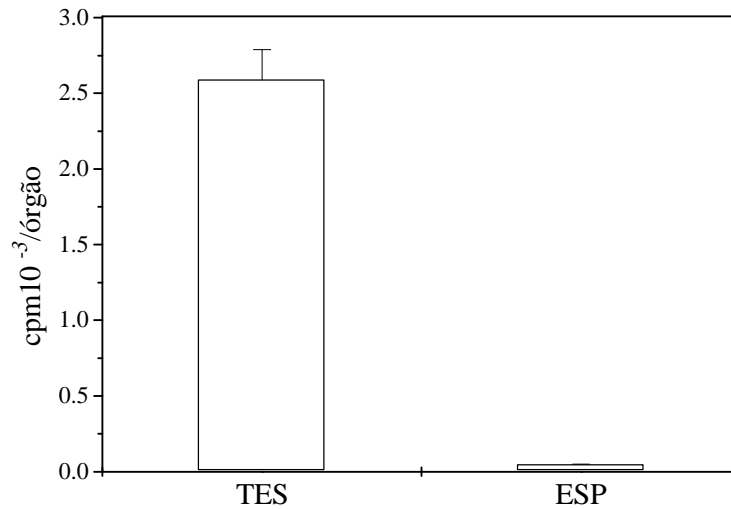


Figura 32 – Transferência de ¹²⁵I-Lf após a cópula de *R. prolixus*.

A Lf marcada radioativamente nas apolipoporinas com ¹²⁵I (6×10^4 cpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 5 dias. Após este período, os testículos (**TES**), glândulas acessórias (**GA**), vesículas seminais (**VS**) e espermatecas (**ESP**) foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15M. A radioatividade associada foi estimada por contador gamma. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

Visto que há transferência lipídica dos machos às fêmeas durante a cópula de *R. prolixus*, ensaios de cópula utilizando Lf marcada fluorescentemente foram realizados para se obter informações adicionais deste processo.

A Lf foi duplamente marcada na porção protéica com Texas Red e na porção lipídica com fosfatidilcolina conjugada a BODIPY (FC-AG-BODIPY). Esta Lf foi injetada em machos que posteriormente copularam com fêmeas virgens por 24 horas. Após este período, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas e a fluorescência foi analisada por microscopia de epifluorescência (Figura 33). A presença da fosfatidilcolina (em verde) foi observada no canal interno da espermateca. Entretanto, nenhuma fluorescência atribuída a Texas Red-Lf foi encontrada. Este resultado acrescido dos dados mostrados na Figura 32 confirma que as apolipoforinas da Lf não são transferidas às espermatecas das fêmeas durante a cópula.

Outro experimento de localização de lipídios fluorescentes nas espermatecas das fêmeas após a cópula foi realizado utilizando uma LF duplamente marcada com ácido palmítico conjugado ao BODIPY (AG-BODIPY) e fosfatidiletanolamina conjugada ao Texas Red (Texas Red-FE) conforme apresentado na Figura 34. Pode-se observar a presença do ácido graxo fluorescente no canal interno do órgão. Já a fluorescência da fosfatidiletanolamina Texas Red proveniente dos machos não foi detectada nas fêmeas. Aparentemente, a transferência de fosfolipídios marcados no fosfato, seja com ^{32}P i ou com fluoróforos, não ocorre durante a cópula de *R. prolixus* (Figura 30 e 34). Porém a transferência de fosfolipídios marcados nos ácidos graxos foi observada (Figura 33).

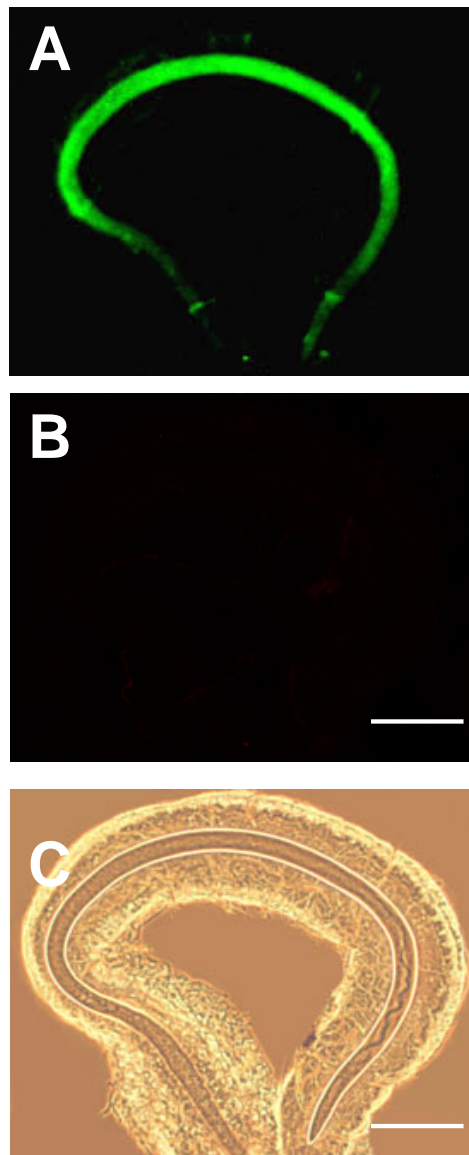


Figura 33 – Localização da fosfatidilcolina (FC-AG-BODIPY) e da Lf fluorescente (Texas Red-Lf) na espermateca após a cópula.

A Lf duplamente marcada na porção protéica com Texas Red e na porção lipídica com FC-AG-BODIPY foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 24 horas. As espermatecas da fêmea foram isoladas e a fluorescência observada por microscopia de epifluorescência. Barra de tamanho em branco: 50 μm . (A) Localização da FC-AG-BODIPY; (B) Localização da Texas Red-Lf; (C) Imagem de fase contraste das imagens A e B.

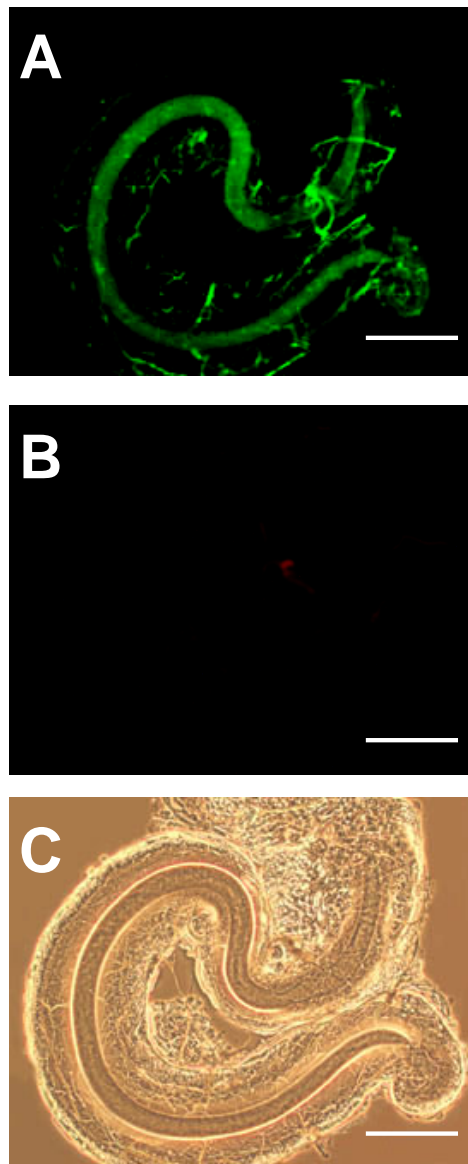


Figura 34 – Localização do ácido palmítico (AG-BODIPY) e da fosfatidiletanolamina (Texas Red-FE) na espermateca após a cópula.

A Lf duplamente marcada nos fosfolípidios com Texas Red-FE e nos ácidos graxos com AG-BODIPY foi injetada em machos adultos no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 24 horas. As espermatecas da fêmea foram isoladas e a fluorescência observada por microscopia de epifluorescência. Barra de tamanho em branco: 50 μm . (A) Localização da AG-BODIPY; (B) Localização da Texas Red-FE; (C) Imagem de fase contraste das imagens A e B.

Isto pode indicar algum tipo de processamento ou modelagem dos fosfolipídios incorporados da Lf nos testículos, liberando assim o fosfato e utilizando as cadeias de ácidos graxos para posterior montagem de novos fosfolipídios e posterior transferência dos mesmos às fêmeas durante a cópula. Outra hipótese é a síntese de novos fosfolipídios pela espermateca usando os ácidos graxos provenientes da quebra de fosfolipídios nos testículos.

Para verificar se as espermatecas, além de serem um órgão de armazenagem de sêmen, também possuíam a capacidade de sintetizar fosfolipídios a partir de $^{32}\text{P}_i$ e ^3H -ácido palmítico; espermatecas não-radioativas foram incubadas com estes precursores radioativos por diferentes tempos. Após cada tempo, os órgãos foram lavados, submetidos à extração lipídica. Os lipídios extraídos foram separados por TLC e determinou-se a radioatividade associada às manchas correspondentes aos fosfolipídios. Verificou-se que as espermatecas são capazes de sintetizar fosfolipídios a partir de ambos os precursores (Figura 35).

A composição dos lipídios transferidos durante a cópula é mostrada na Figura 36. A ^3H -Lf foi injetada em machos e estes copularam com fêmeas virgens por 5 dias. Após isto, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas e submetidas à uma extração de lipídios e TLC. O principal lipídio radioativo presente nas espermatecas após a cópula foi o diacilglicerol; mas fosfolipídios marcados nos ácidos graxos também foram encontrados assim como foi visualizado na Figura 33 para fosfatidilcolina fluorescente.

Associada à transferência de lipídios durante a cópula, observa-se um aumento do número de espermatozóides nas espermatecas das fêmeas ao longo dos dias após a união dos casais (Figura 37). Este aumento é observado até o 4º dia

após a reunião dos casais, em que então o número de espermatozoides começa a decair acompanhado do início da oviposição (resultado não-mostrado).

A espermateca armazena o sêmen proveniente dos machos após a cópula. Deste sêmen, os espermatozoides são usados na fertilização dos ovos e algumas moléculas presentes no fluido seminal são capazes de atravessar o aparelho reprodutor das fêmeas e alcançar a hemolinfa onde desempenham diversas funções (WOLFNER, 2002). Foi mostrado anteriormente nesta tese que os lipídios radioativos provenientes da Lf podem ser encontrados nos espermatozoides e fluido seminal dos machos (Figura 16). Além disso, ao longo de RESULTADOS – PARTE III pode-se constatar a transferência lipídica durante a cópula. Desta forma, procurou-se saber se os lipídios radioativos encontrados nas espermatecas das fêmeas após a cópula realmente são devido à transferência de espermatozoides marcados, a ^3H -Lf foi injetada em machos. Estes machos copularam com fêmeas virgens por 5 dias, após isto, as fêmeas foram separadas e esperou-se até a postura dos primeiros ovos.

A Figura 38 mostra a presença de radioatividade (associada aos ^3H -lipídios neutros) em ovos recém-postos pelas fêmeas que copularam com machos injetados. Um grupo de ovos radioativos foi separado e esperou-se 15 dias até a eclosão das ninfas de 1º estágio, demonstrando assim que estes ovos estavam realmente fertilizados (resultado não-mostrado). Além disso, também foi encontrada radioatividade na hemolinfa das fêmeas que copularam com machos injetados.

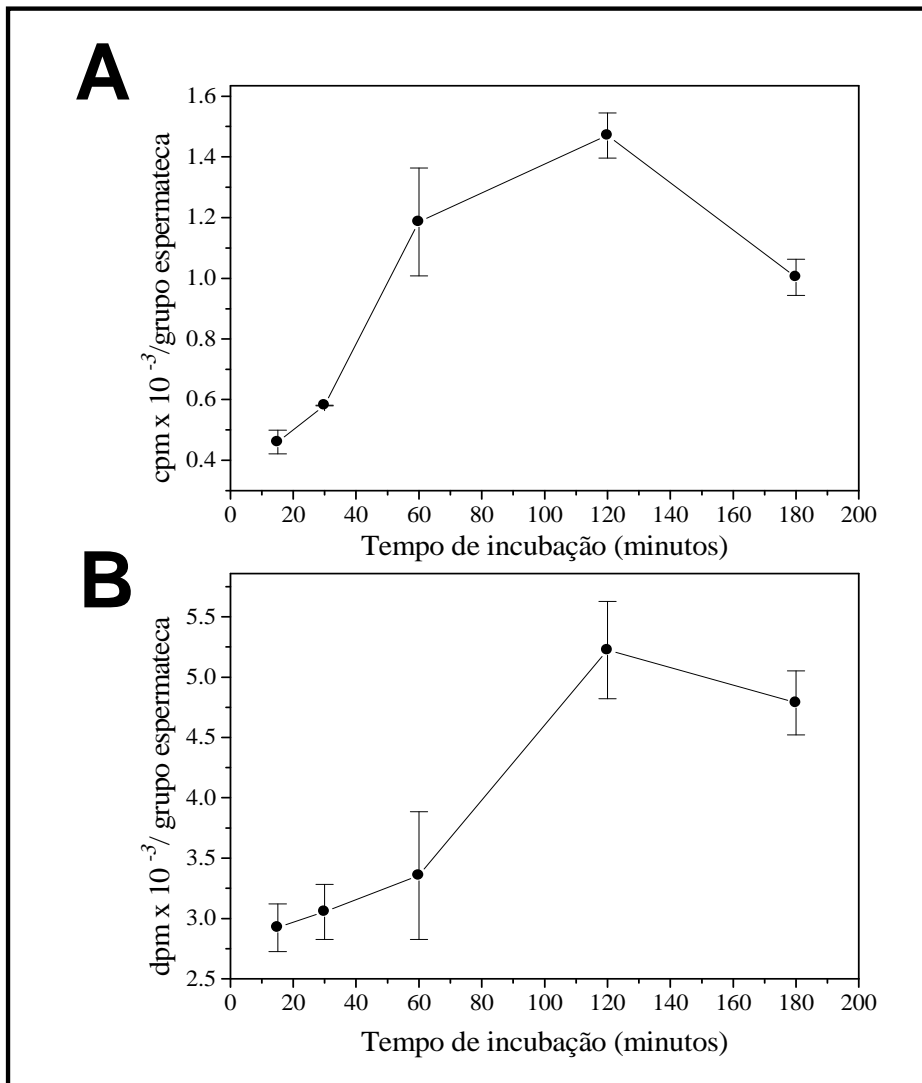


Figura 35 – Capacidade de síntese de fosfolipídios pelas espermatecas a partir de precursores radioativos.

As espermatecas de fêmeas adultas (4 espermatecas reunidas por ponto/tempo) foram dissecadas e incubadas em meio Sigma 199 na presença de fosfato inorgânico radioativo, ^{32}P i (0,5 μCi) (A), ou com ácido palmítico radioativo ^3H (0,5 μCi) (B) por diferentes tempos. Após os tempos desejados, as espermatecas foram lavadas, homogeneizadas e submetidas a uma extração de lipídios. Os lipídios foram separados por TLC. As manchas correspondentes aos fosfolipídios foram raspadas das placas e a radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida. Os resultados são médias \pm DP de três determinações.

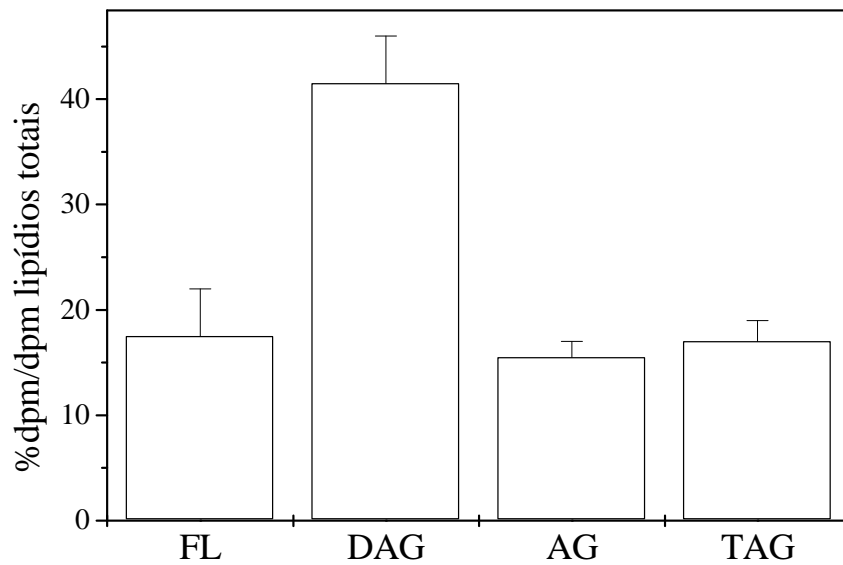
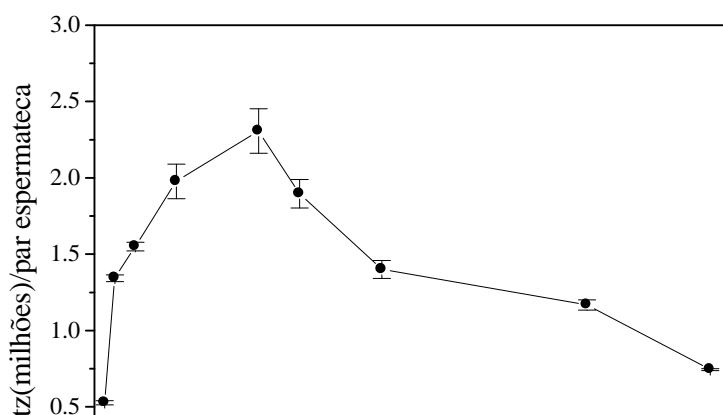


Figura 36 – Composição dos lipídios transferidos durante a cópula e presentes na espermateca da fêmea.

A $^3\text{H-Lf}$ (5×10^4 dpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada por 5 dias. Após este período, as espermatecas da fêmea foram dissecadas, lavadas e os lipídios totais extraídos e analisados por TLC. A radioatividade associada a cada classe de lipídio foi estimada por cintilação líquida e expressa como dpm do lipídio por dpm totais (todos os lipídios = 100%) média \pm erro padrão para três experimentos independentes.

DAG: diacilglicerol; AG: ácidos graxos livres; FL: fosfolipídios; TAG: triacilglicerol.



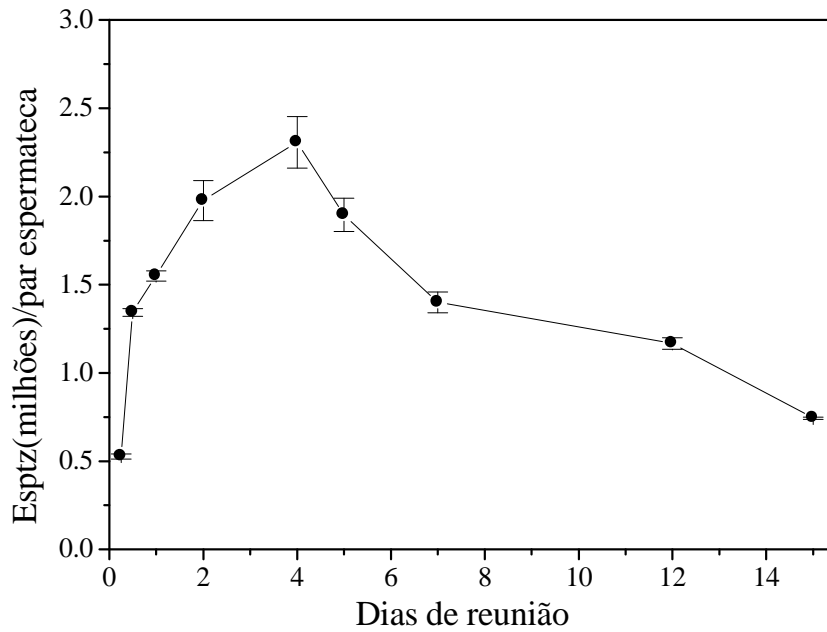


Figura 37 – Contagem de espermatozoides transferidos às espermatecas durante a cópula ao longo dos dias de reunião dos casais.

No 2º dia após a alimentação, machos e fêmeas foram postos em vials (um casal/vial) por diferentes dias. A cada dia desejado, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas e os espermatozoides transferidos após a cópula foram contados.

Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

Esptz: espermatozoides.

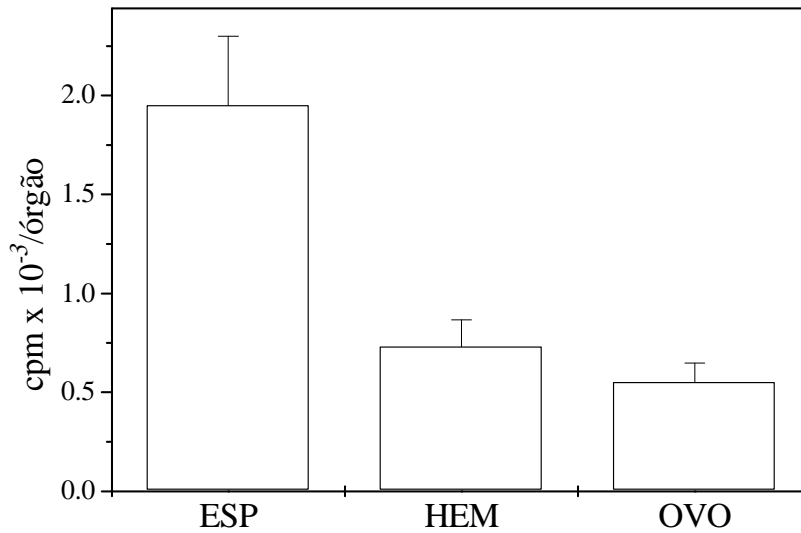


Figura 38 – Presença de ³H-lipídios neutros em fêmeas de *R. prolixus* após a cópula.

A ³H-Lf (6×10^4 dpm) foi injetada em machos de 1ª alimentação no 2º dia após a alimentação. Cada macho foi posto em um mesmo vial com uma fêmea virgem não-injetada. No 5º dia após o encontro, as espermatecas (**ESP**) foram dissecadas e a hemolinfa (**HEM**) foi coletada. Um grupo de fêmeas foi usado para coleta de ovos recém-postos (1º dia de postura) (**OVO**). A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida e expressa em dpm por par de espermatecas e/ou 5 µL de hemolinfa e/ou 1 ovo posto. Os pontos no gráfico representam média ± DP para três determinações.

RESULTADOS - PARTE IV



4- RESULTADOS - PARTE IV: INFLUÊNCIA DO VÔO NA TRANSFERÊNCIA DE LIPÍDIOS DURANTE A CÓPULA DE *Rhodnius prolixus*

O vôo é um processo que requer uma intensa mobilização e transporte de recursos, principalmente os lipídios, a serem utilizados como combustíveis para os músculos de vôo de forma a sustentar o exercício prolongado (BLACKLOCK & RYAN, 1994). Estudos anteriores do metabolismo de lipídios durante o vôo de *R. prolixus* mostraram que mudanças na densidade da Lf ocorrem durante este processo metabólico indicando entrega de lipídios aos músculos de vôo (OLIVEIRA, 2003). Devido a isto, nesta tese, procurou-se identificar o efeito do vôo na transferência de lipídios durante a cópula de *R. prolixus*.

A capacidade de vôo dos machos ao longo dos dias após a alimentação é mostrada na Figura 39B. O 2º dia após a alimentação foi o dia em que os machos voaram por mais tempo. Curiosamente, é neste período em que a produção de espermatozóides encontra-se acentuada nos testículos (Figura 39A). Estes resultados indicam que neste período de alta atividade metabólica, provavelmente a disponibilidade de lipídios oriundos da digestão do sangue é grande para suprir as demandas de recursos para estas duas importantes atividades fisiológicas.

A fim de verificar a influência do vôo na transferência de lipídios da Lf, a lipoproteína responsável por entregar lipídios dos sítios de absorção e estocagem como o intestino, às gônadas, a ^{32}P -Lf (Figura 40A) ou ^3H -Lf (Figura 40B) foi injetada em machos adultos após diferentes tempos de vôo. Após 24 horas, os testículos e os músculos de vôo foram dissecados e a radioatividade associada aos órgãos foi determinada. Verificou-se uma diminuição da incorporação de ^{32}P -fosfolipídios e ^3H -

lipídios neutros pelos testículos e, um aumento da transferência destes lipídios aos músculos de vôo ao longo do tempo de vôo.

O mesmo experimento foi realizado com a injeção de ^{32}P -Lf ou ^3H -Lf em fêmeas adultas após diferentes tempos de vôo. Assim como foi observado no vôo de machos, um decréscimo na transferência de lipídios aos ovários e um aumento da transferência aos músculos de vôo foram observados (Figura 41). Este fenômeno pode ser confirmado quando se observa o perfil lipídico dos ovários e músculos de vôo após a atividade de vôo (Tabela 1). Nos ovários, o vôo está associado a uma diminuição da quantidade de todas as classes de lipídios analisadas. Já nos músculos de vôo, exceto triacilglicerol, houve aumento da quantidade de todos os lipídios analisados.

Com o objetivo de se analisar o efeito do vôo na produção de espermatozoides pelos testículos, os machos de *R. prolixus* voaram até a exaustão. Após 24 horas, os testículos foram coletados e os espermatozoides foram contados conforme mostrado na Figura 42. Observou-se uma diminuição de cerca de 40% no número de espermatozoides em testículos de machos que voaram comparado aos que foram mantidos no repouso.

Uma vez que o vôo está relacionado a uma diminuição da incorporação de lipídios e, por conseguinte de Lf, pelos testículos e, uma diminuição na produção de espermatozoides por este órgão, perguntou-se se o exercício também levaria a um decréscimo na transferência de lipídios às fêmeas durante a cópula. Machos adultos voaram até a exaustão e foram injetados com a ^3H -Lf. Estes machos copularam com fêmeas virgens não-radioativas por 4 dias; e após isto, as espermatecas da fêmeas, testículos e músculos de vôo dos machos foram dissecados. Pode-se verificar que uma diminuição da radioatividade presente nos testículos de machos que voaram e,

nas espermatecas de fêmeas que copularam com estes machos em relação aos experimentos com machos em repouso (Figura 43). Este fenômeno foi acompanhado por um aumento da transferência de lipídios neutros marcados aos músculos de vôo nos machos que voaram. Estes resultados indicam que o fluxo de Lf é deslocado aos músculos de vôo a fim de suprir a demanda lipídica deste órgão em detrimento dos testículos; e este processo altera a transferência de lipídios às fêmeas durante a cópula.

A diminuição da produção de espermatozoides pelos testículos, da incorporação de lipídios pelos testículos e da transferência de lipídios durante a cópula está associada a uma diminuição na transferência de espermatozoides às fêmeas. A Figura 44 mostra um decréscimo de 25% no número de espermatozoides encontrados nas espermatecas das fêmeas que copularam com machos que voaram se comparado às fêmeas que copularam com machos mantidos em repouso.

Por fim, verificou-se a influência do vôo de machos (Figura 45) ou de fêmeas (Figura 46) na oviposição. No caso do vôo de machos, as fêmeas que copularam com machos que se exercitaram previamente (ver METODOLOGIA) apresentaram uma diminuição de mais de 40% no número de ovos postos se comparado àquelas que copularam com machos mantidos em repouso. Já no caso do vôo de fêmeas, observou-se um decréscimo de 20% no número de ovos postos comparado ao às fêmeas em repouso.

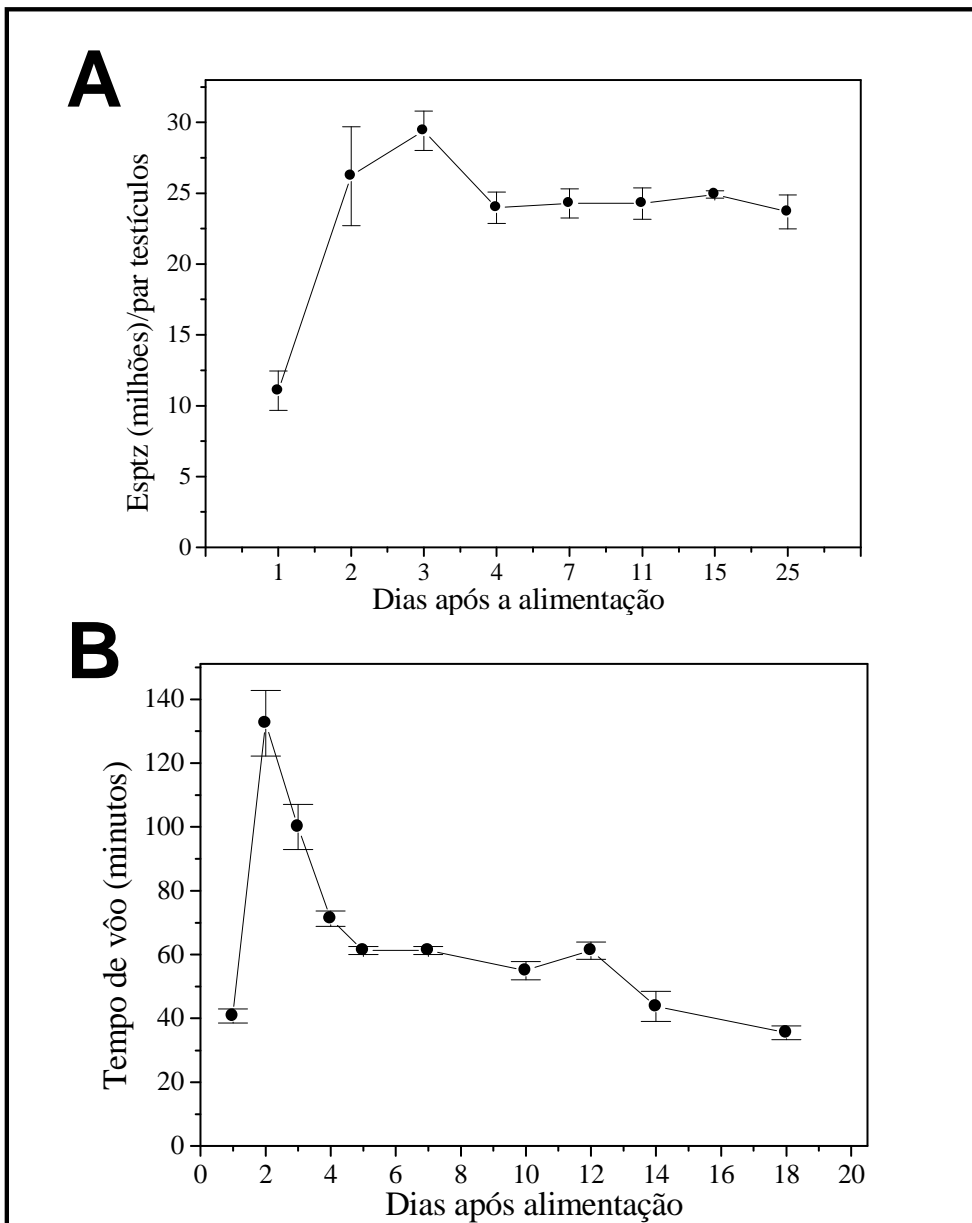


Figura 39 – Produção de espermatozóides pelos testículos e capacidade de vôo de machos adultos de *R. prolixus* ao longo dos dias após a alimentação .

Em diferentes dias após a alimentação sanguínea, os testículos de machos adultos foram dissecados e os espermatozóides contados (A). Paralelamente, foi avaliada a capacidade de machos adultos ao longo dos dias após a alimentação. Para isto, machos adultos de 1ª alimentação foram submetidos ao vôo exaustivo em vários dias após o repasto (B). Os resultados mostrados são médias \pm DP para três determinações. Esptz: espermatozóides.

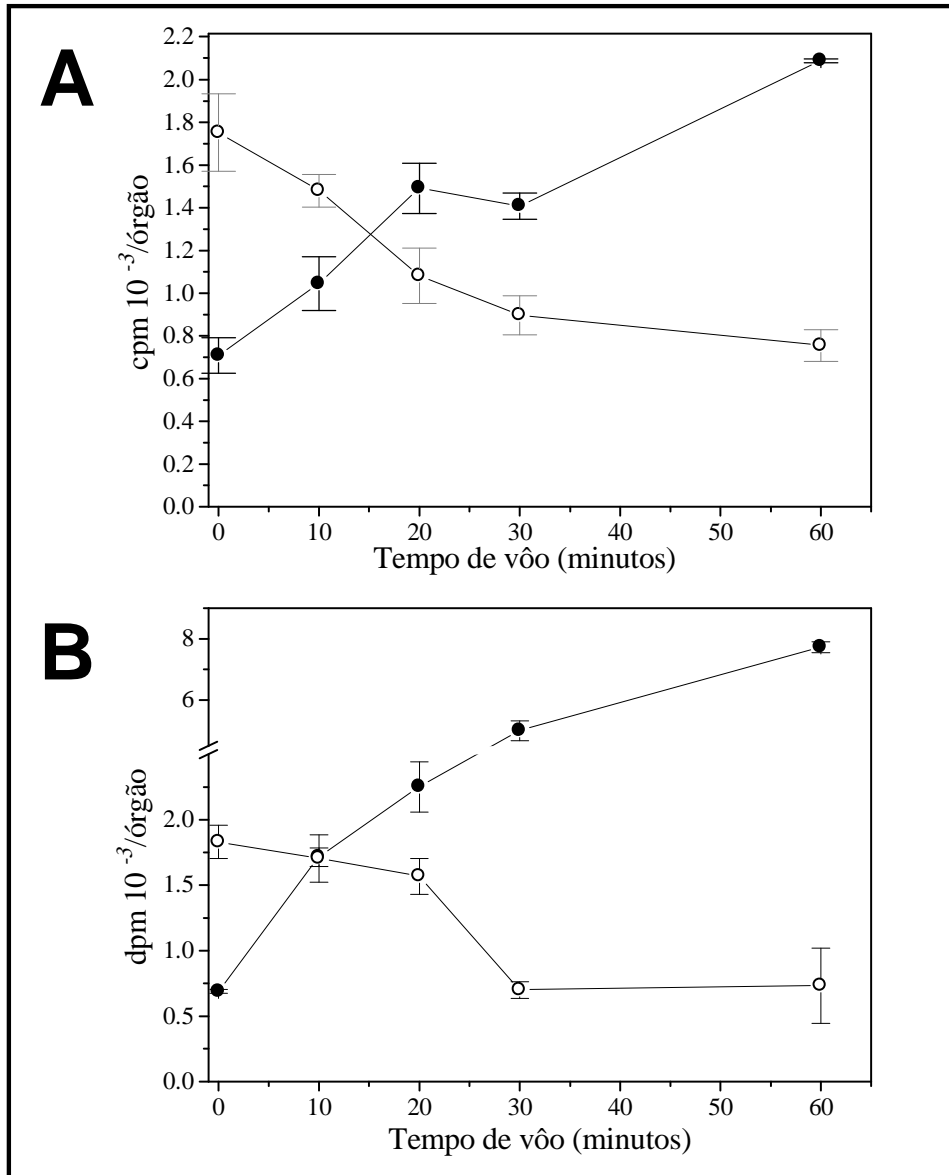


Figura 40 - Efeito do vôo de machos na transferência de ^{32}P -fosfolipídios (A) e ^3H -lipídios neutros (B) para os testículos e músculos de vôo.

^{32}P -Lf (5×10^4 cpm) (A) ou ^3H -Lf (5×10^4 dpm) (B) foi injetada em machos adultos após diferentes tempos de vôo no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os testículos (○) e os músculos de vôo (●) foram dissecados, lavados e a radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para quatro determinações.

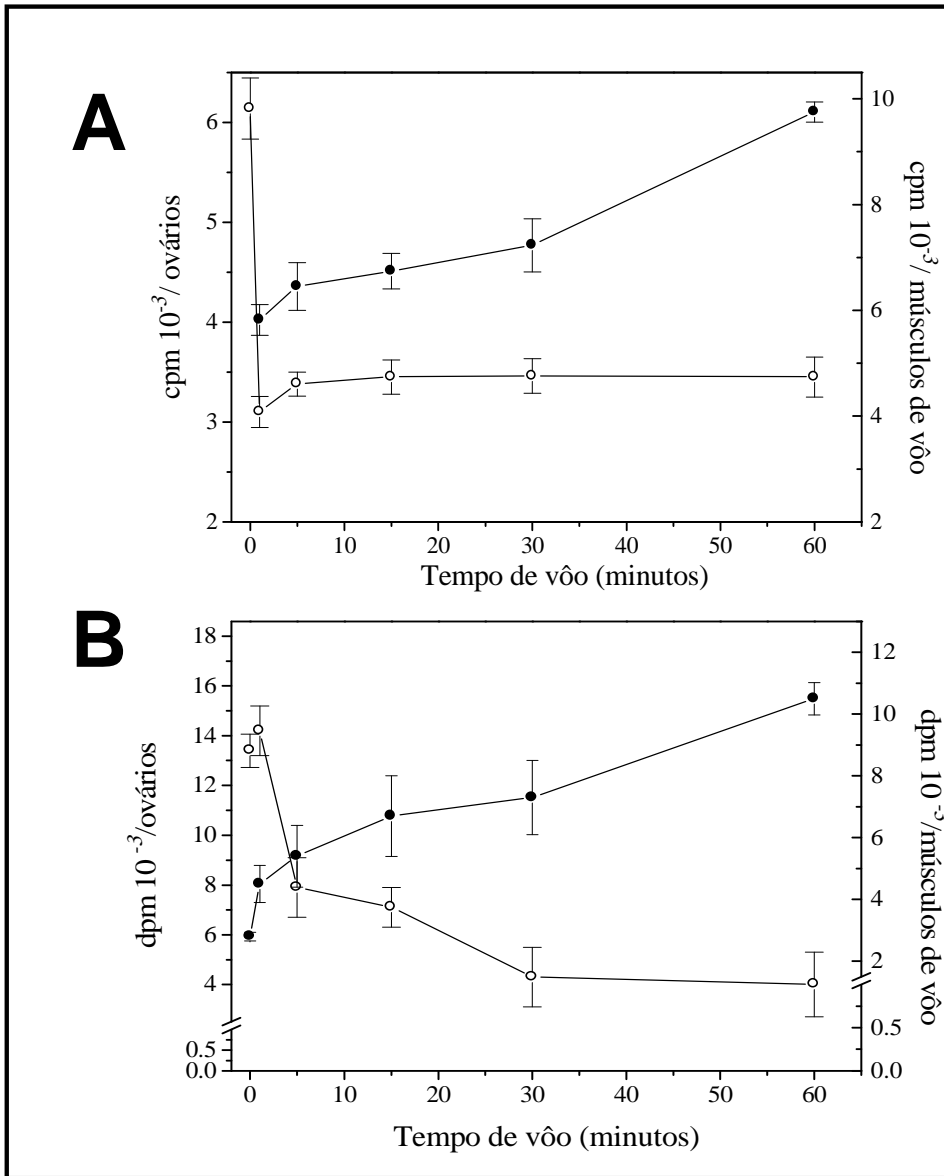


Figura 41 - Efeito do vôo de fêmeas na transferência de ^{32}P -fosfolipídios (A) e ^3H -lipídios neutros (B) para os ovários e músculos de vôo.

^{32}P -Lf (5×10^4 cpm) (A) ou ^3H -Lf (5×10^4 dpm) (B) foi injetada em fêmeas adultas após diferentes tempos de vôo no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas, os ovários (○) e os músculos de vôo (●) foram dissecados, lavados e a radioatividade associada foi determinada por cintilação líquida. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para quatro determinações.

Tabela 1: Perfil lipídico dos ovários e músculos de vôo após o vôo.

Fêmeas de *R. prolixus* voaram por uma hora, após isto, os ovários e músculos de vôo foram coletados e submetidos à uma extração lipídica. Os lipídios foram analisados por TLC. O conteúdo de cada lipídio foi estimado por densitometria como descrito em METODOLOGIA. Os valores mostrados na tabela correspondem a μg de lipídio por órgão. Desvio padrão para dois experimentos independentes.

Lipídios	Músculos de vôo		Ovários	
	Repouso	Vôo	Repouso	Vôo
Ésteres de colesterol	9,05 (\pm 0,9)a	13,76 (\pm 1,0)b	13,11(\pm 1,1)	8,85 (\pm 0,8)
Triacilglicerol	36,61 (\pm 2,1)	26,81 (\pm 2,6)	32,62 (\pm 2,6)	17,92 (\pm 1,2)
Ácidos graxos	28,31 (\pm 2,7)	33,57 (\pm 0,5)	11,01 (\pm 1,0)	8,30 (\pm 0,6)
Diacilglicerol	10,47 (\pm 1,1)	12,32 (\pm 0,8)	10,76 (\pm 1,7)	7,92 (\pm 0,7)
Fosfolipídios	7,50 (\pm 0,8)	8,21 (\pm 0,8)	7,31 (\pm 0,6)	4,91 (\pm 0,3)
Monoacilglicerol	-	-	1,32 (\pm 0,1)	0,13 (\pm 0,01)

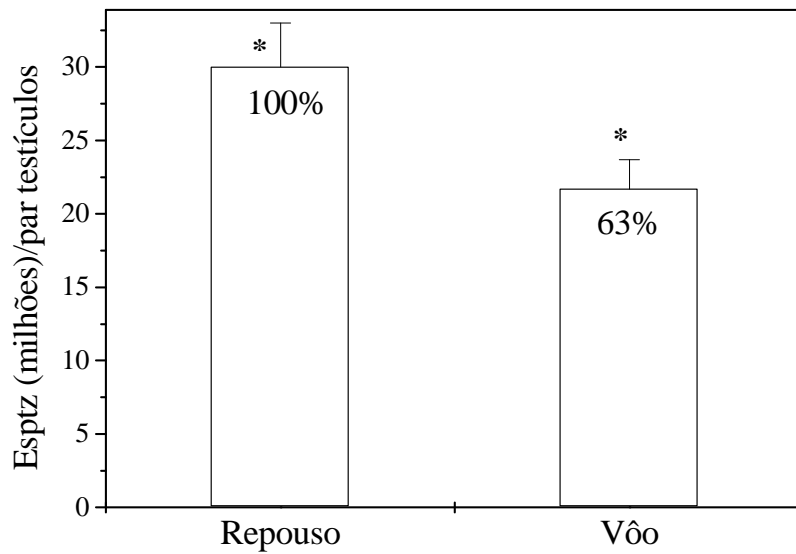


Figura 42 – Produção de espermatozoides pelos testículos após o vôo exaustivo de machos adultos de *R. prolixus*.

Machos adultos foram submetidos ao vôo exaustivo no 2º dia após a alimentação. Após 24 horas do término da atividade de vôo, os testículos foram dissecados e os espermatozoides contados. Um grupo controle de machos mantidos em repouso também foi utilizado. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações. * $P < 0,05$

Esptz: espermatozoides.

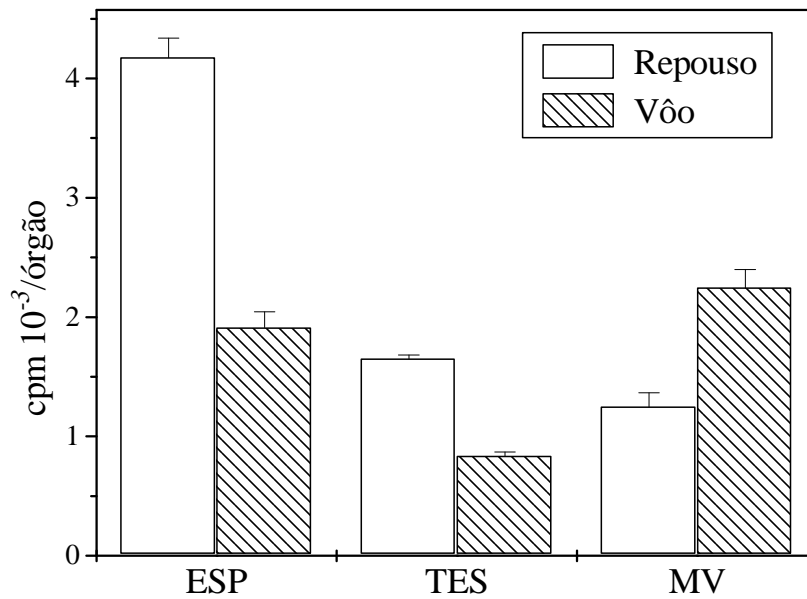


Figura 43 – Influência do vôo dos machos na transferência de lipídios às fêmeas durante a cópula de *R. prolixus*.

Machos de *R. prolixus* voaram até a exaustão no 2º dia após a alimentação. Após isto, os machos foram injetados com a ³H-Lf (5 x 10⁴ dpm) e reunidos às fêmeas virgens (mantidas em repouso) não-injetadas por 4 dias. Após este período, os testículos e músculos de vôo dos machos; e as espermatecas das fêmeas foram dissecados, lavados e homogeneizados em NaCl 0,15M. A radioatividade associada foi estimada por cintilação líquida. As colunas em branco representam os experimentos que utilizaram machos em repouso. Já as colunas em tracejado representam os experimentos realizados com machos submetidos ao vôo exaustivo. Os pontos no gráfico representam média ± DP para três determinações. ESP: espermateca, MV: músculos de vôo, TES: testículos.

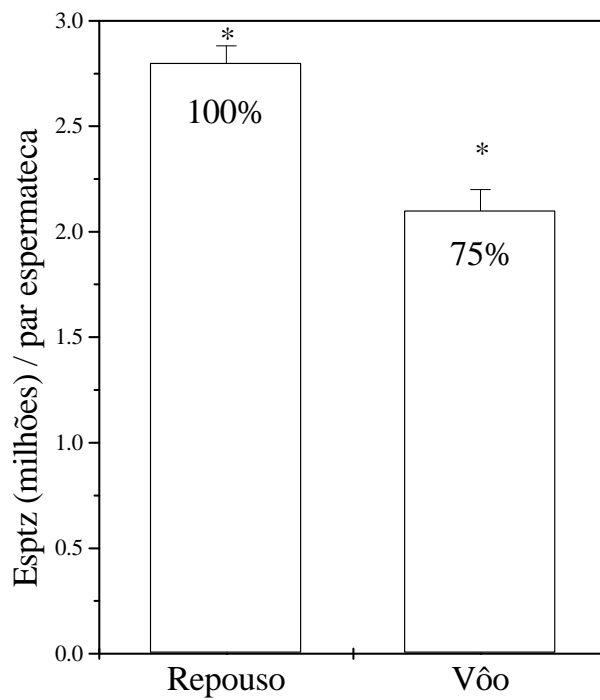


Figura 44 – Efeito do vôo dos machos na transferência de espermatozóides às espermatecas das fêmeas durante a cópula.

Machos adultos foram submetidos ao vôo exaustivo no 2º dia após a alimentação. Após isto, os machos foram reunidos às fêmeas virgens (sempre mantidas em repouso) por 4 dias. Após isto, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas e os espermatozóides contados. Um grupo controle de fêmeas que copularam com machos mantidos em repouso também foi utilizado. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

Esptz: espermatozóides. * $P < 0,05$.

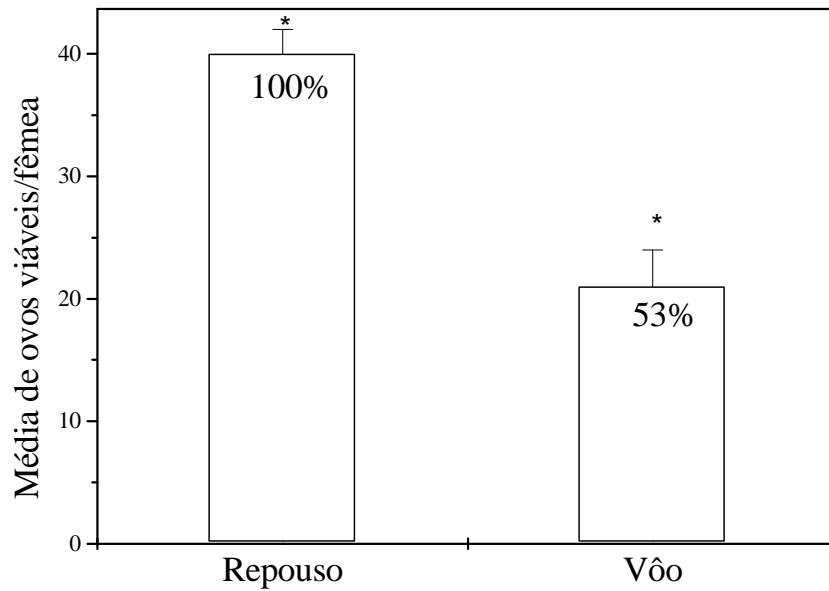


Figura 45 – Efeito do vôo dos machos na oviposição.

Machos adultos foram submetidos ao vôo exaustivo no 2º dia após a alimentação. Após isto, os machos foram reunidos às fêmeas virgens (mantidas em repouso) por 4 dias. Após isto, as fêmeas foram separadas e esperou-se até a postura de ovos. Os ovos foram contados e o resultado expresso em um gráfico. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações.

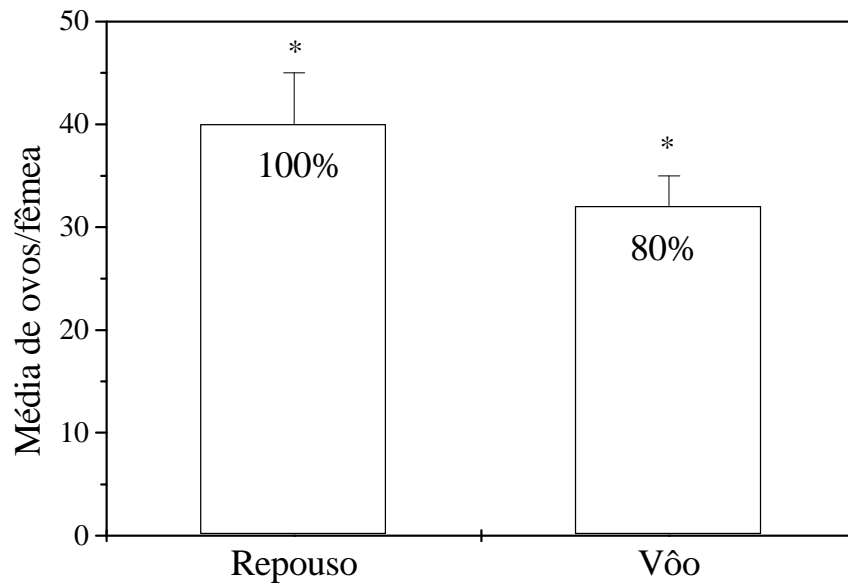


Figura 46 – Efeito do vôo de fêmeas na oviposição.

Fêmeas adultas foram submetidas ao vôo exaustivo no 3º dia após a alimentação. Após isto, esperou-se até a postura de ovos. Os ovos foram contados e o resultado expresso em um gráfico. Os pontos no gráfico representam média \pm DP para três determinações. * $P < 0,05$.

DISCUSSÃO



5- DISCUSSÃO

Apesar da aparente simplicidade, os insetos são modelos experimentais de grande utilidade no estudo de processos bioquímicos e fisiológicos. No que diz respeito ao transporte de lipídios, os estudos realizados em insetos contribuem significativamente para um melhor entendimento deste processo em vertebrados visto que, em ambos os sistemas, a entrega de lipídios é mediada por lipoproteínas de estrutura e origens evolutivas similares (SMOLENAARS e cols., 2007). Além disso, o estudo de insetos hematófagos é muito relevante devido ao fato destes serem vetores de doenças de importância médica que afetam milhões de pessoas principalmente nas áreas tropicais e subtropicais.

Em mamíferos, as lipoproteínas são responsáveis pela entrega seletiva de lipídios aos testículos. Estes lipídios, principalmente ésteres de colesterol, são utilizados na síntese de testosterona nas células de Leydig e na produção de gametas pelas células de Sertoli (LEVALLET e cols., 1996; FOFANA e cols., 2000; REAVEN e cols., 2000). Nesta tese foi estudado, pela primeira vez, o papel da lipoforina na espermatogênese através da caracterização da incorporação da lipoforina pelos testículos de insetos utilizando como modelos experimentais o hemíptero hematófago, *Rhodnius prolixus*, e o gafanhoto migratório, *Locusta migratoria*.

Em relação ao *R. prolixus*, a análise da incorporação de lipídios por diferentes órgãos de adultos machos após injeção de uma lipoforina marcada radioativamente com ^{32}P i (^{32}P -Lf), mostrou que há uma grande acumulação de lipídios nos testículos (Figura 5). De 5 a 10% da radioatividade associada à Lf marcada radioativamente é encontrada nos testículos nos tempos de máxima incorporação (dado não-

mostrado). A acumulação lipídica nos testículos mostra que há uma demanda de lipídios significativa neste órgão.

Observamos também que a incorporação de lipídios pelos testículos atinge seu patamar máximo no 2º dia após a alimentação. Isto se deve ao fato de grandes quantidades de nutrientes estarem disponíveis nos primeiros dias após a alimentação resultado da digestão sanguínea (Figura 7). Desta forma, a Lf pode se abastecer de lipídios no intestino médio e entregá-los aos órgãos periféricos (COELHO e cols., 1997; RODENBURG & VAN DER HORST, 2005; ATELLA e cols., 2006).

As cinéticas de incorporação de fosfolipídios e lipídios neutros pelos testículos são mostradas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Uma vez que a Lf contém ambas as classes de lipídios, os dados obtidos podem indicar que estas moléculas são incorporadas de maneira temporalmente diferente. Um curso temporal utilizando a Lf marcada radioativamente na porção protéica com ^{125}I , ^{125}I -Lf (Figura 9), mostrou-se linear até 30 horas conforme foi verificado para fosfolipídios na Figura 8. Aparentemente, em um primeiro momento, os lipídios neutros são preferencialmente incorporados e, posteriormente, a partícula inteira, incluindo os fosfolipídios, é mais favoravelmente internalizada pelo órgão.

Várias hipóteses podem explicar este fenômeno, uma delas é que os testículos interagem preferencialmente com uma Lf rica em lipídios neutros, especialmente diacilgliceróis, em um tipo de transporte seletivo para esta classe lipídica. Uma vez que o conteúdo de diacilglicerol diminuiu na Lf, isto sinaliza aos testículos para internalização da partícula inteira de Lf. Este "sinal" pode ser a própria Lf. Em adultos de *R. prolixus* em repouso, encontra-se duas populações marcantes de Lf de densidades diferentes e associadas a diferentes quantidades de

apoLf-III o que sugere diferentes conteúdos lipídicos (OLIVEIRA e cols., resultados não-mostrados). Estas diferentes Lfs então podem interagir de forma distinta com os testículos ora levando preferencialmente a transferência de lipídios; ora levando à internalização da partícula inteira.

Outra hipótese é a de que diferentes receptores de Lf estão expostos nas membranas das células e levam à entrada da Lf nas células ou a simples entrega de lipídios. O número e a função destes diferentes receptores poderiam mudar ao longo do tempo por moduladores como vôo, disponibilidade de nutrientes, parasitismo, entre outros.

Alternativamente, os testículos poderiam apresentar um mesmo receptor de Lf e este poderia interagir de formas diferentes com a mesma Lf. Van Hoof e colaboradores (2002 e 2003) mostraram que em células de mamíferos transfectadas com o receptor de Lf de insetos, LpR, a endocitose da Lf não leva à degradação das apolipoproteínas nos endossomas mas somente à partição dos lipídios e posterior reciclagem do receptor e da Lf. Já no corpo gorduroso de *L. migratoria*, onde o LpR é naturalmente expresso, a endocitose da Lf mediada por este receptor com e sem degradação do ligante pode ocorrer ao mesmo tempo nas células do tecido. Certamente para se entender melhor como a Lf interage com os testículos de insetos, um estudo mais aprofundado considerando estas hipóteses deve ser realizado.

A detecção da apoLf-I e apoLf-II nos testículos por *Western Blotting* (Figura 10) e a visualização da mesma dentro do tecido por microscopia de epifluorescência a partir da marcação da Lf com FITC (Figura 13) são evidências que corroboram com o fato de que os testículos são realmente capazes de internalizar a Lf. Além disso, as apolipoproteínas não são exocitadas das células retornando à hemolinfa visto

que não foi detectada radioatividade até 5 dias após a injeção da ^{125}I -Lf em machos (Figura 9). O gradual desaparecimento da banda correspondente à apoLf-II na Figura 10 seria devido a uma possível degradação da mesma no interior das células. Em conjunto, estes resultados indicam que a Lf não atua como um veículo reutilizável no transporte de lipídios aos testículos de *R. prolixus*, diferente do que foi observado nos músculos de vôo durante o vôo de *L. migratoria* (VAN HEUSDEN e cols., 1987; OLIVEIRA e cols., 2006); e nos ovários de *R. prolixus* durante a ovogênese (GONDIM e cols., 1989). O mecanismo observado em testículos se assemelha ao descrito para *Anopheles gambiae* em que a Lf é endocitada e acumulada pelos ovócitos em desenvolvimento (ATELLA e cols., 2006).

Os principais lipídios, provenientes da Lf, incorporados pelos testículos foram encontrados na forma de fosfolipídios, triacilglicerol e diacilglicerol (Figura 11A). Dentre os fosfolipídios, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina foram os majoritários (Figura 11B). Ensaios de microscopia utilizando Lf marcada fluorescentemente nos lipídios permitiram a visualização dos mesmos no interior do tecido (Figuras 13 e 14). Utilizando-se uma Lf marcada duplamente nos fosfolipídios e na porção protéica (Figura 15), verificou-se a co-localização dos fosfolipídios e da Lf no tecido corroborando com a idéia que a partícula inteira da Lf é internalizada de forma similar pelos testículos (Figuras 7 e 9).

A internalização da ^{125}I -Lf observada a 28°C , foi inibida a 4°C (Figura 9). Todavia, a ligação da Lf aos testículos ainda ocorreu a 4°C (Figura 12) indicando que a incorporação da Lf pelos testículos é um processo dependente de energia. Adicionalmente, foi mostrado que ocorre competição entre a Lf radioativa e a não-marcada pelos sítios de ligação no testículo. O mesmo não foi verificado quando o competidor usado foi uma proteína não-específica, a albumina (Figura 12). Isto

indica que a interação da Lf com os testículos envolve a participação de um receptor específico assim como verificado em outros órgãos de *R. prolixus* como descrito em outros trabalhos de nosso grupo (ATELLA e cols., 1995; MACHADO e cols., 1996; PONTES e cols., 2002; GRILLO e cols., 2003).

Dantuma e colaboradores (1997) identificaram um receptor da família de receptores da LDL em células de corpo gorduroso de *Locusta migratoria*. Isto implica que, semelhante ao que ocorre em mamíferos, a Lp também pode ser internalizada via endocitose mediada por receptor. A LDL de mamíferos é endocitada via ligação ao seu receptor, o LDLR, e então liberada no citoplasma em endossomas iniciais que amadurecem em endossomas tardios onde a lipoproteína é degradada (BROWN e GOLDSTEIN, 1986; STOORVOGEL e cols., 1991, HUSSAIN e cols., 1999). Em insetos, o LpR, receptor de Lf, também já foi identificado em outros tecidos de *L. migratoria* como ovários e cérebro (RODENBURG & VAN DER HORST, 2005); e em outros insetos como *Aedes aegypti* e *Galleria mellonella* (SEO e cols., 2003; LEE e cols., 2003).

Portanto, para verificar a presença do receptor LpR em testículos de insetos, no caso *Locusta migratoria*, um projeto em colaboração com o Departamento de Fisiologia Bioquímica da Universidade de Utrecht, Holanda, foi realizado sob supervisão do Prof. Dick J. van der Horst e Dr. Kees W. Rodenburg.

O receptor LpR foi detectado em SDS-PAGE de preparações de membrana de testículos de *L. migratoria* através da técnica *Western Blotting* usando o anticorpo anti-LpR 2189/90 que reconhece 20 peptídeos do domínio de ligação do receptor (última seqüência de repetições de cisteínas). Sob condições redutoras, o LpR apresentou um peso molecular de aproximadamente 150 kDa, sendo um pouco maior do que o descrito por Van Hoof e cols. (2003) para LpR de corpo gorduroso

(Figura 17). Experimentos preliminares mostraram que os ovários de *L. migratoria* apresentam uma isoforma do LpR de corpo gorduroso e que, a mobilidade eletroforética deste receptor, em condições redutoras, se assemelha em muito ao LpR de testículos (OLIVEIRA e cols., resultados não-publicados e RODENBURG e cols., comunicação pessoal). O LpR presente nos testículos não foi imuno-detectado quando o anticorpo anti-LpR 9218, que reconhece a porção C-terminal do LpR de corpo gorduroso, foi utilizado (OLIVEIRA e cols., resultados não-publicados).

Já sob condições não-redutoras (Figura 18), o LpR obtido de testículos apresentou uma mobilidade eletroforética maior se comparado ao LpR reduzido (Figura 17) o que indica a presença de múltiplas pontes de sulfeto na molécula. A Figura 19 mostra que o LpR de testículos é expresso somente em larvas de 5^o estágio (L5) e adultos jovens, estando ausente nos testículos de animais mais velhos. Este perfil de expressão é similar ao observado para LpR de corpo gorduroso (Van Hoof e cols., 2003).

Este padrão de expressão do LpR está diretamente relacionado à capacidade dos testículos de captar a HDLp (lipoforina de alta densidade) ao longo da fase adulta. Testículos dissecados de jovens adultos do 1^o dia após a muda são capazes de incorporar partículas de HDLp marcadas fluorescentemente nas apolipoporinas, OG-HDLp, como nos lipídios, Dil-HDLp (Figura 20); num padrão pontuado de vesículas, característico para processos endocíticos (VAN HOOFF e cols., 2003). Um tratamento do tecido com tripsina depois da incubação com OG-HDLp e antes da fixação, não alterou o padrão pontuado de marcação verificando que a HDLp estava realmente encapsulada em membranas (isto é, em vesículas endocíticas) e não inespecificamente na superfície do tecido (Figura 22).

Em testículos de adultos mais velhos, quando o LpR é pouco expresso, o padrão de vesículas com a HDLp fluorescente não foi observado (Figura 21) Esta relação entre expressão do LpR e capacidade endocítica do tecido também foi observada em corpo gorduroso de *L. migratoria* (VAN HOOFF e cols., 2003).

A incubação de LDLp, lipoforina de baixa densidade, marcada com Oregon Green na porção protéica, OG-LDLp com testículos de adultos de 1º dia após a muda não apresentou nenhum padrão de endocitose (Figura 23). O mesmo fenômeno foi anteriormente observado por Van Hoof e colaboradores (comunicação pessoal) em relação ao corpo gorduroso. A LDLp é uma lipoproteína presente na hemolinfa de insetos durante o vôo e é responsável por entregar seletivamente lipídios aos músculos de vôo (VAN HEUSDEN e cols., 1987). Por sua vez, Dantuma e cols. (1999) mostraram que o LpR não é expresso em músculos de vôo e, portanto, não teria um papel importante no abastecimento de lipídios aos músculos de forma a manter o vôo sustentado. Este conjunto de evidências aponta para o fato de que a interação entre o receptor LpR e a LDLp é pouco significativa e improvável seja qual for o tecido.

A fim de caracterizar a captação da HDLp pelos testículos como um processo endocítico, experimentos de *binding* e internalização. A 4°C, a OG-HDLp somente é capaz de se ligar aos seus receptores nos testículos, visto que nestas condições a endocitose é inibida (DUNN e cols., 1980). Porém, quando a temperatura é elevada a 27°C, observa-se que a HDLp anteriormente ligada, é capaz de ser internalizada e encapsulada em vesículas endocíticas no interior das células (Figura 24). Os mesmos resultados foram obtidos mediante a incubação com Dil-HDLp demonstrando que a entrada de lipídios da HDLp nas células está condicionada à endocitose da partícula inteira (Figura 25).

A endocitose da OG-HDLp pelos testículos a 27°C também foi inibida por um excesso de HDLp não-marcada mas não por um excesso de albumina, uma proteína inespecífica (Figura 26). Isto implica que a endocitose da HDLp pelos testículos é mediado por um receptor, o LpR. De maneira interessante, a endocitose da HDLp de *L. migratoria* pelos testículos deste inseto também foi inibida por um excesso de Lf de *R. prolixus* o que pode indicar que o receptor LpR pode reconhecer Lfs de diferentes insetos (Figura 26). Além disso, este dado pode indicar que o gene do receptor LpR em *L. migratoria* e o gene deste receptor em *R. prolixus* possivelmente possuem um gene ancestral comum e que, devido a isto, podem reconhecer domínios comuns nas Lfs destes insetos.

Observou-se também a inibição da endocitose da HDLp pelos testículos na presença de inibidores como o NH₄Cl e a suramina (Figuras 27-29), em que a acidificação dos endossomas e a ligação da HDLp ao seu receptor foram interrompidas respectivamente (SCHNEIDER e cols., 1982; MELLMAN e cols., 1986; TSUCHIDA & WELLS, 1990).

A partir dos resultados obtidos neste projeto em colaboração e mostrados nesta tese, conclui-se que a HDLp é endocitada via um receptor específico, o LpR, em testículos de *L. migratoria*. Traçando um paralelo com *R. prolixus*, o presente trabalho proveu evidências diretas da localização da Lf no interior do tecido, da dependência de energia e do envolvimento de um receptor no processo de incorporação da Lf pelos testículos. Portanto, postula-se que a endocitose de Lf mediada por receptor em testículos também ocorre em *Rhodnius*. Entretanto, a identificação de um receptor de Lf nos testículos deste inseto precisa ser futuramente elucidada.

Os testículos são órgãos responsáveis pela produção dos espermatozóides em animais. Neste órgão, existem diferentes demandas lipídicas como a obtenção de energia, a formação de reservas energéticas para os espermatozóides e, principalmente, a síntese de biomembranas dos espermatozóides (DUMSER, 1980; MITA & Nakamura, 1993; FLESCHE & GADELLA, 2000). Neste contexto, a Lp desempenharia um papel importante no transporte de lipídios a fim de suprir a demanda dos testículos.

Em um experimento de injeção de ^3H -Lf em machos adultos de *R. prolixus* e posterior isolamento dos espermatozóides, foram detectados lipídios radioativos na fração de espermatozóides principalmente na forma de fosfolipídios (Figura 16A). Além disso, também encontramos radioatividade proveniente da ^3H -Lf na fração do fluido seminal (Figura 16B). Isto implica que a Lf incorporada pelos testículos constitui uma fonte de lipídios à espermatogênese e conseqüente produção do sêmen. A localização de lipídios fluorescentes vindos da Lf nas vesículas seminais (Figura 17) reforça este conceito visto que este órgão tem como função a armazenagem temporária do sêmen antes da cópula.

Em relação aos lipídios encontrados no fluido seminal, estes poderiam ser usados como fontes de energia durante a migração do espermatozóide até o ovo como já foi descrito em outros invertebrados (MITA e cols., 2002). Além disso, estes lipídios livres poderiam ter diferentes sítios de ação na fêmea levando a respostas como estímulo à produção de ovos, redução da receptividade sexual da fêmea e, até mesmo, diminuição do tempo de vida da fêmea; eventos já atribuídos à ação das acps, proteínas das glândulas acessórias de *Drosophila melanogaster* (CHAPMAN & DAVIES, 2004).

Nesta tese, o papel da Lf na transferência de lipídios dos machos às fêmeas durante a cópula de *R. prolixus* também foi estudado (Figura 30-34). Os resultados sugerem que, após a incorporação da Lf pelos testículos, os fosfolipídios são remodelados a fim de gerar ácidos graxos, provavelmente por ação de fosfolipases, para síntese de novos fosfolipídios. Estes novos fosfolipídios podem ser transferidos às fêmeas durante a cópula junto com o sêmen, visto que a presença de fosfolipídios livres, não-associados aos espermatozóides, foi detectada no fluido seminal (Figura 16).

Outra possibilidade é que a remodelagem dos fosfolipídios ocorre nas espermatecas após a transferência do esperma. Classicamente, as espermatecas têm como função principal a retenção do sêmen após a cópula (KHALIFA, 1950) e, portanto, não teriam o aparato enzimático necessário a quebra e síntese *de novo* de lipídios. Entretanto, a incubação de espermatecas com $^{32}\text{P}_i$ e ^3H -ácido palmítico mostrou que elas são capazes de sintetizar fosfolipídios a partir destes precursores (Figura 35). Estas evidências viabilizam o conceito de que os fosfolipídios da Lf incorporados pelos testículos, usados na produção do fluido seminal e então transferidos às fêmeas durante a cópula sofreriam remodelagem nas espermatecas e não nos testículos.

A transferência de lipídios após 5 dias de união dos casais está associada ao aumento do número de espermatozóides presentes na espermateca neste período (Figura 37). Além disso, após injeção de ^3H -Lf em machos e ensaio de cópula, verificou-se a presença de radioatividade atribuída aos ^3H -lipídios neutros da Lf injetada em ovos postos e também na hemolinfa das fêmeas (Figura 38).

Estes resultados somados aos mostrados na Figura 16 são evidências diretas que os lipídios da Lf são usados na produção dos espermatozóides e do fluido

seminal a fim de compor o sêmen a ser transferido às fêmeas durante a cópula. Nas fêmeas, os espermatozoides participam da fecundação dos ovos e, os lipídios do fluido seminal atravessam o trato reprodutor das fêmeas e alcançam a hemolinfa assim como descrito para as Acps de *D. melanogaster* (HEIFETZ e cols., 2000). A função destes lipídios na hemolinfa permanece não esclarecida.

Uma vez que a Lf é responsável pelo abastecimento de lipídios aos músculos de vôo durante o exercício (VAN HEUSDEN e cols., 1987; VAN DER HORST e cols., 2002) a influência do vôo na transferência de lipídios durante a cópula e na produção de espermatozoides e ovos foi abordada nesta tese.

A capacidade de vôo é um dos mais importantes fatores para o sucesso na colonização do ambiente terrestre pelos insetos. Por este motivo, o vôo tem sido alvo de estudo de muitos grupos de pesquisa em diversas áreas do conhecimento. Este tópico torna-se mais instigante se considerarmos o vôo de insetos vetores responsáveis por efeitos alarmantes nas populações humanas (WHO, 2006). Isto porque o vôo potencializa a capacidade de dispersão destes insetos aumentando a área de incidência das doenças transmitidas pelos mesmos.

Sabe-se que o vôo de fêmeas de várias espécies de insetos pode prejudicar o desenvolvimento dos ovários, retardar e até mesmo inibir a ovogênese resultando numa diminuição do número de ovos postos pelas mesmas (JONHSON, 1963; KENNEDY, 1961; RANKIN e cols., 1994). Estes eventos foram descritos primeiramente por Kennedy (1961) e denominado síndrome vôo-ovôgenese. Esta síndrome propõe que o vôo consumiria muita energia de modo que menos fontes energéticas, como os lipídios, ficariam disponíveis para a ovogênese e, de forma análoga, o mesmo ocorreria com a espermatogênese e o sucesso reprodutivo da

cópula. Entretanto, pouco se sabe da influência do vôo na espermatogênese em insetos foi realizado.

A capacidade de vôo e de produção de espermatozóides de machos adultos ao longo dos dias após a alimentação é mostrada na Figura 39. Observou-se que por volta do 2º dia após a alimentação, os machos são capazes de voar por mais tempo. Neste mesmo período, a produção de espermatozóides atinge seu patamar máximo. Também neste período, a captação de lipídios, e conseqüentemente, da Lf pelos testículos é máxima como mostrado na Figura 6. Nos primeiros dias após a alimentação, em conseqüência da digestão do sangue, a disponibilidade de nutrientes é grande no inseto. Desta forma, este maior aporte de lipídios fica disponível para utilização na dispersão do inseto pelo vôo e/ou para fins reprodutivos. Porém, a partícula responsável pela entrega de lipídios, utilizada nestes dois processos, a Lf, é a mesma.

Durante o vôo de machos ou fêmeas (Figura 40 e 41, respectivamente), verificou-se que o transporte de fosfolipídios e lipídios neutros é desviado para sustentar o vôo prolongado. Isto porque se observou uma menor transferência lipídica às gônadas e conseqüente aumento aos músculos de vôo. Este fenômeno foi mais explícito ao se analisar o perfil lipídico de ovários e músculos de vôo após o exercício (Tabela 1). Nos ovários, houve diminuição das quantidades de todas as classes lipídicas. Já nos músculos de vôo, houve aumento do conteúdo de todos os lipídios, exceto triacilglicerol. Este triacilglicerol provavelmente constitui reserva dos próprios músculos, sendo hidrolisado rapidamente a fim de se obter ácidos graxos livres para a pronta obtenção de energia para o vôo.

Como reflexo desta menor incorporação de lipídios pelos testículos durante o vôo, o número de espermatozóides presentes em testículos de machos que voaram

até a exaustão se mostrou 40% menor se comparado a machos mantidos em repouso (Figura 42). Obviamente, os efeitos deletérios da produção de espécies reativas de oxigênio (estress oxidativo) pela atividade de vôo especialmente peroxidação lipídica e dano às membranas biológicas deve ser incluído como fator importante na diminuição na produção de espermatozoides durante o vôo. Estes resultados indicam que existe uma relação antagônica entre o vôo e a espermatogênese em *Rhodnius prolixus* como já descrito para a ovogênese em outros insetos (KENNEDY, 1961, RANKIN e cols., 1994).

O vôo também foi capaz de interferir na transferência de lipídios às fêmeas durante a cópula. Fêmeas que copularam com machos submetidos ao vôo apresentaram menos lipídios transferidos na espermateca após a cópula (Figura 43). Este decréscimo na transferência de lipídios causado pelo vôo de machos está diretamente relacionado a uma diminuição do número de espermatozoides presentes nas espermatecas das fêmeas em 25% (Figura 44). Como resultado final deste processo, o vôo de machos responde por uma diminuição da oviposição de 40% (Figura 45). O vôo de fêmeas, nas mesmas condições experimentais, uma sessão de vôo até a exaustão, também levou a uma diminuição do número de ovos postos (Figura 46). Porém, esta diminuição foi menos acentuada do que para o vôo de machos.

É importante considerar que além quantidade, provavelmente, a qualidade dos espermatozoides e fluido seminal transferidos por machos que voaram é inferior se comparada a de machos em repouso. O estresse oxidativo causado pelo vôo, os danos aos lipídios da Lf como oxidação de ácidos graxos nesta situação fisiológica (OLIVEIRA e cols., resultados não-publicados) e a falta de lipídios disponíveis aos testículos durante o exercício podem levar a uma formação inadequada da

membrana plasmática dos espermatozoides que é um fator crucial para o sucesso na fecundação (FLESCH & GADELLA, 2000).

Em síntese, esta tese apresentou evidências experimentais que explicitam o papel da lipoforina na espermatogênese e cópula de insetos como fonte de lipídios para formação do sêmen. Adicionalmente, foi demonstrado como o vôo, ao interferir no transporte da lipoforina, atua como um antagonista às funções reprodutivas. Além disso, este é o primeiro relato da endocitose de uma lipoproteína por testículos em insetos.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

- AELLA, G.C., GONDIM, K.C., MASUDA, H. (1992) Transfer of phospholipids from the fat body to lipophorin in *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 19, 133-144.
- AELLA, G.C., GONDIM, K.C., MASUDA, H. (1995) Loading of lipophorin particles with phospholipids at midgut of *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 30, 337-350.
- AELLA, G.C., ARRUDA, M.A.B.C.F., MASUDA, H., GONDIM, K.C. (2000) Fatty acid incorporation by *Rhodnius prolixus* midgut. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 43, 99-107.
- AELLA, G.C., SILVA-NETO, M.A.C., GOLODNE, D.M., AREFIN, S., SHAHABUDDIN, M. (2006). *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 36, 375-386.
- BAER, B., MORGAN, E.D., SCHMID-HEMPEL, P. (2001) A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. **PNAS**, 98, 3926-3928.
- BEENAKKERS, A.M.Th., VAN DER HORST, D.J., VAN MARREWIJK, W.J.A. (1981) Metabolism during locust flight. **Comp. Biochem. Physiol.**, 69B, 315-321.
- BEENAKKERS, A.M.T., VAN DER HORST, D.J., VAN MARREWIJK, W.J.A. (1984) Insect flight muscle metabolism. **Insect Biochem.**, 14, 243-260.
- BEENAKKERS, A.M.Th., BLOEMEN, R.E.B., de VLIEGER, T.A., VAN DER HORST, D.J., VAN MARREWIJK, W.J.A. (1985) Insect adipokinetic hormones. **Peptides**, 6, 437-444.
- BLACKLOCK, B.J., RYAN, R.O. (1994) Hemolymph lipid transport. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 24, 855-873.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37, 911-917.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science** 232, 34-47.
- BROWN, M.S., HERZ, J., GOLDSTEIN, J.L., (1997) LDL receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. **Nature** 388, 629-630.

- CEROLINI, S., KELSO, K.A., NOBLE, R.C., SPEAKE, B.K., PIZZI, F., CAVALCHINI, L.G. (1997) Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biology Rep.**, 57, 976-980.
- CHAPMAN, T., DAVIES, S.J. (2004) Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. **Peptides** 25, 1477-1490.
- CHEON, H.M., SEO, S.J., SUN, J., SAPPINGTON, T.W., RAIKHEL, A.S. (2001) Molecular characterization of VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 31, 753-760.
- CHINO, H., KITAZAWA, K. (1968) Diglyceride carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, 176, 1-26.
- CHINO, H., KATASE, H., DOWNER, R.G.H. (1981b) Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the american cockroach: purification, characterization and function. **J. Lipid Res.**, 22, 7-15.
- CHINO, H. (1985) **Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin**. Oxford: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 10, 115-134.
- COELHO, H.S.L., ATELLA, G.C., MOREIRA, M.F., GONDIM, K.C., MASUDA, H. (1997) Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 35, 301-313.
- DANTUMA, N.P., PIJNENBURG, M.A., DIEDEREN, J.H.B., VAN DER HORST, D.J. (1997) Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. **J. Lipid Res.**, 38, 254-265.
- DANTUMA, N.P., POTTERS, M., de WINTHER, M.P., TENSEN, C.P., KOOIMAN, F.P., BOGERD, J., VAN DER HORST, D.J. (1999) An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. **J. Lipid Res.**, 40, 973-978.
- DE KORT, C.A.D., KOOPMANSCHAP, A.B. (1987) Molecular characteristics of lipophorin, the juvenile hormone-binding protein in the hemolymph of the Colorado potato beetle. **Arch. Insect biochem. Physiol.**, 5, 255-269.

- DE MEIS, L., MASUDA, H. (1974) Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum e by orthophosphate through two different reactions. **Biochemistry**, 13, 2057-2062.
- DIEDEREN, J.H.B., MAAS, H.A., PEL, H.J., SCHOONEVELD, H., JANSEN, W.F., VULLINGS, H.G.B. (1987) Co-localization of the adipokinetic hormones I and II in the same glandular cells and in secretory granules of corpus cardiacum of *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. **Cell Tissue Res.**, 249, 379-389.
- DUMSER, J.B. (1980) The regulation of spermatogenesis in insects. **Ann. Rev. Entomol.**, 25, 341-369.
- DUNN, W.A., HUBBARD, A.L., ARONSON, N.N. (1980) Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of ¹²⁵I-asialofetuin by the perfused rat liver. **J. Biol. Chem.**, 255, 5971-5978.
- FIELDING, P.E., FIELDING, C.J. **Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system**, em: Bernardi G., Vance D.E., Vance J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 4^a ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2002, pp. 527-552.
- FOFANA, M., TRAVERT, C., CARREAU, S., LE GOFF, D. (2000) Evaluation of cholesteryl ester transfer in seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. **J. Reprod. Fer.**, 118, 79-83.
- FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1469, 197-235.
- FRAYN, K.N. **Lipoprotein metabolism**, em: Snell K. (Ed.), *Metabolism regulation: a human perspective*, Portland Press, London, 1996, pp. 197-217.
- GANONG, W.F. **Energy balance, metabolism, and nutrition**, em: Foltin J., Nogueira I., Ramsom J., Sheinis L.A. (Eds.), *Review of medical physiology*, McGraw-Hill Companies, New York, 2001, pp. 271-306.
- GARCIA, E.S., GARCIA, M.L.M., MACARINE, J.D., UBATUBA, F.B. (1975) Alimentação do *Rhodnius prolixus* no laboratório. **An. Acad. Bras. Ciência**, 47, 539-545.

- GHOSH, R.N., GELMAN, D.L., MAXFIELD, F.R. (1994) Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting Hep2 cells using confocal microscopy. **J. Cell Science**, 107, 2177-2189.
- GOLODNE, D.M., VAN HEUSDEN, M.C., GONDIM, K.C., MASUDA, H., ATELLA, G.C. (2001) Purification and characterization of a lipid transfer particle in *Rhodnius prolixus*: phospholipid transfer. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31, 567-571.
- GONDIM, K.C., OLIVEIRA, P.L., MASUDA, H. (1989) Lipophorin from *Rhodnius prolixus*: Purification and partial characterization. **Biochem Insect**, 19, 153-314.
- GRILLO, L.A., PONTES, E.G., GONDIM, K.C. (2003) Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 33, 429-438.
- HEIFETZ, Y., LUNG, O., FRONGILLO, E.A., WOLFNER, M.F. (2000) The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. **Cur. Biol.**, 10, 99-102.
- HUSSAIN, M.M., STRICKLAND, D.K., BAKILLAH, A., 1999. The mammalian low density lipoprotein receptor family. **Annu. Rev. Nutr.** 19, 141-172.
- HORWITZ, J., PERLMAN (1977) Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. **Met. Enzymol.**, 141, 169-175.
- JONAS, A. **Lipoprotein structure** em: Bernardi G., Vance D.E., Vance J.E. (Eds.), Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, 4^a ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2002, pp. 483-504.
- JOHNSON, C.G. (1963) Physiological factors in insect migration by flight. **Nature**, 4879, 423-427.
- KAWOOYA, J.K., KEIM, P.S., RYAN, R.O., SHAPIRO, J.P., SAMARAWEERA, P., LAW, J.H. (1984) Insect apolipophorin III. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, 259, 10733-10737.
- KAWOOYA, J.K., LAW, J.H. (1988) Role of lipophorin transport to the insect egg. **J. Biol. Chem.**, 263, 8748-8753.
- KENNEDY, J.S. (1961) A turning point in the study of insect migration. **Nature**, 189, 785-791.
- KHALIFA, A. (1950a) Spermatophore production and egg-laying behavior in *Rhodnius prolixus*. **Parasitology** 40, 283-289.

- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685.
- LEE, C.S., HAN, J.H., LEE, S.M., HWANG, J.S., SEOK, W.K., LEE, B.H., KIM, H.R. (2003) Wax moth, *Galleria mellonella*, fat body receptor for High-Density Lipoprotein (HDLp). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 54, 14-24.
- LEVALLET, J., BILINSKA, B., MITTRE, H., GENISSEL, C., FRESNEL, J., CARREAU, S. (1998) Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature testicular cells. **Biol. Reprod.**, 58, 919-926.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.R., RANDALL, R.J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193, 265-275.
- MACHADO, E.A., ATELLA, G.C., GONDIM, K.C., de SOUZA, W., MASUDA, H. (1996) Characterization and immunocytochemical localization of lipoprotein binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 31(2), 185-196.
- MADRELL, S.H.P. (1969) Secretion by Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. **J. Exp. Biol.**, 51, 71-97.
- MAYOR, S., PRESLEY, J.F., MAXFIELD, F.R. (1993) Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. **J. Cell Biol.**, 121, 1257-1269.
- MARTIN-NIZARD, F., RICHARD, B., TORPIER, G., NOUVELOT, A., FRUCHART, J.C., DUTHILLEUL, P., DELBART, C. (1987) Analysis of phospholipid transfer during HDL binding to platelets using a fluorescent analog of phosphatidylcholine. **Thromb. Res.**, 811-825.
- MITA, M., UEHARA, T., NAKAMURA, M. (2002) Comparative studies on the energy metabolism in spermatozoa of four closely related species of sea urchins (Genus *Echinometra*) in Okinawa. **Zoo. Science**, 19, 419-427.
- MELLMAN, I., FUCHS, R., HELENIUS, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. **Ann. Rev. Biochem.**, 55, 663-700.
- OLIVEIRA, G.A. Mudanças na densidade da lipoproteína durante o vôo de *Rhodnius prolixus*. Orientador: Geórgia Correa Atella. Rio de Janeiro, 1996. Dissertação. (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

- OLIVEIRA, G.A., BAPTISTA, D.L., GUIMARÃES-MOTTA, H., ALMEIDA, I.C., MASUDA, H., ATELLA, G.C. (2006) Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 62, 164-175.
- OUDEJANS, R.C.H.M., VROEMEN, S.F., JANSEN, R.F.R. (1996) Locust adipokinetic hormones: Carrier independent transport and differential inactivation at physiological concentrations during rest and flight. **PNAS**, 93, 8654-8659.
- OSANAI, M., NAGAOKA, S. (1992) Adenine compounds in the male reproductive tract and the spermatophore of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 102B, 49-55.
- O'SHEA, M., RAYNE, R.C. (1992) Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. **Experientia**, 48, 430-438.
- PATNAIK, N.M., MUNDALL, E.C., TRUMBUSTI, B.G., LAW, J.H., KEZDY, F.J. (1979) Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of *Manduca sexta*. **Comp. Biochem. Physiol.** 63B, 469-476.
- PÉREZ, J.R. **Estudo sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus***. Ver. Venez. Sor., Caracas, 1969, pp. 11-98.
- PENESFSKY, H. (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, 252, 2891.
- PONTES, E.G., GRILLO, L.A., GONDIM, K.G. (2002) Characterization of lipophorin binding to the fat body of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32, 1409-1417.
- PRASAD, S.V., FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G.J.P., SUMIDA, M. (1986a) Lipoprotein biosynthesis in the larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, 261. 17174-17176.
- QAZI, M.C.B., HEIFETZ, Y., WOLFNER, M.F. (2003) The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. **Dev. Biol.**, 256, 195-211.
- RANKIN, M.A., HAMPTON, E.N., SUMMY, K.R. (1994) Investigations of the oogenesis-flight syndrome in *Anthonomus grandis* (coleoptera: Curculionidae) using tethered flight tests. **J. Insect Behavior**, 7, 795-810.

- RAO, H.V. (1974) Free amino acids in seminal fluid & haemolymph of *Cimex lectularious* L. & their possible role in sperm metabolism. **Indian J. Exp. Biol.**, 12, 346-348.
- REAVEN, E., ZHAN, L.Z., NOMOTO, A., LEERS-SUCHETA, S., AZHAR, S. (2000) Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. **J. Lipid Res.**, 41, 343-356.
- RODENBURG, K.W., VAN DER HORST, D.J. (2005) Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: Analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. **BBA**, 1736, 10-29.
- RUIZ, J.L., OCHOA, B. (1997) Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by nanodimensional thin layer chromatography and image analysis. **J. Lipid Res.**, 38, 1482-1489.
- RYAN, R.O., HAUNERLAND, N.H., BOWERS, W.S., LAW, J.H. (1988) Insect lipid transfer particle catalyses diacylglycerol exchange between high density and very high density lipoproteins. **BBA**, 962, 143-148.
- RYAN, R.O., VAN DER HORST, D.J. (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. **Ann. Rev. Entomol.**, 45, 233-260.
- SAUL, D., FABIAN, L., FORER, A., BRILL, J. (2004) Continuous phosphatidylinositol metabolism is required for cleavage of crane fly spermatocytes. **J. Cell Science** 117, 3887-3896.
- SEO, S.J., CHEON, H.M., SUN, J., SAPPINGTON, T.W., RAIKHEL, A.S. (2003) Tissue and stage specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand binding repeats in the adult mosquito. **J. Biol. Chem.** 278, 41954-41962.
- SCHELNESS, G.S., SELLERS, J.A. (2001) Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. **Curr. Opin. Lipidol.** 12, 151-157.
- SCHNEIDER, W.J., BEISIEGEL, U., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1982) Purification of the Low Density Lipoprotein Receptor, an Acidic Glycoprotein of 164,000 Molecular Weight. **J. Biol. Chem.**, 257, 2664-2673.

- SCHNEIDER, W.J. **Lipoprotein receptors** em: Bernardi G., Vance D.E., Vance J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 4^a ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2002, pp. 553-5724.
- SHAPIRO, J.P., LAW, J.H., WELLS, M.A. (1988) Lipid transport in insects. **Ann. Rev. Entomol.** 33, 297-318.
- SMOLENAARS, M.M., MADSEN, O., RODENBURG, K.W., VAN DER HORST, D.J. (2007) Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. **J. Lipid Res.**, 48, 489-502.
- SOULAGES, J.L., WELLS, M.A. (1994) Metabolic fate and turnover rate of hemolymph free acids in adults *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 24, 79-86.
- SURHOLT, B., GOLDBERG, J., SCHULZ, T.K.F., BEENAKKERS, AM.Th., VAN DER HORST, D.J. (1991) Lipoproteins act as a reusable shuttle for lipid transport in the flying death's-head hawkmoth *Acherontia atropos*. **BBA**, 1086, 15-21.
- STANLEY-SAMUELSON, D., JURENKA, J.A., BLOMQUIST, G.J., LOHER, W. (1986) De novo biosynthesis of prostaglandins by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 85, 303-307.
- STOORVOGEL, W., STROUS, G.J., GEUZE, H.J., OORSCHOT, V., SCHWARTZ, A.L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. **Cell** 65, 417-427.
- TSUCHIDA, K., WELLS, M.A. (1998) Changes in lipophorin composition during the fourth to fifth instar molt of *Manduca sexta*. **Insect Biochem.**, 18, 263-268.
- VANCE, J.E. **Assembly and secretion of lipoproteins** em: Bernardi G., Vance D.E., Vance J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 4^a ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2002, pp. 505-526.
- VAN DER HORST, D.J., WEERS, P.M.M., VAN MARREWIJK, W.J.A. (1993) **Lipoproteins and lipid transport** EM Stanley-Samuelson D.W., Nelson D.R. (Eds.), *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*, University of Nebraska Press, Lincoln, NE, 1993, pp. 1-24.
- VAN DER HORST, D.J., VAN HOOFF, D., VAN MARREWIJK, W.J.A., RODENBURG, K.W. (2002) Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. **Mol. Cell Biochem.**, 239, 113-119.

- VAN HEUSDEN, M.C., VAN DER HORST, D.J., VOLSHOL, J., BEENAKKERS, A.M.Th. (1987) The recycling of protein components of flight-specific lipophorin in *Locusta migratoria*. **Insect Biochem.**, 17, 771-776.
- VAN HEUSDEN, M.C., LAW, J.H. (1989) An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, 264, 17287-17292.
- VAN HOOF, D., RODENBURG, K.W., VAN DER HORST, D.J. (2002) Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. **J. Cell Science**, 115, 4001-4012.
- VAN HOOF, D., RODENBURG, K.W., VAN DER HORST, D.J. (2003) Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. **J. Lipid Res.**, 44, 1431-1440.
- VAN HOOF, D., RODENBURG, K.W., VAN DER HORST, D.J. (2005) Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 35, 117-128.
- WEERS, P.M., VAN DER HORST, D.J., VAN MARREWIJK, W.J.A. VAN DEN EIJNDE, M., VAN DOORN, J.M., BEENAKKER, A.M.T. (1992) Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. **J. Lipid Res.**, 33, 485-491.
- ZIEGLER, R., DAVIS, N.T., BRADFIELD, J.Y. (1991) Localization of the site of storage and of synthesis of the adipokinetic hormone in *Manduca sexta*. **Sericology**, 31-45.
- ZIEGLER, R., WILLINGHAM, L.A., SANDERS, S.J. (1995) Apolipophorin III and adipokinetic hormone in lipid metabolism of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 25, 101-108.
- WEERS, P.N.M., RYAN, R.O. (2003) Apolipophorin III: a lipid-triggered molecular switch. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 33, 1249-1260.
- WEIS-FOGH. Flight performance of desert locust (*Schistocerca gregaria*) (1956) **Phil. Trans. Royal Soc. Biol. Sciences**, 239, 459-510.
- WIRTZ, K.W.A. (1991) Phospholipid transfer proteins. **Ann. Rev. Inc.** 60, 73-99.
- WOLFNER, M.F. (2002) The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. **Heredity**, 88, 85-93.

WHO Expert Comitee. Disponível em <http://www.who.ch/programmes/ctd>. Acesso em: 2006.

ANEXOS



7 ANEXOS

7.1 ARTIGO I

ARTIGO I

“Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism”

Giselle A. Oliveira, Daniela L. Baptista, Horacio Guimarães-Motta, Igor C. Almeida,
Hatisaburo Masuda and Geórgia C. Atella.

Archives of Insect Biochemistry and Physiology 62:164-175, 2006

Flight-Oogenesis Syndrome in a Blood-Sucking Bug: Biochemical Aspects of Lipid Metabolism

Giselle A. Oliveira,¹ Daniela L. Baptista,¹ Horacio Guimarães-Motta,¹ Igor C. Almeida,² Hatisaburo Masuda,¹ and Georgia C. Atella^{1*}

Lipophorin (Lp), either labeled in diacylglycerol moiety with [³H]-Palmitic acid or in phospholipid moiety with ³²Pi, was injected into *Rhodnius prolixus* females. Insects were induced to flight for different times. In just a few minutes of flight, the transfer of radioactivity to ovaries decreased, accompanied by its increase to flight muscles. After one hour of flight, Lp density was higher (1.132 g/mL) than before flight (1.116 g/mL). Lp purified from insects after flight was analyzed by gel filtration chromatography and a polyacrylamide gel pore limit electrophoresis. Both analyses demonstrated a decrease in Lp molecular mass after flight but no changes in apoLp-III amounts were observed. Time-course experiments showed that only 30 min of flight are required for the detection of changes in Lp density and molecular mass. About the same time of rest is necessary for Lp density and molecular mass to return to the baseline value. The lipid content from Lp particles, determined by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), showed a decrease in total lipids after flight. At the same time, an increase of many classes of lipids was observed in flight muscles except for triacylglycerol, which was reduced. The increase of flight muscle lipids was accompanied by a decrease of the ovaries lipid content. The insects subjected to daily exhaustive flight showed a significant decrease in total number of eggs produced. But insects subjected to a single exhaustive flight showed only a small reduction in total number of eggs. Lp density variation during the flight activity of *Rhodnius prolixus* females is discussed in association with physiological events such as oogenesis. *Arch Insect Biochem Physiol* 62:164–175, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Keywords: flight-oogenesis syndrome; lipophorin; insect flight; lipid transport; ovaries; oviposition

INTRODUCTION

Insect flight involves one of the most intense biochemical processes known in nature. Many species such as *Manduca sexta* and *Locusta migratoria* are capable of long-term flight (Blacklock and Ryan, 1994). To provide energy for this exercise, it is necessary to mobilize and transport substrates to flight muscles. Carbohydrates are used for the first 30 min of flight (Beenackers et al., 1984; Van der Horst,

2003). After that, lipids become the main fuel for flight activity. The mobilization of lipid stores involves the release of a peptide, adipokinetic hormone (AKH), from corpus cardiacum (Van der Horst, 2003). Additionally, there is the participation of a lipoprotein called lipophorin (Lp), used as a reusable shuttle in lipid transport (Van Heusden et al., 1987; Surholt et al., 1991; Van der Horst et al., 2002).

High-density Lp (HDLp) is the major lipoprotein in the hemolymph of resting insects. It is

¹Instituto de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Contract grant sponsor: Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT); Contract grant sponsor: Programa de Núcleos de Excelência (Proneo); Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ); Contract grant sponsor: International Foundation for Science (IFS).

Abbreviations used: AKH: adipokinetic hormone; ApoLp: apolipophorin; DAG: diacylglycerol; ES-MS: electrospray mass spectrometry; HDLp: high-density lipophorin; HPTLC: high-performance thin layer chromatography; LDLp: low-density lipophorin; Lp: lipophorin; kDa: kilodaltons; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; PBS: phosphate buffer solution; SDS: sodium dodecyl sulphate; TAG: triacylglycerol.

*Correspondence to: Dr. Georgia C. Atella, Instituto de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, P.O. Box 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-590, Brazil. E-mail: atella@bioqmed.ufrj.br

Received 14 December 2005; Accepted 17 January 2006

known to transport lipids of many classes between tissues involved in lipid absorption, storage, and utilization (Beenakkers et al., 1985; Shapiro et al., 1988). HDLp is generally composed of two apoproteins: apoLp-I (250,000 daltons) and apoLp-II (80,000 daltons). A third apolipoprotein called apoLp-III (18,000 daltons) can be present in adults of the same species, including *Rhodnius prolixus* (Gondim et al., 1989a), depending on their physiological state (Kawooya et al., 1984; Weers and Ryan, 2003).

During insect flight, AKH interacts with fat body cell receptors and stimulates the hydrolysis of triacylglycerol (TAG), resulting in large amounts of diacylglycerol (DAG). Gradually, DAG is transferred to HDLp particles. Simultaneously, apoLpIII molecules associate with those particles. As a result, HDLp is converted into low-density Lp (LDLp). At flight muscles, DAG is hydrolyzed and LDLp dissociates into HDLp and apoLp-III. HDLp can return to fat body to be reloaded with DAG, thus acting as a reusable shuttle during flight (Van Heusden et al., 1987; Surholt et al., 1991; Van der Horst et al., 2002).

Flight activity in the kissing bug *R. prolixus* has been described in the field (Lehane and Schofield, 1981) and under laboratory conditions (Gringorten and Friend, 1979; Schofield, 1979; Ward and Baker, 1982). It is known that lipid stores are present in flight muscles and can be used as fuel resources for flight activity (Ward et al., 1982). It seems likely that the kissing bugs rely on fat oxidation to supply energy for flight. It is proposed that flight activity consumes energy so that less energy resources are available for oogenesis (flight-oogenesis syndrome) (Kennedy, 1961; Rankin et al., 1986; Sappington and Showers, 1992). However, the role of Lp in the transport of lipids from fat body to flight muscles and the possible changes in the metabolism during flight process are unknown in insect vectors.

In this work, we investigate changes in Lp density and the dynamics of lipid transport during *R. prolixus* flight and we discuss its possible implications in oogenesis. Due to the fact that diacylglycerol and phospholipids are of fundamental

importance for oogenesis and embryogenesis, the principal classes of neutral lipids and phospholipids are also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Insects

Insects were taken from a colony of *R. prolixus* maintained at 28°C and 80% relative humidity. The experimental insects were normal mated females fed on rabbit blood at 3-week intervals.

³²Pi Purification

Carrier-free ³²Pi purchased from Comissão Nacional de Energia Nuclear (São Paulo) was purified by means of a Dowex 1x-10 column (de Meis and Masuda, 1974).

Flight Experiments

Rhodnius prolixus females on the third day after a blood meal were subjected to a wind tunnel based on an apparatus described by Weis-Fogh (1956). The insects were tethered by means of a thin cotton thread fixed to the pronotum by glue. Some insects stopped flying occasionally during the test period, but they were immediately re-stimulated to fly. The non-flying period was never more than 5% of the test time. Flight times given are the total of the actual period of flight.

Lp Purification

The hemolymph, which contains about 40 µg of Lp per µL (Gondim et al., 1989a), was collected in the presence of phenylthiourea (30–130 mg/mL), 5 mM EDTA, and a mixture of protease inhibitors prepared in 0.15 M NaCl, in a final concentration of 0.05 mg/mL soybean trypsin inhibitor, leupeptin, antipain, and 1 mM benzamidine. It was centrifuged at room temperature for 5 min at 13,000g. The supernatant was diluted to 7 mL with 0.15 M NaCl and 1.75 g KBr was added. This material was centrifuged at 45,000 rpm in a Beckman

Type 70.1Ti rotor at 4°C for 20 h and Lp was collected from the top of the KBr gradient (Gondim et al., 1989a). To determine the Lp density, it was diluted to 10 mL with PBS (10 mM phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) and applied to a second gradient using 10 mL of a solution of KBr 50% (w/v) prepared in 0.15M NaCl. After ultracentrifugation at 45,000 rpm in a Beckman Type 70Ti rotor at 4°C for 20 h, the gradient was fractionated and the density of each fraction was measured in a refractometer (Ryan et al., 1984). The fractions were applied to Sephadex G-50 spin columns (Penesfsky, 1977), and for radioactive samples, radioactivity was estimated by scintillation counting (Coelho et al., 1997).

Preparation of Labeled Lp

To prepare [³²P]-labeled Lp, adult females were fed with blood enriched with ³²Pi (Gondim et al., 1989a) using a special feeder (Garcia et al., 1975). On the third day after the blood meal, females of *R. prolixus* were kept flying at different times according to experimental conditions. After this, hemolymph was collected and Lp was purified as described above. [³H]-labeled Lp was prepared as follows. [³H]-palmitic acid (10 µL, 10 µCi; specific activity: 1 mCi/mL, Perkin Elmer) was injected with a Hamilton syringe into adult females on the third day after a blood meal. After 2 h, the hemolymph was collected and Lp was purified as described above. Routinely, [³H]-Lp was subjected to a lipid extraction and thin layer chromatography (TLC). The spot of each lipid was scrapped and the radioactivity estimated by scintillation counting. The main lipid labeled in [³H]-Lp was diacylglycerol (data not shown).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Polyacrylamide slab gels were run both under denaturing conditions (with SDS; Laemmli, 1970) and under non-denaturing conditions (Davis, 1964). The protein concentration was estimated according to Lowry et al. (1951), using bovine serum

albumin as a standard. For radioactive samples, the gels were stained, scanned, dried, and autoradiographed.

Molecular Mass Determination

Molecular mass of Lp was estimated in a Superose 6 HR 10/30 HPLC column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, pH 8.0, at 0.5 mL/min, and calibrated using following protein standards: thyroglobulin, 669,000 daltons; apoferritin, 440,000 daltons; β-amylase, 200,000 daltons; bovine serum albumin, 66,000 daltons; soybean trypsin inhibitor, 20,000 daltons. Alternatively, molecular mass of Lp was determined by a pore-limiting gradient PAGE (3–20%), as described by Nichols et al. (1986). The gels were subjected to 100 V for 24 h. Calibration standards were: thyroglobulin, apoferritin, catalase (232,000 daltons), and bovine serum albumin.

Influence of Time of Flight in the Transfer of Radioactivity From Lp to the Ovary and Flight Muscles

Lp labeled in the phospholipid moiety with ³²Pi (40 µg) and labeled in the diacylglycerol lipid moiety with [³H]-palmitic acid (40 µg) was injected into *R. prolixus* females subjected to different flight times (5 females for each time). Twenty-four hours after injection, ovaries and flight muscles were dissected and washed in physiological saline (Madrell, 1969). The organs were homogenized in 0.15 M NaCl and incorporated radioactivity was measured by scintillation counting.

Time-Course of Flight Activity

On the third day after feeding with blood enriched with ³²Pi, adult females were induced to fly for 0, 1, 5, 25, 45, and 60 min (20 females for each time). Their hemolymph was collected and subjected to KBr gradient ultracentrifugation as mentioned before. The Lp of each group of insects was purified and its density determined. The Lp molecular weight of each group was estimated by a pore-limiting gradient PAGE as described previously.

Time-Course of Lp Density Recovery

Adult females flew for 1 h on the third day after a blood meal enriched with ^{32}P i. After this, they were kept in rest for 0, 5, 10, 30, and 60 min (20 females for each time). Control was performed by maintaining the females in rest without previous flight activity. Their hemolymph was collected and subjected to KBr gradient ultracentrifugation as mentioned before. The Lp of each group was purified and its density determined. The Lp molecular weight of each time (except 5 min of rest) was estimated by a pore limiting gradient PAGE as described previously.

Influence of Flight Activity in the Lipid Composition of Flight Muscles and Ovary

Adult females ($n = 5$) flew for 1 h; after that, flight muscles and ovary were dissected, washed, and homogenized in 0.15 M NaCl. The organs were subjected to a lipid extraction (Bligh and Dyer, 1959). The lipids extracted were analyzed by TLC, as described for neutral lipids (Vogel et al., 1962). The TLC plate was stained as described by Ruiz and Ochoa, (1997) and subjected to densitometric analysis. Each lipid spot was identified by comparing to lipid standards (Sigma, St. Louis, MO) run in parallel. A lipid mass curve was done to convert the densitometric values into micrograms of each lipid on TLC plate using samples of 50, 100, and 200 μg of cholesterol standard (Sigma).

Lipid Composition of Lp After Flight

Lp before and after 1-h flight (90 μg) was subjected to a lipid extraction (Bligh and Dyer, 1959). The lipids were analyzed by a high-performance thin layer chromatography (HPTLC) as described for neutral lipids (Vogel et al., 1962). HPTLC plates were stained as described by Ruiz and Ochoa, (1997) and subjected to densitometric analysis. Each lipid spot was identified by comparing to lipid standards (Sigma) run in parallel. A lipid mass curve was done to convert the densitometric

values into micrograms of each lipid on TLC plate using samples of 50, 100, and 200 μg of cholesterol standard (Sigma).

Influence of Flight Activity in Oviposition

Adult females ($n = 30$) were induced to daily exhaustive flight for 2 weeks after blood meal. During that period, the number of eggs of each female was counted and compared to females kept in rest. Another experiment was done when females ($n = 30$) were induced to one session of exhaustive flight on the first day after a blood feeding. During 2 weeks, the number of eggs was counted and compared to females kept in rest.

Influence of Flight Activity in Apolipoprotein Amounts of Lp

Lp before and after 1-h flight were purified as described above and additionally after KBr gradient were applied in a Superose 6 HR 10/30 HPLC column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, pH 8.0, at 0.5 mL/min. The purified lipoproteins (30 μg) were applied to a polyacrylamide gel (6–22.5%) electrophoresis in the presence of SDS (Laemmli, 1970). The gels were stained, scanned and analyzed by densitometry.

RESULTS

^{32}P -Lp was injected into *R. prolixus* females subjected to different times of flight activity. Under these conditions, ^{32}P -phospholipid transfer to the ovaries decreased and the transfer to flight muscles increased during the initial minutes of flight activity (Fig. 1A). The same experiment was conducted using ^3H -labeled Lp (Fig. 1B). The transfer of ^3H -diacylglycerol to the ovaries decreased, followed by an increase in the flight muscles. These experiments indicated that just a few minutes of flight can promote a partial interruption of lipid flow from Lp to ovaries and, consequently, a major mobilization of energy resources to the flight muscles providing conditions for the physical exercise. Associated with this transfer of

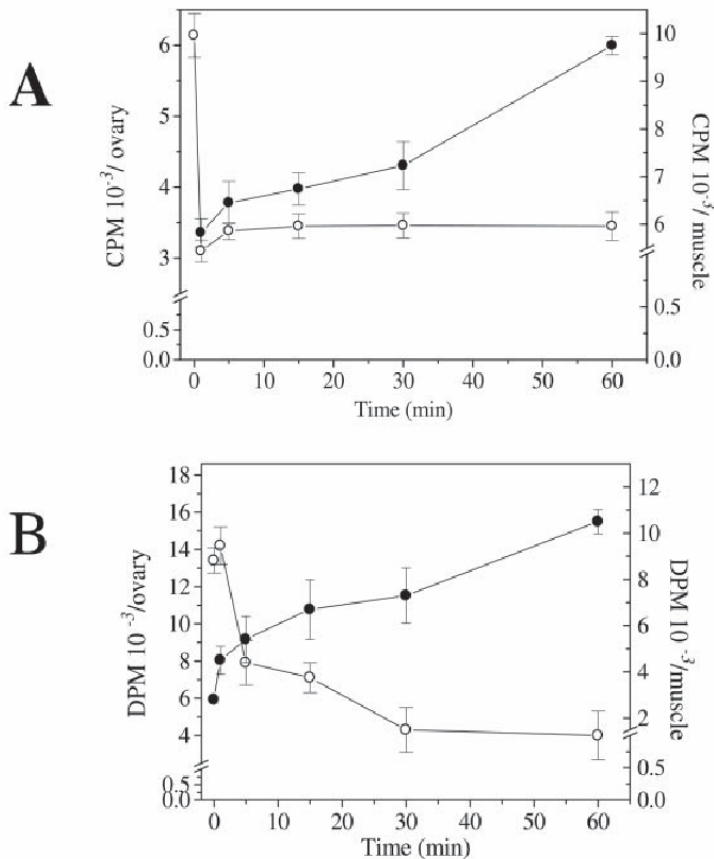


Fig 1. Uptake of [³²P]-phospholipids and [³H]-diacylglycerol from Lp to ovaries (open circles) and muscles (closed circles) after flight activity. [³²P]-Lp (A) and [³H]-Lp (B) were injected into females of *R. prolixus* at different times of flight. Twenty-four hours after injection, ovaries and flight muscles were dissected and radioactivity was estimated by scintillation counting. The vertical bars represent the S.E. for 4 determinations. Other experimental details are described in Materials and Methods.

lipids to the muscle, Lp particles reduced their content of lipids after 1-h flight, about 0.26 μg of total lipids per μg Lp protein (Table 1).

To follow Lp density variation during flight activity, females of *R. prolixus* were kept flying for 1 h. After flight, hemolymph was collected, Lp purified, and its density measured, as described in Materials and Methods. After 1-h flight, the major population of Lp in the hemolymph was denser, about 1.132 g/mL, than before flight, about 1.116 g/mL (Fig. 2). SDS-PAGE analysis of Lp purified from females that flew during 1 h showed that the amount of apoLp-III (percentage of apoLp-III from total lipophorin) did not vary when compared to the rest, from 5.75% (± 2.1) before flight to 4.5% (± 1.65) after 1-h flight (Fig. 3).

To ascertain whether the Lp density variation was followed by a variation of Lp native molecular mass, samples of Lp before and after flight were applied to a gel filtration chromatography and a

TABLE 1. Lipophorin Lipid Profile After Flight Activity[†]

Lipids	Rest (μg lipid/ μg protein)	Flight (μg lipid/ μg protein)
Cholesterol ester	0.26 (± 0.02)	0.17 (± 0.01)
Triacylglycerol	0.22 (± 0.01)	0.15 (± 0.01)
Diacylglycerol	0.25 (± 0.01)	0.18 (± 0.01)
Phospholipids	0.10 (± 0.01)	0.07 (± 0.01)
Total lipid	0.83 (± 0.05) [*]	0.57 (± 0.04) [*]

[†]Lp (90 μg) before and after 1-h flight was subjected to lipid extraction. Extracted lipids were separated by HPTLC and the content of each class of lipid estimated by densitometry, as described in Materials and Methods. Data corresponds to μg of lipid per μg of Lp protein. Values shown are the mean of two distinct experiments with the respective SEs in parentheses.

^{*}The difference between the 2 groups is significant for $P < 0.05$.

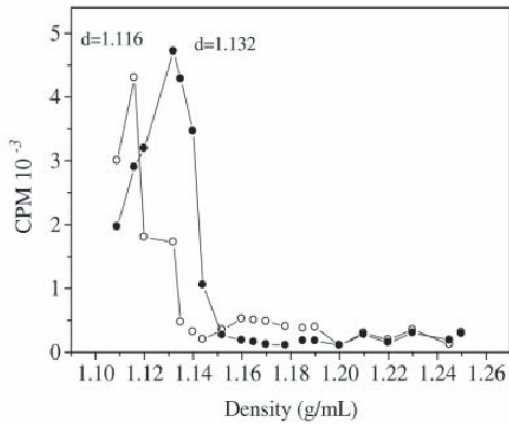


Fig. 2. Lp density variation during flight activity. On the third day after a blood meal enriched with ³²Pi, females were kept flying for 1 h. Control was performed by keeping the females in rest. Lp before (open circles) and after (closed circles) flight was purified by a KBr gradient ultracentrifugation as described in Materials and Methods. The density was measured by a refractometer and the radioactivity of each fraction was estimated by scintillation counting. The density value of fractions with the highest levels of radioactivity is shown at the top of the graph.

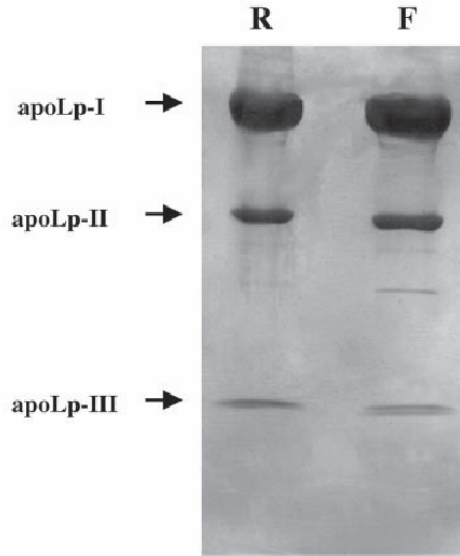


Fig. 3. Analysis of apoLp-III amounts of Lp before and after 1-h flight. Females were induced to fly for 1 h. Control was performed by keeping a group of females in rest. Lp before (R) and after (F) flight was purified by a KBr gradient ultracentrifugation and subjected to a SDS-PAGE (6–22.5%) as described in Materials and Methods.

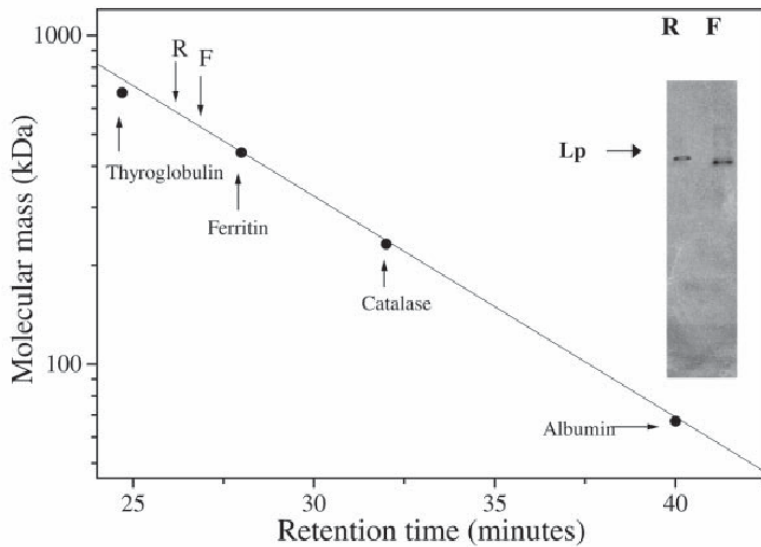


Fig. 4. Determination of Lp native molecular mass after flight activity. Females were kept flying for 1 h and a control group was performed by keeping the females in rest. Hemolymph was collected and Lp purified as described in Materials and Methods. Lp obtained before (R) and after flight (F) was subjected to a gel filtration chromatography in an HPLC column. Thyroglobulin, apoferritin, catalase, and bovine serum albumin were used as standards. Inset: The pore-limiting gradient PAGE of these Lp samples.

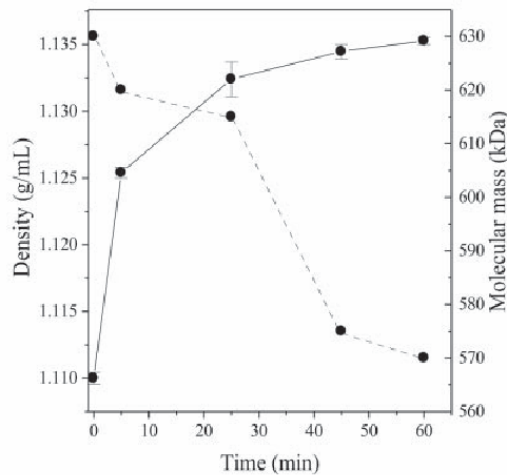


Fig. 5. Time-course of Lp density variation at different flight times. Females of *R. prolixus*, previously fed with blood enriched with $^{32}\text{P}_i$, were induced to fly for different times. Hemolymph was collected and Lp purified of different insect groups. The density of major Lp populations of each flight time was measured by a refractometer (—). Time-course of Lp molecular mass variation during flight activity (---). The Lp molecular mass was estimated by a pore-limiting gradient PAGE. The vertical bars represent S.E. for 3 determinations. Other experimental details are described in Materials and Methods.

pore-limiting gradient PAGE (inset in Fig. 4). The experiments shown in Figure 4 indicated that after 1 h of exercise Lp became smaller than Lp before flight.

The time-course of changes in density and molecular mass, associated with flight activity, is

shown in Figure 5. At the beginning of flight activity, Lp density remained close to the resting value. After 30 min of flight, Lp density reached a maximum value (1.132 g/mL). Lp of each time was subjected to a pore-limiting gradient PAGE to estimate the molecular mass of the particles. It was observed that the increase of Lp density during flight activity was accompanied by a gradual decrease of Lp molecular mass (Fig. 5).

The transport of lipids from Lp particles to flight muscles changes the density of Lp particles. To see whether the composition of phospholipids associated with Lp particles was changed or not, a careful qualitative analysis of phospholipids associated with Lp particles, before and after flight, was conducted by Electrospray Mass Spectrometry (ES-MS). No change in phospholipids composition was detected (data not shown).

To verify whether the change in Lp transfer activity, induced by flight, was enough to change the content of lipids in the tissues, flight muscles and ovaries were dissected before and after flight, and subjected to a lipid extraction and TLC analysis. Table 2 shows that except for TAG, all other classes of lipids amounts increased in the muscles after flight, while all classes of lipids amounts decreased in the ovaries. This set of results has suggested that flight activity has changed the metabolic effort from oogenesis to muscle activity. To ascertain whether this metabolic change affected or did not affect the egg production, the eggs produced by a group of insects subjected to a single flight were counted. We observed a reduction of 19.5% in the total eggs laid (Table 3).

TABLE 2. Lipid Profile From Flight Muscles and Ovaries After Flight Activity[†]

Lipids	Flight muscles ($\mu\text{g lipid}$)		Ovaries ($\mu\text{g fluid}$)	
	Rest	Flight	Rest	Flight
Cholesterol ester	9.05 (± 0.9)	13.76 (± 1.0)	13.11 (± 1.1)	8.85 (± 0.8)
Triacylglycerol	36.61 (± 2.1)	26.81 (± 2.6)	32.62 (± 2.6)	17.92 (± 1.2)
Free fatty acids	28.31 (± 2.7)	33.57 (± 0.5)	11.01 (± 1.0)	8.30 (± 0.6)
Diacylglycerol	10.47 (± 1.1)	12.31 (± 0.8)	10.76 (± 1.7)	7.92 (± 0.7)
Phospholipids	7.50 (± 0.8)	8.21 (± 0.8)	7.31 (± 0.6)	4.91 (± 0.3)
Monoacylglycerol	—	—	1.32 (± 0.1)	0.13 (± 0.01)

[†]Flight activity was induced for 1h in *R. prolixus* females ($n = 5$). Muscles and ovaries were then dissected and lipids extracted. Lipid profile was analyzed followed by TLC. The content of each lipid class was estimated by densitometry as described in Materials and Methods. Data correspond to μg of lipid per organ. Values shown are mean of two distinct experiments with the respective SEs in parentheses.

TABLE 3. Effect of a Single Flight Session and Daily Flight on *R. prolixus* Oviposition¹

State	Average of eggs/female	% of inhibition
Flight (one session)*	32 ± 3	19.5
Rest (one session)*	40 ± 5	—
Flight (daily)*	20 ± 5	62.5
Rest (daily)*	40 ± 4	—

¹On the first day after a blood feeding, insects ($n = 30$) were forced to fly until exhaustion (just one session). Another group of females ($n = 30$) was forced to fly until exhaustion daily for 2 weeks. During 2 weeks, the number of eggs of each female of both groups was counted and compared to the number of eggs laid by females kept in rest. Data represent the mean ± SE for 4 determinations.

*Levels of significance, $P < 0.05$.

As the ovary was slightly affected to the point of reducing the egg production, we analyzed the time of recovery of Lp as regards its ability to transport lipids.

The time-course of Lp density recovery shown in Figure 6 indicates that 30 min of rest were re-

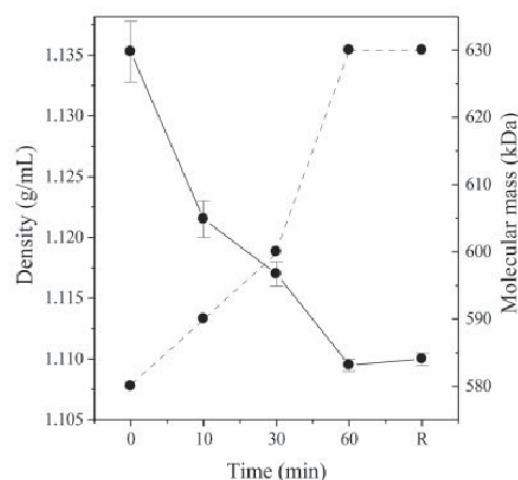


Fig. 6. Time-course of Lp density recovery. Females of *R. prolixus* previously fed with blood enriched with ³²Pi, were induced to fly for 1 h on the third day after blood meal. After this time, insects were kept in rest during different times. The hemolymph was collected and Lp purified. The density of major Lp populations of each time was measured by a refractometer (—). Time-course of Lp molecular weight recovery (---). The Lp molecular weight of each time of rest (except 5 min) was estimated by a pore-limiting gradient PAGE. The vertical bars represent S.E. for 3 determinations. Other experimental details are described in Materials and Methods.

quired for Lp density to return to the pre-flight value (1.116 g/mL). Lp of each time was subjected to a gel filtration chromatography and the change in molecular mass analyzed. It was observed that a gradual decrease in the density of Lp particles was accompanied by an increase of Lp molecular mass.

These results indicate that the mechanism of lipid supply for Lp in *R. prolixus* is very efficient. Under flight activity, only a few minutes are required to detect denser and smaller Lp particles in the hemolymph, indicating a significant flux of lipids carried by lipophorin to the muscles. As soon as flight activity ceases, Lp particles are loaded back with lipids reaching their initial density.

According to the theory known as flight-oogenesis syndrome, insects subjected to long periods of flight reduce the number of eggs laid. The rationale for this is that flight activity consumes so much energy that less substrates are left for oogenesis. As we observed only a small reduction in the number of eggs laid (Table 3), another group of females was subjected to a daily session of exhaustive flight. Under these conditions, the females reduced by 62.5% the number of eggs laid when compared to females maintained at rest (Table 3).

DISCUSSION

Flight activity is a process that requires mobilization and transport of resources that will be used as fuel in flight muscles. Lipid transport involves the participation of Lp that acts as a reusable shuttle (Van Heusden et al., 1987; Surholt et al., 1991; Van der Horst et al., 2002). We have previously demonstrated that during oogenesis, Lp transfers phospholipids to the growing oocytes (Gondim et al., 1989b), and can be reloaded at the fat body and midgut (Atella et al., 1992, 1995). Here we show that *R. prolixus* Lp density and molecular mass are changed upon flight. In addition, lipid flow from Lp to the ovaries is partially interrupted during the flight process.

We observed that two different results were obtained as regards the transfer of [³²P]-phospholipids and [³H]-diacylglycerol from Lp to ovaries and

flight muscles associated with flight activity. When [32 P]-Lp was injected into females after flight, the transfer of [32 P]-phospholipids to ovaries decreased. However, this transfer to flight muscles increased during the initial minutes of flight activity. The same occurred with the transfer of [3 H]-diacylglycerol when [3 H]-Lp was injected after flight (Fig. 1). These experiments show that flight activity promotes a major mobilization of phospholipids and diacylglycerol to flight muscles.

The results indicate that flight activity can depress responses to vegetative functions, such as oogenesis, as described previously in many lepidoptera species (Kennedy, 1961). Certainly, this occurs because both processes utilize basically the same energy resources. Building and maintaining flight activity consume energy and material reserves, otherwise available for oogenesis (Rankin et al., 1986; Sappington and Showers, 1992).

Lp density variation in *R. prolixus*, associated with oogenesis, was observed by Coelho et al. (1997). On the third day after feeding, Lp density reached its lower value because of an intense uptake of lipid from blood digestion. From day 3 onward, associated with the egg production, a continuous increase in the Lp density was observed. Around day 12, Lp density reached its highest value. From day 12 onward, coinciding with the end of vitellogenesis, the Lp density returned to its original value.

A similar event was observed when females of *R. prolixus* flew for 1 h (Fig. 2). Lp density changed from a rest value of 1.116 to 1.132 g/mL. Probably, after 1 h of flight activity, the capacity of muscles to take up lipids from Lp overcame lipid loading of Lp and the particle became denser. That variation of density was also associated with variation of Lp molecular mass (Fig. 4). However, no variation in apoLp III amounts in Lp particles after flight and before flight was observed (Fig. 3) as similar to that previously demonstrated by Gondim et al. (1992) for *R. prolixus* Lp treated with phospholipase A_2 for complete removal of phospholipids, as opposed to what was previously reported for long-distance flying species such as *Locusta migratoria* and *Manduca sexta*, where an increase in

apoIII amount could be observed (Weers and Ryan, 2003).

The time-course of flight activity demonstrated that about 30 min of exercise was necessary to observe a denser and smaller Lp particle in hemolymph (Fig. 5). On the other hand, about the same time of rest after flight activity was required for Lp density and molecular mass to return to rest value (Fig. 6). The transfer of neutral lipids and phospholipids to the flight muscles changed the density of Lp particles. The total lipid amount of Lp after flight decreased when compared to Lp of resting females (Table 1). However, a careful qualitative analysis by Electrospray Mass Spectrometry showed that the composition of phospholipids associated with Lp particles did not change after flight (data not shown). None of the phospholipid classes associated with Lp was depleted from the particles as a consequence of flight activity.

The changes in the density and molecular mass of Lp particles observed during *R. prolixus* flight were not observed in long-range migratory species such as *Acherontia atropos*, *Locusta migratoria*, and *Manduca sexta* (Ryan et al., 1987; Van Heusden et al., 1987; Surholt et al., 1991, 1992; Van der Horst et al., 2002), in which there is a predominance of a low-density Lp, LDLp, during exercise. Therefore, the efficiency of metabolic mechanisms involved in the reloading of Lp particles must vary between flying insect species. Since *R. prolixus* is not an insect involved in long-term flight, it is tempting to speculate that it lacks such fast Lp reloading mechanisms.


It was also shown here that the rapid redirection of the metabolism from oogenesis to flight activity was accompanied by a change in the content of lipids of the tissues. In the flight muscles, except for TAG, all other classes of lipids measured augmented following by the beginning of flight (Table 2). Flight activity induced Lp particles to unload all classes of lipids from the muscles. The fact that TAG was the only class of lipid muscle reduced can be interpreted as evidence that, as it occurs in other insect species (Ward et al., 1982), TAG is also the main lipid class consumed in *R. prolixus* in order to release fatty acids to be used as an energy resource.

The change in the content of lipids associated with the ovary, induced by a single flight activity, was enough to cause a small alteration in the total number of the eggs produced (Table 3). This can be explained by a rapid recovery of Lp capacity to carry lipids. The detection of reduced amount of lipids in the ovary as compared to the control (Table 2) does not mean necessarily that the ovary delivered lipids to other tissues, but simply that the ovary started a process of follicle resorption, as reported for insects subjected to metabolic stress, nutritional (Clements and Boocock, 1984; Soller et al., 1999) or parasitic infection (Hurd and Arme, 1987; Hopwood et al., 2001).

When the insects were subjected to a daily exhaustive flight activity (Table 3), the number of eggs laid was reduced significantly, probably as a consequence of a metabolic stress caused by the large consumption of energy required for generating flight activity.

This work suggests that *R. prolixus* flight can only be used as a mechanism of dispersion for short distances, since the loading of Lp with lipids after some minutes of flight, which results in a density and molecular mass variation, seems to be inefficient to provide a long-term exercise. This mechanism can be used either to reduce high populations or when environmental conditions for growth and oviposition, such as food availability, are not suitable, as described by Kennedy (1961). Moreover, we demonstrated that flight and oogenesis are antagonistic processes since both utilize, basically, the same energy sources. We have observed that the capacity of the insect to fly, changes in a very complex way following the days after a meal, but the meaning of this is not clear and is currently under investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Dr. Mario A. C. Silva-Neto and Mr. Joshua A. Lieberman for a critical reading of the manuscript; Lilian Soares da Cunha Gomes and Heloisa Coelho for excellent technical assistance, Litiane Moura Rodrigues and José de S. Lima, Jr., for insect care. 

LITERATURE CITED

- Atella GC, Gondim KC, Masuda H. 1992. Transfer of phospholipids from the fat body to lipophorin in *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 19:133–144.
- Atella GC, Gondim KC, Masuda H. 1995. Loading of lipophorin particles with phospholipids at midgut of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 30:337–350.
- Beenackers AMTh, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA. 1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem* 14:243–260.
- Beenackers AMTh, Bloemen REB, de Vlieger TA, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA. 1985. Insect adipokinetic hormones. *Peptides* 6:437–444.
- Blacklock BJ, Ryan RO. 1994. Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem Mol Biol* 24:855–873.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
- Clements AN, Boocock MR. 1984. Ovarian development in mosquitoes: stages of growth and arrest and follicular resorption. *Physiol Ent* 9:1–8.
- Coelho HSL, Atella GC, Moreira MF, Gondim KC, Masuda H. 1997. Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 35:301–313.
- Davis BJ. 1964. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 124:404–427.
- de Meis L, Masuda H. 1974. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum by orthophosphate through two different reactions. *Biochemistry* 13:2057–2062.
- Garcia ES, Macarine JD, Garcia MLM, Ubatuba FB. 1975. Alimentação do *Rhodnius prolixus* no laboratório. (Feeding of *Rhodnius prolixus*.) *An Acad Brasil Ciênc* 47:537–545.
- Gondim KC, Atella GC, Masuda H. 1989a. Lipophorin from *Rhodnius prolixus*: Purification and partial characterization. *Insect Biochem* 19:153–314.
- Gondim KC, Oliveira PL, Masuda H. 1989b. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. *J Insect Physiol* 35:19–27.

- Gondim KC, Atella GC, Kawooya JK, Masuda H. 1992. Role of phospholipids in the lipophorin particles of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 20:303–314.
- Gringorten JL, Friend WC. 1979. Haemolymph volume changes in *Rhodnius prolixus* during flight. *J Exp Biol* 83:325–333.
- Hopwood JA, Ahmed AFM, Polwart A, Williams GT, Hurd H. 2001. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. *J Exp Biol* 204:2773–2780.
- Hurd H, Arme C. 1987. An evaluation of *Locusta migratoria* as a model for the study of pathophysiology of *Hymenolepis diminuta* metacestodes in insects. *J Parasit* 73:1063–1064.
- Kawooya JK, Keim PS, Ryan RO, Shapiro JP, Samaraweira P, Law JH. 1984. Insect apolipophorin III. Purification and properties. *J Biol Chem* 259:10733–10737.
- Kennedy JS. 1961. A turning point in the study of insect migration. *Nature* 189:785–791.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lehane MJ, Schofield CJ. 1981. Field experiments of dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75:399–400.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AR, Randall RJ. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Madrell SHP. 1969. Secretion by Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. *J Exp Biol* 51:71–97.
- Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. 1986. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 128:417–431.
- Penesfsky H. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 252:2891.
- Rankin MA, McAnelly ML, Bodenhamer JE. 1986. The oogenesis-flight syndrome revisited. *Insect flight: dispersal and migration*. Berlin: Springer-Verlag, p 27–48.
- Ruiz JL, Ochoa B. 1997. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by nano-dimensional thin layer chromatography and image analysis. *J Lipid Res* 38:1482–1489.
- Ryan RO, Schmidt JO, Law JH. 1984. Chemical and immunological properties of lipophorins from seven orders. *Arch Insect Biochem Physiol* 1:375–383.
- Sappington TW, Showers WB. 1992. Reproductive maturity, mating status and long-duration flight behavior of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) and the conceptual misuse of the oogenesis-flight syndrome by entomologists. *Environm Entomol* 21:4:677–688.
- Schofield CJ. 1979. The behavior of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bullet Entomol Res* 69:363–381.
- Shapiro JP, Law JH, Wells MA. 1988. Lipid transport in insects. *Ann Rev Entomol* 33:297–318.
- Soller M, Bornes M, Kubli E. 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev Biol* 208:337–351.
- Surholt B, Goldberg J, Schulz TKF, Beenackers AMTh, Van der Horst DJ. 1991. Lipoproteins act as a reusable shuttle for lipid transport in the flying death's-head hawkmoth *Acherontia atropos*. *Biochim Biophys Acta* 1086:15–21.
- Surholt B, Van Doorn JM, Goldberg J, Van der Horst DJ. 1992. Insect lipophorin interconversions: compositional analysis of high and low density lipophorin of *Acherontia atropos* and *Locusta migratoria*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 373:13–20.
- Van der Horst DJ. 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp Biochem Physiol Part B* 136:217–226.
- Van der Horst DJ, Van Hoof D, Van Marrewijk WJA, Rodenburg KW. 2002. Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol Cel Biochem* 239:113–119.
- Van Heusden MC, Van der Horst DJ, Volshol J, Beenackers AMTh. 1987. The recycling of protein components of flight-specific lipophorin in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem* 17:771–776.
- Vogel CW, Doizaki WM, Zieve L. 1962. Rapid thin-layer chromatographic separation of phospholipids and neutral lipids of serum. *J Lipid Res* 3:138–140.

- Weers PNM, Ryan RO. 2003. Apolipoprotein III: a lipid-triggered molecular switch. *Insect Biochem Mol Biol* 33:1249–1260.
- Ward JP, Candy DJ, Smith SN. 1982. Lipid storage and changes during flight by Triatomine bugs (*Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*). *J Insect Physiol* 28:6:527–534.
- Ward JP, Baker PS. 1982. The tethered flight performance of a laboratory population of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Entomol Res* 72:287–293.
- Weis-Fogh T. 1956. Flight performance of desert locust (*Schistocerca gregaria*). *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci* 239:459–510.

7.2 ARTIGO II

ARTIGO II

“Lipophorin uptake by testes as a lipid source to male semen”

Giselle A. Oliveira, Miranda C. Van Heusden and Georgia C. Atella

Insect Biochemistry and Physiology (submetido)

LIPHOPHORIN UPTAKE BY TESTES AS A LIPID SOURCE TO MALE SEMEN

Giselle A. Oliveira, Miranda C. Van Heusden and Georgia C. Atella*

Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, CEP 21941-590, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-590, Brasil.

*Corresponding author: Dr Georgia C. Atella, Phone: + 55-21-2562-6785. Fax + 55-21-2270-8647, E-mail: atella@bioqmed.ufrj.br

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio à Núcleos de Excelência (Pronex) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT).

Total number of figures: 6

Tables: 1

Abbreviated title: lipophorin uptake by testis

Abstract

Lipid transport through the aqueous circulatory system of animals is mediated by lipoproteins. In insects, lipophorin (Lp), the major hemolymphatic lipoprotein, is able to selectively deliver lipids to target tissues such as ovaries during oogenesis. In this work, we demonstrated for the first time the Lp uptake by insect testes using the hematophagous insect, *Rhodnius prolixus*, as the experimental model. Lp labeled in the phospholipid moiety with ^{32}P i (^{32}P -Lp) was injected into adult males at different days after blood meal. The testes and fat body incorporated large amounts of lipids from ^{32}P -Lp. On the second day, phospholipid uptake by testes reached its maximum value. Kinetics of ^{32}P -Lp and ^{125}I -Lp at 28°C demonstrated that the entire Lp particle was taken up by testes at a similar rate. Such a process was blocked at 4°C . Lp uptake by testes was also inhibited by an excess of unlabeled Lp, but not by bovine serum albumin. Western blotting of testes total homogenates revealed the presence of apolipoprotein I (apoLp-I) and apolipoprotein II (apoLp-II) inside the tissue. Using double fluorescently labeled Lp, we observed a co-localization of the imported Lp and its lipids in testes. Together these findings indicate a receptor-mediated Lp endocytic uptake by testis cells. Moreover, we detected the presence of radioactive lipids from ^3H -Lp in the spermatozoa and seminal fluid fractions. Mating experiments showed the transfer of these ^3H -lipids to female spermatheca. The Lp uptake and the use of its lipids as substrates by testes, during physiological processes such as spermatogenesis, are discussed.

Key words: lipophorin, insect, testes, spermatogenesis, lipid.

1. Introduction

Lp is the major lipoprotein in the hemolymph of insects (Chino et al., 1981). The main function of this lipoprotein is the transport of several classes of lipids among tissues involved in lipid absorption, storage, and utilization (Shapiro et al., 1988; Blacklock and Ryan 1994; Van der Horst et al., 2002). Lp is composed of two apolipoproteins: apoLp-I (250,000 daltons) and apoLp-II (80,000 daltons). A third apolipoprotein, called apoLp-III (18,000 daltons), can be present in adults of the same species, depending on their physiological state (Kawooya et al., 1984; Weers and Ryan, 2003).

The lipid transport by Lp is a key step of important insect physiological processes, such as flight activity. During flight, HDLp (high density Lp) can be loaded with diacylglycerol (DAG) in fat body cells and associated with apoLp-III molecules, resulting in a less dense and larger particle called LDLp (low density Lp). LDLp is able to deliver DAG to flight muscles, without protein internalization, and be reloaded in fat body, thus acting as a reusable shuttle during flight activity (Van Heusden et al., 1987; Van der Horst et al., 2002).

Oogenesis is another insect process in which Lp plays an important role. This process is characterized by a rapid accumulation of proteins and lipids by the developing oocytes, and the production of a great number of eggs in a relatively short period of time. Lp is able to transfer several classes of lipids, such as diacylglycerol, cholesterol, and phospholipids to growing oocytes (Kawooya and Law, 1988; Gondim et al., 1989; Jouni et al., 2003; Atella, et al., 2006). As a result, in some insect species, 30-40% of the dry mass of a mature egg consists of lipids (Kawooya and Law, 1988; Ziegler and Van Antwerpen, 2006). However, the role of Lp in the lipid transport to testis during spermatogenesis is unknown in insects.

In mammals, lipoproteins are involved in the selective transfer of cholesteryl ester to testis cells. This cholesteryl ester can be converted into testosterone by gonadotrophic hormone treated Leydig cells (Reaven et al., 2000), and can be involved in membrane renewal

by Sertoli cells and, putatively, by germ cells (Levallet et al., 1998; Fofana et al., 2000). The lipid transfer to testes is an essential step of spermatogenesis since spermatozoa are subjected to changes in the composition of their plasma membrane in order to modulate their motility and fecundity. The lipid composition of spermatozoon plasma membrane is an important aspect of the membrane fusion during acrossome reaction, and subsequently in the success of fertilization (Flesch and Gadella, 2000).

In insects, lipids can play different roles in the male reproduction system. Stanley-Samuelson et al. (1986) demonstrated that fatty acids can be incorporated by testis and converted into prostaglandins by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. In addition, free fatty acids can also be involved in the synthesis of mating plugs by males of *Bombus terrestris* L (Baer et al., 2001). Lipids also function as potential regulators of membrane-actin cytoskeleton interactions during cleavage of crane fly spermatocytes (Saul et al., 2004). Therefore, the lipid transport by lipoproteins to testis in insects can be postulated to supply the lipid demands of this organ. In the present article, we examine the capacity of testes of *Rhodnius prolixus* to uptake lipids from Lp and the role of Lp in spermatogenesis.

2. Materials and methods

2.1 Insects

Insects were taken from a colony of *Rhodnius prolixus* maintained at 28°C and 80% relative humidity. The experimental insects were normal adults fed on rabbit blood at 3-week intervals.

2.2 ³²Pi Purification

Carrier-free ³²Pi purchased from Comissão Nacional de Energia Nuclear (São Paulo) was purified by means of a Dowex 1x-10 column (de Meis and Masuda, 1974).

2.3 Lp Purification

The hemolymph, which contains about 40 µg of Lp per µL (Gondim et al., 1989), was collected in the presence of phenylthiourea (30-130 mg/mL), 5 mM EDTA, and a mixture of protease inhibitors prepared in 0.15 M NaCl, in a final concentration of 0.05 mg/mL soybean trypsin inhibitor, leupeptin, and antipain, and 1mM benzamidine. It was centrifuged at room temperature for 5 minutes at 13,000g. The supernatant was diluted to 7 mL with 0.15 M NaCl and 1.75g KBr was added. This material was centrifuged at 45,000 rpm in a Beckman Type 70.1Ti rotor at 4°C for 20 hours, and Lp was collected from the top of the KBr gradient (Gondim et al., 1989). The Lp samples were applied to Sephadex G-50 spin columns (Penesfsky, 1977). The degree of purification of Lp was monitored by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Protein concentration of Lp was estimated according Lowry et al (1951) using BSA (bovine serum albumin) as a standard.

2.4 Preparation of isotopically Labeled Lp

To prepare ^{32}P -labeled Lp, adult females were fed on blood enriched with ^{32}P (Gondim et al., 1989) using a special feeder (Garcia et al., 1975). ^{32}P -Lp was purified from hemolymph on a KBr gradient ultracentrifugation as described above. ^3H -labeled Lp was prepared as follows. ^3H -palmitic acid (10 μL , 10 μCi ; specific activity: 1 mCi/mL, Perkin Elmer, USA) was injected with a Hamilton syringe into adult females on the third day after a blood meal. After 2 hours, the hemolymph was collected and Lp was purified as described above. Routinely, ^3H -Lp was subjected to a lipid extraction and thin layer chromatography (TLC). The spot of each lipid was scrapped, and the radioactivity was estimated by scintillation counting. The main lipid labeled in ^3H -Lp was diacylglycerol (data not shown). In order to prepare ^{125}I -labeled Lp, purified Lp was iodinated with ^{125}I -sodium iodide (Comissão Nacional de Energia Nuclear) in the proportion of 200 μCi /mg of protein, using Iodo-gen (Sigma Chemical Co, St. Louis) (100 μg /mg of protein) as per the manufacturer's instructions. To remove the free iodine, the reaction mixture was passed through three Sephadex G-50 spin columns (Penefsky, 1977).

2.5 Preparation of Fluorescently labeled Lp

Purified Lp was doubly-labeled with fluorescein, 5'-isothiocyanate (FITC), and Texas Red-conjugated phosphatidylethanolamine, N-Texas Red[®] sulphonyl-1,2-dihexanoly-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Texas Red-PE) (Molecular Probes, USA) as described by Martin-Nizard *et al.* (1987). Alternatively, purified Lp was labeled with BODIPY labeled palmitic acid, 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-hexadecanoic acid (BODIPY-FA), or with BODIPY labeled phosphatidylcholine, 2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-

sn-glycero-3-phosphocholine (BODIPY-PC) (Molecular Probes, USA). Distribution of fluorescent lipids and Lps was observed using methods described in the literature (Atella and Shahabuddin, 2002).

2.6. Phospholipid uptake by different organs and during the days after feeding

^{32}P -Lp (40 μg) was injected into adult males (n=10) at different days after blood feeding. On each day, testes were dissected and washed in physiological saline (Madrell, 1969). The testes were homogenized in 0.15 M NaCl, and incorporated radioactivity was measured by scintillation counting. To verify the phospholipid uptake by different tissues, ^{32}P -Lp (40 μg) was injected into adult males on the second day after meal (n=10). After 24 hours, the organs were dissected, homogenized, and radioactivity was measured by scintillation counting.

2.7. Lp and lipid uptake by testes

Lp (40 μg) labeled in the phospholipid moiety with ^{32}P , in the diacylglycerol moiety with ^3H -palmitic acid, or in the apolipoprotein moiety with ^{125}I was injected into adult males on the second day after feeding. At different times, testes were dissected, washed and homogenized (n=10). The hemolymph was also collected each time. The radioactivity was estimated by scintillation counting for ^{32}P and ^3H samples, or gamma counting for ^{125}I samples.

2.8. Lp binding to the testes

Non-radioactive testis (n=5) were dissected and incubated at different times on ice under three distinct experimental conditions: with purified ^{32}P -Lp (0,5mg/mL); with ^{32}P -Lp in the presence of non-radioactive Lp (70 mg/mL); or in the presence of bovine serum albumin

(70 mg/mL). After incubation, testes were washed in 1 mL of physiological saline (Maddrell, 1969) for 30 minutes at 28°C and homogenized in NaCl 0.15 M. The radioactivity was determined using a scintillation counter.

2.9. Lipid analysis

On the second day after meal, ^3H -Lp (40 μg) was injected into adult males (n=10). After 24 hours, the testes were dissected, washed, and homogenized in 0.15M NaCl. Lipid extraction was performed according to Blight and Dyer (1959) for 2h in a stoppered tube in 5 mL of methanol-chloroform-water solution (2:1:0.8, v/v), with intermittent agitation. After the centrifugation, the supernatant was collected and the pellet was subjected to a second lipid extraction (1h). To the pooled supernatants, 5 mL of water and 5mL of chloroform were added. The mixture was shaken and, after centrifugation, the organic phase was removed and dried under nitrogen. Extracted lipids were analyzed by one-dimensional TLC for neutral lipids (Vogel et al., 1962). Each lipid spot was identified by comparison to lipid standards (Sigma) run in parallel. The plates were stained with iodine. The spots were scrapped, the lipids eluted, and the radioactivity associated with each spot was determined by scintillation counting.

2.10 Fluorescent experiments

Fluorescent-labeled Lp (10 μg) was injected into adult males (n=4) on the second day after feeding. After 24 hours, testes were dissected and washed. Fluorescent observations were made by epifluorescence microscopy (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NJ, USA) with phase-contrast component and monochromatic filters for FITC/BODIPY (excitation 505nm/emission 515nm) or for Texas Red (excitation 582nm/emission 601nm).

2.11 Spermatozoa separation

^3H -Lp was injected into adult males (n=10) on the second day after blood feeding. After 24 hours, testes were dissected and washed in physiological saline (Maddrell, 1969). The spermatozoa separation was performed according to Cerolini et al. (1997) with modifications. The tissues were gently homogenized in PBS 1% sucrose, and centrifuged at room temperature for 5 minutes at 1000 rpm. The supernatant was collected and the same volume of PBS 1% sucrose was added. The mixture was centrifuged at 4°C for 15 minutes at 2500 rpm to separate spermatozoa (pellet) from seminal fluid (supernatant). The supernatant was collected, the pellet washed with PBS 1% sucrose and centrifuged under the same conditions. The pooled supernatants and pellet samples were subjected to a lipid extraction, and the lipids were analyzed by TLC as described above.

2.12 SDS-PAGE and Western blotting

Lp (40 μg) was injected into adults males on the second day after feeding. After 24 and 48 hours, the testes were dissected and homogenized in a mixture of protease inhibitors as described above. Total proteins (30 μg) from testes homogenates were separated by SDS-PAGE. Polyacrylamide gels were run at 20mA and stained with amido black. Western blotting was performed as follows. Gels were transferred to a nitrocellulose membrane at 190 mA for 90 min. Membranes were blocked with albumin, and then probed with a 1:10000 dilution of a rabbit polyclonal anti-Lp antibody and developed using the ECL system.

2.13 Mating experiments

On the second day after feeding, ^3H -Lp was injected into virgin males (n=10). These males were placed into single vials with non-radioactive virgin females for 4 days. After that,

the testes, seminal vesicles, and accessory glands from males and female spermathecas were dissected and washed in physiological saline (Maddrell, 1969). The radioactivity associated with each organ was determined by scintillation counting. A further analysis of lipid transfer during mating was performed using fluorescently labeled Lp with BODIPY-FA or BODIPY-PC. Fluorescent-labeled Lp (10 μ g) was injected into adult males (n=4) on the second day after feeding. These males were placed into single vials with non-injected virgin females for 24 hours. After that, the testes and female spermathecas were dissected and washed in physiological saline (Maddrell, 1969). Fluorescent observations were made by epifluorescence microscopy (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NJ, USA) as described previously.

3. Results

The lipid uptake by different organs was studied by ^{32}P -Lp injection into adult males. After 24 hours, the heart, midgut, fat body, and testes were isolated, and the radioactivity associated with each organ was then estimated (Fig. 1A). As expected, the fat body was able to incorporate large amounts of lipids from Lp. Moreover, testis tissue was also capable of uptake a significant amount of lipids from Lp.

Since the blood meal regulates the metabolism of *R. prolixus*, the capacity of Lp to deliver lipids to testes during the days after blood meal was examined. The ^{32}P -Lp was injected into adult males on several days after feeding. At the desired times, testes were dissected, and the radioactivity associated with each tissue was estimated (Fig. 1B). On the second day after feeding, the lipid uptake by testes reached its maximum value. The rate of lipid incorporation slightly declines during the 3rd and 4th days after blood meal. After that, we observed a still significant incorporation in the followings days until the 15th day. This data indicates a constant lipid supply by Lp to testes.

A further study of the lipid uptake by testes was performed. We examined the kinetics of incorporation at different times after ^{32}P -Lp injection into adult males on the second day after feeding (Fig. 2). The lipid uptake was linear up to 30 hours and then diminished. Simultaneously, we observed a gradual decrease of radioactivity in the hemolymph.

To analyze if Lp was also internalized by testis cells, we performed a kinetics study using ^{125}I -labeled Lp at 28°C and 4°C (Fig. 3A). At 28°C, Lp uptake was linear up to 30 hours and then decreased, but at 4°C, no increase of Lp uptake was observed (Fig. 3A). This indicates that Lp internalization by testis is an energy-dependent active process. In addition, we traced the radioactivity in the hemolymph for 5 days after injection to verify whether the Lp apolipoproteins could be recycled back to hemolymph. No peak of radioactivity was observed in hemolymph during the analyzed time (Fig. 3A). Total testes homogenates

obtained from 24 and 48 hours after Lp injection were analyzed by immunoblotting to observe the presence of Lp. As shown in Figures 3B-C, apoLp-I and apoLp-II were detected. Together these findings demonstrate that testis cells internalize the entire Lp particle, both lipid and protein moiety, in an energy-dependent manner. Furthermore, the apolipoproteins are kept in the cells and not returning to hemolymph.

To examine if Lp-uptake by testes is a receptor-mediated process, we performed a competition assay using ^{125}I -Lp and unlabeled Lp. Unlabeled BSA was used as a non specific protein competitor in control experiments. Figure 4 shows that, in the presence of unlabeled Lp, ^{125}I -Lp uptake is inhibited in a time-dependent manner. Therefore, there is a clear competition between unlabeled Lp and ^{125}I -Lp for binding sites in testes. No inhibition was observed using unlabeled BSA. The results suggest that Lp uptake is related to a receptor-mediated process, and probably involves participation of a specific receptor for Lp.

To obtain more spatial information about Lp-internalization by testes, we injected a double fluorescently labeled Lp (both lipid and protein moiety) into adult males on the second day after feeding. After 24 hours, testes were isolated and Lp localization was analyzed using microscopy (Fig. 5). We observed an accumulation of labeled lipids in bodies localized close to testicular junctions (Fig. 5A). Labeled Lp was also found in these bodies (Fig. 5B), which indicates a co-localization of the protein and lipid moieties of Lp inside of testis cells (Fig. 5C). This is consistent with the fact the entire Lp particle is internalized by testes at a similar rate (Fig 2-3).

To reveal the composition of incorporated lipids by testis cells, ^3H -Lp, which contains large amounts of labeled diacylglycerol, was injected into adult males on the second day after feeding. After 24 hours, the testes were isolated and lipids were analyzed by TLC (Table 1). Phospholipids and triacylglycerol were the main labeled lipids found in testes total

homogenates. These results demonstrate that incorporated lipids from Lp can be converted into other classes of lipids by testis cells.

Testes are responsible for spermatozoa production which requires a great supply of lipids (Dumser, 1980). In order to examine if lipids from Lp could be associated with spermatozoa or seminal fluid, ^3H -Lp was injected into adult males. The testes were dissected, and spermatozoa and seminal fluid fractions were isolated and subjected to lipid extraction. Table I shows that lipids from labeled Lp were present in the isolated spermatozoa from testes, mainly as phospholipids (54%). On the other hand, triacylglycerol, diacylglycerol, and phospholipids were the main labeled lipids found in the seminal fluid fraction.

In order to verify whether Lp lipids associated with spermatozoa and seminal fluid fractions are transferred to females during mating, ^3H -Lp was injected into adult males. These males were paired with virgin females for 4 days. After that, the male reproductive organs and female spermathecas were dissected. Figure 6A shows the presence of radioactivity from ^3H -lipids in testes, but also in female spermatheca. We also injected fluorescently labeled Lp with BODIPY-FA (Fig 6B-C) or BODIPY-PC (Fig. 6D-E) into adult males. Afterwards, the injected males were placed with virgin females into separated vials for 24 hours. After that, the spermatheca was isolated and the fluorescence observed by microscopy. In agreement with radioactive experiments, the fluorescent lipids were found in spermatheca, demonstrating lipid transfer from males to females during mating.

4. Discussion

In mammals, lipoproteins have been proposed to selectively deliver lipids to testes to be converted to testosterone or to be used during germ cell membrane production (Levallet et al., 1998; Fofana et al., 2000; Reaven et al., 2000). Here, for the first time, we have observed the Lp uptake by insect testes using our experimental model, the kissing-bug *Rhodnius prolixus*. We also examined which lipids are incorporated by testes and their utilization in spermatozoa production and posterior transfer to females during mating.

A high accumulation of lipid from Lp was noted in testes when radioactively labeled Lp in the lipid moiety was injected into *R. prolixus* adult males (Fig. 1A). It is strong evidence of the great demand for lipid in this organ to sustain male reproductive functions.

Figure 1B shows that, on the second day after blood meal, the lipid incorporation by testes reached its maximum value. This result is in agreement with the fact that large amounts of nutrients are available on the earlier days of the digestion process, so Lp can be loaded with lipids in the midgut and deliver them to target tissues (Coelho et al., 1997; Rodenburg and van der Horst et al., 2005; Atella et al., 2006). Nevertheless, we also verified a significant incorporation of radioactivity until the 15th day after feeding. This demonstrates a constant demand for lipid which is required by a continuous process, such as spermatogenesis (Dumser, 1980; Oliveira et al., unpublished data).

The kinetics of lipid and Lp uptake by testes is linear up to 30 hours, as shown in Figure 2 and 3A. The rate of Lp uptake by testis cells is slower compared with *R. prolixus* ovary, fat body, and flight muscles (Gondim et al., 1989; Atella et al., 2000; Oliveira et al., 2006). Most likely, oogenesis, lipid storage, and flight activity are metabolic processes that more readily require energy sources than spermatogenesis.

The presence of apoLp-I and apoLp-II in testes total homogenates (Fig 3B) and the visualization of Lp inside of the organ (Fig. 5) demonstrate that the entire Lp particle is

internalized by testis cells. After that, no apolipoproteins are recycled back to hemolymph (Fig. 3A). Together these findings support the concept that Lp does not act as a reusable shuttle during lipid transport to *R. prolixus* testes. A similar lipid transport pathway was described for *Anopheles gambiae*, whereas Lp was taken up by developing oocytes (Atella et al., 2006).

We observed no Lp entry into testes at 4°C (Fig. 3A), whereas cell surface binding still occurs (Fig. 4). In addition, we also demonstrated that unlabeled Lp competes strongly with radioactively labeled Lp for binding sites in testis cells. The same was not verified using a nonspecific protein competitor (Fig. 4), indicating a possible participation of a specific Lp receptor in Lp uptake by testes.

Receptor-mediated lipoprotein endocytosis has been proposed, both in mammals and insects models (Rodenburg and van der Horst, 2005; Brown et al., 1997). In mammals, LDL particles are internalized upon binding to LDL receptor (LDLR), released in initial endosomes which mature to lysosomes where total LDL degradation occurs (Brown and Goldstein, 1986; Stoorvogel et al., 1991, Hussain et al., 1999). Recently, genes for Lp receptors have been cloned and sequenced from *Locusta migratoria* fat body (Dantuma et al., 1999), *Galleria mellonella* (Lee et al., 2003), and *Aedes aegypti* ovaries (Cheon et al., 2001; Seo et al., 2003) and were identified as members of LDLR receptor family. Van Hoof et al. (2003) demonstrated that a novel member of this receptor family, LpR, is able to mediate Lp endocytosis in fat body cells of *L. migratoria*. Moreover, LpR or a variant thereof was also detected in testis cells from young adult locusts, and can be related to Lp endocytosis in this organ (Oliveira et al., unpublished).

In the present work we have provided direct evidence of endocytic uptake of Lp by testes in *R. prolixus*. Clearly the entire Lp particle is taken up by testis and accumulated on lipid bodies inside the organ. Based on these results, and together with the temperature

dependence of the process and competition experiments, we can postulate an endocytic uptake of Lp in testes. However, the identification of an Lp receptor in *R. prolixus* testes remains to be elucidated.

Table 1 shows the fate of Lp lipids by testes. Testis cells are able to internalize Lp and use its lipids as substrates for spermatogenesis since we detected the presence of radioactive lipids from ^3H -Lp in the spermatozoa fraction, principally as phospholipids. Furthermore, we also observed radioactive lipids from ^3H -Lp in the seminal fluid fraction.

The spermatozoa plasma membrane formation and modulation are dynamic processes which take place in male and female reproductive tracts, respectively, and are related to the maturation and capacitation of sperm cells (Dumser, 1980; Flesch and Gadella, 2000). Mammalian lipoproteins can play an important role in these processes since they are able to transfer lipids to supply the lipid demands of testes (Reaven et al., 2000). Our results suggest that Lp can play a similar role during *R. prolixus* spermatogenesis, providing lipids to be used as either energy sources or spermatozoon plasma membrane compounds by testis cells. Furthermore, lipids from Lp are present in seminal fluid, and probably can be used as an additional energy resource when spermatozoa cross to the female tract. They may also have sites of action within and outside the female reproductive system causing different responses, such as the hormonal stimulation described for seminal peptides and proteins of *Drosophila* accessory glands (for review see Chapman and Davies, 2004).

Figure 6 shows that, during mating, labeled lipids from Lp can be transferred from males to female spermatheca, which is responsible for the retention of sperm after copulation (Khalifa, 1950a). These results are in agreement with the idea that Lp is taken up by testes, and their lipids are used to synthesize spermatozoa which is transferred to female spermatheca during mating. Therefore, the lipid transport mediated by Lp to testes may be an important step in maintaining the reproductive fitness of this insect. We are currently addressing the

effect of flight activity on Lp incorporation by testes and the possible implications on lipid transfer during mating and posterior fertilization.

5. Acknowledgments: Special thanks for Dr Daniel M. Golodne for the support throughout the work. We express our gratitude to Lilian Soares da Cunha Gomes and Heloisa Coelho for excellent technical assistance, and Litiane Moura Rodrigues and José de S. Lima Junior for insect care.

6. References

- Atella, G.C., Arruda, M.A., Masuda, H., Gondim, K.C., 2000. Fatty acid incorporation By *Rhodnius prolixus* midgut. Arch. Insect Biochem. Physiol. 43, 99-107.
- Atella, G.C., Shahabuddin, M., 2002. Differential partitioning of maternal fatty acids and phospholipid in neonate mosquito larvae. J. Exp. Biology 205, 3623-3630.
- Atella, G.C., Silva-Neto, M.A.C., Golodne, D.M., Arefin, S., Shahabuddin, M., 2006. *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. Insect Biochem. Molec. Biol. 36, 375-386.
- Baer, B., Morgan, E.D., Schmid-Hempel, P., 2001. A nonspecific fatty acid within the bumblebee mating plug prevents females from remating. Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 98 (7), 3926-3928.
- Blacklock, B.J., Ryan, R.O., 1994. Hemolymph lipid transport. Insect Biochem. Molec. Biol. 24, 855-873.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1986. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 34-47.
- Brown, M.S., Herz, J., Goldstein, J.L., 1997. LDL receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. Nature 388, 629-630.
- Cerolini, S., Kelso, K.A., Noble, R.C., Speake, B.K., Pizzi, F., Cavalchini, L.G., 1997. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. Biology Rep. 57, 976-980.
- Chapman, T., Davies, S.J., 2004. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. Peptides 25, 1477-1490.

- Cheon, H.M., Seo, S.J., Sun, J., Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 2001. Molecular characterization of VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 753-760.
- Chino, H., Katase, H., Downer, R.G.H., 1981. Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the american cockroach: purification, characterization and function. *J.Lipid Res.* 22, 7-15.
- Coelho, H.S.L., Atella, G.C., Moreira, M.F., Gondim, K.C., Masuda, H., 1997. Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35, 301-313.
- Dantuma, D.P., Potters, M., De Winter, M.P., Tensen, C.P., Kooiman, F.P., Bogerd, J., Van der Horst, D.J., 1999. An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J. Lip. Res.* 40, 973-978.
- de Meis, L., Masuda, H., 1974. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum by orthophosphate through two different reactions. *Biochemistry* 13, 2057-2062.
- Dumser, J.B., 1980. The regulation of spermatogenesis in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 25, 341-349.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *BBA.* 1469, 197-235.
- Fofana, M., Travert, C., Carreau, S., Le Goff, D., 2000. Evaluation of cholesteryl ester transfer in seminiferous tubule cells of immature rats in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fer.* 118, 79-83.
- Garcia, E.S., Macarine, J.D., Garcia, M.L.M., Ubatuba, F.B., 1975. Alimentação do *Rhodnius prolixus* no laboratório. *An. Acad. Bras. Ciência* 47, 539-545.

- Gondim, K.C., Oliveira, P.L., Masuda, H., 1989. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: transfer of phospholipids. *J. Insect Physiol.* 35, 19-27.
- Hussain, M.M., Strickland, D.K., Bakillah, A., 1999. The mammalian low density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 141-172.
- Jouni, Z.E., Takada, N., Gazard, J., Maekawa, H., Wells, M.A. Tsuchida, K., 2003. Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles in vitro: role of lipid transfer particle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33(2), 143-53.
- Kawooya, J.K., Keim, P.S., Ryan, R.O., Samaraweera, P. Law, J.H., 1984. Insect apolipoprotein III. Purification and properties. *J. Biol.Chem.* 259, 10733-10737.
- Kawooya, J.K., Law, J.H., 1988. Role of lipophorin transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.* 263, 8748-8753.
- Khalifa, A., 1950a. Spermatophore production and egg-laying behavior in *Rhodnius prolixus*. *Parasitology* 40, 283-289.
- Laemmli, UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C.S., Han, J.H., Lee, S.M., Hwang, J.S., Kang, S.W., Lee, B.H., Kim, H.R., 2003. Wax moth, *Galleria mellonella* fat body receptor for high density lipophorin (HDLp). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54, 14-24.
- Levallet, J., Bilinska, B., Mitre, H., genissel, C., Fresnel, J., Carreau, S., 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature testicular cells. *Biology of Reprod.* 58, 919-926.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Madrell, S.H.P., 1969. Secretion by Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. *J. Exp. Biol.* 51, 71-97.

- Oliveira, G.A., Baptista, D.L., Guimarães-Motta, H., Almeida, I.C., Masuda, H., Atella, G.C. flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62, 164-175.
- Penesfsky, H., 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252, 2891.
- Reaven, E., Zhan, L.Z., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., Azhar, S., 2000. Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J. Lipid Res.* 41, 343-356.
- Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2005. Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family member. *BBA.* 1736, 10-29.
- Saul, D., Fabian, L., Forer, A., Brill, J., 2004. Continuous phosphatidylinositol metabolism is required for cleavage of crane fly spermatocytes. *J. Cell Science* 117, 3887-3896.
- Seo, S.J., Cheon, H.M., Sun, J., Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 2003. Tissue and stage specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand binding repeats in the adult mosquito. *J. Biol. Chem.* 278, 41954-41962.
- Shapiro, J.P., Law, J.H., Wells, M.A., 1988. Lipid transport in insects. *Ann Rev Entomol.* 33, 297-318.
- Stanley-Samuelson, D., Jurenka, J.A., Blomquist, G.J., Loher, W., 1986. De novo biosynthesis of prostaglandins by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 85, 303-307.
- Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V., Schwartz, A.L., 1991. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 417-427.
- Van der Horst, D.J., Van Hoof, D., Van Marrewijk, W.J.A., Rodenburg, K.W., 2002. Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol. Cel. Biochem.* 239, 113-119.

Van Heusden, M.C., Van der Horst, D.J., Volshol, J., Beenackers, A.M.Th., 1987. The recycling of protein components of flight-specific lipophorin in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 17, 771-776.

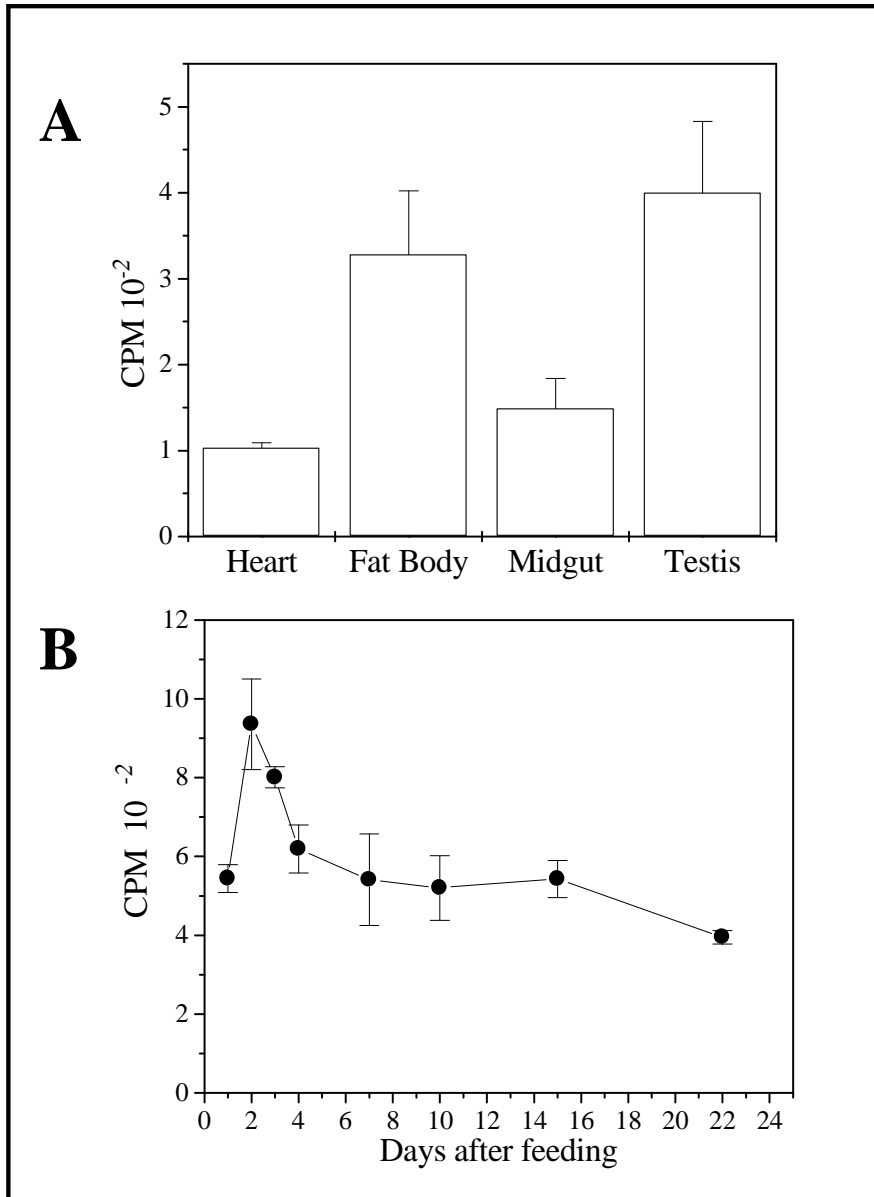
Van Hoof, D., Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2003. Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *J. Lip. Res.* 44, 1431-1440.

Vogel, W.C., Zieve, L., Carleton, R.O., 1962. Measurement of serum lecithin, lysolecithin and sphingomyelin by a simplified chromatographic technique. *J. Lab. Clin. Med.* 59, 335-344.

Ziegler, R., Van Antwerpen, R., 2006. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 264-274.

Weers, P.N.M., Ryan, R.O., 2003. Apolipophorin III: a lipid-triggered molecular switch. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1249-1260.

7. Figures

**Figure 1**

Oliveira et al, 2007.

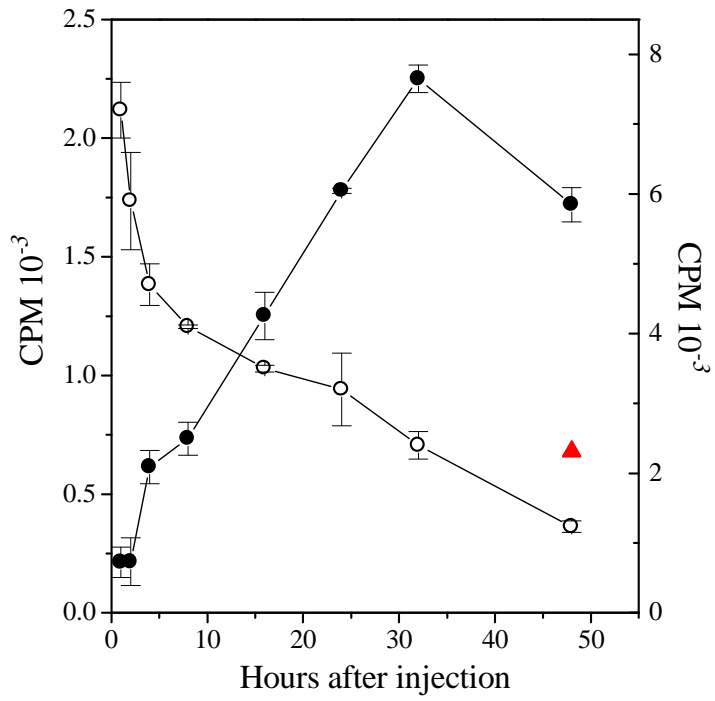
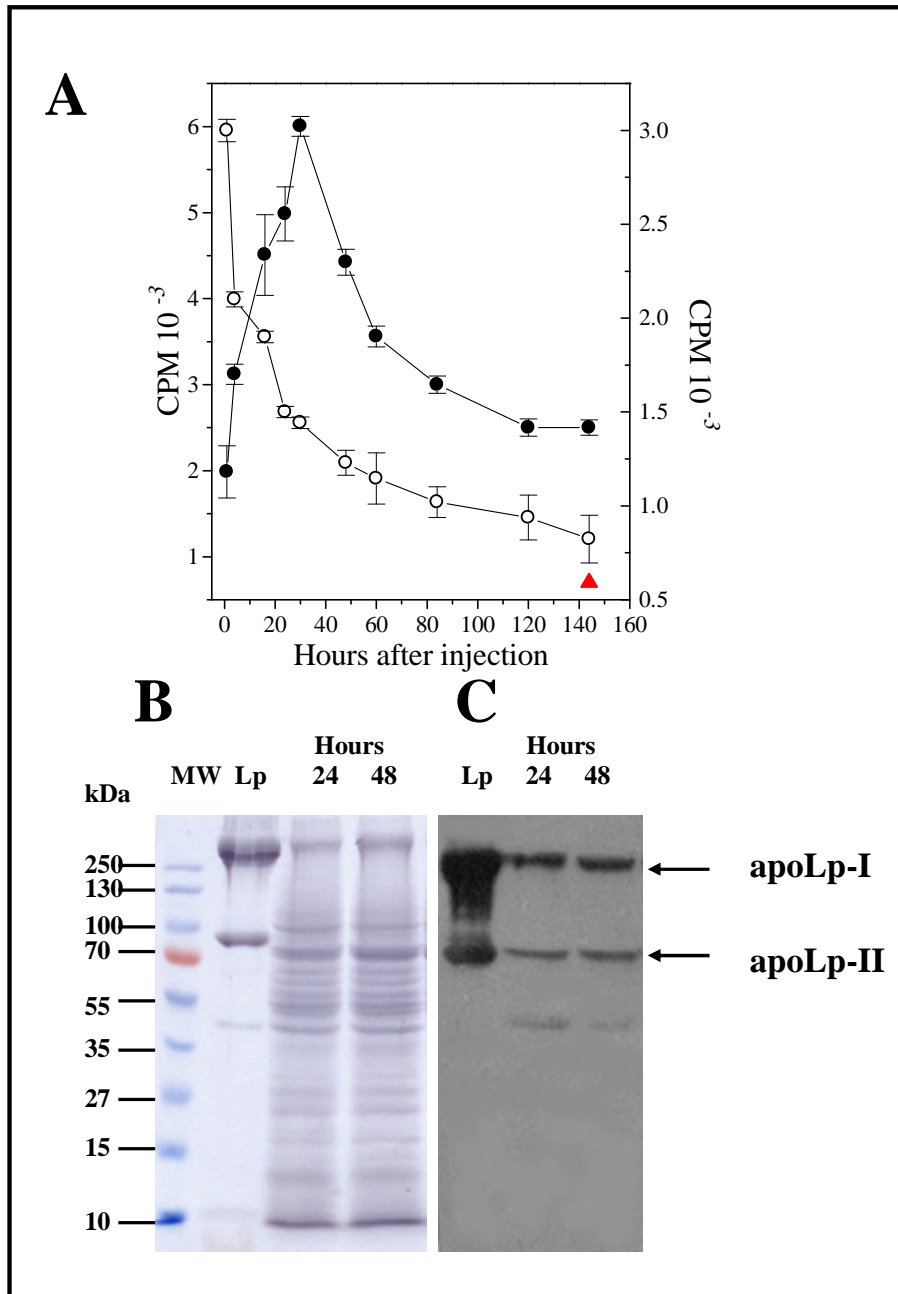


Figure 2

Oliveira et al, 2007.



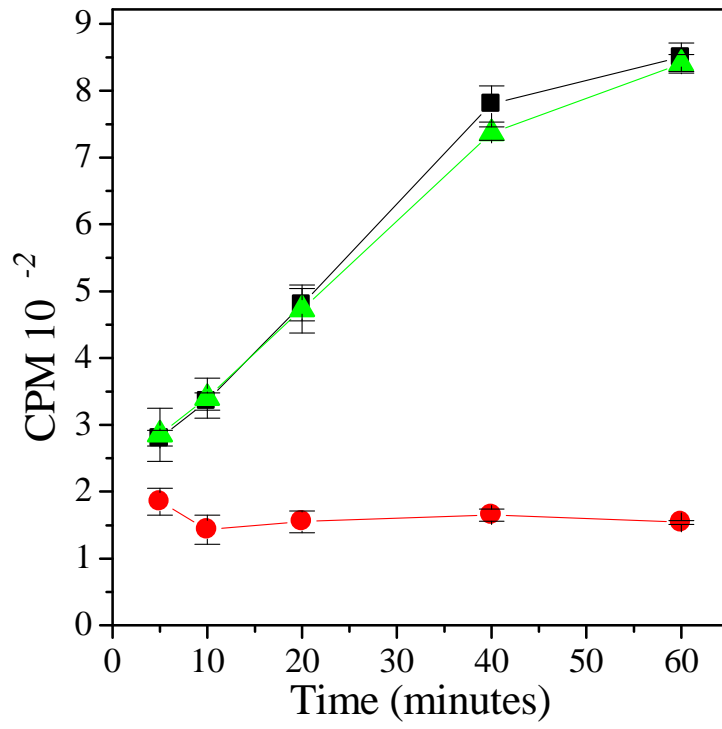


Figure 4

Oliveira et al, 2007.

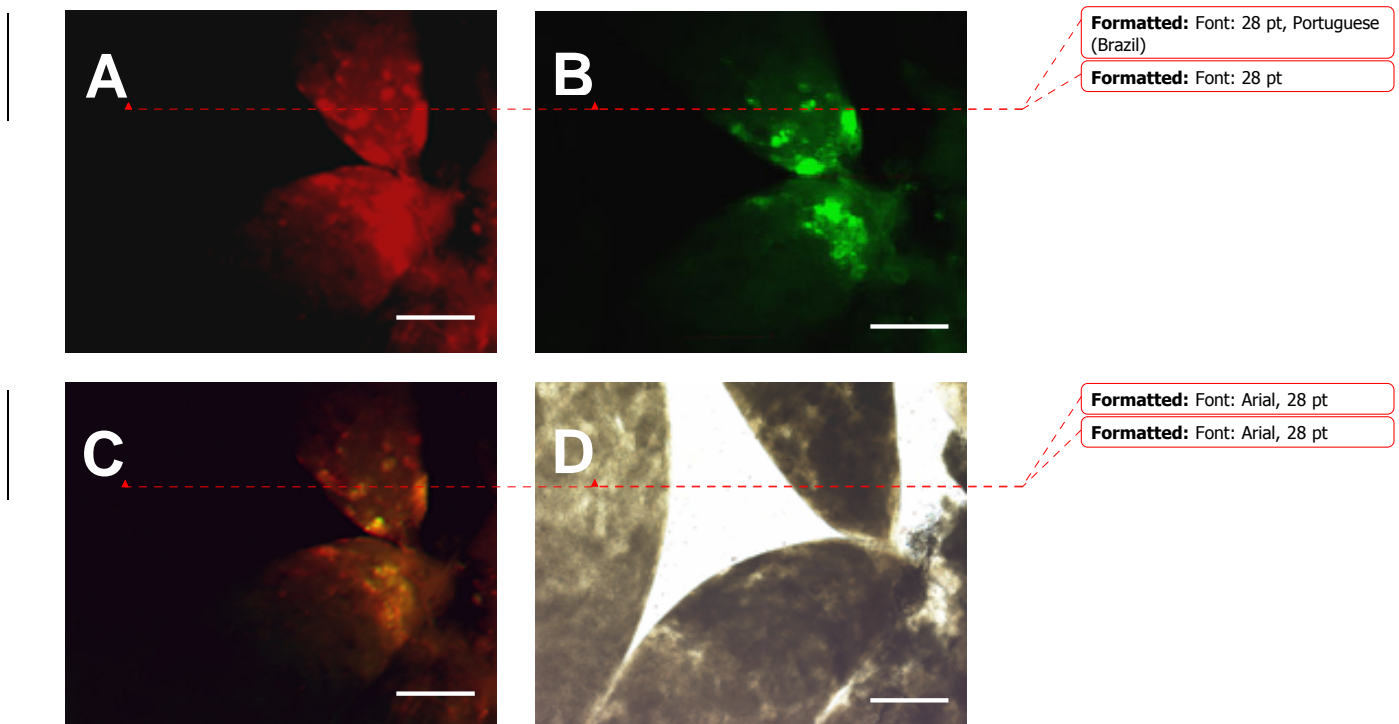


Figure 5

Oliveira et al, 2007.

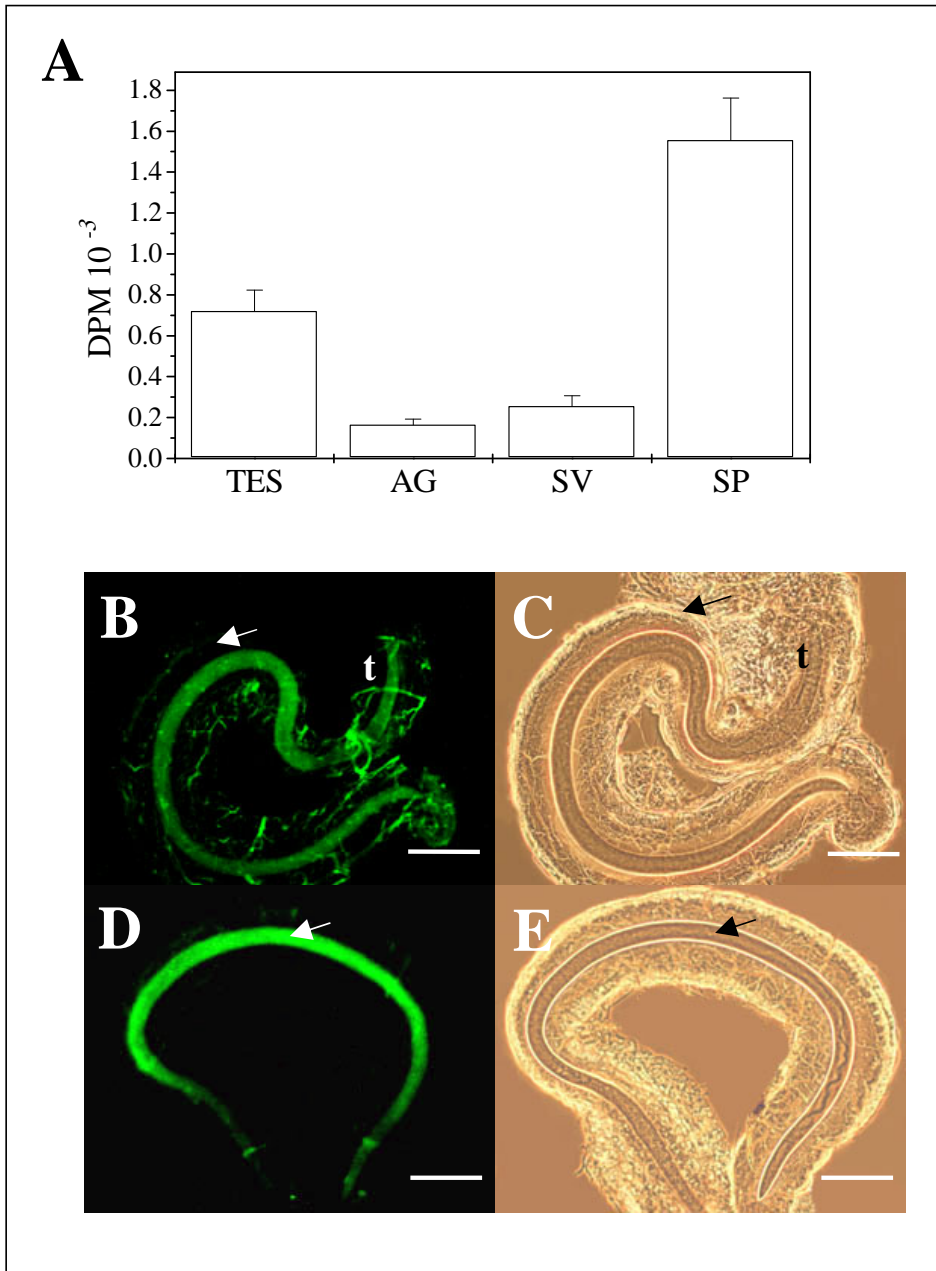


Figure 6

Oliveira et al, 2007.

8. Figure captions

Fig.1. (A) Uptake of radiolabeled lipids by different organs. ^{32}P -Lp was injected into adult males on second day after meal. After 24 hours, the organs were dissected, homogenized and radioactivity measured by scintillation counting. Results are the average of three different experiments. (B) Lipid uptake by testes at different days after feeding. ^{32}P -Lp was injected into adult males during days after blood meal. On each day, testes were dissected, washed, and homogenized. The incorporated radioactivity was measured by scintillation counting. Data represents the mean \pm SEM of three independent experiments.

Fig.2. Kinetics of lipid uptake by testes at 28°C. On the second day after feeding, ^{32}P -Lp was injected into adult males. After different times, testes were dissected (●) and hemolymph collected (○). The associated radioactivity was estimated by scintillation counting. A parallel experiment was conducted at 4°C to determine the basal levels of Lp binding to the tissue (▲). The vertical bars represent S.E. for 3 determinations.

Fig.3. Incorporation of Lp by testes. (A) Kinetics of Lp uptake by testes at 28°C. At different times after injection of ^{125}I -Lp into males, testes were dissected (●) and hemolymph collected (○). The associated radioactivity was estimated by scintillation counting. A parallel experiment was conducted at 4°C to determine the basal levels of Lp binding to the tissue (▲). The vertical bars represent S.E. for three determinations. (B) SDS-PAGE and (C) Western blotting detection of Lp in testes. Twenty-four and forty-eight hours after injection of Lp into males, the testes were dissected and homogenized in a mixture of protease inhibitors described under Materials and Methods. Total proteins from testes homogenates were separated by SDS-PAGE. The gel was blot-transferred to a nitrocellulose membrane and

reacted with an anti-Lp polyclonal antibody. Panel A and B: lane 1: molecular weight standard; lane 2 and 3: 24 and 48 hours after Lp injection.

Fig.4. Lp binding at testes tissue at 4°C. Non-radioactive testes were incubated with ³²P-Lp without any competitor (■), in the presence of unlabelled Lp (▲), or BSA (●). After incubation, testes were washed in physiological saline for 30 minutes at 28°C and homogenized as described under Materials and Methods. The radioactivity of each organ was determined using a scintillation counter. The vertical bars represents S.E. for three independent experiments.

Fig.5. Localization of FITC labeled -Lp and phosphatidylethanolamine in testes. Double fluorescently labeled-Lp was injected into adult males on the second day after blood meal. After 24 hours, testes were dissected and fluorescence analyzed by epifluorescence microscopy. More experimental details are described under Materials and Methods. Scale bar, 100 μm. (A) Localization of Texas Red-PE in *R. prolixus* testis. (B) Localization of FITC labeled-Lp in testis. (C) Merged image of A and B shows similar localization of FITC labeled-Lp and Texas Red-PE. (D) Phase-contrast image of the testis shown in A and B.

Fig.6. (A) Transfer of ³H-lipids during mating. ³H-Lp was injected into males on the second day after blood meal. The injected males were paired with females for 4 days. After that, the organs were dissected and the radioactivity determined as described under Materials and Methods. The vertical bars represent S.E. for 3 determinations. AG: accessory glands; SP: spermatheca; SV: seminal vesicles; TES: testes. (B-E) Localization of fluorescently labeled

fatty acid (B) and phosphatidylcholine (D) in female spermatheca. Fluorescent-labeled Lp with BODIPY-FA or BODIPY-PC was injected into adult males. These males were placed into single vials with non-injected females for 24 hours. After that, the testes and spermatheca were dissected and the fluorescence analyzed by epifluorescence microscopy. More experimental details were described under Materials and Methods. Tracheae are indicated with **t** (B,C). Black and white arrows indicate spermatheca internal channels. Scale bar, 50 μm . (B) Localization of BODIPY-FA in *R. prolixus* spermatheca. (C) Phase-contrast image of B. (D) Localization of BODIPY-PC in spermatheca. (E) Phase-contrast image of the testis shown in D.

9. Tables

Table 1

Incorporation of lipids from Lp into spermatozoa fraction by *Rhodnius prolixus* testes.

³H-Lp was injected into adult males (n=10) on the second day after blood meal. After 24 hours, the testes were dissected, gently homogenized, and the spermatozoa and seminal fluid fractions separated as described under Materials and Methods. The radioactivity associated with each fraction was determined using scintillation counting and described as percentage. The S.E. values were calculated from three individual experiments (indicated under parentheses). CHOEs: esterified cholesterol; DAG: diacylglycerol; FFA: free fatty acids; ND: non-determined; PL: phospholipids; TAG: triacylglycerol.

LIPID INCORPORATION	PERCENTAGE OF ASSOCIATED RADIOACTIVITY (%)	PERCENTAGE OF EACH LIPID CLASS (%)	
Testes-total homogenate	100 (20% ± 2.0 from initial injected ³ H-Lp)	PL	29 ± 1.5
		DAG	19 ± 1
		FFA	11 ± 1
		TAG	20 ± 0.4
		CHOEs	9.5 ± 0.5
		ND	11.5 ± 1.5
Spermatozoa fraction	18.8 ± 3.5	PL	54 ± 9.1
		DAG	8,4 ± 1.6
		FFA	18.6 ± 3.2
		TAG	14.6 ± 2.7
		CHOEs	4.4 ± 0.9
		ND	
Seminal fluid fraction	6.5 ± 1.3	PL	28.8 ± 5.4
		DAG	20 ± 3.9
		FFA	15.4 ± 3.1
		TAG	22.2 ± 4.4
		CHOEs	13.6 ± 2.6
		ND	

7.3 *Curriculum vitae*

Giselle de Almeida Oliveira
2007

DADOS PESSOAIS

- Nome: Giselle de Almeida Oliveira
- Filiação: Mauro Silva de Oliveira e Jurema Lopes de Almeida Oliveira
- Data de Nascimento: 18/08/1979
- Nacionalidade: Brasileira
- Naturalidade: Rio de Janeiro - RJ
- Endereço: Rua Viseu 245/02, Rocha - RJ, CEP 20975-040
- Telefone: (021) 2501-5574 – 3277-4774
- Identidade: 11875576-8 IFP
- CPF: 085518867-70
- e-mail: gjal@bioqmed.ufrj.br
gdealmeidaoliveira@gmail.com

FORMAÇÃO

- Graduação: 1998-2001. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia. Ciências Biológicas, Modalidade Licenciatura.
- Pós-graduação: 2002-2003. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Bioquímica Médica. Grau de Mestre em Química Biológica.
- Pós-graduação: 2003-2007 (previsão de conclusão). Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Bioquímica Médica. Grau de Doutor em Química Biológica.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- Zigman Brener Award – Melhor Poster na Sessão Biologia de Vetores entre 62 trabalhos.

ESTÁGIOS NO PAÍS

- Iniciação Científica - Laboratório de Bioquímica de Insetos/ICB/CCS – Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação de Geórgia Corrêa Atella. Agosto/1999 - Dezembro/2001.

ESTÁGIOS NO EXTERIOR

- Pós-graduação: Projeto de doutorando em Bioquímica e Fisiologia Laboratório de Fisiologia Bioquímica/ Faculteit Biologie - Universiteit Utrecht/Holanda, sob a orientação do Dr. Kees Rodenburg e Prof. Dick van der Horst. Novembro/2005 – Junho/2006.

EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

- Ensino Médio

Monitora do Curso de Férias intitulado “O inseto por dentro” ministrado para alunos e professores de 2^o Grau no Instituto de Bioquímica Médica/ICB/CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Janeiro – Fevereiro/2000.

Licencianda de Ciências Biológicas no Colégio Pedro II Unidade Centro (330 horas). 2001.

- Graduação

Professora na disciplina BMQ – 140: Bioquímica M1, Bloco III – Metabolismo de lipídios e aminoácidos; ministrada para alunos do 1^o período do curso de medicina junto com os professores Débora Foguel e Marcos Sorgine pelo Instituto de Bioquímica Médica/ICB/CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Novembro – Dezembro/2002.

Professora na disciplina BMQ – 140: Bioquímica M1, Bloco IV – Integração metabólica; ministrada para alunos do 1^o período do curso de medicina junto com os professores Andréia da Poian e Marcos Sorgine pelo Instituto de Bioquímica Médica/ICB/CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Outubro - Novembro/2004.

Professora na disciplina PCI-Endócrino, Bloco Bioquímica – Hormônios; ministrada para alunos do 3^o período do curso de medicina junto com a professora Geórgia Correa Atella pelo Instituto de Bioquímica Médica/ICB/CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Maio – Junho/2005.

BOLSAS CONCEDIDAS

- Iniciação Científica: CNPq. Agosto/1999 – Julho/2001
- Iniciação Científica: CNPq. Agosto/2001 – Março/2002.
- Mestrado: CNPq. Abril/ 2002 – Março/2003.
- Doutorado: CNPq. Abril/2003 até o presente momento.
- Doutorado PDEE: Capes. Novembro/2005 – Junho/2006.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS

“Lipid metabolism during *Aedes aegypti* development.” Araujo, A., Oliveira, G.A. Atella, G.C. XXXIII Encontro Anual em Pesquisa Básica da Doença de Chagas e XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2006.

“LDL receptor family member-mediated lipophorin uptake in testis of *Locusta migratoria*”. Oliveira, G.A., Atella, G.C., Van der Horst, D.J., Rodenburg, K.W. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

“The bioactive molecules from *Belostoma anurum* saliva.” Vargas, C.S., Oliveira, G.A., Souza, A.S., Targino, M.R., Monteiro, R.Q., Pereira, M.H., Melo, A.L., Tavares do Carmo, M.G., Atella, G.C. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.

“Lipid metabolism in *Aedes aegypti*.” Batista, E.S., Oliveira, G.A., Atella, G.C. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.

“Analysis of lipid composition of *Belostoma anurum* saliva.” Targino, M.R., Oliveira, G.A., Pereira, M.H., Melo, A.L., Atella, G.C. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004.

“Further investigations of lipid transfer from males to females during mating in *Rhodnius prolixus*”. Oliveira, G.A.; Atella, G.C. XXX Encontro Anual em Pesquisa Básica da Doença de Chagas e XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2003.

“Flight activity decreases lipid transfer during mating in *Rhodnius prolixus*”. Oliveira, G.A.; Atella, G.C. VII Encontro Arthomint, 2003.

“Flight activity decreases lipid transfer during mating in *Rhodnius prolixus*”. Oliveira, G.A.; Atella, G.C. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003.

TRABALHOS ORIGINAIS

“Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism”. **Giselle A. Oliveira**, Daniela L. Baptista, Horacio Guimarães-Motta, Igor C. Almeida, Hatisaburo Masuda and Geórgia C. Atella. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2006 Aug;62(4):164-75.

“Lipophorin uptake by testes as a lipid source to male semen.” **Giselle A. Oliveira**, Miranda C. Van Heusden and Geórgia C. Atella. Submetido a Insect Biochemistry and Physiology.

“Exogenous heparin exerts an inhibitory effect over oviposition and oogenesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*”. Costa-Filho, A., Martins, R.C., Santos, A.V.F., Souza, M.L.S., Dellias, J.M.M., **Oliveira, G.A.**, Atella, G.C., Silva, L.F. Submetido.

“A novel lipophorin from the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): characterization and role in lipid transport to developing oocyte.” Aline dos Anjos Ximenes; **Giselle A. Oliveira**; Daniella B. Leite; Paula Cunha; Evelize Folly; Daniel M. Golodne and Georgia C. Atella. Submetido.

CURRICULUM VITAE

Nome: Giselle de Almeida Oliveira

Nascimento: 18/08/1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

Faculdade de Biologia - Modalidade Licenciatura pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, outubro de 1998 a dezembro de 2001.

Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Comunicações em Congresso

- 14 comunicações em congressos nacionais
- 3 comunicações em congressos internacionais

Publicações:

Oliveira, G.A., Baptista, D.L., Guimarães-Motta, H., Almeida, I.C., Masuda, H., Atella, G.C. (2006). Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62(4): 164-175.

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](#)