

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOQUÍMICA)

THAÍS DUARTE BIFANO
TESE DE DOUTORADO

“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS*
***PERUVIANUS* (HEMIPTERA)”**

São Paulo
28/08/2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

THAÍS DUARTE BIFANO

**“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS*
PERUVIANUS (HEMIPTERA)”**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo
2008

THAÍS DUARTE BIFANO

**“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS PERUVIANUS*
(HEMIPTERA)”**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

***Aos meus pais Fátima e Adilson ao meu irmão
Gustavo e a amiga Érica por todo amor e apoio.***

AGRADECIMENTOS

Antes mesmo de entrar no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Química da USP, o professor Walter Ribeiro Terra me recebeu e me apoiou na decisão de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Isto nunca será esquecido, muito menos em vão. Toda a sua dedicação ao ensino e a pesquisa me faz cada vez mais querer ser um pouco do que ele é para os seus alunos e para o meio acadêmico. Minha gratidão é eterna e verdadeira! Da mesma forma, fui acolhida pela professora Clélia Ferreira Terra, que além das muitas dicas e idéias para o meu projeto, melhorando e aperfeiçoando as minhas idéias e técnicas, sempre se fez muito presente no meu enriquecimento cultural. Duas pessoas muito especiais que serão para sempre lembradas com muito carinho.

Minha eterna gratidão àquele que foi o meu primeiro e eterno mentor, professor Carlos Peres Silva, presente sempre na minha vida, como um grande amigo e como parceiro de discussões e trocas de idéias.

Agradeço aos meus familiares e principalmente a minha mãe Maria de Fátima Duarte Cataldi Bifano ao meu pai Adilson Cataldi Bifano e ao meu irmão Gustavo Cataldi Bifano que mesmo sofrendo com a minha constante ausência física, sempre me incentivaram e compreenderam a importância desta jornada solitária.

Companheira para todos os momentos e situações, amiga para vida toda, Érica Moreira de Oliveira, define tudo que eu sou e que eu quero ainda ser um dia. Pessoa correta, justa e acima de tudo lutadora e vencedora, te amo!

Minha cachorra Mel, mesmo não sendo uma pessoa de verdade para muitos, pra mim você é e significa paz, tranquilidade, amor e cumplicidade nos momentos mais difíceis. Não sei o que seria do meu doutorado sem o seu apoio diário e incondicional.

A Ana Gomez, John e Daniel, grandes amigos, vizinhos e companheiros meu agradecimento por estar sempre aprendendo a lidar com diferenças que só enriquecem a nossa vida.

A Patrícia Pessoa e ao Chico Schoenmaker, agradeço pela amizade e apoio.

Aos companheiros de instituto que se fizeram presente no decorrer do meu doutorado: Fabiane Cançado, pelas conversas sérias e outras descontraídas; Luci

Deise Navarro, sempre me recebendo e me ajudando com os sequenciamentos de DNA; Milton Nishiyama Junior, me salvando da selva que foi por algum tempo pra mim, a bioinformática; além de todos dos laboratórios de Regulação da Expressão Gênica em Microorganismos, Bioquímica Molecular de Microorganismos, Bases Moleculares das Propriedades Catalíticas das Enzimas e Laboratório de Transdução de Sinal.

As Técnicas do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Luiza Nakabayashi, M^a Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso, a ajuda e dedicação de vocês serão pra sempre lembrada com muito carinho! A aluna Daniela Beton, e Dra. Maria Cícera Pereira da Silva, agradeço pela constante ajuda na biologia molecular, tanto na confecção de protocolos quanto na discussão de resultados. A amiga, Nathália Ramalho, obrigada pela presença na minha vida. Aos colegas Marcelo Padilha, Lucas, Alexandra Drumont, Ivan Bragatto, Fábio Tamaki, Bruno Lira, Fábio Mendes, Pedro Galvão, André Pimentel, Flávia Bartolleti, Walciane da Silva, Dr. Fernando Genta, eu agradeço pela ajuda e pela paciência comigo!

Augusto Crivellari e Thiago Alegria, alunos dedicados que tiveram grande importância no meu crescimento profissional, agradeço por cada momento e cada discussão de resultados e desenho de protocolo.

A Dra. Adriana Rios Lopes, primeira pessoa que me ajudou a dar os passos iniciais no Laboratório de Bioquímica de Insetos. Sua ajuda foi essencial para o meu projeto. Minha admiração e reconhecimento eternos.

As agências que financiaram o meu projeto, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, e Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, sou grata pelo apoio financeiro e por acreditarem na minha competência.

RESUMO

(Bifano, T.D.), Fisiologia Molecular Intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). 2008. 173 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A partir da identificação de catepsinas L em ensaios *in vitro* e em zimogramas partimos para purificação desta enzima no inseto. A região V2 foi selecionada como fonte de obtenção da cisteína proteinase já que dentre os três ventrículos o segundo apresentou maior atividade específica. Após diversas tentativas de isolar esta proteinase, foi estabelecida uma marcha de purificação que envolvia em todas as etapas a participação de metil metanosulfonato (MMTS), o que inativa a proteinase evitando assim autólise ao longo do processo de purificação. A marcha consistiu de três passos cromatográficos (troca-iônica, filtração em gel e afinidade, nesta ordem) onde foi observada a presença de duas cisteína proteinases, cada uma apresentando respectivamente as seguintes massas moleculares 32 e 45 kDa (SDS-PAGE). As duas cisteína proteinases possuem o mesmo pH ótimo igual a 6,3. Além disso, estas enzimas foram termicamente inativadas a 40 °C segundo uma cinética de primeira ordem aparente, sugerindo a existência de apenas uma espécie molecular de cada enzima na preparação com meia vida de 5 minutos para cis 1 e 4,8 minutos para cis 2. Foi determinada a constante de dissociação entre enzima-inibidor, onde foi observado os valores de 17,3 nM para cis 1 e 7,11 nM para cis 2 através da titulação por E-64. A eficiência de catálise cis 1 e cis 2 é maior para o substrato sintético Z-FR-MCA do que para Z-RR-MCA, indicando que tratava-se de catepsinas L.

Com o intuito de descrever os mecanismos moleculares por trás dos fenômenos fisiológicos no intestino médio do Hemiptera *Dysdercus peruvianus* foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA deste tecido. Utilizamos ESTs provenientes desta biblioteca com o objetivo de identificar genes transcritos relacionados com proteínas de transporte de glicose além de enzimas digestivas. Após o processamento das leituras, surgiram 1053 ESTs úteis. Montando estes ESTs por alinhamento de bases, foram produzidos 62 contíguos e 841 singletos, o que totaliza 903 seqüências únicas. Entre as seqüências homólogas encontradas as mais relevantes para o nosso estudo foram: β -glicosidase (marcadora de membranas microvilares), α -glicosidase (marcadora de membranas

perimicrovilares), aminopeptidase (espaço perimicrovilar), catepsina L (conteúdo de vesículas secretoras) e proteína transportadora de açúcar do tipo GLUT. Estas seqüências encontradas tiveram a sua transcrição específica (ou preferencial) averiguada por RT-PCR semiquantitativo nos diferentes tecidos do inseto estudado (intestino médio, túbulo de Malpighi, corpo gorduroso, glândula salivar, ventrículo 1, ventrículo 2 e ventrículo 3 do intestino médio).

O transporte de glicose e água *in vivo* foi estudado. Para isso, os insetos foram alimentados com uma solução contendo glicose e corante não absorvível seguido de dissecação e análise do conteúdo luminal. O transporte de água e glicose foi inibido por floretina 0,2 mM (inibidor do uniportador GLUT) e por florizina 0,1 mM (inibidor do simportador SGLT) e ativado por K₂SO₄ 50 mM. Isto sugere a presença do transportador do tipo uniportador (GLUT), e do simportador K⁺-glicose (SGLT), ambos co-transportando água. O transcriptoma revelou proteína homóloga a transportador GLUT cuja seqüência está parcialmente completa e foi analisada com ferramentas de bioinformática.

Palavras-chave: *Dysercus peruvianus*, Hemiptera, transcriptoma, catepsina L, GLUT, SGLT.

ABSTRACT

(Bifano, T.D.), Intestinal molecular physiology of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). 2008. 173 pages. PhD Thesis – Graduate Programme in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

After identification of cathepsins L *in vitro* assays and in zymograms we began to purify this enzyme in insect midgut. The region V2 was selected as a source of material for purifying a cysteine proteinase because it contains most of the activity of that proteinase. After several attempts to purify this proteinase, an effective process was developed that avoid autolysis with methyl methanethiosulfonate (MMTS), a sulfhydryl-reactive and reversible sulfonating reagent for thiol-containing molecules. The purify process was made by three chromatographic steps (anion-exchange column, gel filtration column and affinity column in this order), where two cysteine proteinase were purified, cys 1 and cys 2 with 32 and 45 kDa (SDS-PAGE). The two cysteine proteinases have the same pH optimum of 6.3. Besides that, these enzymes were thermically inactivated following apparent first-order kinetics with a half-life of 5 min (cys1) and 4.8 min (cys2) at 40 °C. Both Cys are inhibited by E-64 with a K_D of 17.3 nM (Cys 1) and 7.11 nM (Cys2). Both Cys are more active on Z-FR-MCA than on Z-RR-MCA, suggesting they are cathepsins-L.

With purpose of describe the molecular mechanisms underlying physiological phenomena in midgut of the Hemiptera *Dysdercus peruvianus* a cDNA library was prepared from midgut mRNA. We used ESTs from this library to identify transcripts genes related with glucose transport proteins besides digestive enzymes. Analysis of 1053 high-quality expressed sequence tags (ESTs) yielded 903 unique sequences comprised of 62 contigs and 841 singlets. Among the homologous sequences found the following are more relevant to our aim: β -glucosidase (microvillar membrane marker), α -glucosidase (perimicrovillar membrane marker), aminopeptidase (perimicrovillar space marker), cathepsin L (vesicles content) and sugar transporter protein, GLUT. These sequences had its specific transcription (or preferential) verified by semi-quantitative RT-PCR on different insect tissues (malpighian tubules, salivary gland, fat body, midgut, midgut first ventriculus, second ventriculus and third ventriculus).

The glucose and water absorption across the first ventriculus of the midgut of the Hemiptera *Dysdercus peruvianus* were determined. The insects were fed with a

glucose-non-absorbable dye solution, followed by periodical dissection of insects and analysis of ventriculus contents. The transport of water and glucose can be inhibited by 0.2 mM phloretin (GLUT inhibitor) and by 0.1 mM phlorizin (SGLT inhibitor) and is activated by 50 mM K_2SO_4 . The results suggest that *D. peruvianus* has a transporter uniporter like (GLUT) and K^+ -glucose symporter like SGLT, both co-transporting water. The transcriptome showed a GLUT homologous protein which sequence is almost complete and was analyzed by bioinformatics tools.

Keywords: *Dysercus peruvianus*, Hemiptera, transcriptome, cathepsin L, GLUT, SGLT.

LISTA DE ABREVIACOES

μM	Micromolar
ABS	Absorbncia
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	“Basic Local Aligment Search”
cDNA	ácido desoxirribonuclico complementar
Cis	Cisteina proteinase
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfxido
DNA	cido desoxirribonuclico
DpCaL	Catepsina L de <i>Dysdercus peruvianus</i>
DpGLUT	Transportador facilitativo de glicose de <i>Dysdercus peruvianus</i>
E-64	Trans-epoxisucinil-L-leucil-amino (4-guanidino) butano
EDTA	cido etilenodiaminotetraactico de sdio
EST	“Expressed sequence tags”
FPLC	“Fast Protein Liquid Chromatography”
GLUT	Transportador facilitativo de glicose
IPTG	Isopropiltiol- β -D-galactopiranosídeo
k_{cat}	Constante catalítica
K_D	Constante de dissociao
kDa	Quilodaltons
K_i	Constante de inibio
K_m	Constante de Michaelis
LB	Meio de cultura de Luria-Bertani
m/v	Massa/volume
MES	cido 2-(N-Morfolino) etanoesulfnico
MMTS	Metilmetanosulfonato
MOPS	cido morfolinopropano sulfnico
MPM	Membrana perimicrovilar
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
mU	miliunidades
NPβGlu	Para nitrofenil beta D glicopiranosídeo
p/v	Peso/volume

pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pfu	Unidades formadoras de placa
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase precedida de transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SGLT	Co-transportador glicose-sódio
TAE	Tampão tris acetato EDTA
Tris	Tris (hidroximetil)-amino metano
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
V1	Ventrículo 1
V2	Ventrículo 2
V3	Ventrículo 3
V4	Ventrículo 4
V_{max}	Velocidade máxima
X-gal	5-bromo-4-cloro-3indol beta D-galactopiranosideo
Z-FR-MCA	Carboxibenzoil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metil-coumarina
Z-RR-MCA	Carboxibenzoil-arginil-arginil-7-amino-4-metil-coumarina

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Dentre os numerosos filões que constituem o Reino Animal, o filo Arthropoda se destaca dos demais, devido à diversidade de formas de vida, correspondendo a 83% do reino animal, agrupados em diversas classes que estão distribuídas em cinco subfilos (Trilobitomorpha, Chelicerata, Myriapoda, Hexapoda e Crustacea) (Gallo, 1978). Dentre elas, a classe Insecta que faz parte do subfilo Hexapoda é considerada a maior e a mais bem sucedida de todo filo Arthropoda, representando 73% dos invertebrados e 83% dos artrópodes (Maranhão, 1977).

O subfilo Hexapoda compreende fundamentalmente artrópodes terrestres, grupos que hoje habitam ambientes aquáticos invadiram secundariamente tais habitats através de adaptações comportamentais e modificações em seus sistemas para trocas gasosas com o ar. Os primeiros registros indiscutíveis de fósseis de hexápodes são criaturas sem asas do Devoniano inferior (390 milhões de anos atrás) que lembram os colêmbolos modernos (Collembola) e as traças-saltadoras (Archaeognatha), os primeiros insetos fósseis com asas apareceram mais tarde no Devoniano. No entanto, existem rastros fósseis que se parecem muito com os dos hexápodes, e o relógio molecular sugere uma origem dos insetos do início do Siluriano.

A mais espetacular irradiação evolutiva dos Hexapoda ocorreu, sem dúvida, entre insetos, os quais habitam quase todos os habitats concebíveis no meio terrestre e na água doce e, de forma menos comum, até na superfície dos oceanos e regiões litorâneas marinhas. Insetos também são encontrados em locais muito improváveis, tais como poços e lagoas salgadas. Frequentemente vivem onde pouco dos demais animais ou plantas conseguem existir. Não é exagero dizer que os insetos governam a terra. Sua diversidade e abundância desafiam a imaginação.

Não sabemos quantas espécies de insetos existem, nem mesmo quantas foram descritas. Estimativas publicadas do número de espécies descritas variam de 890.000 até mais de um milhão. Uma média de aproximadamente 3.500 novas espécies tem sido descrita anualmente, de Lineu, em 1758, embora, nas últimas décadas, essa média tenha subido para 7.000 novas espécies por ano. As estimativas do número de espécies que ainda deverão ser descritas variam de 3 milhões a 100 milhões.

A rica diversidade dos insetos parece ter surgido através da combinação de características vantajosas, incluindo a exploração evolutiva dos genes de desenvolvimento trabalhando sobre corpos segmentados e compartimentalizados, a coevolução com as plantas (particularmente plantas com flores), a miniaturização, e a invenção do voo.

Em 1920, Brues apud Panizzi e Parra (1991) publicou um estudo sobre a seleção de plantas hospedeiras por parte de insetos, especialmente lepidópteros e concluiu que, salvo algumas exceções, estes insetos demonstravam acentuada preferência em selecionar plantas de famílias ou gêneros e sugeriu a idéia de uma evolução paralela sendo mais tarde definido como uma evolução adaptativa paralela recíproca que determinava os padrões de uso da planta hospedeira pelos insetos.

Aproximadamente metade das espécies de insetos se alimenta de plantas, entretanto, possivelmente nenhuma espécie de planta em seu meio ambiente é atacada por todas as espécies de insetos e não é comum que um inseto, em seus limites geográficos, se alimente indiscriminadamente de todas as plantas (Thorsteinson, 1960 apud Panizzi e Parra, 1991). Simples observações demonstram que os insetos vivem associados com certas espécies ou partes de plantas (Dethier, 1976 apud Panizzi e Parra, 1991).

A interação entre insetos e plantas levou ao longo da evolução ao desenvolvimento de mecanismos de defesa contra o ataque de pragas (Gatehouse *et al.*, 1990). Estudos têm revelado que as plantas defendem-se de insetos e patógenos produzindo substâncias químicas que os repelem ou intoxicam (Maug, 1982). Entre esses compostos existem proteínas capazes de inibir as enzimas digestivas dos insetos e cujas concentrações nas plantas podem variar em resposta ao ataque pelas pragas. O conhecimento da distribuição das enzimas no tubo digestivo dos insetos permitirá inferir a facilidade de acesso do inibidor às diferentes enzimas. Isso poderá orientar a seleção de variedades de plantas economicamente interessantes capazes de produzir inibidores das enzimas mais acessíveis e eficazes, tornando-as mais resistente às pragas.

Embora a utilização de genes que levam a expressão de proteínas potencialmente tóxicas estarem sendo estudadas e muitas delas já terem sido inseridas em plantas de interesse econômico tornando-as resistentes a insetos-praga (Vaeck *et al.*, 1987; Hilder *et al.*, 1987), uma desvantagem dessa tecnologia são os altos níveis da proteína normalmente requeridos para afetar o inseto (Brunke

e Meeusen, 1991). Um maior conhecimento das enzimas digestivas dos insetos poderia levar ao desenvolvimento de inibidores específicos dessas enzimas que poderiam ser usados como uma nova geração de praguicidas.

Os insetos também são excelentes modelos de estudo do sistema digestivo devido a grande adaptação em relação a dietas e habitat e também pelo seu intestino ser uma das principais interfaces entre o inseto e o meio ambiente (Terra e Ferreira, 2005).

Entretanto, o conhecimento sobre a organização do processo digestivo dos insetos ainda não foi completamente elucidado (Terra e Ferreira, 2005). Entende-se nesse contexto, a necessidade do desenvolvimento de estudos esclarecedores, uma vez que a tecnologia de transferência de genes entre diferentes organismos já se encontra bem avançada, porém, o conhecimento de alvos a serem explorados ainda é reduzido.

1.2 - PERDAS AGRÍCOLAS CAUSADAS PELOS INSETOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO ALGODÃO

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das mais tradicionais do Brasil e tem dado sinais de forte avanço nos últimos anos. A sua cadeia produtiva gera riquezas superiores a 25 bilhões de dólares anualmente, representando cerca de 4% do PIB nacional e mais de 13,5% do PIB industrial (Têxtil, 2004).

O setor têxtil é um dos maiores empregadores do Brasil, com 1.650 milhões de postos de trabalho, apesar da forte modernização tecnológica que se vem observando desde a abertura da economia, no início da década de 1990 (Anuário Brasileiro do Algodão, 2006).

No ano de 2005, o setor têxtil exportou 2,2 bilhões de dólares, um recorde histórico, valor 5,89% superior ao do ano anterior (Anuário Brasileiro do Algodão, 2006). A expectativa da Associação Brasileira da Indústria Têxtil (ABIT) é que o setor têxtil, como um todo, atinja o valor de vendas externas de 4,0 bilhões de dólares, em 2008.

No campo, os sinais de avanço são consideráveis. Apesar da redução da área plantada na safra 2005/2006, o país tem colhido produções históricas: 1.309,4 milhões de toneladas de pluma na safra 2003/2004, 1.298,7 na safra 2004/2005 e 1.046,5 na safra 2005/2006, cultivando mais de 1 milhão de hectares com a cultura do algodão (CONAB, 2006).

Além dos fatores tecnológicos, o bom desempenho da cultura do algodão nos últimos anos deveu-se à melhoria do preço e ao aumento das exportações. O Brasil está no terceiro ano de exportações com quantidade significativa de algodão em pluma para o mercado externo, principalmente China e Europa. Em 2002, foram exportadas 110 mil toneladas; no ano de 2003, foram 175 mil; em 2004, os agricultores fecharam contratos para venda de 331 mil toneladas; e, em 2005, as exportações alcançaram 391 mil toneladas. Essa garantia de mercado foi o fator determinante para o aumento da produção, via expansão da área colhida e incrementos no rendimento médio da cultura, principalmente nos estados de Mato Grosso, Goiás e Bahia, que respondem por, aproximadamente, 71% da área colhida e 80% da produção nacional.

Ressalta-se ainda que a cultura do algodão modificou radicalmente a oferta de emprego na agricultura dos cerrados brasileiros, onde, praticamente, emprega-se o ano inteiro. O algodão exige uma estrutura complexa, por isso requer um contingente maior de pessoas trabalhando. Estima-se que, somente nos estados do Mato Grosso, Goiás e Bahia, na safra 2004/2005, foram gerados 89 mil empregos diretos e 267 mil indiretos.

Trata-se de uma cultura de alta rentabilidade e de imensas possibilidades para o Brasil, tanto para o cultivo de sequeiro como para o irrigado, que poderá avançar paulatinamente e levar o País a ganhar posições entre os quatro maiores produtores de fibras do mundo, hoje representados pela China, EUA, Índia e Paquistão, caso as reduções nos subsídios à produção nos Estados Unidos sejam executadas, em concomitância com o determinado pela Organização Mundial do Comércio, e a demanda mundial cresça a taxas acima dos 2,49% a.a., observadas nos últimos cinco anos. A competitividade do algodão e da cadeia têxtil brasileira está entre as melhores do mundo.

Até o início da década de 90, a produção de algodão no Brasil concentrava-se nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Após esse período, aumentou significativamente a participação do algodão produzido nas áreas de cerrado, basicamente da região Centro-Oeste. Esta região, que em 1990 cultivava apenas 123.000 ha (8,8% da área de algodão do país) passou para 479.000 ha em 2002, correspondendo a 63,0% do total da área. Os estados do Centro-Oeste, reconhecidamente produtores de algodão herbáceo, são: Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul. Outros estados brasileiros que também estão produzindo

algodão no Cerrado são: a Bahia e o Maranhão na região Nordeste, cujos sistemas de produção apresentam características semelhantes às do Centro-Oeste. Atualmente, a região Centro-Oeste responde por 74,47% do algodão produzido no Brasil. Somando-se a produção do Centro-Oeste com a da Bahia e do Maranhão, o algodão do cerrado representa mais de 80,0% da produção nacional.

É bem possível que a natureza tenha desenhado a planta de algodão especialmente para os insetos, visto que suas flores são vistosas, coloridas e grandes; além de suas folhas, às vezes também coloridas; os botões florais, as maçãs e os nectários (florais, extraflorais e intraflorais) são largos e suculentos, chegando a produzir grandes quantidades de açúcares solúveis por dia, dependendo da espécie do cultivar, do ambiente que funcionam como estimulantes para chamariz e posteriormente, colonização e recolonização de insetos fitófagos, entre eles e *Dysdercus peruvianus*, inimigos naturais e outros artrópodes (Soares, 2000).

Todavia, os insetos-praga representam um dos fatores limitantes para sua exploração. Estima-se que nos EUA, apesar de um aumento de dez vezes no uso de inseticidas de 1945 a 1988, as perdas anuais das plantações causadas por insetos aumentaram de 7 para 13%. Em todo o mundo essa perda é de cerca de 20% (Apoema, 2000). A consequência direta desses dados é o alto consumo de agroquímicos no combate aos insetos-praga, o que eleva o custo de produção, diminuindo a margem de lucro do produtor, associado aos problemas relacionados à saúde e poluição ambiental. A cultura do algodão é uma das que mais consomem agrotóxicos na lavoura, pois apesar de ocupar menos de 2,0% de área plantada mundialmente com todas as culturas, neste cultivo são gastos, anualmente, em torno de 25% de todo o inseticida utilizado pelo homem (Soares, 2000).

Meios de controle baseados na biologia dos insetos, conhecidos como meios biorracionais chamam cada vez mais atenção. Entretanto um maior desenvolvimento desse meio de controle requer um maior conhecimento dos mecanismos de defesa dos vegetais e da interação inseto-planta.

1.3 - INSETOS SUGADORES DE SEMENTES

As sementes são atacadas por uma ampla variedade de organismos que vão desde microorganismos (fungos e bactérias) até invertebrados (insetos e nematóides) e vertebrados (pássaros e mamíferos). Dentre os vários predadores das

sementes, os insetos representam um amplo e variado grupo, em muitos casos sendo um fator de grande importância na produtividade de sementes e grãos de interesse econômico causando perdas consideráveis à produção de alimentos (Panizzi e Parra, 1991).

Os insetos podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com seus hábitos alimentares em relação às sementes: os mastigadores e os sugadores. Os mastigadores são representados principalmente pelas ordens Coleoptera (Anobiidae, Chrysomelidae, Cerambycidae, Curculionidae, Scolytidae) Lepidoptera (Incurvariidae, Noctuidae, Olethreutidae, Pyralidae, Tortricidae), Hymenoptera (Agaonidae, Eurytomidae, Formicidae), Orthoptera (Tettigoniidae) e Diptera (Agromyzidae, Cecidomyidae, Tephritidae) (Janzen, 1971, 1977, 1978). Dentre os mastigadores, a subfamília Bruchidae (Chrysomelidae) é o grupo mais comum e amplamente estudado por serem importantes pragas de leguminosas (Panizzi e Parra, 1991).

Os insetos sugadores de sementes são representados, principalmente, pela ordem Hemiptera com diversas famílias, destacando a Pyrrhocoridae. A maioria dos hemípteros (percevejos) prefere se alimentar de sementes imaturas, que são mais macias e, portanto, mais fáceis de serem perfuradas. Entretanto, percevejos da família Pyrrhocoridae e Lygaeidae alimentam-se de sementes maduras (Janzen, 1978). Os Pyrrhocoridae incluem os manchadores do algodão (*Dysdercus* spp.) que são sugadores importantes de sementes de árvores das florestas decíduas na América Central (Janzen, 1971), além de importante praga nas lavouras comerciais de algodão (Freire e Santos, 1999).

D. peruvianus, assim como outros percevejos sugadores de sementes, se alimentam introduzindo seus estiletes nas sementes. Após uma ejeção de saliva na semente há sucção do que foi liquefeito (Silva e Terra, 1994). Embora alguns autores sugerem um papel para as enzimas da glândula salivar na liquefação de constituintes sólidos das sementes (revisão Miles, 1972), Saxena (1963) indeferiu esta hipótese com o argumento de que a saliva se mantém em contato com o substrato por um tempo muito curto. Segundo ele, os componentes insolúveis das sementes são rompidos e desalojados, sob a forma de partículas finas pela ação conjunta dos estiletes dos insetos e da saliva.

Na lavoura de algodão as perdas são também se dão nas fibras desse vegetal, já que o inseto mancha as flores causando prejuízos econômicos (Freire e Santos, 1999).

A composição química das sementes é bem variável, dependendo de fatores como espécie e idade da planta. Elas tendem a concentrar múltiplos nutrientes que alteram a sua porcentagem em peso seco de proteína e óleo e costumam variar de 10 a 40% para sementes de várias famílias (Panizzi e Parra, 1991). As sementes são ricas em proteínas como globulinas, albuminas, glutelinas, além de lipídeos geralmente na forma de triglicerídeos e também de carboidratos presentes principalmente em cereais, uma pequena porcentagem de açúcares além de minerais, compostos nitrogenados, vitaminas e fitohormônios (Duffus e Slaughter, 1980; Carvalho e Nakagawa, 1983).

1.4 - PROCESSO DIGESTIVO EM INSETOS

O processo digestivo nos insetos é dividido em três fases: a digestão inicial, intermediária e final. A digestão inicial consiste na diminuição do tamanho das moléculas poliméricas do alimento em moléculas oligoméricas através da ação de hidrolases, tais como: amilases, celulasas, hemicelulasas e proteinases. Estas enzimas atuam respectivamente sobre o amido, celulose, hemicelulose e proteína. Durante a digestão intermediária, os oligômeros resultantes da digestão inicial continuam sendo hidrolisados por polímeros hidrolases como amilase ou oligômeros hidrolases como aminopeptidase. Os produtos resultantes são dímeros tais como maltose, celobiose e dipeptídeos derivados. Os dímeros na digestão final são clivados em monômeros pelas dímero hidrolases, exemplificadas pela maltase, celobiase e dipeptidase (Terra e Ferreira, 2005).

O maior sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies é o intestino médio, havendo pouca ou nenhuma participação de enzimas de glândulas salivares. O intestino médio constitui um tubo simples (ventrículo) de onde podem se expandir divertículos (cecos gástricos) usualmente na sua extremidade proximal. Na maior parte dos insetos, os intestinos médios contem no seu lúmen uma membrana (também chamada de matriz) quitino protéica (membrana peritrófica) que envolve o alimento ingerido, e que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (dentro da membrana) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana).

1.5 - MEMBRANAS MICROVILARES E PERIMICROVILARES EM HEMIPTERA

Insetos da ordem Hemiptera se distinguem de todos outros insetos por possuírem uma probóscide que inclui um canal salivar assim como um canal alimentar (Goodchild, 1966). O aparelho bucal especializado dos Hemiptera é usado para sugar líquido ou alimentos liquefeitos que podem variar de seiva de plantas ou mesmo sementes a diferentes tipos de presas e hospedeiros. A adaptação de se alimentar de líquidos provindos de plantas durante todos os estágios de vida é característico da ordem Hemiptera, diferente de outros insetos que possuem aparelhos bucais para a sucção e penetração. Esta observação sugere que outras estruturas no trato intestinal devem e podem ser responsáveis pela capacidade que os Hemiptera têm de explorar um número tão variado de fontes alimentícias permitindo uma adaptação tão espetacular.

Além disso, os Hemiptera possuem células intestinais envolvidas por uma membrana extracelular, chamada membrana perimicrovilar (MPM) (Terra, 1988) o que também os faz distintos dos demais insetos. Esta estrutura foi detectada através de estudos morfológicos realizados por vários pesquisadores e possuem diferentes descrições e interpretações (Marshal e Cheung, 1974; Reger, 1971; Burgos e Gutierrez, 1976; Lane e Harrison, 1979; Andries e Torpier, 1982; Baerwald e Delcarpio, 1983; Billingsley e Downe, 1983, além de outros).

A MPM é uma estrutura lipoprotéica que se estende da base da microvilosidade intestinal até o lúmen e delimita um compartimento fechado, o espaço perimicrovilar (Terra, 1988). Este espaço está entre a membrana microvilar e a perimicrovilar. Em Hemiptera não sugadores de seiva, a função da MPM está relacionada à função da membrana peritrófica, tal como compartimentalização do processo digestivo, otimização da absorção de aminoácidos da dieta, imobilização de algumas enzimas e proteção do epitélio intestinal (Terra e Ferreira, 2005). A membrana microvilar é mais rica em proteínas integrantes, dentre elas os transportadores de aminoácidos e os portassomos (K^+ ATPases) (Terra e Ferreira, 1994). A membrana perimicrovilar é alimentada a partir de membranas internas das vesículas multimembranosas, as quais se formam ao nível do Complexo de Golgi, e se encaminham em direção às bases das microvilosidades, onde ocorre a fusão das membranas externas dessas vesículas com a membrana microvilar, e a fusão das membranas internas com a base das membranas perimicrovulares (Silva e Terra, 1994; Silva e Terra, 1995; Silva *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1996).

Um estudo recente baseado em microscopia eletrônica de transmissão e imunolocalização de uma α -glicosidase embasam a sugestão de que a origem evolutiva da MPM está nos Condylgnatha, que compreende as ordens Thysanoptera e Hemiptera (Silva *et al.*, 2004). A origem celular da MPM não é ainda completamente entendida, mesmo havendo diversos estudos publicados sobre este assunto (Lane e Harrison, 1979; Andries e Torpier, 1982; Gutierrez e Burgos, 1986; Silva *et al.*, 1995).

Silva e colaboradores (1996) realizaram um trabalho pioneiro com uma α -glicosidase ligada a MPM, onde propôs com base experimental sólida a origem intracelular do sistema perimicrovilar. A α -glicosidase foi purificada, o que permitiu a produção de um anticorpo policlonal que foi utilizado para investigar a localização celular da enzima (Silva *et al.*, 1995). A imunolocalização desta enzima no epitélio do intestino médio do *D. peruvianus* reafirma a hipótese que as MPMs são originadas de membranas internas de vesículas com dupla membrana que foram vistas vindo do complexo de Golgi.

Apesar destes avanços, poucos trabalhos reportam a origem do sistema de MPM em espécies de Hemiptera (Billingsley e Downe, 1983, 1990) e, além disso, algumas questões continuam não resolvidas tais como as enzimas marcadoras bioquímicas de outros compartimentos: espaço perimicrovilar (aminopeptidase), membrana microvilar (β -glicosidase) e o lúmen do intestino médio (catepsinas). Seria interessante gerar anticorpos destas enzimas e imunolocalizá-las nos seus distintos compartimentos celulares para assim fortalecer a hipótese do modelo proposto por Terra (1988).

O maior problema enfrentado pelos insetos sugadores de seivas vegetais é assegurar a absorção de nutrientes essenciais, tais como aminoácidos que ocorrem em baixa concentração em todos os tipos de seiva. Os sugadores de seiva realizariam essa absorção de acordo com o seguinte modelo: as membranas microvillares transportariam ativamente íons potássio do espaço perimicrovilar gerando um gradiente de concentração de potássio entre o espaço intermembranas e o lúmen intestinal com seiva rica em potássio. Este gradiente de concentração poderia ser usado para forçar a absorção de compostos orgânicos através de co-transportadores apropriados na membrana perimicrovilar. Os compostos orgânicos,

uma vez no espaço perimicrovilar, difundir-se-iam até transportadores na superfície das membranas microvilares (Terra, 1988, Terra e Ferreira, 1994) (Figura 1).

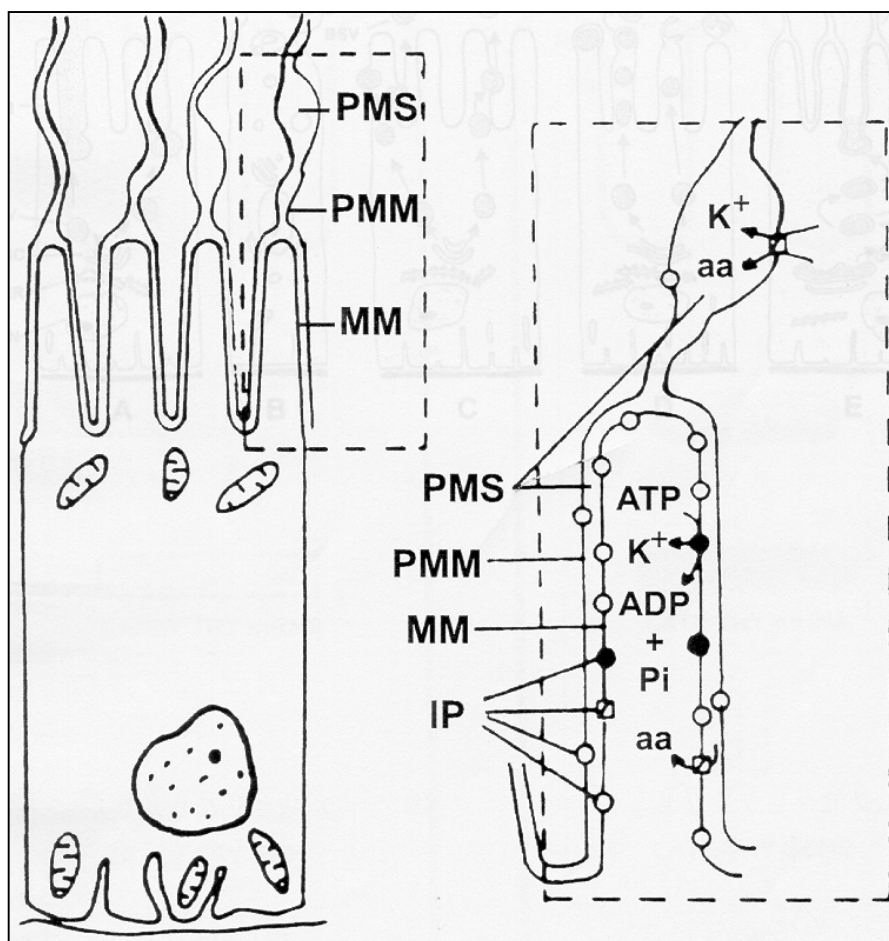


FIGURA 1 - Modelo estrutural do papel fisiológico da membrana microvilar das células do intestino médio de Hemiptera.

A figura a esquerda é uma representação de uma típica célula de intestino médio de Hemiptera e a figura a direita mostra em detalhe o seu ápice. A membrana microvilar (MM) é recoberta pela membrana perimicrovilar (PMM), a qual se estende pelo compartimento luminal com fundo cego. As membranas microvilar e perimicrovilar delimitam um compartimento fechado, chamado espaço perimicrovilar (PMS). A membrana microvilar é rica em proteínas integrais (IP) e a membrana perimicrovilar é pobre (Terra, 1988).

1.6 - O GÊNERO *DYSDERCUS*

O adulto possui um corpo elíptico, com 12 a 15 mm de comprimento. As asas são de coloração castanho clara a escuro, e possuem três linhas brancas sob o tórax e na base das pernas, apresentando cinco estágios ninfais. As ninfas são de

coloração avermelhada. A proporção sexual é de 1:1, sendo as fêmeas maiores que os machos.

O desenvolvimento destes insetos inicia-se no solo, onde a fêmea, após a fecundação, faz a postura nas escavações ou fendas no solo, nas proximidades do algodoeiro, cobrindo-as com pequenas quantidades de terra. Os ovos são, a princípio, esbranquiçados e, posteriormente, apresentam-se de cor amarelada. Após 10 dias ocorre a eclosão, surgindo as ninfas ou formas jovens, de cor alaranjada. Estas sobem pela planta e se aglomeram sobre as maçãs e capulhos onde, após introduzirem o rostro, sugam a seiva e atingem a semente. Preferencialmente, penetram entre as fibras dos capulhos abertos, que são atacados tanto pelas ninfas quanto pelos adultos que sugam as sementes. As ninfas bem desenvolvidas, medem cerca de 8 mm de comprimento e são de coloração avermelhada. Após 30 dias surge o adulto, que mede 15 mm de comprimento aproximadamente. O ciclo evolutivo completo é de 45 dias, em média. A espécie se reproduz durante todo o ano em plantas hospedeiras alternativas silvestres ou cultivadas (malváceas, solanáceas, etc). As populações crescem e migram entre lavouras durante o verão, e condições de alta umidade favorecem o desenvolvimento do inseto.

Os danos causados pelos manchadores podem assim ser resumidos: quedas das maçãs novas provocadas pelas picadas; mau desenvolvimento das maçãs, principalmente quando atacadas ainda novas; abertura defeituosa dos capulhos quando as maçãs são atacadas durante o seu desenvolvimento, com prejuízo parcial ou total; manchas nas fibras causadas pelas dejeções destes insetos. Finalmente, os manchadores podem causar sérios danos através da podridão das fibras dos capulhos, pela introdução de bactérias e de certos fungos (Gallo *et al.*, 1988).

Esse gênero é de grande interesse econômico, pois a ele pertencem algumas das mais sérias pragas do algodoeiro nos países em que se cultiva essa Malvaceae. De sua dieta principal também fazem parte plantas das famílias Amaranthaceae, Bombaceae, Compositae, Rubiaceae e Esterculiaceae. Insetos do gênero *Dysdercus* são fitófagos, mas exibem esporadicamente comportamento de predadores saprófagos (Gonçalves, 2000).

O *Dysdercus* é um inseto pouco estudado e foram registrados atacando algodoeiro (*Gossypium spp.*) em diversas regiões do mundo sendo registrada sua ocorrência na África, Argentina, Guiana e Paraguai. No Brasil ela foi relatada nos

estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Vários estudos foram realizados sobre ecologia e comportamento de diferentes espécies do gênero *Dysdercus* em diversas regiões do mundo, principalmente na África. Entretanto no Brasil, onde ocorrem 14 espécies e 7 subespécies desse gênero de um total de 53 espécies americanas conhecidas, há poucos estudos (Gonçalves, 2000).

1.7 - MODELO EXPERIMENTAL: *DYSDERCUS PERUVIANUS*

Estudos do intestino médio de *D. peruvianus* mostraram que ele é dividido em três ventrículos que são chamados V1, V2 e V3, conectando ao intestino posterior através do V4 (Silva *et al.*, 1995).

O V1 é uma região dilatada, com uma parede mais espessa, que serve de reservatório para estocagem de alimento ingerido, absorção de água e açúcar. Nesta câmara a água é rapidamente absorvida, permitindo a secreção de mais saliva (Silva *et al.*, 1995). A absorção de água em insetos depende do bombeamento de sais para o interior de compartimentos no epitélio do órgão responsável pela absorção. Isto cria um gradiente de pressão osmótica entre o compartimento e o lúmen do órgão, o que leva à absorção da água (Berridge, 1970).

A absorção de água em *D. peruvianus* não depende de sais da sua dieta e ela só se torna significativa quando cerca de 40% da glicose presente na dieta foram absorvidos. Isto sugere que a água é absorvida em *D. peruvianus* somente quando um gradiente osmótico favorável é estabelecido entre o lúmen ventricular e algum compartimento no epitélio intestinal (Silva *et al.*, 1995).

O V2 é uma região tubular, que se encontra dobrada na cavidade abdominal do intestino, e é separada do primeiro segmento ventricular por uma constricção, que serve de válvula para controle da passagem do alimento de uma região para outra. Este segmento é o principal sítio de digestão de proteínas (Silva *et al.*, 1995).

V3 tem uma forma esférica e parede delicada e bastante elástica. Na passagem de V2 para V3 também se encontra uma constricção como observada entre V1 e V3. O V4 é um ducto curto ligado ao V3 à ampola onde se inserem os túbulos de Malpighi, marco onde finaliza o intestino médio e se inicia o posterior (Silva *et al.*, 1995).

1.8 - DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS DIGESTIVAS EM HEMIPTERA

A ocorrência de diferentes enzimas digestivas no canal alimentar de insetos é freqüentemente dita depender principalmente da composição química da dieta ingerida (Wigglesworth, 1972). Essa visão leva a acreditar que a adaptação ao hábitat e o hábito alimentar são mais importantes que as características filogenéticas na determinação do repertório de enzimas digestivas no trato intestinal de insetos. Todavia, alguns trabalhos têm mostrado que características adaptativas observadas em insetos pertencentes ao mesmo táxon, mas com diferentes hábitos alimentares parecem ter evoluído de um mesmo padrão básico de digestão, enquanto que insetos com hábitos alimentares similares, mas de grupos taxonômicos divergentes mostram diferentes padrões na organização da digestão, apesar da existência de numerosas características convergentes (Terra, 1988; 1990; Terra e Ferreira, 1994, 2005).

Os insetos utilizam uma grande variedade de proteinases com função digestiva (Terra, 1988; 1990). Proteinases serínicas do tipo tripsina e quimotripsina são descritas na maioria das espécies de insetos investigadas (Applebaum, 1985), mas importantes grupos têm apresentado exceções interessantes, como os hemípteros Heteroptera, os dípteros Cyclorrhapha e os coleópteros Cucujiformia (Terra e Ferreira, 1994). Na ordem Hemiptera, apenas proteinases cisteínicas e aspárticas têm sido descritas ocorrendo no lúmen intestinal desses insetos. Gooding (1969) sugeriu pela primeira vez que enzimas semelhantes a catepsinas B de mamíferos poderiam estar envolvidas na digestão extracelular em *R. prolixus*. De fato, a ocorrência de catepsinas B tem sido verificada em várias espécies de outras famílias de Hemiptera, como Cimicidae (Houseman e Downe, 1982), Pentatomidae (Houseman, *et al.*, 1984), Phymatidae (Houseman, *et al.*, 1985) e Pyrrhocoridae (Silva e Terra, 1994). Catepsinas D também foram descritas em *R. prolixus* (Houseman e Downe, 1983; Garcia, 1987; Terra *et al.*, 1988).

Através de estudos sobre o fracionamento celular das células do epitélio do ventrículo posterior de *R. prolixus* e a separação de frações de membranas microvilares e perimicrovilares por centrifugação isopícnica em gradientes de sacarose, Ferreira *et al.* (1988) propuseram que a α -manosidase e a α -glicosidase seriam proteínas integrantes das membranas microvilares e perimicrovilares,

respectivamente, e que uma aminopeptidase estaria aprisionada no espaço perimicrovilar. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que os oligopeptídeos resultantes da digestão de proteínas por proteinases tipo catepsinas seriam transportados para o espaço perimicrovilar, onde sofreriam a ação da aminopeptidase ali presente e os produtos seriam então absorvidos.

D. peruvianus apresenta uma α -glicosidase majoritária associada à membrana perimicrovilar que se encontra principalmente no primeiro segmento ventricular (V1), região onde ocorre a absorção de glicose (Silva e Terra, 1994). A atividade de aminopeptidase é principalmente solúvel, sendo facilmente liberada com a homogeneização do tecido intestinal. Assim como foi descrito para *R. prolixus*, Silva *et al.* (1996) demonstraram em *D. peruvianus* que a α -glicosidase seria integrante da membrana perimicrovilar, enquanto que a β -glicosidase seria integrante da membrana microvilar e a aminopeptidase solúvel estaria no espaço perimicrovilar.

1.9- CLASSIFICAÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS

A classificação das enzimas e o sistema de numeração usado são recomendados pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular (1992). Dentre elas destacamos as peptidases (EC 3.4), enzimas que atuam clivando as ligações peptídicas e incluem as endopeptidases, (EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.2.4.11-19). As proteinases são divididas em subclasses com base no seu mecanismo catalítico, como o mostrado pelos substratos específicos ou pH (Terra e Ferreira, 2005).

Glicosidasas (EC 3.2) são classificadas de acordo com a especificidade com o substrato. Estão incluídas nesta classe enzimas que clivam ligações internas em polissacarídeos e são usualmente nomeadas de acordo com o seu substrato, como amilase, celulase, pectinase e quitinase. Além disso, há enzimas que hidrolisam oligossacarídeos e dissacarídeos. Oligossacaridasas e dissacaridasas são usualmente nomeadas com base no monossacarídeo que doa o seu grupo redutor para a ligação glicosídica e a sua configuração (α ou β) para a ligação (Terra e Ferreira, 2005).

O grupo dos lipídeos é grande e heterogêneo e tem como características a insolubilidade em água e a grande solubilidade em solventes apolares. Alguns

contêm ácidos graxos (gorduras, fosfolipídeos, glicolipídeos e ceras) e outros não (terpenóides, esteróides e carotenóides). Ligações de éster são hidrolisadas em lipídeos que contêm ácidos graxos antes de serem absorvidos. As enzimas que hidrolisam ligações de éster são: hidrolases éster carboxil (EC 3.1.1), lipases, esterases e fosfolipases A e B; hidrolases monoéster fosfórico, que são as fosfatases e as hidrolases diéster fosfóricas (EC 3.1.4), incluindo fosfolipases C e D (Terra e Ferreira, 2005).

1.10 - PROTEINASES

O termo proteinase é sinônimo de peptídeo hidrolase, e este termo incluem todas as enzimas que clivam ligações peptídicas (classificadas pela *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* como EC 3.4). Embora as proteínas possam sofrer modificações pós-transcricionais reversíveis (fosforilação e transições alostéricas), a proteólise é irreversível. Uma vez a proteína tendo sido hidrolisada, a única maneira viável para reconstrução de uma molécula intacta é transcrever mais mRNA. Baseado na natureza da proteólise, não é de se surpreender que enzimas proteolíticas estejam envolvidas na mediação de processos que são frequentemente irreversíveis: coagulação, digestão, maturação de citocinas e pró-hormônios, apoptose e quebra de proteínas intracelulares. Proteólise é um mecanismo onipresente que a célula emprega para regular a função e destino das proteínas (Neurath e Walsh, 1976; Polgar, 1989a).

Proteinases podem ser subdivididas em exopeptidases, na qual a ação pode ocorrer nas porções amino ou carboxi-terminal do peptídeo (EC 3.4.11-19), ou em endopeptidases, enzimas que clivam ligações peptídicas internas em peptídeos e usualmente não podem acomodar aminoácidos das porções amino ou carboxi-terminal carregados em seu sítio ativo (EC 3.4.21-24,99). Todas têm em comum o mecanismo geral de ataque nucleofílico ao carbono carbonil de uma ligação peptídica (Polgar, 1989b). Isto resulta num processo hidrolítico ácido-base que rompe a ligação covalente. Diferentes proteinases utilizam estratégias distintas para gerar o nucleófilo e para justapor o nucleófilo com a ligação alvo. Estas diferenças são úteis na classificação e, baseado nisto, as endoproteinases podem ser agrupadas em quatro classes majoritárias: serino (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspartato (EC 3.4.23) e metalo (EC 3.4.24). Os dois últimos grupos de enzimas utilizam resíduos aspartato e metais pesados (usualmente zinco), respectivamente

para imobilizar e polarizar a molécula de água para que o átomo de oxigênio da água se torne o nucleófilo (Menard e Storer, 1992). Serino e cisteíno proteinases utilizam suas cadeias laterais HO- e HS-, respectivamente, diretamente como nucleófilo. Embora não seja idêntico, os mecanismos catalíticos da serino e da cisteína proteinase são consideravelmente semelhantes. Em geral, estas enzimas são dobradas em dois domínios globulares relativamente grandes que circundam uma fissura contendo os resíduos do sítio ativo. A entrada do substrato na fissura é um pré-requisito para a clivagem, dessa forma, é essencial que ocorra um ajuste estrutural adequado entre o substrato e a enzima. Análises cristalográficas de vários membros das classes das serino e cisteíno proteinases revelam estrutura detalhada da região do sítio ativo e da importância de aminoácidos adicionais para o mecanismo catalítico (Matthews *et al.*, 1967; Varughese *et al.*, 1989). Em ambas serino e cisteíno proteinases, a formação de um oxiânion ou ânion tiolato (o nucleófilo), respectivamente, é crucial para catálise, e a formação destes ânions parece ser dependente da formação do par de íons entre o aminoácido do sítio ativo e do aminoácido básico vizinho (histidina) (Polgar, 1989a; Manson e Wilcox, 1993).

1.11 - CLANS E FAMÍLIAS DAS CISTEÍNO PROTEINASES

Proteinases nas quais o nucleófilo que ataca a ligação peptídica é um grupo sulfidril de um resíduo de cisteína são conhecidas como cisteíno proteinases. O mecanismo catalítico é parecido com as das proteinases serínicas, onde um nucleófilo e um doador de prótons são necessários, sendo um resíduo de histidina o doador de prótons em todas as cisteína proteinases, assim como na maioria das serino proteinases. Em algumas famílias apenas a dupla Cys e His parecem essenciais para a catálise, enquanto em outras famílias há evidência da necessidade de um terceiro resíduo para orientar o grupamento imidazol da His.

Rawlings e Barrett, com base na seqüência de aminoácidos, classificaram as cisteíno proteinases em clãs e famílias. O termo família é utilizado para descrever um grupo de enzimas na qual cada proteína apresenta similaridade da sua seqüência primária inteira ou da seqüência responsável pela atividade catalítica, com pelo menos uma outra enzima do grupo. O clã compreende um grupo de famílias que apresenta sinais de relação evolutiva (Rawlings e Barrett, 1993; Rawlings e Barrett, 1994). As cisteínas proteinases estão agrupadas em seis clãs (CA, CD, CE, CF, CH, CX).

1.12 - CISTEÍNA PROTEINASE EM INSETOS

A cisteína proteinase intestinal de insetos foi primeiramente denominada catepsina B (EC 3.4.22.1), pois este grupo de enzimas foi o primeiro a ser descrito. Mais tarde ficou esclarecido que catepsinas B são mais importantes como dipeptidases do que como endopeptidases (Barrett *et al.*, 1998). Catepsina L (EC 3.4.22.15) é a verdadeira endopeptidase que cliva ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P₂ (catepsina B prefere Arg nesta posição) (Barrett *et al.*, 1998). Desta forma, a distinção entre estas duas catepsinas se faz através da utilização de dois substratos fluorogênicos: Z-FR-MCA (específico para catepsina L) e Z-RR-MCA (específico para catepsina B). A especificidade do substrato para as catepsinas B, K, L e S é determinada pelo resíduo de aminoácido da posição P₂. Para que o substrato se ligue efetivamente à enzima, deve ocorrer uma interação favorável entre o resíduo de aminoácido da posição S₂ e o resíduo da posição P₂ (Bown *et al.*, 2004). Para a maioria das catepsinas, incluindo a L, tal interação é favorecida pela presença de cadeias hidrofóbicas volumosas em S₂ e desfavorecida quando há cadeias carregadas (Barrett *et al.*, 1998).

Há cinco famílias estruturais de cisteína proteinases (EC 3.4.22.15) das quais C1 inclui a maioria daquelas importantes para animais (Rawlings e Barrett, 1993). A maioria dos membros da família C1 tem propriedades similares à papaína. Eles têm três resíduos diretamente envolvidos na catálise, Cys 25, His 169 e Asn 175 com Glu 19 (numeração como papaína) ajudando a estabilizar o intermediário reativo. As propriedades semelhantes à papaína são reconhecidas pelo motivo ERFNIN com os resíduos conservados: Glu 34, Arg 68, Phe 72, Asn 75, Asn 83 (numeração como papaína). A maioria das proteinases C1 prefere substratos que possuem uma cadeia lateral hidrofóbica ocupando o subsítio S₂, que é formado por Ser 205 (numeração como papaína) entre outros resíduos (Barrett *et al.*, 2004).

Como visto anteriormente, o mecanismo catalítico das cisteíno proteinases, é bastante similar ao das serino proteinases, pois em ambos os casos há a formação de um intermediário tetraédrico covalentemente ligado (Lowe, 1976), que se forma pela reação entre um nucleófilo e a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada. No caso das cisteíno proteinases, o nucleófilo que ataca é o átomo de enxofre da cadeia lateral de uma cisteína (cisteína 25, numeração da papaína) e o grupo imidazol da cadeia lateral de uma histidina (histidina 159, numeração da papaína) também está envolvido no papel de acceptor de hidrogênio. O grupo SH da

Cys reativa deverá estar no estado livre, assim como o resíduo de His próximo (Drenth *et al.*, 1971 e Glazer e Smith, 1971). A asparagina 175 também é importante para a catálise das cisteíno proteinases, já que este resíduo participa orientando o anel imidazólico His159. Dois grupos NH- e dois resíduos da enzima, Gln 19 e Cys 25, atuam no papel da “cavidade oxianica”, em perfeita analogia à classe das serino proteinases.

As etapas de acilação e desacilação da enzima, no modelo proposto por Storer e Ménard, envolvem a formação de dois intermediários tetraédricos iônicos e quatro estados de transição (Storer e Ménard, 1994). Alguns autores sugerem que o estado de transição pode ser considerado um fator limitante, na determinação da especificidade das enzimas proteolíticas (Storer e Ménard, 1996).

As cisteína proteinases, neste tipo de catálise, necessitam do grupo tiol da Cys 25. A His 159, localizada próxima a cisteína, intervém igualmente na catálise enzimática (Kamphius *et al.*, 1984) conferindo a alta nucleofilicidade ao grupo tiol através da formação do par iônico tiol-imidazol (Storer e Ménard, 1994).

As cisteína proteinases de insetos podem ser digestivas (Terra e Ferreira, 1994; 2005), envolvidas na degradação de vitelina (Cho *et al.*, 1999) ou metamorfose (Takahashi *et al.*, 1993). A ocorrência de cisteína proteinase como enzima digestiva, no lugar das ubíquas serino proteinases, em Hemiptera (percevejos, pulgões e cigarras) (Gooding, 1969; Houseman *et al.*, 1984; Terra e Ferreira, 1994; Cristofolletti *et al.*, 2003) pode resultar de dois eventos evolutivos (Houseman *et al.*, 1985; Cristofolletti *et al.*, 2003). O primeiro foi a perda das serino proteinases após adaptação para hábito sugador de seivas por hemípteros Auchenorrhyncha-símiles (semelhantes às cigarrinhas) que são considerados ancestrais de toda ordem Hemiptera (Goodchild, 1966). O segundo evento foi o uso de proteinase lisossômica para digerir proteína por alguns hemípteros sugadores de seiva (alimento de regra carente de proteína) ao retornar para o hábito de ingerir proteína. Concordando com esta hipótese há o fato de que serino proteinases são somente encontradas em secreções salivares dos Hemiptera, nunca no intestino médio (Thie e Houseman, 1990). Além disso, dados citoquímicos sugerem como sendo a origem da cisteína luminal a cisteína lisossomal (Billingsley e Downe, 1988). No caso dos Coleoptera (besouros) da série Cucujiformia, os únicos outros insetos além dos Hemiptera que têm cisteína proteinase como enzima digestiva (Murdock *et al.*, 1987; Terra e Cristofolletti, 1996), a presença da enzima é admitida como

resultado da adaptação que permitiu esses insetos se nutrir de sementes ricas em inibidores de serino proteinases (Terra e Cristofolletti, 1996).

A despeito da óbvia importância das catepsina L-símiles (CALs) digestivas de insetos, que podem ter rotas secretoras peculiares (Terra e Ferreira, 2005) e parecem estar envolvidas em mecanismos de resistência contra inibidores naturais e podem ser usadas em estratégia de produção de plantas transgênicas, a caracterização molecular dessas enzimas não progrediu muito. Isto é consequência de: (1) dificuldade no estabelecimento que uma CAL ensaiada nos intestinos de insetos foi realmente secretada para o lúmen intestinal e, portanto, pode ser considerada como enzima digestiva verdadeira; (2) dificuldade de isolamento, purificação e caracterização cinética das CALs devido autólise frequentemente observada nos estágios finais da purificação; (3) dificuldade no relacionamento de CALs codificadas por cDNAs clonados de células intestinais, com enzimas digestivas porque muitas daquelas enzimas devem ser lisossômicas, jamais deixando as células.

Existem 86 seqüências de CALs de insetos registradas no GenBank (abril de 2007), das quais 45 correspondem a ordem Coleoptera, 20 Diptera, 10 Hemiptera, 5 Lepidoptera, 4 Thysanoptera e 2 de Hymenoptera. As seqüências apresentam as características comuns às famílias 1 de cisteína proteinases: pró-peptídeo N-terminal que deve ser removido para ativar a enzima, a tríade catalítica e o motivo ERFNIN (Barrett *et al.*, 1994).

A despeito do conhecimento das seqüências acima, as CALs digestivas foram purificadas até homogeneidade apenas de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Cucujiformia: Chrysomelidae) (Koiwa *et al.*, 2000), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Gruden *et al.*, 2003), *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Auchenorrhyncha) (Cristofolletti *et al.*, 2003) e *Tenebrio molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2005). Dessas, as únicas estudadas em detalhes são as de *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2005).

As CALs digestivas são proteinases chaves no processo de digestão de proteínas em Hemiptera e Coleoptera Cucujiformia. Como essas ordens são muito destrutivas em plantações e a mesma planta pode ser atacada por insetos das duas ordens, o desenvolvimento de inibidores que afetassem ambas as enzimas seria muito interessante. Para isto deve-se fazer um estudo detalhado das CALs das duas ordens.

1.13 - AMINOPEPTIDASES EM INSETOS

As aminopeptidases (EC 3.4.11) catalisam a hidrólise seqüencial de resíduos de aminoácidos da região N-terminal de peptídeos, sendo classificadas com base na sua dependência de íons metálicos (geralmente Zn^{2+} ou Mn^{2+}) e especificidade ao substrato. A aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) possui uma ampla especificidade, apesar de remover preferencialmente resíduos de alanina e leucina, enquanto que a aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) prefere resíduos de ácido aspártico e glutâmico como substratos (Norén *et al.*, 1986). Em insetos, essas enzimas são encontradas no intestino médio e desempenham um papel importante na digestão intermediária de proteínas, já que são em geral mais ativas que as carboxipeptidases nesses animais (Terra e Ferreira, 1994). As aminopeptidases clivam aminoácidos de oligopeptídeos produzidos pela ação de proteinases (principalmente tripsina), permitindo que esses aminoácidos sejam transportados através do epitélio intestinal e, conseqüentemente, usados como substratos para a construção de proteínas endógenas do inseto (Taylor, 1993). Comparação de seqüências e de estruturas de aminopeptidases baseada nas suas homologias estruturais e nos principais resíduos envolvidos na catálise permitiu agrupá-las na classe M1 de proteases (Rawlings e Barrett, 1993).

As aminopeptidases de insetos são metaloenzimas e possuem um pH ótimo entre 7,2-9,0, massas moleculares entre 90 e 130 kDa e valores de K_m de 0,13 a 0,78 mM (valores para LpNA como substrato) (Terra e Ferreira, 1994). As aminopeptidases conhecidas em insetos possuem uma ampla especificidade, sendo capazes de hidrolisar uma variedade de substratos β -naftilamidas, exceto acil-amino- β -naftilamidas ácidos, o que indica que são em geral aminopeptidases N (Terra e Ferreira, 1994). Uma exceção é uma aminopeptidase solúvel associada ao glicocálix de *Rhynchosciara americana* (Diptera) que se assemelha a aminopeptidase A de vertebrados. Essa enzima cliva resíduos N-terminais de ácido aspártico ou glutâmico de peptídeos que não são eficientemente clivados por outras aminopeptidases (Klinkowstrom *et al.*, 1994).

Nos insetos menos evoluídos (Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera Adephaga), as aminopeptidases estão principalmente na forma solúvel, enquanto que em insetos mais evoluídos (Coleoptera Polyphaga, Diptera e Lepidoptera), as aminopeptidases estão geralmente ligadas às membranas microvilares das células do intestino médio (Terra e Ferreira, 1994). Na maioria desses insetos, as

aminopeptidases são as principais proteínas presentes nas membranas microvilares (compõem 55% das proteínas microvilares em *Tenebrio molitor* segundo Cristofolletti e Terra, 1999).

As mais bem caracterizadas aminopeptidases de insetos são as de *Rhynchosciara americana* (Ferreira e Terra, 1984, 1985, 1986a e 1986b) de *Tenebrio molitor* (Cristofolletti e Terra, 1999 e 2000) e de *Acyrtosiphon pisum* (Cristofolletti *et al.*, 2006).

O estudo das aminopeptidases digestivas de insetos tem adquirido grande impulso com a descoberta de que, em vários insetos, esta enzima é o sítio receptor para ligação de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Knight *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*; 1997; Garczynski e Adang, 1995; Lee *et al.*, 1996; Nagamatsu *et al.*, 1998; Garner *et al.*, 1999). Estas proteínas de *B. thuringiensis* após sofrerem ativação pelas proteases digestivas do trato digestivo, tornam-se capazes de se ligarem à membrana do enterócito através de uma aminopeptidase e causam a formação de poros que ocasionam despolarização da membrana plasmática e o vazamento do conteúdo celular, levando os insetos à morte (Schnepf *et al.*, 1998).

Nos insetos da ordem Hemiptera, as aminopeptidases se encontram tanto na forma solúvel quanto ligada a membrana. Cristofolletti e colaboradores (2006) purificaram, caracterizaram cineticamente e clonaram uma aminopeptidase N ligada à membrana perimicrovilar modificada do afídeo *Acyrtosiphon pisum*. As aminopeptidases solúveis já estudadas estão aprisionadas no espaço perimicrovilar, como foi demonstrado em *R. prolixus* (Ferreira *et al.*, 1988) e em *D. peruvianus* (Silva *et al.*, 1996) de acordo com estudos de fracionamento celular e separação de membranas microvilares e perimicrovilares por centrifugação em gradientes de sacarose.

1.14 - α -GLICOSIDASES EM INSETOS

As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) são enzimas que catalisam a hidrólise dos resíduos de glicose na porção terminal não redutora da ligação α -1,4 de dissacarídeos, aril-glicosídeos ou oligossacarídeos com eficiência variada como para *D. peruvianus*, onde ela é capaz de hidrolisar oligossacarídeos até maltopentose (Terra e Ferreira, 2005). As α -glicosidases são classificadas, em função de sua

similaridade de seqüência em quatro famílias: as famílias 4, 13, 31 e 97 (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993).

α -Glicosidases de intestino médio de insetos podem ser solúveis ou podem estar ligadas à membrana microvilar. As formas solúveis podem estar presentes no lúmen do intestino médio, como observado em Coleoptera (Ferreira e Terra, 1989; Baker, 1991), e Hymenoptera (Schumaker et al., 1993) ou pode permanecer absorvida no glicocálix da célula, como em Lepidoptera (Santos e Terra, 1986). Em *Musca domestica* (Diptera), uma α -glicosidase minoritária foi encontrada no lúmen do intestino médio e uma α -glicosidase majoritária adsorvida no glicocálix (Terra e Jordão, 1989). α -Glicosidases ligadas a membrana são proteínas integrantes de membranas microvillares em células de intestino médio (Espinoza-Fuentes e Terra, 1986; Terra e Jordão, 1989; Jordão e Terra, 1991). A compartimentalização das α -glicosidases no intestino médio depende da posição filogenética dos insetos, de acordo com o fato estabelecido de que toda digestão padrão se correlaciona bem com a filogenia (Terra, 1988, 1990).

Diversas α -glicosidases foram caracterizadas em insetos (Terra e Ferreira, 2005), e várias já foram purificadas: adulto de *Apis mellifera* (Heber e Mathinson, 1976); adulto de *Drosophila melanogaster* (Tanimura et al., 1979); larva de *Thaumetopeae pityocampa* (Pratviel-Sosa et al., 1986). Entretanto todas essas enzimas foram purificadas a partir de insetos inteiros, e, portanto, não devem ser claramente de origem intestinal, podendo também ser encontradas em glândulas salivares ou hipofaríngeas (Huber e Mathinson, 1976). α -Glicosidases purificadas e caracterizadas até este momento foram a α -glicosidase de *D. peruvianus* purificada a partir de membranas perimicrovillares (Silva e Terra 1995), duas α -glicosidases do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Marana et al., 2000), três α -glicosidases do vetor neo-tropical da malária o *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) (Souza-Neto et al., 2007) e uma α -glicosidase da abelha japonesa *Apis cerana japonica* (Wongchawalit et al., 2006).

1.15 - β -GLICOSIDASES EM INSETOS

β -glicosidases (EC 3.2.1) são exoenzimas, que removem os monossacarídeos da região terminal não redutora de di e/ou oligossacarídeos. Dependendo do monossacarídeo que é removido, a β -glicosidase é chamada β -glicosidase (glicose),

β -xilosidase (xilose), β -galactosidase (galactose). Frequentemente a mesma β -glicosidase tem habilidade em hidrolisar diferentes resíduos de monossacarídeos de glicosídeos. Neste caso, β -glicosidase é usado para nomear todas as enzimas, que removem glicose com eficiência (Terra e Ferreira, 1994). Em insetos, β -glicosidases têm um papel na digestão final de celulose e hemicelulose, na quebra de carboidratos de glicoproteínas (Terra e Ferreira, 1994) e pode ainda hidrolisar glicolípídeos, como proposto por Marana e colaboradores (1995). No entanto, a função precisa de muitas β -glicosidases não está clara, já que algumas hidrolisam apenas substratos sintéticos (Morgan, 1975; Marana *et al.*, 1995).

Características gerais já podem ser delineadas para as β -glicosidases digestivas encontradas em insetos (ver Terra e Ferreira, 2005). No geral elas apresentam um peso molecular que varia de 30 a 150 kDa; pIs já determinados mostraram que essas enzimas apresentam características de ácidas a neutras com esse parâmetro variando de 3,7 a 7,8 e o pH ótimo está na faixa de 4,5 a 6,5. Entretanto, em Lepidoptera essas enzimas apresentam um pH ótimo mais alto do que o encontrado em outros insetos variando de 6 a 7.

O número de β -glicosidases no tubo digestivo pode variar. Alguns insetos possuem apenas uma β -glicosidase capaz de clivar vários substratos, enquanto outros possuem várias dessas enzimas com especificidades diferentes para os diversos substratos. Quando várias enzimas estão presentes, suas especificidades são diferentes e, quando somente uma enzima está presente, ela possui especificidade ampla cobrindo as especificidades de todas aquelas enzimas presentes nos insetos que possuem duas ou quatro dessas proteínas (Ferreira *et al.*, 1998, Azevedo *et al.*, 2003).

Baseado na eficiência catalítica relativa a diferentes substratos, β -glicosidases de insetos podem ser divididas em duas classes. Classe A inclui as enzimas que possuem eficiência em hidrolisar substratos contendo aglicones hidrofílicos, como dissacarídeos e oligossacarídeos. A classe B compreende enzimas que possuem uma alta atividade somente sobre substratos contendo aglicones hidrofóbicos, como as alquil-, *p*-nitrofenil- e metilumbeliferil β -glicosidases.

Enzimas da classe A são mais abundantes do que as β -glicosidases da classe B. A classe A hidrolisa di- e oligossacarídeos e possui quatro subsítios para ligação

com glicose no sítio ativo (Ferreira *et al.*, 2001, 2003; Marana *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2003).

Além do importante papel na digestão, β -glicosidases são importantes na relação inseto-planta. Para impedir a herbivoria, plantas sintetizam um grande número de glicosídeos tóxicos que podem estar presentes em concentrações que vão de 0,5% a 1% (Spencer, 1988). A presença destes glicosídeos em dietas de alguns insetos pode explicar o variado número de β -glicosidases com diferentes especificidades nos seus intestinos. A maior parte dos glicosídeos de plantas possui um aglicone hidrofóbico e são compostos β -ligados O-glicosil. Já que os aglicones são normalmente mais tóxicos do que os próprios glicosídeos, a intoxicação pode ser evitada pela diminuição da atividade sobre glicosídeos tóxicos (β -glicosidase tipo B) provavelmente responsáveis pela hidrólise de glicolipídeos, sem afetar a digestão final da hemicelulose e celulase que é feita pelas β -glicosidases do tipo A (Terra e Ferreira, 2005).

Experimentos realizados através de fracionamento celular sugeriram que essas enzimas poderiam servir como marcadores em insetos da espécie *D. peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), onde a α -glicosidase estaria associada à membrana perimicrovilar, a β -glicosidase à membrana microvilar e a aminopeptidase no espaço entre estas duas membranas, denominado espaço perimicrovilar. Estudos minuciosos deverão ser realizados de modo a comprovar definitivamente a origem deste sistema membranar, auxiliando desse modo no aprofundamento dos conhecimentos de como se organiza o processo digestivo na ordem Hemiptera.

1.16 - ETIQUETAS DE SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS (EXPRESSED SEQUENCE TAGS – ESTs)

As etiquetas de seqüências expressas são seqüências curtas (200-500 pb) de DNA geradas das extremidades 3' e 5' de clones de cDNA selecionados ao acaso, os quais representam os genes expressos de um organismo. Os genes mais expressos serão representados na biblioteca muitas vezes por clones idênticos ou por clones quase idênticos. Para reduzir esta redundância e para aumentar as possibilidades de identificar transcritos raros, as bibliotecas do cDNA usadas em projetos de EST são frequentemente normalizadas para aumentar a freqüência relativa de clones raros (Bonaldo *et al.*, 1996). O método foi descrito pelo grupo de Craig Venter, em 1991, para análise de genes expressos em cérebro humano e

atualmente vem sendo aplicado para a análise da expressão de genes nos mais diferentes tipos de organismos. O objetivo do seqüenciamento e análise de ESTs é gerar, rapidamente, dados sobre os genes que codificam proteínas de um determinado tipo de célula, organismo ou parte do mesmo. A análise de EST é um método eficaz para amostragem de genes expressos em um organismo ou em um tecido. Assim, para organismos molecularmente e geneticamente até agora mal descritos, a facilidade e economia relativa de obter uma seqüência parcial a partir de bibliotecas de cDNA pode ser uma maneira altamente produtiva de gerar muita informação sobre genes funcionais (Boguski *et al.*, 1993; Rudd, 2003). No campo da biologia molecular de parasitas, este tipo de abordagem permitiu o descobrimento de diversos candidatos a drogas e vacinas (Lizotte-Waniewski, *et al.*, 2000). Entretanto, dados gerados por ESTs também contém tipos de informações adicionais importantes.

A abundância da seqüência de um EST particular no banco de dados de um organismo refletirá o seu nível de expressão (no caso da biblioteca não ser normalizada). Como as bibliotecas de cDNA das quais os ESTs são gerados são construídas dos tecidos isolados ou dos estágios específicos do ciclo de vida, o índice do EST por biblioteca pode ser informativo a respeito do tecido ou estágio-específico, ou da expressão do tecido ou estágio-regulado. Além disso, pode-se ao comparar perfis de EST de organismos relacionados montando um perfil filogenético de conservação da seqüência e expressão para cada gene e seus homólogos.

Em 2002 o grupo do pesquisador Alfred Vogler mostrou o potencial que há nas pequenas bibliotecas de cDNA para descoberta e análise comparativa de genes úteis para estudos funcionais e filogenéticos ao comparar bibliotecas de EST de sete espécies de Coleoptera (Theodorides *et al.*, 2002). Outros grupos de pesquisa utilizaram esta mesma metodologia para análise transcricional em diversos organismos de interesse econômico. Apesar dos Hemiptera terem grande importância econômica são claramente pouco representados em banco de dados genômicos quando comparados com outras ordens. Um total de 134.954 seqüências de nucleotídeos de Hemiptera são citadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) contra 1.453.547 de Diptera e 466.126 de Lepidoptera (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (GenBank, Junho 2008).

Um incremento do nosso conhecimento sobre seqüenciamento genômico tem grande importância no estudo de porções expressas do genoma através de

estratégia baseada em seqüenciamento de cDNAs. Além de rápida, esta metodologia tem um custo menor, sendo muito eficaz na identificação de um grande número genes no organismo do interesse (Adams *et al.*, 1991). Nós adotamos esta estratégia com intuito de obter seqüências relacionadas com enzimas digestivas (cisteína-proteinase, aminopeptidase, β -glucosidase), transportadores e proteínas estruturais do intestino médio do *D. peruvianus*.

1.17 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E FUNCIONAIS DOS TRANSPORTADORES DE MONOSSACARÍDEOS

Em insetos, glicose é importante em vários aspectos do metabolismo e absolutamente necessária para a sobrevivência (Wegener *et al.*, 2003). Durante a metamorfose em insetos, a glicose funciona como fonte energética e substrato para a síntese dos tecidos da pupa e do adulto (Chippendale, 1978). A falta de glicose causa falência de órgãos e falência do sistema nervoso o que resulta numa desordem de comportamento e morte (Wegener *et al.*, 2003). Além disso, já foi observada a importância deste açúcar na reprodução de *Bombyx mori* (Kawamura *et al.*, 2003).

Membranas plasmáticas de células eucarióticas são formadas por duas camadas de lipídios que impedem a passagem de moléculas hidrofílicas e, portanto a glicose é transportada pela membrana plasmática através de proteínas carreadoras associadas à membrana, chamadas transportadores de glicose. Há dois grupos de proteínas transportadoras que se distinguem estruturalmente e funcionalmente, que mediam a transferência da glicose e outros açúcares através da bicamada lipídica: um sistema carreador acoplado a Na^+ (SGLT) (Wright, 2001) e o transportador facilitativo de glicose (GLUT) (Bell *et al.*, 1990; Carruthers, 1990; Mueckler, 1994; Joost e Thorens, 2001). Os dois tipos de transportadores pertencem às famílias carreadoras de solutos (SLC), que compreendem 43 famílias (SLC1-SLC43).

1.17.1 - CO-TRANSPORTADOR DE GLICOSE E SÓDIO (SGLT)

Os SGLTs efetuam um transporte acoplado, ingressando conjuntamente na célula, sódio, glicose (ou galactose, em alguns casos) e água. Localizam-se na membrana luminal das células epiteliais encarregadas de absorção (intestino delgado) e reabsorção de nutrientes. Aproveita-se a entrada do sódio a favor de um

gradiente eletroquímico formado entre o exterior e o interior da célula, para transportar a glicose contra um gradiente químico. A família SGLT (transportador de glicose dependente de sódio, gene SLC5A) compreende co-transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT1 e SGLT2), o sensor de glicose SGLT3, inositol (Berry *et al.*, 1995) e transportadores de multivitaminas SGLT4 e SGLT6 (Balamurugan *et al.*, 2003), e o transportador de iodo de tireóide SGLT5 (Smanik *et al.*, 1996). SGLT1 e SGLT2 podem ser inibidos por florizina (floreína-2'- β -glicosídeo), um produto da casca da macieira (Gerardi-Laffin *et al.*, 1993). Todos os SGLTs possuem uma estrutura secundária similar, com quatorze domínios transmembranares com estrutura de α -hélice.

O SGLT1, é uma proteína de 664 aminoácidos, que tem uma alta afinidade por glicose, com um K_m de 0,3 mM. Apresenta quatorze domínios transmembranares em α -hélice, com os domínios amino (N) e carboxi (C) terminais localizados na região extracelular da membrana, além de apresentarem um sítio de glicosilação entre os domínios seis e sete. O transporte de sódio e de glicose se realiza através de duas vias diferentes, o sódio entra por uma região da proteína na porção N-terminal e o monossacarídeo através da região C-terminal. A união do sódio ao SGLT gera uma mudança de conformação que permite o transporte de glicose para o interior da célula, na estequiometria: duas moléculas de sódio, uma molécula de glicose e 260 moléculas de água (Wright, 2001; Loo *et al.*, 1996).

O SGLT2 é uma proteína de 672 aminoácidos com 59% de similaridade com o SGLT1 e apresenta um K_m de 1,6 mM para glicose. Transporta uma molécula de sódio por uma de glicose, seu K_m para o sódio é de 200 a 300 mM. Localizam-se nos rins e são responsáveis pela reabsorção de 90% da glicose filtrada nos rins.

O SGLT3 é uma proteína de 674 aminoácidos com 70% de similaridade com SGLT1 e apresenta um K_m de 6 mM para glicose. Transporta duas moléculas de sódio para uma de glicose (Wright, 2001).

1.17.2 - TRANSPORTADOR FACILITATIVO DE GLICOSE (GLUT)

Os transportadores facilitativos de glicose (GLUT) utilizam o gradiente de difusão de glicose (e outros açúcares) pela membrana plasmática e exibem especificidades por diferentes substratos, propriedades cinéticas e padrão diferenciado de expressão em tecidos. O genoma humano contém 14 membros da família GLUT, a qual é dividida em três subfamílias de acordo com as similaridades

entre seqüências de nucleotídeos e elementos característicos (Joost e Thorens, 2001; Rogers *et al.*, 2002; Uldry *et al.*, 2001). As diferenças são principalmente relacionadas com características funcionais (especificidade por substrato, valores de K_m , afinidade de ligação com os inibidores citocalasina B e forscolina) (Joost *et al.*, 2001). Além disso, a função de alguns transportadores é modificada pela redistribuição regulada de proteínas entre a membrana celular e o compartimento intracelular. Estas diferentes características permitem uma regulação específica e complexa da tomada de glicose de acordo com as necessidades celulares e das condições fisiológicas de suprimento de substrato (Joost *et al.*, 2001).

Os GLUTs apresentam uma conformação protéica similar; são glicoproteínas de 45 a 55 kDa (Doege *et al.*, 2000), com doze domínios transmembranares com estrutura α -hélice. Os extremos N- e C-terminais localizam-se no citoplasma, além disso, apresentam um sítio de glicosilação na região externa da membrana. Cada uma das diferentes isoformas de GLUT possui características cinéticas próprias, adaptadas as necessidades metabólicas do organismo. Os segmentos transmembranares 3, 5, 7 e 11 são hidrofílicos em uma face do cilindro α -hélice e hidrofóbicos na outra, portanto formam um poro e desta forma permite a entrada do monossacarídeo a favor de um gradiente de concentração (Guerre-Millo *et al.*, 1995). Para que ocorra a entrada de glicose deve formar previamente uniões como pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila e carbamino do GLUT e os grupos hidroxila da glicose (Lienhard *et al.*, 1992). A glicose é internalizada na célula através de quatro etapas: primeiramente a glicose se une ao transportador na face externa da membrana, em seguida o transportador modifica a sua conformação no sítio de união fazendo com que a glicose no próximo passo seja liberada no citoplasma, finalmente o transportador livre muda novamente sua conformação, expõe o sítio de união à glicose na face externa e retorna o seu estado inicial (Carruthers, 1990).

Há uma grande defasagem de conhecimento a respeito dos transportadores de glicose em insetos, tendo apenas sido identificado e caracterizado até o momento um cDNA codificante de GLUT8 em formiga (Chen *et al.*, 2006).

1.18 - BOMBAS DE ÁGUA

A água pode atravessar membranas celulares através de três rotas: bicamada lipídica, canais de passagem de água ou por mecanismos dependentes de

mudanças conformacionais de proteínas transportadoras (Zeuthen, 1991, 1994; Zeuthen, *et al.*, 1996; Loo, *et al.*, 1996; Zeuthen *et al.* 1997).

Desde o momento em que Reid (1892) demonstrou que a água é transportada pelo intestino na ausência de diferença de pressão hidrostática e osmolaridade transepitelial, essa questão, de como a água é transportada através das células epiteliais na ausência de forças externas, vêm intrigando fisiologistas. A maioria dos estudos nos últimos 40 anos originou da hipótese de que o transporte ativo de sódio era o responsável pela geração de gradientes osmóticos locais em tecidos epiteliais e esta água estaria acoplada ao movimento do sódio por osmose. Peter Curran propôs um modelo com três compartimentos para a absorção de fluidos pelo intestino (Curran e McIntosh, 1962), e Jared Diamond propôs um modelo de osmose local para vesícula biliar (Diamond e Bossert, 1967). O compartimento de osmose local não foi definido no modelo de Curran, mas Diamond propôs que o gradiente de osmose local era gerado em espaços intracelulares laterais. A última hipótese está de acordo com a localização das bombas de sódio e potássio na membrana basolateral do epitélio absorptivo.

Com a descoberta de Peter Agre dos canais de passagem de água (Preston *et al.*, 1992), as aquaporinas, houve o retorno do interesse do transporte de água em epitélio, especialmente em rim. No intestino há pouca ou quase nenhuma expressão de aquaporinas em enterócitos e isto aumenta a possibilidade de que a alta permeabilidade a água pelas membranas basolateral ou microvilosidades está relacionada a uma grande permeabilidade da bicamada lipídica ou da presença de canais para passagem de água. Glicose estimula o transporte de sódio através das microvilosidades do enterócito pelo co-transporte glicose-sódio, e o sódio que entra na célula é bombeado para fora para o espaço intercelular lateral pela bomba basolateral sódio-potássio. É comumente aceito que a água segue o transporte de açúcar e do sal através de osmose local. Esta ligação entre o transporte de glicose, sal e água é a base da terapia utilizada para o tratamento de diarreia causada por cólera, chamada terapia de re-hidratação oral (Hirschorn e Greenough, 1991).

A comprovação de que transportadores de monossacarídeos do tipo co-transportador glicose-sódio estariam envolvidos também na entrada de moléculas de água nas células foi feita através de estudos envolvendo a expressão de SGLT1 em oócitos de *Xenopus laevis* (Zampighi *et al.* 1995; Loo *et al.* 1996, 1999; Loike *et al.* 1996; Meinild *et al.* 1998). Foi observado que a permeabilidade osmótica da água de

SGLT1 expressos em oócitos é diretamente proporcional ao número de co-transportadores expressos na membrana. A permeabilidade à água pelo SGLT1 ocorre independente do tamanho e da direção do gradiente osmótico, assim como da presença ou ausência de ligantes (sódio e glicose), mas a florizina inibe a passagem da água através do SGLT1 com um K_i de aproximadamente 5 μM na presença de sódio (Zeuthen *et al.*, 2001). De acordo com o modelo proposto por Parent e colaboradores (1992b), Loo e colaboradores (1993) e Meinild e colaboradores (2002), primeiramente dois íons sódio se ligariam ao SGLT1, promovendo uma mudança conformacional no co-transportador, permitindo a “ligação” de uma molécula de glicose e 200-260 moléculas de água. Este complexo preenchido passaria por um processo de mudança conformacional para expor o substrato na superfície interna da membrana, onde a água e o açúcar se dissociariam. O deslocamento do sódio da membrana ocorre, pois há uma baixa concentração de sódio dentro da célula. A saída do sódio faz com que a conformação antes relaxada da proteína resulte numa conformação mais fechada fazendo com que haja a expulsão da água. O ciclo catalítico é completado com a isomerização da proteína voltando esta para a conformação inicial.

Recentemente foi demonstrado que além de transportar glicose o transportador do tipo facilitativo GLUT2 transporta também moléculas de água (Zeuthen *et al.*, 2007). Quando expressos em oócitos de *Xenopus laevis*, estes transportadores exibem propriedades de canais para passagem de água que são sensíveis ao inibidor específico floretina (Fischbarg *et al.*, 1990). O GLUT2 transporta água através de dois mecanismos que funcionam em paralelo: a partir de um acoplamento com glicose e por um transporte osmótico dirigido por uma acumulação de açúcar no oócito (Zeuthen *et al.*, 2007).

2 - OBJETIVOS GERAIS

O inseto utilizado neste trabalho, *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera), constitui um interessante modelo de estudo, visto que, possui uma membrana que recobre o intestino médio distinta de qualquer outra membrana já observada em insetos; seu intestino médio é seccionado em ventrículos, o que possibilita estudos precisos de transporte de açúcares e água; e a presença de cisteína proteinase como proteinase digestiva majoritária ao contrário de uma serino proteinase encontrada na maioria das ordens da classe Insecta. Desta forma, as principais metas desta dissertação abrangem a identificação das proteínas encontradas no intestino médio do inseto modelo, caracterização do transporte de glicose no ventrículo anterior e o estudo das cisteína proteinases digestivas.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de uma biblioteca de cDNAs do intestino médio de *D. peruvianus* em fago Lambda Uni ZAP[®] para seqüenciamento ao acaso. Processamento e análise das ESTs. Seleção de algumas seqüências para estudo de distribuição tecidual através de RT-PCR semiquantitativo.
- Estudo de cisteína proteinases digestivas, envolvendo distribuição tecidual, purificação e caracterização cinética, além de tentativa de relacionar as seqüências de catepsinas L encontradas no transcriptoma com as proteinases purificadas do inseto.
- Descrição por experimentos *in vivo* dos tipos de transportadores de açúcar no intestino médio de *D. peruvianus*. Seqüenciamento completo e análise com ferramentas de bioinformática de seqüência homóloga ao transportador de glicose encontrado no transcriptoma obtido.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - COLÔNIA DE INSETOS

Neste estudo foram usados insetos adultos do sugador de sementes de algodão, *Dysdercus peruvianus* (Pentatomomorpha: Pyrrhocoridae), obtidos da colônia mantida em nosso laboratório desde 1990. Estes insetos são mantidos em viveiros de plástico contendo areia e cobertos por um pedaço de pano de algodão presos por elásticos, tendo livre acesso à água e a sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) que são previamente congeladas com o intuito de eliminar organismos que possam contaminá-las. Estas sementes são obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

As colônias são mantidas em condições de fotoperíodo natural com umidade relativa de 50-70% e temperatura de 24 ± 2 °C.

3.2 - DISSECÇÃO DOS INSETOS E PREPARO DE AMOSTRA

Fêmeas adultas de *D. peruvianus* foram previamente imobilizadas no gelo e então dissecadas em solução de cloreto de sódio 215 mM para remoção do trato digestivo e posterior retirada de membranas microvilar e perimicrovilar.

Para obtenção de enzimas digestivas, os insetos utilizados estavam no período adulto, com acesso a água e sementes de algodão. Durante a dissecção dos insetos, em solução de cloreto de sódio 215 mM, primeiramente são descartados a carapaça e o corpo gorduroso e posteriormente o intestino anterior e posterior. Somente o intestino médio é utilizado, sendo que este é subdividido em ventrículo 1, 2 e 3. Os ventrículos (V1, V2 e V3) que formam o intestino médio foram separados para serem futuramente homogeneizados.

Animais que passaram pelo processo de jejum com posterior privação de água e foram alimentados com solução de corante, tiveram o V1 retirado e o seu conteúdo luminal coletado com auxílio de um capilar acoplado a um aparato de sucção.

Cada lote de ventrículos foi homogeneizado em água bidestilada em gelo com auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, seguida de centrifugação a 20.000 g por 30 minutos à 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante utilizado para ensaio de atividade e determinação de proteínas.

3.3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Amostras contendo intestinos de *D. peruvianus* foram aquecidas durante 5 minutos a 95 °C em tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, contendo SDS 2% (p/v), glicerol 10%, β -mercaptoetanol 0,36 mM e azul de bromofenol 0,0025%) e em seguida submetidas a uma separação eletroforética utilizando um equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) em placa fina (1 mm) em poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970). As eletroforeses foram realizadas a 200 V e temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol (utilizado como indicador da mobilidade eletroforética) estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa sendo que o gel foi corado para visualização de proteínas pelo método de prata (Blum *et al.*, 1987). O marcador de massa molecular utilizado foi o Low Range Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) contendo as seguintes proteínas: fosforilase B (112 KDa), albumina sérica bovina (81 KDa), ovalbumina (49,9 KDa), anidrase carbônica (36,2 KDa), inibidor de tripsina de soja (29,9 KDa) e lisozima (21,3 KDa).

3.4 - ATIVIDADE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES NATIVAS (PAGE)

Amostra contendo intestinos de *D. peruvianus* com o equivalente a 7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína foi submetida a uma separação eletroforética em gel 12% utilizando um equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) em placa fina (1 mm) em condições nativas (Laemmli, 1970). Os géis nativos não continham SDS e β -mercaptoetanol, assim como o tampão de amostra e o tampão de corrida. As eletroforeses foram realizadas a 100 V a 4 °C até que o azul de bromofenol (utilizado como indicador da mobilidade eletroforética), estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa.

A atividade da cisteína-proteinase foi monitorada em gel através do ensaio com o substrato específico. Após o fracionamento das proteínas, o gel foi incubado em banho-maria por 5 minutos a 30 °C utilizando como substrato o reagente fluorogênico Z-FR-MCA 1 mM em tampão MES 0,1 mM pH 6,0, EDTA 3 mM e cisteína 3 mM. O produto da atividade enzimática pode ser evidenciado em transiluminador de UV 312 nm (Manchenko, 1994) e posteriormente fotografado.

3.5 - DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Nos ensaios de atividade enzimática a mistura dos reagentes foi incubada a 30 °C por pelo menos quatro períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de enzimas) ou sem substrato (branco de enzima) foram feitos e tratados do mesmo modo que os experimentais. A atividade está expressa em mili unidades (mU), onde a unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de clivar 1 μmol de ligações por minuto.

O ensaio de cisteína proteinase foi realizado utilizando como substrato Z-FR-MCA 1 mM (inicialmente solubilizado em DMSO) em tampão MES 0,1 M pH 6,0 com 3 mM de EDTA e 3 mM de cisteína. O volume de reação foi de 1,2 mL e a reação foi interrompida com a adição de 0,2 mL de ácido acético 30%. Metil coumarina é liberada quando o substrato é hidrolisado e desta forma pode-se detectá-la através de sua fluorescência medida com a excitação a 380 nm e emissão a 460 nm (Alves *et al.*, 1996).

3.6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteína na amostra foi feita utilizando o método descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton e Evans (1992), usando curva padrão de albumina sérica bovina, nos casos de amostras que continham Triton X-100; ou o descrito por Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina de ovo.

3.7 - EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Os homogeneizados de intestino médio total e dos ventrículos separados (V1, V2 e V3) de *D. peruvianus* foram pré-incubados e ensaiados com vários inibidores a fim de verificar o efeito perante a atividade da cisteína-proteinase digestiva deste inseto. Os inibidores utilizados foram: E-64, um inibidor irreversível de cisteína-proteinases, 10 μM solubilizado em DMSO; pepstatina A, um inibidor reversível de aspártico-proteinases, 1 μM solubilizado em DMSO e PMSF, inibidor irreversível de serino-proteinases, 1 mM solubilizado em metanol. Além disso, foi feito um ensaio controle nas mesmas condições citadas anteriormente para testar uma possível interferência do metanol utilizado na solubilização do PMSF.

3.8 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PURIFICAÇÃO DE CISTEÍNA PROTEINASE

Para preparação do homogeneizado de cada ventrículo do intestino médio foram utilizadas fêmeas com 4-7 dias após emergência. Os insetos foram dissecados como citado anteriormente (item 3.3).

Cada lote de aproximadamente 20 ventrículos foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 20 mM contendo 1 mM de MMTS pH 8,0 com auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, seguida de centrifugação a 20.000 g por 30 minutos à 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante utilizado para homogeneização de mais um lote de 20 ventrículos, seguida de centrifugação a 20.000 g por 30 minutos à 4°C.

3.9 - CROMATOGRAFIAS

3.9.1 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Foi usada a coluna HiTrap Q XL (Pharmacia) de 1 mL. A coluna foi operada manualmente, sendo a cromatografia realizada a 4 °C dentro de uma câmara fria. As frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

O fluxo utilizado foi de aproximadamente 1 mL/min e as frações coletadas de 1,0 mL. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão Tris-HCl 20 mM contendo 1 mM de MMTS pH 8,0 antes das cromatografias. A amostra foi eluída com tampão Tris-HCl 20 mM contendo 1 mM de MMTS e 1 M de NaCl pH 8,0.

Esta coluna foi utilizada com a finalidade de retirar pigmentos e contaminantes da amostra, já que o próximo passo envolve uma coluna de filtração em gel, onde a presença de pigmento pode inviabilizar a utilização da coluna em pouco tempo de uso.

3.9.2 - CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

Foi usada a coluna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia). A coluna foi acoplada ao sistema de FPLC (Pharmacia Biotech), sendo a cromatografia realizada em temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm. As frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

A cromatografia foi realizada em tampão MES 100 mM contendo NaCl 0,2 M e MMTS 1 mM, pH 6,0, sendo o fluxo utilizado de 0,5 mL/min e as frações coletadas

de 0,3 mL. A coluna foi previamente equilibrada com 2 volumes de tampão antes das cromatografias.

3.9.3 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Foi usada a coluna Arginina-Sepharose 4B acoplada ao sistema Akta Prime Plus (Pharmacia), sendo a cromatografia realizada em temperatura ambiente. As frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

A cromatografia foi realizada em tampão MES 0,1 M contendo cisteína 3 mM, EDTA 3 mM, pH 6,0 sendo o fluxo utilizado de 1,0 mL/min e as frações coletadas de 1,0 mL. A amostra foi eluída com tampão MES 0,1 M contendo cisteína 3 mM, EDTA 3 mM e arginina 1 M, pH 6,0. A coluna foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão antes das cromatografias. A amostra aplicada na coluna foi diluída na ordem de 1:1 com tampão MES 0,2 M contendo cisteína 6 mM, EDTA 6 mM, pH 6,0 para retirada do MMTS presente na amostra, permitindo assim que os resíduos de cisteína ligassem na coluna. Toda fração foi coletada em tubos contendo tampão MES 0,5 M e MMTS 5 mM, pH 6,0.

3.10 - PURIFICAÇÃO DAS CISTEÍNA PROTEINASES DO VENTRÍCULO 2

O sobrenadante do homogeneizado seguido de centrifugação (vide item 3.2) do ventrículo 2 do intestino médio de *D. peruvianus* foi aplicado na coluna HiTrap Q XL (Pharmacia). As frações eluídas com maior atividade sobre o substrato Z-FR-MCA foram reunidas. Esse material foi concentrado de um volume de 2 mL para aproximadamente 200 µL com o auxílio do concentrador de amostra Amicon Ultra (Millipore). Esta amostra concentrada foi então aplicada na coluna de filtração em gel Superdex 75 (Pharmacia). Dois picos contendo atividade sobre Z-FR-MCA foram observados. Dessa forma, o primeiro pico foi chamado pico 1 e o segundo de pico 2. As frações do pico 1 foram reunidas, bem como as do pico 2 separadamente. Cada um destes dois picos foram separadamente diluídos da ordem de 1:1 no tampão MES 0,2 M contendo cisteína 6 mM, EDTA 6 mM, pH 6,0 e aplicados na coluna de afinidade Arginina-Sepharose (Pharmacia). Em cada uma das cromatografias foram obtidas frações que foram eluídas com tampão MES 0,1 M contendo cisteína 3 mM, EDTA 3 mM e arginina 1 M, pH 6,0 e apresentavam atividade sobre Z-FR-MCA.

3.11 - DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS PURIFICADAS

Essa determinação foi realizada usando preparações purificadas das cisteína proteinases de *D. peruvianus*. A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.8. O experimento foi realizado através de um ensaio de quatro tempos, sendo a inclinação da reta para cada ponto determinada. A atividade foi expressa em porcentagem da maior atividade obtida. Tanto os ensaios quanto a determinação de pH das misturas de substrato e tampão foram realizadas a 30 °C. Esse cuidado é necessário uma vez que a temperatura pode afetar a ionização de grupos presentes no tampão. Foi utilizado o tampão citrato-fosfato 100 mM, para o pH entre 3,6 e 4,6 e o tampão MES 0,1 M para o pH entre 5 e 8, todos contendo cisteína 3 mM e EDTA 3 mM.

3.12 - INATIVAÇÃO TÉRMICA

Inativação térmica das cisteína proteinases foi estudada incubando-se preparações purificadas das mesmas em banho-maria a 40 °C, seguindo-se a determinação da atividade remanescente após diferentes intervalos de tempo (5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30 minutos).

3.13 - ESTUDOS CINÉTICOS

Os ensaios cinéticos foram realizados usando preparações purificadas das cisteína proteinases 1 e 2 de *Dysdercus peruvianus*. Para determinação de K_m , a velocidade de hidrólise foi determinada usando pelo menos dez concentrações diferentes de substrato. As velocidades de hidrólise dos diferentes substratos foram determinadas e usadas para traçar o gráfico de Lineweaver-Burk. O programa Enzfitter (Elsevier Biosoft, Cambridge, UK) foi usado para determinar K_m e V_{max} .

3.14 - TITULAÇÃO COM TRANS-EXPOXYSUCCINIL-L-LEUCIL-AMIDO (4-GUANIDINO BUTANO) (E-64) DA CIS 1 E CIS 2 DO INTESTINO MÉDIO DO *D. PERUVIANUS*

A porção linear do plote da atividade contra a concentração de E-64 extrapola a concentração de E-64, o qual é equivalente à concentração total da enzima estudada. A atividade proteolítica no ponto de equivalência corresponde à concentração da enzima livre que é idêntica a concentração de E-64 livre. Sabendo a concentração total da enzima e a concentração da enzima livre, é possível determinar a concentração do complexo enzima-inibidor. A constante de dissociação

(K_d) do complexo cisteína proteinase–E-64 pode ser calculada pela equação: $K_d = [E][I]/[EI]$ (detalhes em Green e Work, 1953; Knight e Barrett, 1976). A atividade específica é calculada pela fórmula: *atividade específica* = A/nM , onde A é a atividade na alíquota titulada; n é o número de mols de enzima na alíquota titulada e M o peso molecular da enzima em mg.

3.15 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE INTESTINO DE *D. PERUVIANUS*

Apenas fêmeas de *D. peruvianus* bem alimentadas foram utilizadas para extração de RNA total do intestino médio.

A dissecação dos insetos foi feita utilizando tampão NaCl 215 mM preparado com água DEPC (dietilpirocarbonato), sendo que logo após serem retirados os intestinos foram congelados em gelo seco para evitar a ação de RNAses.

O RNA total de 10 intestinos de fêmeas de *D. peruvianus* foi extraído com o reagente Trizol (GIBCO-BRL). Durante 5 minutos 10 intestinos foram homogeneizados em 1 mL de Trizol em temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 11000 rpm por 10 minutos a 4 °C. À fase aquosa foi acrescentado 200 µL de clorofórmio. Após 15 segundos de agitação seguida de 3 minutos de incubação à temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 11000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde 250 µL de isopropanol e 250 µL de solução de precipitação (1,2 M de NaCl; 0,8 M de citrato trissódico e água DEPC) foram adicionados e por 10 minutos ficaram incubando a temperatura ambiente. Após 10 minutos de centrifugação a 11000 rpm por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em etanol 75%, centrifugado a 11000 rpm por 5 minutos a 4 °C, sendo que esta etapa foi repetida mais uma vez. Ao final da segunda lavagem com etanol 75%, o sedimento passou por um período de secagem no fluxo laminar por 3 minutos. O sedimento seco foi dissolvido em 100 µL de água tratada com DEPC com agitação manual freqüente à 65 °C.

Depois de feita a preparação, a qualidade do RNA foi checada através da razão de absorbância A_{260}/A_{280} nm, obtendo o resultado de 1,9 e através de gel de agarose 1,5%.

3.16 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DO INTESTINO MÉDIO DE *DYSDERCUS PERUVIANUS*

O RNA total extraído do intestino de *D. peruvianus* foi enviado para a empresa Vertis Biotechnologie AG, localizada na Alemanha com o propósito da construção da biblioteca de cDNA de expressão normalizada.

Partindo do RNA total enviado, a poli A+RNA foi purificada. Com a poli A+RNA foi sintetizada a primeira fita de cDNA utilizando um primer random-Xho1-linker e uma transcriptase reversa M-MLV-Rnase. A síntese da segunda fita foi feita utilizando um segundo primer e DNA polimerase Klenow. O NO-cDNA resultante foi então amplificado com 13 ciclos de LA-PCR (Barnes, 1994).

Depois de obtida a normalização do cDNA amplificado, este foi clonado e inserido no vetor Lambda Uni ZAP[®].

Este vetor permite uma excisão, *in vivo*, simples e eficiente e a recircularização de qualquer inserto contido dentro do vetor lambda para formar um fagomídeo contendo o inserto (Ausubel *et al.*, 1990). Esse processo de excisão depende da localização da seqüência de DNA dentro do fago e da presença de uma variedade de proteínas como, por exemplo, as M13. As proteínas M13 do fago reconhecem a região do DNA que normalmente serve como origem de replicação. Esta origem pode ser dividida em duas partes: o sítio de iniciação e o sítio de término para a síntese de DNA (Sambrook *et al.*, 2001). O fago lambda se faz acessível às proteínas M13 pela infecção simultânea das células XL1-Blue MRF' com o vetor lambda e o fago "helper EX Assist". Dentro dessas bactérias as proteínas M13 reconhecem a região iniciadora do DNA dentro do vetor lambda e uma nova fita de DNA é sintetizada e duplicada. A síntese dessa nova fita continua passando pelo inserto clonado e pelo gene de resistência à ampicilina, até o sinal de término que se encontra no vetor lambda. Essa fita simples de DNA é circularizada e empacotada pelo produto do gene II do fago Helper na forma de fagomídeo, que é em seguida secretado pelas células XL1-Blue MRF'. Posteriormente à secreção das partículas do fago, as bactérias usadas no processo de excisão do clone de cDNA são mortas por aquecimento à 70 °C e o fago lambda é lisado, mas o fagomídeo não é afetado pelo aquecimento. As células SOLR são infectadas com o fagomídeo e podem ser plaqueadas para a formação de colônias. As colônias formadas a partir do fagomídeo pBluescript foram amplificadas por PCR e submetidas à seqüenciamento.

3.17 - LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA A PLASMÍDEOS VETORES

A clonagem de fragmentos de DNA obtidos de ampliações por PCR, foram clonados no plasmídeo pGEM-T, utilizando o Kit de ligação pGeneT-Easy vector Sistem I (Promega). A reação de ligação consistia de T4 DNA ligase, 1µg de plasmídeo juntamente com o fragmento de PCR (purificado de géis de agarose) a ser clonado no tampão apropriado. Esta mistura foi incubada por 16 h a 4 °C. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes.

3.18 - PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES

Um pré-inóculo de *Escherichia coli* da linhagem XL1-blue foi preparado a partir de uma colônia isolada, crescida em meio LB líquido durante 16 h, a 37 °C e sob agitação de 250 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado a 400 mL de meio LB líquido e mantido nas condições anteriormente descrita de crescimento até obter uma $A_{600} = 0,3$. A cultura foi mantida no gelo por 10 min. Este material foi submetido a várias centrifugações e o precipitado que continha as células em cada centrifugação foi ressuspensionado em tampão PIPES 10 mM, pH 7, contendo CaCl_2 60 mM e glicerol 15% (v/v). As condições de centrifugação foram as seguintes: (a) centrifugação a 1.600x g, por 7 min a temperatura ambiente, precipitado ressuspensionado em 10 mL de tampão. (b) centrifugação a 1.000x g, por 5 min a temperatura ambiente, precipitado ressuspensionado em 10 mL de tampão, esta ressuspensão foi mantida no gelo por 30 min. (c) centrifugação a 1.000x g, por 5 min a temperatura ambiente, precipitado ressuspensionado em 2 mL de tampão. Finalmente, o sobrenadante final foi alíquotado e estocado a -80 °C.

3.19 - TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Foram utilizados 30 µl das células competentes XL1-blue (ver 3.18) para serem transformadas com 10 µl da reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor. Esta mistura foi mantida no banho de gelo por 30 min e imediatamente submetida a um choque térmico a 42 °C por 90 seg, retornando ao gelo por 3 min. Adicionou-se 200 µL de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo pGeneT-Easy vector). Finalmente, as células foram plaqueadas em LB ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina; 100 µL de IPTG 100 mM e 50 mg/mL X-gal,

incubadas a 37 °C por 16 horas. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto originaram colônias de cor brancas.

3.20 - SEQÜENCIAMENTO AO ACASO DA BIBLIOTECA DE CDNA

3.20.1 - EXCISÃO *IN VIVO* DO PLASMÍDEO BLUESCRIPT

Células XL1-Blue MRF' e SOLR foram crescidas em LB líquido suplementado com maltose 0,2% (p/v) e MgSO₄ 10 mM durante 16 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida as células foram precipitadas por centrifugação (2.000 g por 5 minutos a 8 °C) e ressuspensas em uma solução de MgSO₄ 10 mM até obter uma A₆₀₀ de 1.0 (8 x 10⁸ células/mL).

Em seguida, foram combinados 10⁷ pfu da biblioteca em fago λ Zap II (1μL) com 10⁸ de XL1-Blue MRF' e 10⁹ pfu de fago "helper EX Assist". Nesse passo proteínas codificadas pelo fago "helper" reconhecem especificamente regiões do DNA do fago λ Zap II e promovem a excisão e circularização de uma fita simples de DNA que contém as seqüências do plasmídeo Bluescript e o inserto de cDNA contido no clone de interesse. Essa mistura foi então incubada a 37 °C por 15 minutos e logo em seguida foi acrescentado LB líquido para incubação por 3 horas a 37 °C com agitação para que o plasmídeo fosse então encapsulado pelas proteínas do fago "helper" e eliminado pelas células XL1-Blue MRF'. Para purificar os fagos, a cultura foi incubada a 70°C por 20 minutos, período suficiente para matar células XL1-Blue MRF' presentes no meio. Finalmente, esse material foi centrifugado (2.000 g por 10 minutos a 8 °C) e o sobrenadante, contendo os fagos carregando o plasmídeo pBluescript e fagos λ Zap II, recuperados.

Para finalizar, as células SOLR foram transformadas com o plasmídeo pBluescript. Para isso 200 μL de células SOLR foram incubadas com 1 μL da preparação de fagos obtida no passo anterior. Após 15 minutos de incubação a 37 °C essas células foram plaqueadas em meio LB agar contendo carbenicilina (50 μg/mL), X-gal (50 mg/mL) e IPTG 100 mM. As placas foram incubadas por 16 h a 37°C.

Durante esse procedimento, os fagos "helper EX Assist" infectam as célula SOLR, mas não são capazes de crescer. Essas células são selecionadas negativamente em meios contendo carbenicilina e X-gal. Os fagos λ Zap II não são capazes de infectar as células SOLR. Células infectadas pelos fagos "helper

ExAssist” contendo como material genético o plasmídeo pBluescript são selecionadas positivamente em meios contendo carbenicilina e X-gal.

3.20.2 - CRESCIMENTO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS EM LB LÍQUIDO E PCR DE COLÔNIA

As colônias isoladas obtidas no meio LB agar contendo carbenicilina, X-gal e IPTG foram crescidas em placas de 96 poços durante 16 h a 37 °C sem agitação em meio LB líquido também contendo carbenicilina (50 µg/mL).

Posteriormente com auxílio de um carimbo de replicação parte das bactérias que cresceram no meio líquido foram transferidas para uma placa de PCR para realização do PCR de colônia e ao restante foi acrescido glicerol 30% e então armazenadas a -80 °C. A reação de PCR de colônia foi realizada em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,4, contendo KCl 50 mM; gelatina 0,01% (p/v); Triton X-1000, 1% (p/v); MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; 0,5 mM de cada iniciador utilizado; 5 U de taq DNA Polimerase. Esta reação foi incubada a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos como descrito a seguir: 30 segundos a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 30 segundos a 55 °C para o pareamento dos iniciadores e finalmente 3 minutos a 68 °C, para o alongamento da fita complementar de DNA.

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose escolhendo aleatoriamente algumas amostras. Os géis foram preparados na concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-acetato 8 mM; EDTA 0,4 mM, pH 8,0) e as amostras de DNA foram resolvidas com uma diferença de potencial de 80-100V. O tampão de amostra (2:5 volumes de amostra) contendo azul de bromofenol, utilizado na eletroforese, foi usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese.

Após a eletroforese, o DNA foi evidenciado utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

3.20.3 - SEQÜENCIAMENTO DOS cDNAs

Os produtos do PCR de colônia após terem sido verificados aleatoriamente através de gel de agarose foram utilizados na reação de seqüenciamento. Com auxílio do carimbo de replicação, o produto do PCR de colônia foi carimbado em uma placa de PCR contendo a mistura para reação de seqüenciamento, usando o

iniciador T7. A reação de seqüenciamento foi realizada usando o produto do PCR de colônia; 3 µL de iniciador na concentração de 3,3 pmol/µL; 2 µL de “Terminator Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer); 3 µL de tampão Tris-HCl 200mM, pH 9 contendo MgCl₂ 5 mM, para um volume final de 15 µL. A reação foi realizada na máquina da Perkin-Elmer com 35 ciclos que consistiam de: 96 °C por 45 segundos; 50 °C por 30 segundos; 60 °C por 4 minutos. As amostras foram seqüenciadas pelo serviço de seqüenciamento de cDNA, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, utilizando um seqüenciador automático ABI373A (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

3.20.4 - ANÁLISE E MONTAGEM DOS ESTS

As seqüências foram processadas em um computador Pentium D 3.00 GHz rodando sobre o sistema operacional Linux (Debian Testing com kernel 2.6) com os programas Phred, Phrap e Consed Linux 2.6 (Ewing e Green 1998a e 1998b; Gordon *et al.*, 1998) compilados, cujas licenças de uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Eletroferogramas gerados no seqüenciador foram convertidos em seqüências, as quais foram aparadas, extirpando-se extremidades de baixa qualidade, e as regiões seqüenciadas de vetor foram mascaradas. Em seguida ao processamento, as seqüências foram alinhadas, separando as que se sobrepõe em contíguos e as isoladas (singletos).

As seqüências obtidas foram comparadas com a base de dados não redundante (nr) do GenBank e Swissprot através da ferramenta de biologia molecular Blast Client 3, software distribuídos pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando o algoritmo Blastx, com matriz BLOSUM 62 e parâmetros padrão (Altschul *et al.*, 1990; Wheeler *et al.*, 2000). Este algoritmo compara a seqüência de nucleotídeos traduzida em todos os quadros de leitura com as proteínas presentes em um banco de dados. Após comparação com a base de dados é gerado um arquivo de saída com a análise de cada seqüência comparada. A similaridade com a seqüência do banco de dados é avaliada por dois parâmetros: a nota, SCORE, que pontua o número de coincidências entre as bases da seqüência estudada com as bases da seqüência presente no banco de dados; e o E-VALUE, que avalia a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso.

Além disso, uma segunda anotação dos genes foi feita de acordo com a classificação do GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org>), que descreve, quando possível três categorias para o mesmo produto gênico: função molecular, processo biológico e componente celular.

3.21 - OBTENÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTENDO INSERTOS DE PROTEÍNAS INTERESSANTES

Após análise de 1053 seqüências, incluindo montagem de contíguos, algumas foram selecionadas, para dar início ao estudo da transcrição específica (ou preferencial) nos diferentes tecidos averiguada por RT-PCR semiquantitativo.

As colônias transformadas de interesse foram selecionadas para serem crescidas em 3 ml de meio LB-líquido a 37 °C sob agitação de 250 rpm, durante 16 horas. A partir destas culturas de bactérias foram extraídos os plasmídeos usando o protocolo "Wizard Miniprep" (Promega). As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e ressuspensas em 200 µl de tampão de ressuspensão (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase 100 µg/ml). Após incubação por 5 min a temperatura ambiente foi realizada a lise alcalina das bactérias, adicionando 200 µl de solução de lise (NaOH 0,2 M; SDS 1% (p/v)), agitando suavemente e incubando novamente por 5 min a temperatura ambiente, seguido de adição de 200 µl de tampão de neutralização (acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8). Este material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi aplicado em mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna foi lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 µM e etanol 55% (p/v) para a retirada do material contaminante. A eluição dos plasmídeos pela coluna foi realizada com água Milli Q pH 7,0.

Os plasmídeos que continham os fragmentos de interesse foram seqüenciados baseados no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com a utilização de didesoxirribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977), usando os iniciadores T7 e T3, que pareiam na região do vetor.

3.22 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE DIFERENTES TECIDOS DE *D. PERUVIANUS*

Apenas fêmeas de *D. peruvianus* bem alimentadas foram utilizadas para extração de RNA total.

A dissecação dos insetos foi feita utilizando tampão NaCl 215 mM preparado com água DEPC 0,01% (dietilpirocarbonato), sendo que logo após serem retirados os intestinos foram congelados em gelo seco para evitar a ação de RNases.

O RNA total de aproximadamente 15 de fêmeas de *D. peruvianus* das regiões: intestino médio, corpo gorduroso, glândula salivar, túbulo de Malpighi, V1, V2 e V3 do intestino médio foram extraídos com o reagente Trizol (GIBCO-BRL) (metodologia usada 3.18).

3.23 - ELETROFORESE DE RNA EM GEL DE AGAROSE CONTENDO FORMALDEÍDO

Cerca de 400 ng de RNA total em água DEPC foram misturados com 3 volumes de tampão de amostra [formamida 65% (v/v), MOPS 10X 12% (v/v), formaldeído 8%(v/v), azul de bromofenol 3% (p/v) e brometo de etídeo 0,5 mg/mL preparados em água DEPC] imediatamente antes da aplicação em gel de agarose contendo formaldeído [agarose 1,25% (p/v), MOPS 1x contendo 16% (v/v) de formaldeído adicionado após fusão da agarose]. A solução de MOPS 10 X corresponde a: MOPS Free Acid 4,1% (p/v), acetato de sódio 0,4% (p/v) e EDTA 0,028% (p/v) e a água DEPC corresponde a água previamente tratada com dietilpirocarbonato como descrito em Ausbel *et al.*, 1990. A eletroforese foi realizada a 40-60 V em aparato livre de contaminação com RNases.

3.24 - RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

RNA total foi extraído de intestino médio, corpo gorduroso, glândula salivar, túbulo de Malpighi, V1, V2 e V3 do intestino médio através do mesmo procedimento descrito em 3.26. As reações de RT-PCR (PCR precedida de transcrição reversa) foram realizadas com reagentes do kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)* de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante. A etapa de transcrição reversa foi realizada a partir de amostras de RNA total previamente tratadas com DNase I (*Invitrogen Life Technologies*) (para eliminar eventual contaminação de DNA genômico da preparação) utilizando-se o iniciador oligo (dT)₁₂₋₁₈ na síntese da primeira fita. Em seguida, a etapa de amplificação do cDNA foi realizada utilizando oligonucleotídeos (Tabela 1) que foram desenhados de acordo com cada seqüência de interesse selecionadas no seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNAs do intestino médio do *Dysdercus peruvianus*.

A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*) em reações de 50 μ L contendo oligonucleotídeos 10 mM, dNTP mix 10 mM, tampão da *Taq* DNA Polimerase, $MgCl_2$ 1,5 mM e DNA molde. As reações foram realizadas em termociclador (*Perkin Elmer*) com desnaturação inicial por 2 minutos a 94 °C, seguida de 35, 30, 25 ou 20 ciclos como descrito a seguir: 45 segundos a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 30 segundos a 53 °C para o pareamento dos iniciadores e finalmente 2 minutos a 72 °C, para o alongamento da fita complementar de DNA. Para o cálculo da temperatura de pareamento dos iniciadores foi utilizada a seguinte equação: $T_m(^{\circ}C) = 2.(A+T)+4.(G+C)$.

Os produtos do RT-PCR semiquantitativo foram analisados através de eletroforese em gel de agarose.

TABELA 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para realização do RT-PCR semiquantitativo

Oligonucleotídeo	Seqüência de DNA
Aminopeptidase	
Forward primer	5'-CTGAGGGGCAGTTTCAAGAG-3'
Reverse primer	5'-GCTTCCTTTAGGCAGCCTTT- 3'
Beta-glicosidase	
Forward primer	5'-GGAGGGACAATTTGGCTTTT-3'
Reverse primer	5'-TTGCAAGAGCAAAGAAGCA-3'
Alfa-glicosidase 1	
Forward primer	5'-GCCAGATATGGTCGGAGGTA-3'
Reverse primer	5'-GGTGCGTCGTGTCCTTAAAT-3'
Alfa-glicosidase 2	
Forward primer	5'-ACCGTTGATAACGGCAGAAC-3'
Reverse primer	5'-TCGGTGACTGCTTGTGCTAC-3'
DpCaL 1	
Forward primer	5'-GGCAGAGGACGAGACAGAAC-3'
Reverse primer	5'-ACACTGAGCCGAGCTGTTTT-3'
DpCaL 2	
Forward primer	5'-GGCAGAGGACGAGACAGAAC-3'
Reverse primer	5'-CTGATTCCAGTGGCAAACCT-3'

Oligonucleotídeo	Seqüência de DNA
DpCaL 3	
Forward primer	5'-GGCAGAGGACGAGACAGAAC-3'
Reverse primer	5'-CGGGTGCTTTGTATTCAGGT-3'
DpCaL 4	
Forward primer	5'-TCGTACGAGCAGTCCATCAG-3'
Reverse primer	5'-ACAAAGGGACGCATTGAAAC-3'
Transportador de açúcar	
Forward primer	5'-CGACCATTGTTTCAGTGTGG-3'
Reverse primer	5'-TAGGAGCCATGGAATCGAAC-3'
rRNA1	
Forward primer	5'-TGGTGCATGGAATAATGGAA-3'
Reverse primer	5'-GCTTTCGCTCTAGTGCGTCT-3'
rRNA2	
Forward primer	5'-CGGTGAAATTCTTGGATCGT-3'
Reverse primer	5'-ACCCAAAAGCTTTGGTTTCC-3'

3.25 - MEDIDA *IN VIVO* DA ABSORÇÃO DE ÁGUA E GLICOSE NO VENTRÍCULO 1 DO INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Grupos de 7 a 10 fêmeas após passarem 10 dias em jejum foram submetidas à privação de água por aproximadamente 12 horas. Em seguida estas fêmeas foram imobilizadas, com ajuda de fita Fisher®, em um aparato montado numa caixa de isopor. Seus estiletes foram inseridos em capilares, que estavam dentro de Eppendorfs, preenchidos com solução do corante azul de Evans 0,02% (p/v), contendo glicose 200 mM e glicerol 20 mM (Figura 2). Os animais permaneceram ingerindo essa solução durante 20 minutos, e após diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos) e a temperatura ambiente (26 °C), grupos foram dissecados e volumes conhecidos dos conteúdos luminiais de V1 foram coletados e levados para 1,0 mL com água bidestilada. A concentração de azul de Evans foi calculada a partir de leituras de absorbância a 610 e 800 nm. Como o corante não absorve a 800 nm, enquanto a 610 nm sua absorbância é máxima, as leituras a 800 nm devem ser proporcionais à turbidez das amostras, sendo usadas para corrigir as leituras de absorbâncias a 610 nm das amostras coletadas, levando em conta a razão entre as leituras a 610 e 800 nm (A_{610}/A_{800}) dos controles. Esses foram feitos com animais, para os quais as soluções oferecidas não continham o corante.

Finalmente, a massa de azul de Evans nos conteúdos de V1 foi calculada a partir das leituras corrigidas de absorbância a 610 nm.

A absorção de glicose a partir do conteúdo luminal de V1 foi estudada usando o mesmo tratamento dos animais como descrito acima para a absorção de água. A quantidade de glicose nos conteúdos foi determinada pelo método de Dahlqvist (1968). Glicose remanescente no conteúdo de V1 foi expressa através da razão entre as massas de glicose e azul de Evans a diferentes intervalos de tempo após o início da alimentação. Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado com a adição de inibidores de transportadores de glicose: floretina (inibidor de GLUT2) 0,2 mM e Florizina (inibidor de SGLT1) 0,1 mM. Além disso, foi também adicionado 50 mM de sulfato de potássio (K_2SO_4) e 50 mM de sulfato de sódio (Na_2SO_4) 50 mM para analisar um possível cotransporte com estes íons.

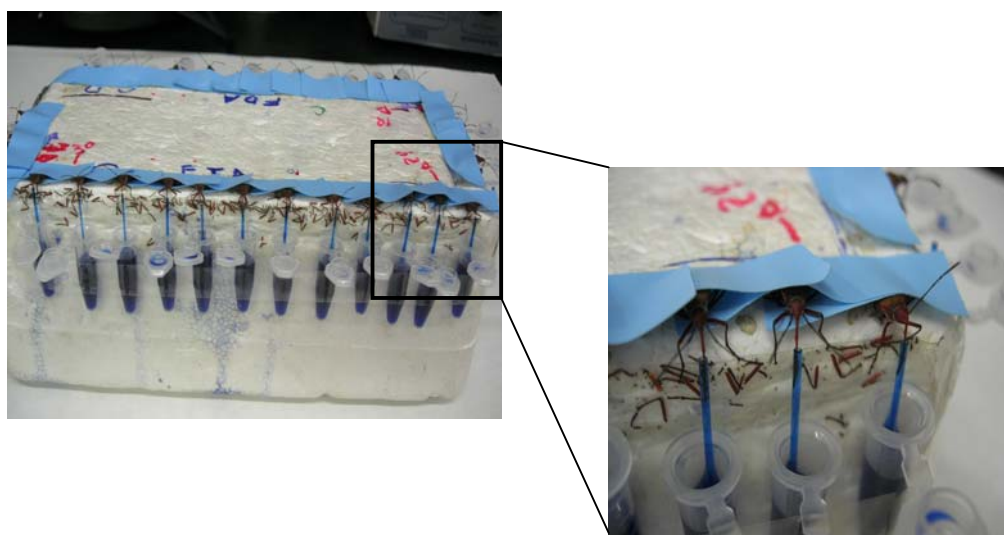


FIGURA 2 - *Dysdercus peruvianus* sugando solução oferecida após passar por jejum e abstinência de água.

Eppendorfs contendo solução de corante azul de Evans 0,02% (p/v), glicose 200 mM e glicerol 20 mM.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDO DAS CISTEÍNA PROTEINASES DIGESTIVAS DO INSETO *DYSDERCUS PERUVIANUS*

4.1 - DISTRIBUIÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA E ATIVIDADE TOTAL DA CISTEÍNA-PROTEINASE EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS INTESTINAIS

A atividade de cisteína-proteinase pôde ser medida e observada através de ensaios enzimáticos em tubos (Figura 3) além de ensaios em gel de poliacrilamida (Figura 4) nos três ventrículos. A fim de ter uma exata medida de atividade específica desta proteinase, foram feitas medidas de atividade com o substrato Z-FR-MCA e quantificação de proteínas separadamente nos três ventrículos tendo o cuidado de separar o epitélio intestinal do conteúdo luminal do intestino médio de *D. peruvianus* (Figura 3).

No epitélio há pouca atividade de cisteína-proteinase quando comparamos com a atividade no conteúdo luminal nos três ventrículos (Figura 3). Se compararmos os três ventrículos entre si, verificamos que V2 luminal é a região do intestino médio com maior atividade específica (14.500 U/mg de proteína) de cisteína-proteinase, seguido por V3 (9.000 U/mg de proteína) e V1 (515 U/mg de proteína) (Figura 3).

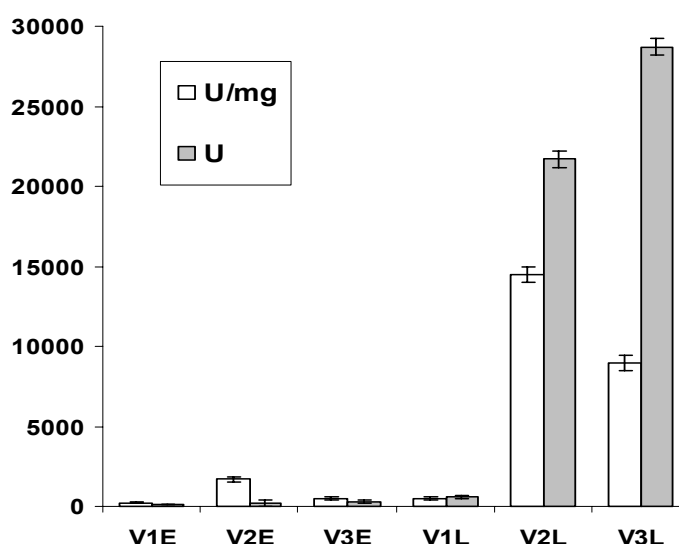


FIGURA 3 - Atividade específica e total de cisteína-proteinase nas diferentes regiões do intestino médio de *D. peruvianus*.

Fêmeas adultas do inseto praga *D. peruvianus* foram dissecadas separando-se o epitélio intestinal do conteúdo luminal dos três ventrículos do intestino médio. O ensaio de

atividade de cisteína proteinase foi realizado com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA e a quantificação de proteína foi feita com BCA . V1E, V2E e V3E correspondem ao epitélio intestinal dos ventrículos 1, 2 e 3; V1L, V2L e V3L correspondem ao conteúdo luminal intestinal dos ventrículos 1, 2 e 3. Barras brancas correspondem a atividade específica, barras cinzas correspondem a atividade total. Os dados são médias e desvio padrão da média de 3 preparações obtidas a partir de 20 animais cada.

4.2 - VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE DE CISTEÍNA-PROTEINASE EM GEL DE ELETROFORESE

Análise da atividade enzimática através de eletroforese em gel para observação de atividade de proteinases é útil, pois permite uma rápida separação e detecção de atividades enzimáticas em extrato biológico bruto, sendo uma ferramenta valiosa no estudo de vários sistemas enzimáticos (Gabriel e Gersten, 1992). Uma das vantagens deste método inclui a possibilidade de se detectar atividade proteolítica em homogeneizado do intestino do inseto sem que haja necessidade de purificação preliminar.

Os intestinos médios das fêmeas adultas e alimentadas de *D. peruvianus* foram separados em ventrículo 1 (porção dilatada), ventrículo 2 (porção alongada) e ventrículo 3 (porção oval). Após estas regiões serem homogeneizadas e centrifugadas, e passarem por processos descritos em materiais e métodos (item 3.2), os homogeneizados resultantes foram submetidos a uma eletroforese nativa e posterior ensaio em gel para verificação de bandas fluorescentes. Foi observado um padrão diferente de bandas nas três regiões (Figura 4). No ventrículo 1, há uma banda de menor mobilidade eletroforética que está presente também no ventrículo 2, mas não está presente no ventrículo 3 (banda 1, Figura 4). Em V2, além da banda de menor mobilidade eletroforética observa-se também uma banda mais intensa de maior mobilidade, sendo que esta última está presente em V3 também (banda 2, Figura 4). Finalmente em V3, há a mesma banda majoritária que aparece em V2 e uma segunda banda de menor migração menos intensa, mas que está somente presente neste ventrículo (banda 3, Figura 4).

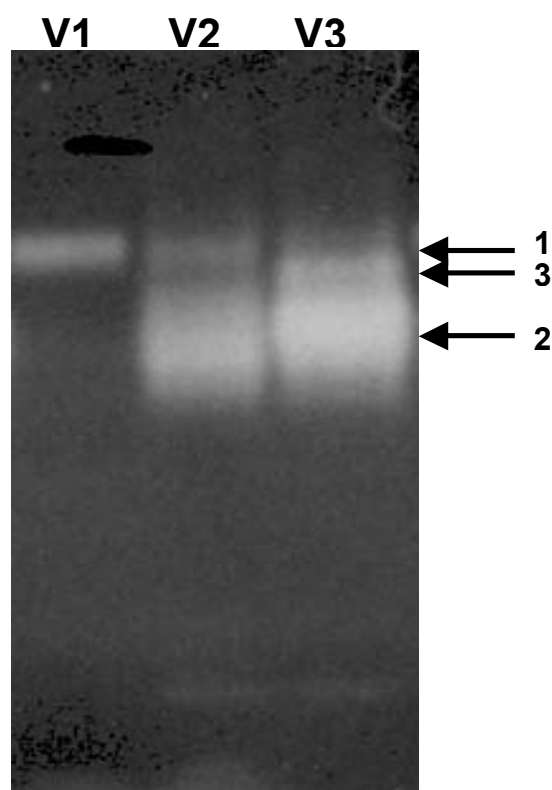


FIGURA 4 - Ensaio em gel de poliacrilamida revelando os padrões de cisteína-proteinase nos diferentes ventrículos em fêmeas adultas de *Dysdercus peruvianus* alimentadas com sementes de algodão.

Amostras contendo o equivalente a 9 intestinos/mL foram homogeneizadas, centrifugadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% nativo-. Em cada raia foi aplicado 30 μ L de amostra com a quantidade adequada de tampão de amostra. Após a migração, a atividade de cisteína-proteinase foi ensaiada com Z-FR-MCA e visualizada sob luz UV, como está detalhada em materiais e métodos. Embora Z-FR-MCA seja também substrato para tripsina, esta enzima não ocorre nos ventrículos de *D. peruvianus* (Figura 5 e texto).

4.3 - CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE CISTEÍNA-PROTEINASE COMO A PROTEINASE MAJORITÁRIA INTESTINAL DE *D. PERUVIANUS*

A classe mecanística da qual a proteinase pertence é determinada a partir de características *in vitro* que incluem a sensibilidade por vários inibidores específicos. Um dos inibidores mais comuns que vem sendo utilizado para diagnóstico e caracterização de cisteína-proteinase é o E-64 (Beynon e Salvesen, 1989; Barrett, 1994). Originalmente isolado de culturas de *Aspergillus japonicus* (Hanada *et al.*, 1978), E-64 é um inibidor não competitivo, irreversível de proteinases que possuem um grupo tiol das famílias papaína e calpaína (Hanada *et al.*, 1978; Barrett *et al.*, 1982; Parkes *et al.*, 1985). Como havia sido assumida a especificidade de E-64 por cisteína-proteinase, este inibidor foi largamente utilizado na caracterização de proteinases digestivas de diversas fontes biológicas, incluindo insetos. Em Coleoptera e Hymenoptera, onde a cisteína-proteinase tem participação digestiva majoritária, E-64 inibiu a atividade proteolítica tanto *in vitro* (Murdock *et al.*, 1987; Wolfson e Murdock, 1990) quanto *in vivo* (Hines *et al.*, 1990). Além disso, foi visto que E-64 é ineficaz em inibir atividade proteolítica em insetos que possuem serina proteinases, tais como Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Diptera (Wolfson e Murdock, 1990; Purcell *et al.* 1992; Christeller *et al.*, 1992).

Depois de observado que E-64 não inibe algumas proteinases tais como serina, metalo e aspártico-proteinases (Hanada *et al.*, 1978; Barrett *et al.*, 1982) fazendo deste inibidor específico para cisteína-proteinases, Sreedharan e colaboradores (1996) observou que tripsina bovina quando ensaiada com BapNa é inibida por E-64 através de um mecanismo reversível.

Além disso, em estudos realizados com diversas espécies de Lepidoptera (Ortego *et al.*, 1996), foi observado a inibição de tripsina, uma serino proteinase, quando esta é ensaiada com os substratos BapNa e BAEE e dependendo da espécie estudada, pode-se também observar inibição por E-64 quando a tripsina é ensaiada com substrato protéico, assim como Lee e Anstee (1995) observaram ao ensaiar tripsina de *Spodoptera littoralis* com BapNa. Vale ressaltar que a concentração de E-64 utilizada para inibir cisteínas proteinases é dez vezes menor do que a utilizada para inibir serino proteases.

Desta forma, a opção de ensaiar outros inibidores específicos para serino-proteinase (PMSF) e aspártico-proteinase (pepstatina A) se fez necessário, a fim de confirmar o resultado obtido da inibição com E-64 verificada nos ensaios com

homogeneizados dos ventrículos (V1, V2 e V3) no intestino médio de *D. peruvianus*. Podemos observar que na figura 5 os três ventrículos foram inibidos por E-64 e permaneceram com atividade nos inibidores para proteinases serínicas e aspárticas. Como há uma pequena inibição observada quando os ventrículos são ensaiados com PMSF, que foi solubilizado em metanol, foi necessário fazer um controle contendo somente o metanol, podendo-se observar que a inibição visualizada era na verdade decorrente da presença de metanol.

A ausência de inibição da atividade proteolítica, ao se usar inibidores de aspártico (pepstatina A) e serina-proteinases (PMSF) (Figura 5), é um forte indício de que a cisteína-proteinase seja a principal protease digestiva de *D. peruvianus*, estando também de acordo com dados da literatura (Silva e Terra, 1994).

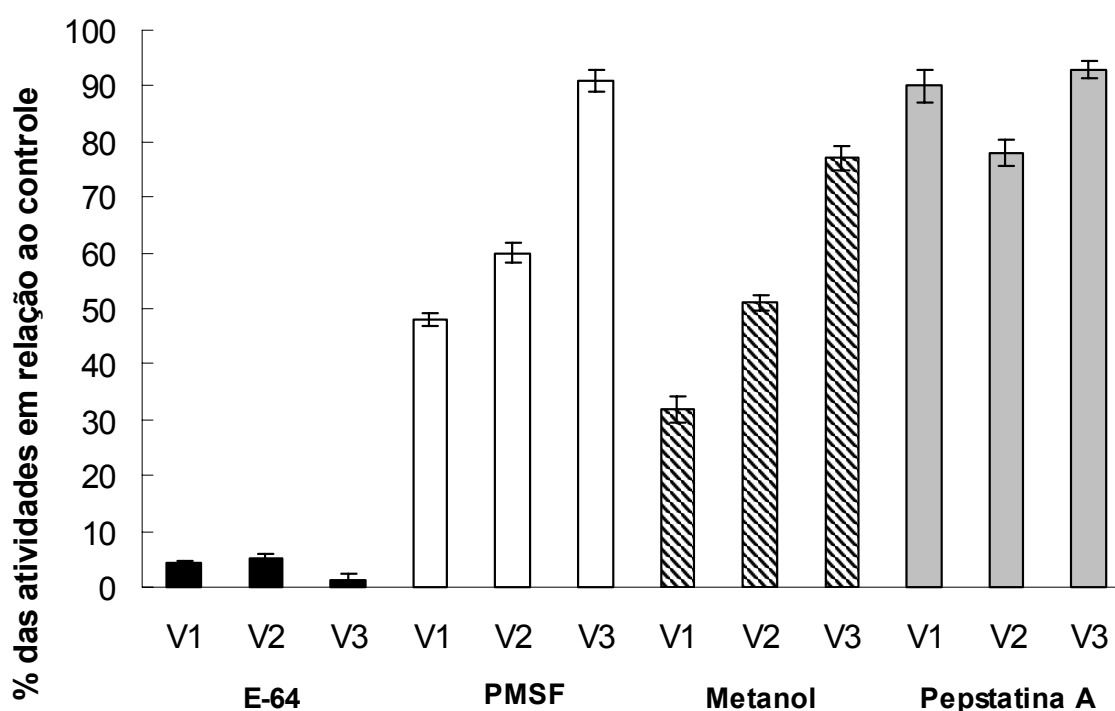


FIGURA 5 - Porcentagem das atividades de V1, V2 e V3 na presença de diferentes inibidores em relação ao controle.

Inibidores de proteinases usados: E-64 10 μ M, PMSF 1 mM, metanol 1% (p/v) e pepstatina 1 μ M. Os dados são médias e desvio padrão da média de 3 preparações obtidas a partir de 20 animais cada.

4.4 - A ESTABILIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA CISTEÍNA-PROTEINASE *IN VITRO*

Como o ventrículo 2 apresentou maior atividade específica de cisteína proteinase (Figura 3), esta região foi escolhida para a tentativa de purificação da proteinase.

Cisteína proteinases são difíceis de isolar, purificar e caracterizar cineticamente devido a freqüente autólise observada nos passos iniciais e finais de purificação. Com o intuito de impedir a autólise nós utilizamos primeiramente cloreto de mercúrio, um composto largamente utilizado para impedir autólise de cisteína proteinase. Observamos, no entanto, que parte da cisteína do intestino médio do inseto estava sendo precipitada e, portanto perdida durante a homogeneização. Dessa forma o cloreto de mercúrio foi substituído por metil metanossulfonato (MMTS), que passou a ser utilizado tanto na homogeneização dos ventrículos quanto nos tampões de cromatografia. O MMTS reage com grupos SH modificando-os para -S-S-CH₃, o que inativa a proteinase. Subsequentemente, tratando a proteinase com cisteína são restabelecidas sulfidrilas originais e a atividade. Foi observado que os ventrículos que foram homogeneizados com MMTS, após terem sido congelados por 24h e descongelados para posterior medida de atividade, tiveram sua atividade de cisteína proteinase mantida, ao contrário dos ventrículos que foram homogeneizados apenas com água bidestilada (Figura 6). A atividade de cisteína proteinase do ventrículo 1 não foi alterada na ausência ou na presença de MMTS, ao contrário de V2 e V3 que, respectivamente, conservam 100% e 68% da atividade relativa quando homogeneizados com MMTS. Na ausência de MMTS V2 apresentou apenas 20% de sua atividade remanescente e V3 19% (Figura 6)

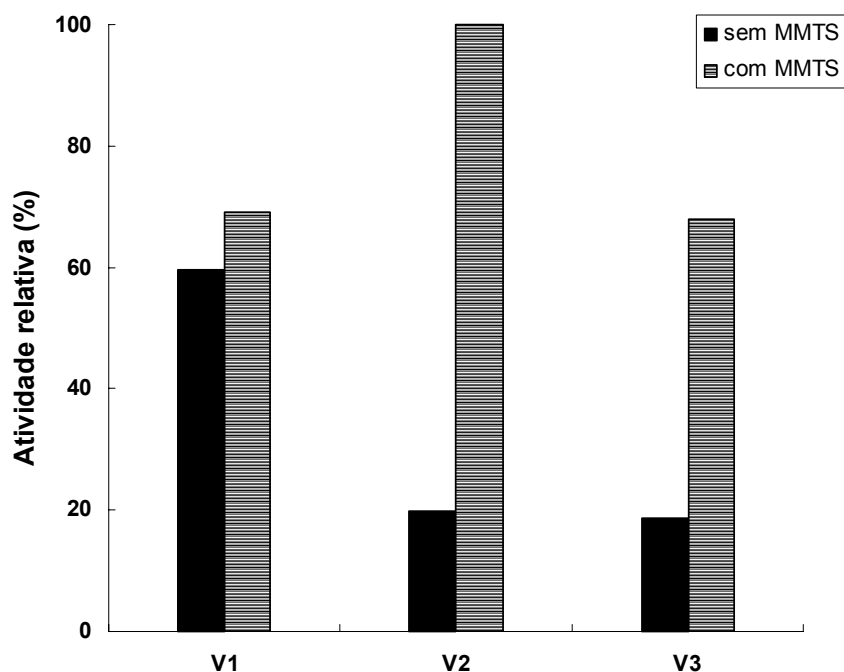


FIGURA 6 - Porcentagem da atividade total remanescente nas três regiões do intestino médio do *D. peruvianus* após congelamento e descongelamento da amostra tratada ou não com MMTS.

Barras escuras correspondem à porcentagem da atividade total remanescente dos homogeneizados sem MMTS; barras hachuradas correspondem a porcentagem da atividade total remanescente dos homogeneizados com MMTS.

4.5 - PURIFICAÇÃO DE DUAS CISTEÍNAS-PROTEINASES DO VENTRÍCULO 2 DO INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Para impedir grandes perdas de atividade da cisteína proteinase ao longo da marcha de purificação, a homogeneização do ventrículo 2 do *D. peruvianus* foi feita em solução contendo MMTS. Após centrifugação, o sobrenadante foi aplicado manualmente dentro de uma câmara fria em uma coluna HiTrap Q de 1 mL, para retirada de pigmentos. Como o próximo passo envolve uma coluna de filtração em gel (Superdex 75) e esta possui um limite de volume permitido a ser aplicado (250 μ L), optou-se em concentrar a amostra eluída da troca aniônica. A recuperação da atividade enzimática após a concentração é quase total. Após a concentração, a amostra foi cromatografada em uma coluna Superdex 75, onde foram separados dois picos de atividade de cisteína proteinase (Figura 7A). A enzima eluída nas

frações 38 e 39 correspondentes ao pico 1, foi denominada cisteína proteinase 1, e a enzima eluída na fração 44 referente ao pico 2, foi então denominada cisteína proteinase 2. O enriquecimento observado para a cisteína proteinase 1 durante esse passo foi de 4,8 vezes e a recuperação da atividade enzimática foi de 1,14% com relação ao material inicial, já o enriquecimento observado para a cisteína proteinase 2 foi de 11,4 vezes e a recuperação da atividade enzimática foi de 0,8% com relação ao material inicial (Tabela 2). Os dois picos separadamente foram cromatografados em uma coluna de afinidade montada a partir da resina Arginina-Sepharose. A amostra correspondente ao pico 1 da filtração em gel depois de ser aplicada na coluna de afinidade foi eluída desta em um único pico com 1,0 M de arginina (Figura 7B). A recuperação da atividade enzimática aplicada foi de 52% e obtido um enriquecimento de mais de 400 vezes em relação ao material anterior. A amostra correspondente ao pico 2 da filtração em gel depois de ser também aplicada na coluna de afinidade foi eluída desta em um único pico com aproximadamente 0,6 M de arginina (Figura 7C). A recuperação da atividade enzimática aplicada foi de 175% e obtido um enriquecimento de mais de 200 vezes em relação ao material anterior. A recuperação é surpreendente, mas foi obtida mais de uma vez. Talvez algum inibidor contaminante seja excluído da preparação neste passo cromatográfico ou o resultado reflita um artefato não identificado.

As frações obtidas nos passos cromatográficos de purificação foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (Figura 8). Ao longo dos passos cromatográficos pode-se observar diminuição de bandas de proteínas quando comparados ao homogeneizado (raia 1 da figura 8). Após a filtração em gel pode-se observar um enriquecimento de bandas na faixa de 31 kDa e na de 21 kDa na raia 4, correspondente ao pico 1. Finalmente, a preparação apresentou apenas um proteína após a cromatografia de afinidade com aproximadamente 32 kDa. Na raia 5, correspondente ao pico 2 da filtração em gel, observamos um enriquecimento de bandas na faixa de 66 kDa e na de 45 kDa. Sendo que ao final da cromatografia de afinidade apenas uma banda de proteína de aproximadamente 45 kDa foi detectada.

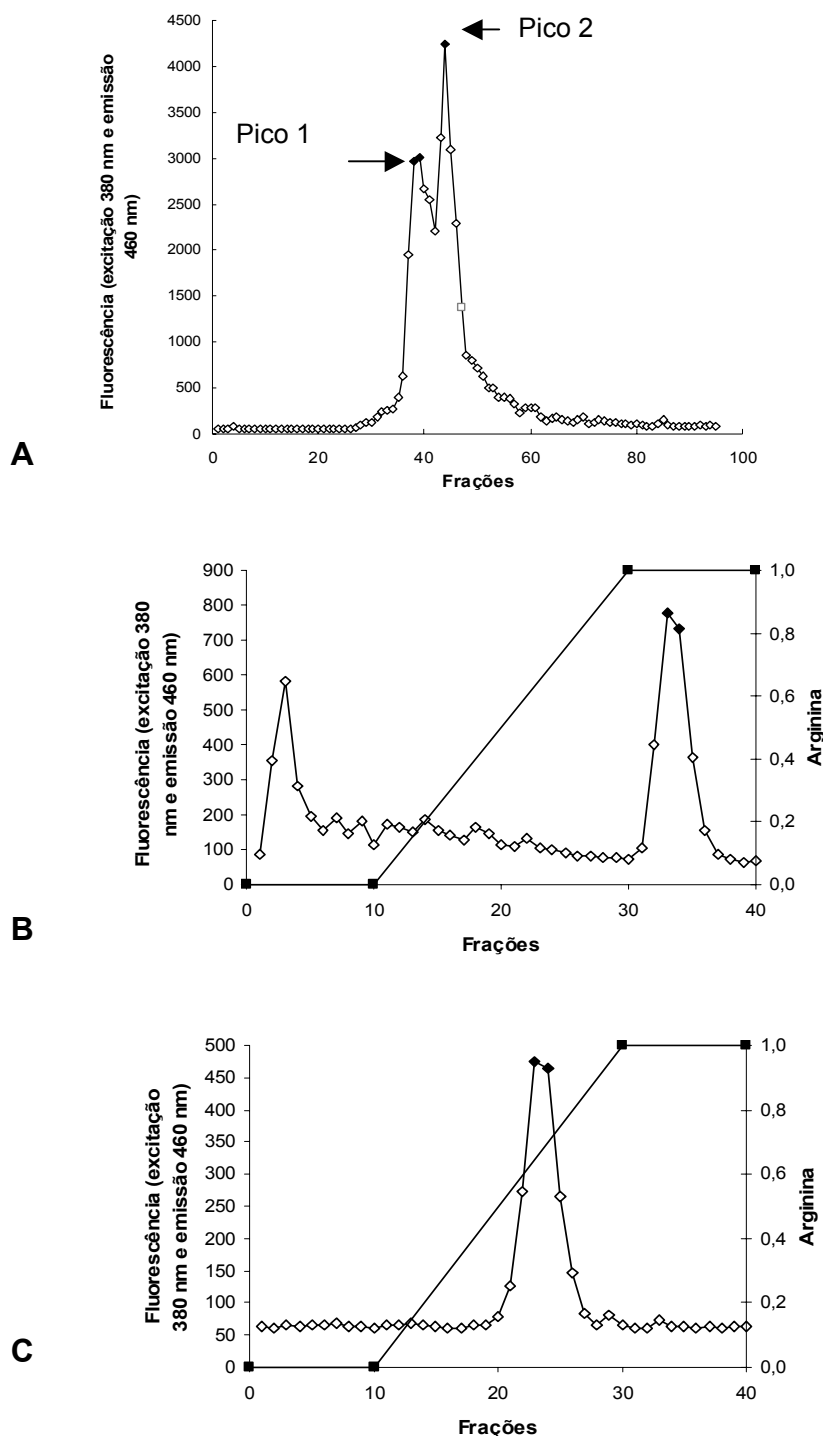


FIGURA 7 - Purificação das cisteína proteinases de *Dysdercus peruvianus*.

Filtração em gel em uma coluna Superdex 75 de homogeneizado de V2 tratado com MMTS após passar por uma coluna HiTrap Q seguida de concentração (A). As frações 38 e 39 correspondentes ao Pico 1 foram reunidas e cromatografadas em uma coluna Arginina-Sepharose (B). A fração 44 correspondente ao Pico 2 foi cromatografada em uma coluna Arginina-Sepharose (C). A atividade enzimática foi determinada para o substrato Z-FR-MCA 1 mM. Os losangos escuros (◆) correspondem às frações que foram reunidas durante a marcha de purificação.

TABELA 2 - Purificação de duas cisteína proteinases de *D. peruvianus*

Fração	Atividade Total (mU)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (mU/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Fração solúvel do conteúdo luminal	1.508.040	8.520	177	100	1
HiTrap Q	808.080	1.820	444	53	2,5
Superdex 75					
Pico 1	17.220	20	861	1,14	4,8
Pico 2	12.138	6	2.023	0,8	11,4
Arginina Sepharose, pico 1	9.048	0,0223	405.000	0,6	2.288
Arginina Sepharose, pico 2	2.1112	0,05	421.534	1,4	2.382

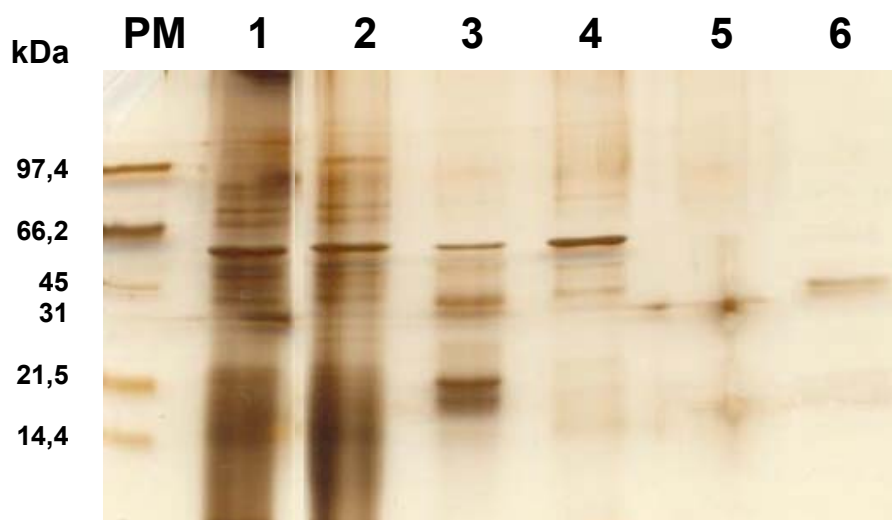


FIGURA 8 - SDS-PAGE (12%) das frações reunidas durante a marcha de purificação das cisteína proteinases do *D. peruvianus*.

Todas as amostras foram dialisadas e submetidas à fervura antes de serem aplicadas no gel. O gel foi corado por prata segundo Blum *et al.* (1987), para evidenciar proteínas. **PM**, padrões de peso molecular; raia **1**, homogeneizado de V2; raia **2**, fração concentrada após ter sido eluída da HiTrap Q; raia **3**, frações correspondentes ao pico 1 eluídas da Superdex; raia **4**, fração correspondente ao pico 2 eluída da Superdex 2; raia **5**, fração eluída da cromatografia de afinidade da cisteína 1; raia **6**, fração eluída da cromatografia de afinidade da cisteína 2.

4.6 - PROPRIEDADES DAS CISTEÍNA PROTEINASES DE V2 DE *D. PERUVIANUS*

As cisteína proteinases digestivas encontradas no lúmen de V2, no intestino médio do *D. peruvianus* purificadas, foram denominadas cis 1 (32 kDa) e cis 2 (45 kDa).

Estas enzimas purificadas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físicas e cinéticas. A Figura 9 apresenta a determinação do pH ótimo, e a Figura 10 sua inativação térmica. Como podemos observar, as duas cisteína proteinases possuem o mesmo pH ótimo igual a 6,3, conciliando com os valores de pH ótimos reportados para as cisteína proteinases de insetos, os quais variam entre 5,0 e 6,0 (Terra e Ferreira, 2005). Além disso, estas enzimas são inativadas a 40 °C segundo uma cinética de primeira ordem aparente por pelo menos 3 meias-vidas, sugerindo a existência de apenas uma espécie molecular de cada enzima na preparação com meia vida de 5 minutos para cis 1 e 4,8 minutos para cis 2 (Figura 10). Estas medidas são compatíveis com cisteína proteinases descritas em outros insetos (Terra e Ferreira, 1994; Cristofolletti *et al.*, 2005).

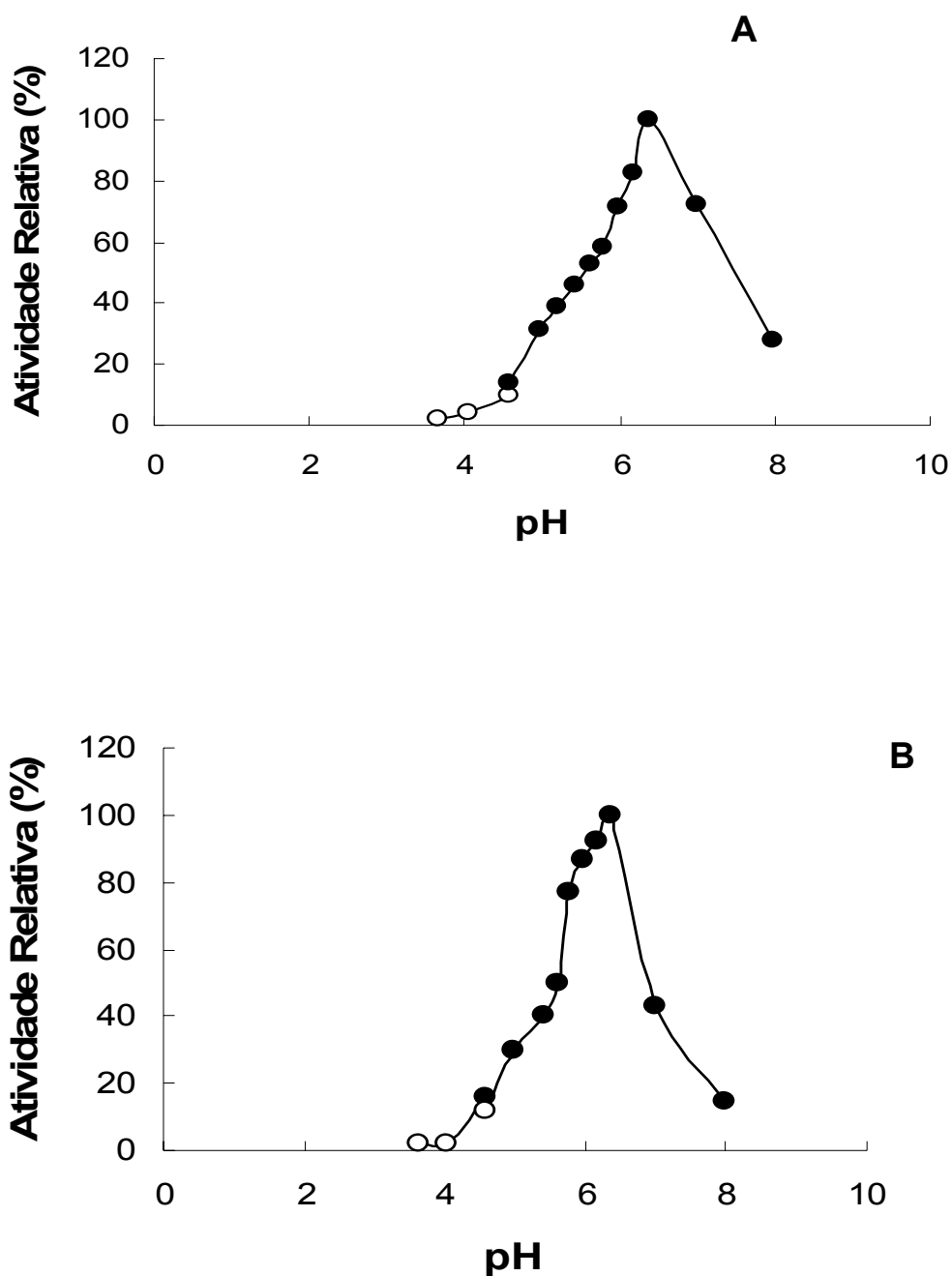


FIGURA 9 - Efeito do pH sobre as cisteína proteinases purificadas de *Dysdercus peruvianus*.

A, cisteína proteinase 1 ensaiada com Z-FR-MCA. **B**, cisteína proteinase 2 ensaiada com Z-FR-MCA. Utilizou-se o tampão citrato-fosfato 100 mM, para o pH entre 3,6 e 4,6 (o) e o tampão MES 0,1 M para o pH entre 5 e 8 (●), todos contendo cisteína 3 mM e EDTA 3 mM. Os resultados estão expressos em função da maior atividade.

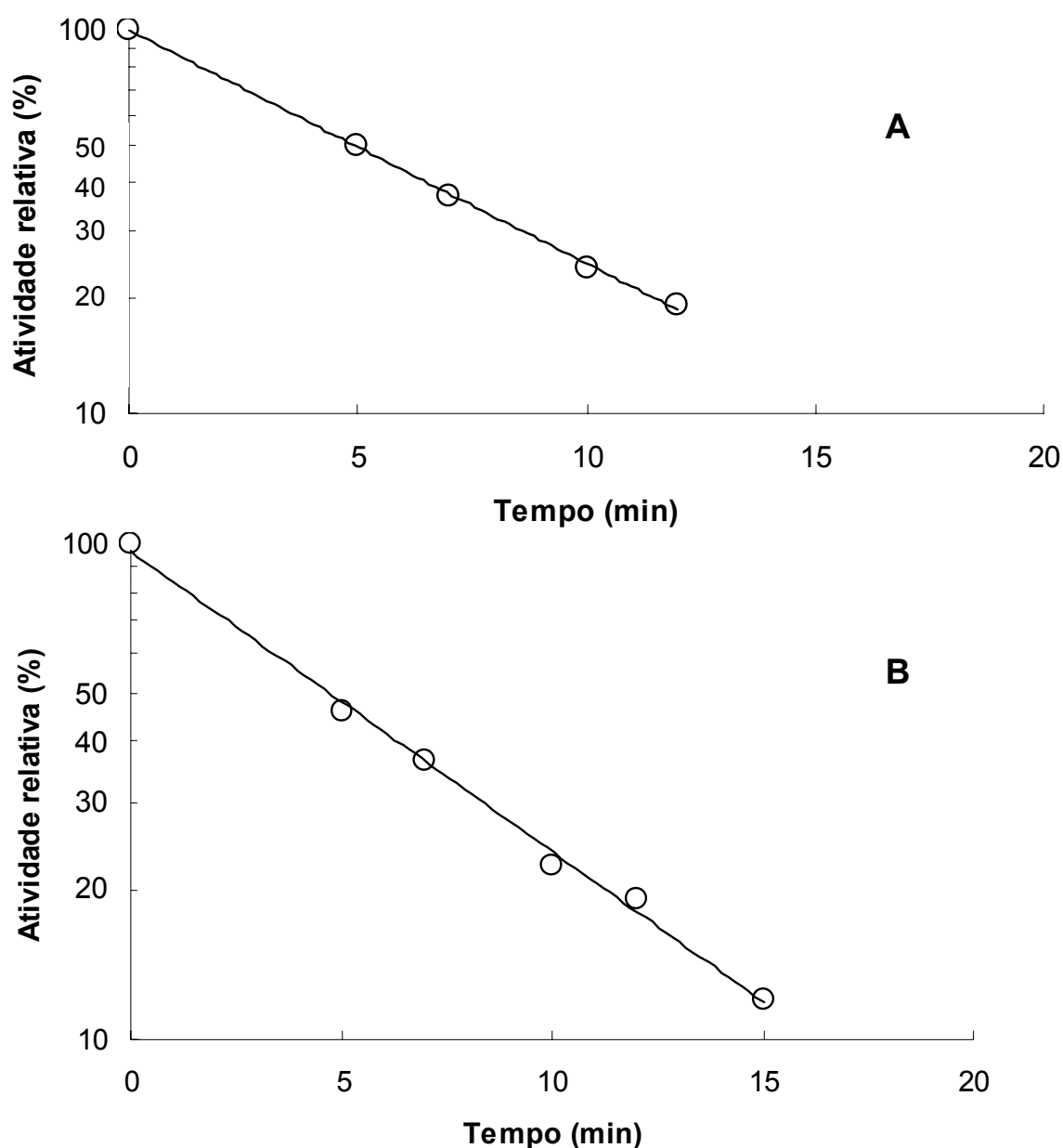


FIGURA 10 - Inativação térmica.

Inativação térmica a 40 °C da cisteína proteinase 1 (**A**) e da cisteína proteinase 2 (**B**), com $T_{1/2}$ estimado em 5 min para cis 1 e 4,8 min para cis 2. O logaritmo da atividade remanescente relativa foi plotado contra o tempo de inativação térmica.

4.7 - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA AS CISTEÍNA PROTEINASES DE *D. PERUVIANUS*

Alguns parâmetros cinéticos para estas enzimas purificadas foram também determinados. A titulação por E-64 (Figura 11) foi o método utilizado para determinar a quantidade de proteína nas amostras contendo as enzimas purificadas, já que ao final da purificação o material se encontra com uma quantidade de proteína

indetectável por métodos colorimétricos usuais (BCA, Bradford), além de determinar a constante de dissociação entre enzima-inibidor, onde foram observado os valores de 17,3 nM para cis 1 e 7,1 nM para cis 2. A constante de dissociação (K_D) foi determinada através dos cálculos citados no materiais e métodos (3.14). Os plotes foram obtidos através do programa GraFit[®] (versão 3.0) para gráficos de cinética enzimática em computador. Foram calculadas as atividades específicas das enzimas na titulação, obtendo um valor de 73.000.000 mU/mg para cis 1 e 17.500.000 mU/mg para cis 2 (ver 3.14). Ao comparar estes valores de atividade específica com os encontrados na tabela de purificação concluímos que grande parte da enzima no material purificado se encontra degradada, mostrando a real dificuldade de purificar cisteínas proteinases. Como a atividade específica calculada na titulação está relacionada com apenas as proteínas realmente ativas o valor de atividade específica se torna muito maior quando comparado com a amostra purificada, que além de conter as enzimas com atividade contem aquelas inativas.

As primeiras cisteína proteinases intestinais de insetos encontradas foram indicadas como enzimas catepsinas B-“like” (EC 3.4.22.1), já que esta foi a primeira cisteína proteinase descrita em animais. Mais tarde descobriu-se que a catepsina B apesar de possuir atividade endopeptídica é mais importante como uma peptil-dipeptidase (Aronson & Barrett, 1978). Isto se deve ao fato da existência de uma alça estendida que carrega um par de resíduos de histidina formando uma capa protegendo a região do sítio ativo, mas permite a ligação do carboxilato C-terminal do substrato (Barrett *et al.*, 2004). Outra maneira de se distinguir catepsinas B de outros membros da família das cisteína proteinases, se refere à habilidade que as catepsinas B têm de clivar substratos contendo resíduo de arginina em P2 (Hasnain *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1995). A catepsina L (EC 3.4.22.15) é uma verdadeira endopeptidase que prefere clivar ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P2 (catepsinas B preferem resíduos de arginina nesta mesma posição) (Barrett *et al.*, 2004). Portanto, é possível distinguir entre as duas enzimas usando os substratos como Z-FR-MCA e Z-RR-MCA.

A eficiência de catálise das duas cisteína proteinases de *D. peruvianus* purificadas foi então determinada para dois substratos sintéticos. A tabela 3 mostra os valores de K_m para os dois substratos, bem como uma comparação entre as razões de k_{cat}/K_m (um parâmetro que indica a adequação de substratos para uma determinada enzima; Fersht, 1999) para os mesmos substratos. Os valores de K_m

encontrados estão listados na tabela 3. Podemos observar que o Z-FR-MCA constitui o melhor substrato para ambas as proteinases quando comparado com a porcentagem de eficiência do Z-RR-MCA, demonstrando que possivelmente as cisteína proteinases aqui estudadas são do tipo catepsinas L. Pesquisas recentes demonstram que todas as cisteínas proteinases digestivas de insetos bem estudadas são catepsinas L (Terra e Ferreira, 2005; Koiwa *et al.*, 2000; Gruden *et al.*, 2003; Cristofolletti *et al.*, 2003 e 2005).

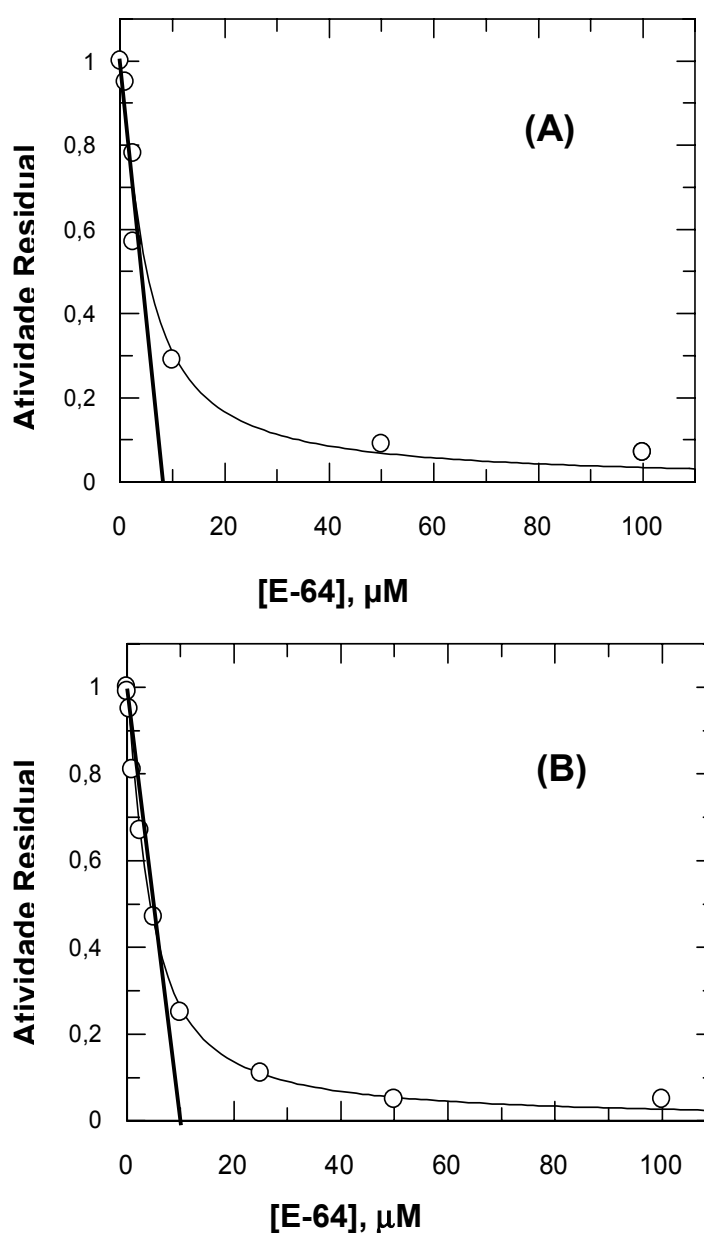


FIGURA 11 - Titulação por E-64 das cisteína proteinases.

Cis 1(A) e Cis 2 (B) foram tituladas através do inibidor E-64. O K_D e atividade específica foram determinadas através do programa GraFit[®] (versão 3.0).

TABELA 3 - Determinação da eficiência catalítica das cisteína proteinases purificadas de *D. peruvianus*, sobre dois substratos diferentes.

Enzima	Substrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}, \text{s}^{-1}$)	Relativo
Cis 1	Z-FR-MCA	9,1	$7,3 \cdot 10^{-2}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$	100
	Z-RR-MCA	6,9	$6,6 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$	11,9
Cis 2	Z-FR-MCA	8,6	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	100
	Z-RR-MCA	5,3	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	1,42

Os parâmetros cinéticos foram ajustados utilizando-se o programa Enzfitter (Elsevier, Biosoft).

4.8 - SEQÜENCIAMENTO DE UMA CATEPSINA L DE *D. PERUVIANUS*

Através do seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNAs de intestino médio do *D. peruvianus* (itens 4.11-4.15) foram obtidas quatro seqüências de catepsinas L entre singletos e contígos denominadas DpCaL 1-4 (Tabelas 7 e 8). Dentre estas seqüências, a denominada DpCaL 1 teve sua transcrição observada apenas no ventrículo 2 do intestino médio através de RT-PCR semiquantitativo (Figura 24 E). Este resultado aponta esta seqüência como uma provável catepsina L digestiva majoritária presente no ventrículo onde a maior parte da proteólise ocorre (Silva e Terra, 1994) sendo provavelmente esta uma das catepsinas L purificadas.

A partir da seqüência parcial apontada como catepsina L pelo Blastx, iniciadores foram confeccionados com objetivo de completar a seqüência. Foram usados diversos iniciadores específicos combinados com iniciadores universais para amplificação por PCR utilizando como molde a biblioteca de cDNAs de intestino médio do inseto. Cada produto obtido na reação de amplificação foi separado em gel de agarose 1%, e então purificado. Os fragmentos de cDNA foram ligados ao vetor pGEM-T, que foi usado para transformar células XL1-blue competentes. Colônias transformantes isoladas foram selecionadas, crescidas em meio LB líquido e submetidas à Mini-prep. Para verificar se esses plasmídeos continham realmente o fragmento de PCR clonado foi feita uma digestão por enzima de restrição EcoRI (dados não mostrados). Os plasmídeos que continham o fragmento foram então seqüenciados. As seqüências obtidas a cada clonagem foram analisadas através dos programas Phred, Phrap e Consed para a montagem correta da seqüência e posterior comparação nos bancos de dados depositados internacionalmente.

A catepsina L seqüenciada de *D. peruvianus* (DpCaL1) consiste de 927 nucleotídeos que codifica uma proteína de 309 aminoácidos (Figura 12).

4.9 - CARACTERIZAÇÃO DA PROVÁVEL SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA DA DPCAL1

A DpCaL1 apresentada na figura 12 está parcialmente completa, já que não chega até a metionina inicial, porém a região que codifica a proteína madura está completa. Esta seqüência contém um pró-peptídeo com 92 resíduos de aminoácidos sendo a enzima madura formada por 128 resíduos de aminoácidos. Com o intuito de proteger células contra atividade degradativa indesejada, essencialmente todas as enzimas proteolíticas celulares e de bactérias são sintetizadas como precursores inativos (zimógenos) (Carmona *et al.*, 1996; Khan e James, 1998). Proteólise ácida é necessária para ativação destes zimógenos (Mason *et al.*, 1987; Rawlings e Barret, 1994). Dessa forma, foi encontrado na DpCaL1 um provável sítio de clivagem do pró-peptídeo entre E⁹²-V⁹³ (Rawlings e Barret, 1994). Como em outras enzimas da família da papaína, uma prolina (P⁹⁴), que deve servir para prevenir proteólise inadequada da porção N-terminal da enzima (Rawlings e Barret, 1994), foi encontrada na posição 2 na forma madura. Dois motivos característicos de catepsinas L (ERFNIN e GNFD) estão presentes na pró-região da DpCaL1: E²³ R²⁶ F³⁰ N³³ I³⁷ N⁴¹ e K⁵⁴ N⁵⁶ F⁵⁸ D⁶⁰ (Kirschke e Wiederanders, 1994) (Figura 12). A seqüência que codifica a enzima madura apresenta os resíduos conservados entre catepsinas: cisteína 25, histidina 169 e asparagina 175 (numeração da papaína) (Rawlings e Barret, 1994; Berti e Storer, 1995) que são identificados como parte do sítio ativo das cisteína proteinases estando posicionados da seguinte forma na DpCaL1: C¹¹⁷ H²⁵⁶ N²⁷⁶. G¹⁵⁶ C¹⁵⁷ N¹⁵⁸ G¹⁵⁹ G¹⁶⁰ é conhecido como um importante motivo estrutural (Karrer *et al.*, 1993). Sete prováveis sítios de glicosilação foram encontrados utilizando o programa NetGlycate 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>) (Johansen *et al.*, 2006).

Análise da DpCaL1 utilizando os programas SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) e TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) não detectou presença de peptídeo sinal na região N-terminal da proteína, embora essa região não esteja completa. No entanto, já foi estudado que catepsina L de humano pode ser direcionada para secreção por uma seqüência de nove aminoácidos localizados na porção C-terminal da proteína (Chauhan *et al.*, 1998). Esta característica também foi observada na seqüência da catepsina L de *Rhodnius prolixus* (Lopez-Ordoñez *et al.*, 2001) que não apresenta o

peptídeo sinal, mas possui esta região característica na porção C-terminal que pode ser a responsável por exportar a proteína para o meio extracelular. Esta seqüência de nove aminoácidos foi identificada no C-terminal da DpCaL1 com três modificações quando comparada com a catepsina secretada de humano: uma treonina por uma valina na penúltima posição, um alanina por um glutamato sete aminoácidos antes do final da proteína e uma serina por uma treonina oito aminoácidos antes do final da proteína. Chauhan e colaboradores (1998) demonstraram que a substituição de treonina por uma valina na penúltima posição, assim como ocorre em DpCaL1, não afeta a exportabilidade da proteína. Nenhuma informação é dada para as outras duas substituições observadas. Este resultado sugere que a DpCaL1 pode ser direcionada para rota de secreção. Apesar disso, mais estudos devem ser realizados a fim de determinar a localização celular desta proteína.

Comparações da DpCaL1 com outras catepsinas L depositadas no banco de dados usando Blastp 2.1.18+, indicaram alta identidade com a catepsina L de *Triatoma infestans* (64%), *Aedes aegypti* (62%) e *Rhodnius prolixus* (64%). O alinhamento das seqüências (Figura 13) mostra que alguns resíduos de aminoácidos são altamente conservados entre essas enzimas.

```

tattccatcaggcagaggacgagacagaacgcaaacgcatggaacgcatatacagaaatcca 62
  F H Q A E D E T E R K R M E R I Y R N P 20
actgaagaacattatcgtatgggagttttcttaaagaacaaacagatgatcgaagaacac 122
  T E E H Y R M G V F L K N K Q M I E E H 40
aacaagaactacgagagcggcgatgtttcgtttcaaatagaagatgaaccatttcggtgac 182
  N K N Y E S G D V S F Q M K M N H F G D 60
ttgtctccagaagaattcaaagaaagaatgaacaagtacaagagttccggtaaaccaaaa 242
  L S P E E F K E R M N K Y K S S G K P K 80
cagctcggctcagtgttcgtcgaaccaaacgttgaagtccccgcctccgtcgcactggagg 302
  Q L G S V F V E P N V E ↑ V P A S V D W R 100
gaaaaggggtgcagttactccggtgaaagatcaggggcagtgcggtcctgctgggcattc 362
  E K G A V T P V K D Q G Q C G S W A F 120
agtacaaccggatctttggaaggccaacatcttctcaaaactggaaaacttgatcattg 422
  S T T G S L E G Q H F L K T G K L V S L 140
agcgaacagaacttagtcgattgtgctggaaggtacggcaatgatggttgcaacgggtgg 482
  S E Q N L V D C A G R Y G N D G C N G G 160
ctgatggacagtgctttcaaatttatcaaagcaaacggaggactagacaccgaagcatct 542
  L M D S A F K F I K A N G G L D T E A S 180
taccctacgaagcaatggacggaagatgcagatttaagaaagcaaacgttggagctact 602
  Y P Y E A M D G R C R F K K A N V G A T 200
ctaaacagttttgttgacattcctcaaggcgatgaagaagctctcaagaaagctatagcg 662
  L N S F V D I P Q G D E E A L K K A I A 220
acggtaggacctatctccgtggccattgacgctggagaaagttcgttccaattttactcc 722
  T V G P I S V A I D A G E S S F Q F Y S 240
ggaggcgtatactacgagaagagatgcagtccttacaacctcgaccacggagtcctcgca 782
  G G V Y Y E K R C S P Y N L D G V L A 260
gtcggctacggttcagaaaacggccaagattactggctggtcaagaactcctggaacgca 842
  V G Y G S E N G Q D Y W L V K S W N A 280
aaatggggagaaaacggttacatcaagatggcaaggaacaagaacaaccactgcggaatc 902
  K W G E N G Y I K M A R N K N N H C G I 300
gctactgaagcaagctaccccggtggtt 929
  A T E A S Y P V V 309

```

FIGURA 12 - Nucleotídeo e seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA que codifica catepsina L de *Dysdercus peruvianus* (DpCaL1)

Os resíduos de aminoácidos que formam os motivos característicos de catepsinas L E-R-F-N-I-N, G-N-F-D e GCNGG estão destacados em cinza. Os resíduos conservados

envolvidos com catálise (C¹¹⁷, H²⁵⁶, N²⁷⁶) estão realçados em preto. O provável sítio de clivagem do propeptídeo para liberação da enzima madura está indicado por uma seta. Possíveis resíduos de lisina glicosiladas por NetGlycate estão em negrito e itálico. Nove aminoácidos da provável seqüência de secreção na região C-terminal está em negrito.

		10	20	30	40	50	60	70
							
L. vannamei	--	FLT	---ACVVAA V	SPSL---	RQQ RD-----	AE GRR ASVQ	RY LSV EQ Q	
R. haemaphysaloides A	--	LRLSL	---CAIVAVTV	ANSHEILRTQ	E -----	TT K S ESHM	LL F TE S	
P. stali		QGLL	---SCLIALGQ	VSFFDLSAD	FTL-----	KF R E DNEL	SY K LE	
N. norvegicus	-----	CGLAL	T SPS-----	EH-----		TQYGRK GDAK	LY QRV QQ E	
T. molitor 2	--	VFII	---AIAIYG S	ALPSTFVA K	EN-----	TTYARS VNAK	T KQ QKKL	
R. haemaphysaloides B	--	RGYI	---CCLFVT A	ITHQELVGA	S -----	AL G D ASDT	YY L ME R	
T. molitor 3	--	SELGI	--VLCLAF A	TLALPKSLFQ	Q SQ-----	LT K S SSPI	IR QL KD V	
H. armigera	--	SIA	---LCVVG A	C VSLLDLVR	S -----	LE S R DSEV	DK M LE	
M. persicae	--	VVI	GLVAF AISSV	SSINLNEVIE	SL-----	MQFK L EDIK	T K V LD	
A. gossypii	--	VVI	GLVAF AISTV	SSINLNEVIE	SL-----	IQFK L EDIK	T K V LD	
S. exigua	--	GVA	---LCLVAG C	VSLLDLVRG	N -----	ME S Q DSEV	DK M VE	
I. ricinus]	--	LRCL	---CLLVAA A	VSYQEV LGA	S -----	AK G S VSET	V L ME R	
R. prolixus	-----	ML-----	IPSF DID-----	PQ L -----		AM G N RNQF	I M V ID	
T. infestans	--	VAICF	---LAFFAISHT	ALHDYFP	L -----	AQFG S KNSF	LI MNV KE Q	
A. aegypti	--	ILIL	---VAFVAA N	VSLYELVK	N -----	LQ R N DSET	R L L VQ	
D. peruvianus	-----	FHQA-----		DETE-----		RKRMERI RNPT	HY MG V LK	
Clustal Consensus						: * . * : * :: :		
		80	90	100	110	120	130	140
							
L. vannamei		QF DD	ARF N	TFT Q Q	TSE TAT	LNVPSRR-----	PTAILRAD	DET
R. haemaphysaloides A		LI K	AK AK L	G Q	LA AKIF	YRG---QR-----	TSRGS	MP ANV
P. stali		KR EK	SR KQ K	F KL HLA	LI YSDVYL	NKSSKAN-----	NNKLQSY	IP AHV
N. norvegicus		QLVEAF	KKF N	TF VA Q	TNE NAV	K Y KGSRGE-----	PTTVFTAE	GRP
T. molitor 2		ETFE E	EK RQ L	T GV L T	TPE MKAYTH	LIMPADLHKN-----	GIPIK	REDLGLN
R. haemaphysaloides B		L R	EK AKSQ	A E	LH VSTR	RNYRDS-----	PREGSF	VE EGF
T. molitor 3		A E	AKF K	T SKA Q	SKE LAYV	RG AQP KHP-----	ENLRMPVSSK	KP
H. armigera		HR K	QRF Q A	RP KYA	LS VHV	NKTLKHP---KAVHGKGR	SRPA	IA AHV
M. persicae		L R	KL S	ET A E H	MQ YSKM	PSLAGG-----	DSNFTNDEGV	LKSENV
A. gossypii		L G	KL S	ET A E H	MQ YTKM	PSLAGG-----	DRNFTNDEAV	LKSENV
S. exigua		HR TK	QRF QRL	EP KYA	LH VHT	NKTAKHGGRNKNVHGK	GHDRGAA	IA AHV
I. ricinus]		H K	EK AR	P SMA E	LH VSTR	RNYKDG-----	PREGS	YLE ENI
R. prolixus		K DE	AK L A	MK HL	MV KAL	KTPNAE-----	RNGKIYVPSNEN	
T. infestans		R DE	KR N	K H	MQ KALN-KL	RSKQQ-----	NSGEV	RATGK
A. aegypti		H K	QRFDL	QEK R RV	KYA LHE	VQTV NRTDSK	---SLKG-VRIE	EPV IE ANV
D. peruvianus		QM EE	KN S D	FQMK H	SPE KER	KY SSGPK-----	QLGSV	VE NVE
Clustal Consensus		. .*	:	:	* *:	.*		
		150	160	170	180	190	200	210
							
L. vannamei		LP----	KE T	K	T	L D K--		DKF M
R. haemaphysaloides A		NDSSL	ST K		A	L D E--		QSF
P. stali		T---	LNKE T	N H	T A	N K--		GS
N. norvegicus		MA----	AD T		A	L NNE--	E	TE D
T. molitor 2		ASVRY	ASF DQ M S	N S	S AI S	MKIAN AGYDS	V Q	VPN--AL
R. haemaphysaloides B		EDLQL	KT K	N	T	P RK--		RSF
T. molitor 3		LA----	AS SN- SE		S T AV	LALQR R-- T		I SS A
H. armigera		T---	Y DH K	E K	T A	Y--		I AA
M. persicae		V---	I KSI K	Y N	S A	V--		I RK
A. gossypii		V---	I KS K	Y N	S A	V--		I RK
S. exigua		S---	Y DH K	D K	T A	Y--		I AA
I. ricinus]		EDFSL	KT T	N	A	S S--M		G TDF
R. prolixus		LP----	KS QR	H	S A	L L R--		KT S
T. infestans		LP----	AK Q	P	S G	L L NKK--	Q	GN D
A. aegypti		E---	V TT K	H	S A A	K--		GK
D. peruvianus		VP----	AS E		T	L K--		AGR D
Clustal Consensus		.*** .	*: **: *****:**:**: .			*:***:**:*		*

	220	230	240	250	260	270	280
L. vannamei	M	Q R A K	D	Q GK	DASN	T Y	VEH S S KK I
R. haemaphysaloides A	E	N A D A E		M K	KKED	T	EG S DD KK
P. stali	E	N Q E H	K	GE ET	RKTSI	S	TQ E MQ I
N. norvegicus	G	W TS D D G	S	Q RS	DANSI	CT	EVQH-T E HE SDI
T. molitor 2	S	W ND T VAQ G S GA		MA GN	HYDPNQ A RLS Y	YLSGP	NM ADM K VA
R. haemaphysaloides B	E	N S K	W	N T	GV H NRS	D	E NK KK A V
T. molitor 3	D	W S S HDY-	MS SA	QG Y	DSSQSVT	LS YY L S	NS AD GQA VA
H. armigera	N	N D G	KA	GV K	YNAKNS	D V	Q EK MQ V
M. persicae	E	L S K L	K	E K	YNPDNS	N	E E MH L V
A. gossypii	E	L S K L	K	E K	YNPENS	K	E D MH L V
S. exigua	N	N D G	K	V K	YNPKES	D V	Q EK MQ
I. ricinus]	E	D RA K	K	NGT GT	H KKST	S	KE S TQ KK
R. prolixus	E	NQ Q VRD	K A	RENN	KEDK	G K Y	LEAS KD QS
T. infestans	D	I VQ Q	G G	A	E K	YKTKS AG K Y	AO N KE EI
A. aegypti	N	M Y Q D G	K	I T H	NPKA	K Y	Q E KK L V
D. peruvianus	N	S F A G L	A	M GR	KKAN	LNS	Q E KK I
Clustal Consensus	* ** *	** ::	*: :* :***:	*::	::	: *	* * :: **::

	290	300	310	320	330	340	350
L. vannamei	QP	HD	EG	TM	A	ET K EA	NTS NK Q S D K
R. haemaphysaloides A	GHS	L E D E	EE	A	VKDG-KK		GS N L S D N
P. stali	HQ	E E EN		V	VEDN-QK		TQ G DQD
N. norvegicus	HF	S KK	PTN	A	-T STE		SG A S RD
T. molitor 2	F D-DP	GS G N T	ETNKFT A I		-N N Q		DG LD F I AN
R. haemaphysaloides B	H	E D E	EQ	V	TKDG-Q		TT E Y T D
T. molitor 3	T-DEL	G LF DQT	NQSD N	V	-SDN Q	IL	SG ES WRQV YG
H. armigera	Q	D DEN	TD	MV	TD Q G		RT L N
M. persicae	I S K	KK F N R	TE	A	FRTDKK G I		KT E M K
A. gossypii	I S K	KK F N R	TE	A	F SDKK G I		KT E M K
S. exigua	Q T	K DEN	TD	MV	TE D S D		RS EL N
I. ricinus]	H	D D E D	ES	V	TLNG-T	F	TT E R S K
R. prolixus	R H	E K QY	PSQ	T	-T N Q		PS ES I HK
T. infestans	GNL	E I D F	NTE	V	-T N Q		PS EN I HN
A. aegypti	I H	E Q D	EN	A	TS E E		TT Q V HD
D. peruvianus	GES	G KR	PYN	A	-S N Q		NAK EN N
Clustal Consensus	: **	: *	**:: : *	: **:	**:	::**::	** ** *

	360
L. vannamei	N Q
R. haemaphysaloides A	Q A
P. stali	N TQ
N. norvegicus	N EP T
T. molitor 2	H GV V TL
R. haemaphysaloides B	Q S
T. molitor 3	N TA AL
H. armigera	H S
M. persicae	N V S
A. gossypii	N V S
S. exigua	H S
I. ricinus]	Q S I
R. prolixus	H M V
T. infestans	H M I
A. aegypti	H V TC
D. peruvianus	H TE V
Clustal Consensus	*:** * * :

FIGURA 13 - Catepsina L do *Dysdercus peruvianus* (DpCaL1) alinhada com outras catepsinas L de insetos.

As seqüências aqui listadas foram retiradas do GenBankTM. L. vannamei: catepsina L de *Litopenaeus vannamei* (CAA68066); R. haemaphysaloides A: catepsina L de *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* (AAQ16117); P. stali: catepsina L de *Plautia stali* (BAF94152); N. norvegicus: catepsina L de *Nephrops norvegicus* (CAA56915); T. molitor 2: catepsina L de *Tenebrio molitor* (AY337517); R. haemaphysaloides B: catepsina L de *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* (AAQ16118); T. molitor 3:

catepsina L de *Tenebrio molitor* (AY332272); H. armigera: catepsina L de *Helicoverpa armigera* (AAQ75437); M. persicae: catepsina L de *Myzus persicae* (CAD42716); A. gossypii: catepsina L de *Aphis gossypii* (CAD33266); S. exigua: catepsina L de *Spodoptera exigua* (ABK90824); I. ricinus: catepsina L de *Ixodes ricinus* (ABO26562); T. molitor 2: catepsina L de *Tenebrio molitor* (AAP94046); R. haemaphysaloides B: catepsina L de *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* (AAQ16118); R. prolixus: catepsina L de *Rhodnius prolixus* (AF320565); T. infestans: catepsina L de *Triatoma infestans* (AAP94047); H. armigera: catepsina L de *Helicoverpa armigera* (AAR12010); A. aegypti: catepsina L de *Aedes aegypti* (ABE72970); D. peruvianus: catepsina L de *Dysdercus peruvianus*. *, : e . indicam, respectivamente resíduos idênticos, altamente conservados e pouco conservados entre as seqüências. O alinhamento foi feito nas condições padrões do programa ClustalX versão 1.8.

4.10 - A ORIGEM E FUNÇÃO DAS CATEPSINAS L DE INTESTINO MÉDIO DE INSETOS

Foi feita análise evolutiva molecular e, filogenética através de um cladograma utilizando o programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis Versão 3.1 (MEGA 3.1) (Kumar *et al.*, 2004) com 46 seqüências de CALs de insetos registradas no GenBank, das quais 30 correspondem a ordem Coleoptera, 7 Diptera, 4 Hemiptera, 1 Lepidoptera, 4 Thysanoptera, além das 4 DpCaLs de *D. peruvianus* (Figura 14). As CALs de insetos formam um grande ramo, ficando apenas uma seqüência de *D. melanogaster* de fora. Este grande ramo se divide num grupo monofilético (bootstrap 84) contendo as DpCaL 1, 3, e 4, além de todas as seqüências de Hemiptera, Thysanoptera, Lepidoptera, 2 de Diptera, 4 de Coleoptera, e num arranjo polifilético contendo além da DpCaL 2 as outras seqüências de Coleoptera e duas seqüências de *D. melanogaster*.

Já que no ramo monofilético estão as seqüências demonstradas como de lisossomos de *T. molitor* (ppCAL1 a-c) (Cristofolletti *et al.*, 2005), além de algumas seqüências de Diptera e Lepidoptera, que não possuem cisteína proteinases digestivas (Terra e Ferreira, 1994), este grupo deve incluir apenas enzimas lisossômicas. No entanto, Hemiptera Heteroptera (Terra e Ferreira, 1994), Hemiptera Auchenorrhyncha (afídeos) (Cristofolletti *et al.*, 2003) e Hemiptera Sternorrhyncha possuem apenas catepsinas L como proteinase digestiva. Neste caso é provável que estes insetos utilizem enzimas lisossomais como proteinases digestivas. Este resultado sugere que as catepsinas L digestivas de Hemiptera são similares as

lisossomais de *T. molitor*, enquanto as de Coleoptera são similares as digestivas de *T. molitor*.

No ramo polifilético estão as seqüências de catepsinas L de *T. molitor* conhecidas como digestivas (ppCAL 2 e 3) de acordo com estudos de localização tecidual através de RT-PCR semiquantitativo e imunocitocalização (Cristofolletti *et al.*, 2005). Além destas seqüências outras de Coleoptera: *C. maculatus*, *L. decemlineata*, *D. virgifera virgifera*, *P. cochleariae*, *H. postica*, Diptera: *D. melanogaster* e a DpCaL 2 de *D. peruvianus* também fazem parte deste grupo. Desta forma, provavelmente todas as seqüências deste ramo são digestivas. Levando em consideração que *T. molitor* possui catepsinas L digestivas e lisossomais podemos imaginar que catepsinas L digestivas originaram de catepsinas L lisossomais através de duplicação gênica e evolução independente. O fato da DpCaL 2 fazer parte deste ramo não significa se tratar de uma catepsina L digestiva diferente das demais de hemípteras, já que foi verificada transcrição do seu mRNA em outros tecidos do *D. peruvianus* além do intestino médio (Figura 24). Provavelmente por se tratar de um EST muito curto (666 pb), esta seqüência não contém regiões importantes para sua caracterização filogenética correta, que seria estar no ramo monofilético com as demais catepsinas L de hemípteras.

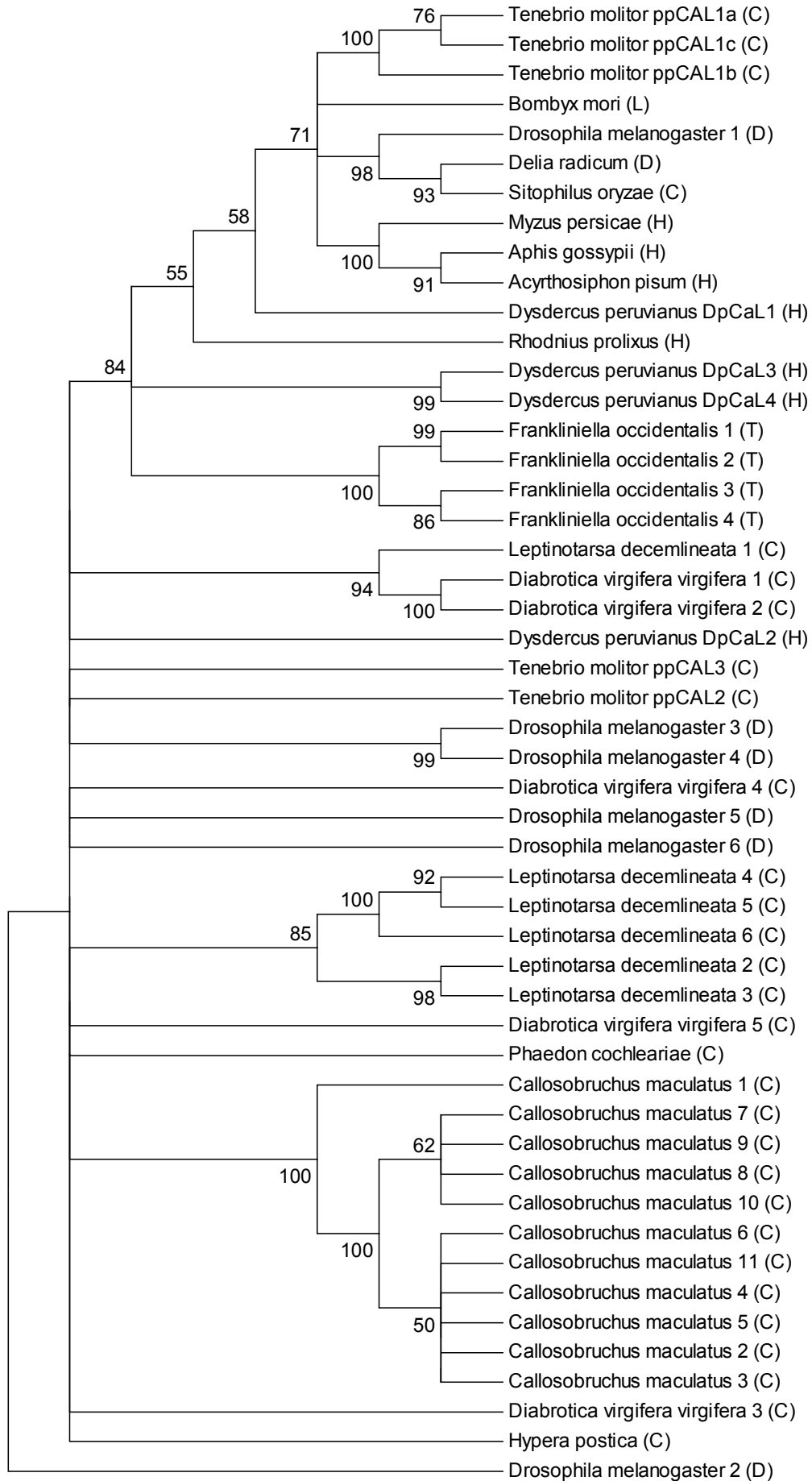


FIGURA 14 - Cladograma de seqüências de catepsinas L de insetos depositadas no GenBank.

As ramificações foram estatisticamente calculadas através do programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) com análise de Bootstrap (corte de 50). C, Coleoptera; D, Diptera; H, Hemiptera; L, Lepidoptera; T, Thysanoptera. *Tenebrio molitor* ppCAL 1a, ppCAL 1b, ppCAL 1c, ppCAL2, ppCAL3, (Coleoptera): AY207373, AY332270, AY332271, AY337517, AY332272; *Bombyx mori* (Lepidoptera): AAB33990; *Drosophila melanogaster* 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Diptera): AAM68565, AAF58330, AAF51923, AAF51924, AAF58331, AAF52922; *Delia radicum* (Diptera): AAL16954; *Sitophilus oryzae* (Coleoptera): Q26636; *Myzus persicae* (Hemiptera: Auchenorrhyncha): CAD42716; *Aphis gossypii* (Hemiptera: Auchenorrhyncha): CAD33266; *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Sternorrhyncha): XP_001944978; *Dydercus peruvianus* DpCaL 1, 2, 3, 4 (Hemiptera: Heteroptera); *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Heteroptera): AAL34984; *Frankliniella occidentalis* 1, 2, 3, 4 (Thysanoptera): AAL02222, AAL02220, AAL02223, AAL02221; *Leptinotarsa decemlineata* 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Coleoptera): AAS20593, AAS20592, AAS20591, AAS20589, AAS20590, AAS20588; *Diabrotica virgifera virgifera* 1, 2, 3, 4, 5 (Coleoptera): CAE47500, CAE47501, CAE47497, CAE47499, AAG17127; *Phaedon cochleariae* (Coleoptera): CAA76927; *Callosobruchus maculatus* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Coleoptera): AAQ11975, AAQ11974, AAQ11973, AAQ11971, AAQ11968, AAQ11970, AAQ11972, AAQ11966, AAQ11967, AAQ11965, AAQ11969; *Hypera postica* (Coleoptera): AAD41105.

UM LEVANTAMENTO DO TRANSCRIPTOMA DO INTESTINO MÉDIO DO HEMIPTERA, *DYSDERCUS PERUVIANUS*, UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE ESTs

4.11 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA E SEQUENCIAMENTO DAS ESTs

O descobrimento de genes através do seqüenciamento de ESTs ao acaso tem se tornado um método de baixa relação custo-benefício para caracterização biológica de uma ampla e crescente série de organismos (Theodorides *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2002; Ribeiro, 2003; Pedra *et al.*, 2003a, 2003b; Ribeiro *et al.*, 2004a, 2004b, 2006; Calvo *et al.*, 2004, 2006; Siegfried *et al.*, 2005; Siviero *et al.*, 2006; Sabater-Muñoz *et al.*, 2006; Felitti *et al.*, 2006; Coblenz *et al.*, 2006). O valor da informação da seqüência derivada está também aumentando através da aplicação de diversos meios de anotação e sofisticadas ferramentas de análise. Com o intuito de obter informações sobre as proteínas do intestino médio do Hemiptera *D. peruvianus* adultos, este tecido foi utilizado como fonte de mRNA para posterior geração de cDNA. A empresa Vertis Biotechnologie AG, localizada na Alemanha, foi quem após obter a normalização dos cDNAs amplificados, clonaram e inseriram estes cDNAs no vetor Lambda Uni ZAP[®]. A biblioteca foi normalizada para minimizar a redundância de transcritos e permitir a detecção de transcritos pouco abundantes.

Aqui no Brasil, no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Química, esta biblioteca de cDNAs em fagos foi seqüenciada ao acaso e seu resultado analisado. O objetivo principal deste procedimento foi fornecer dados relacionados com a fisiologia molecular deste inseto praga.

Cerca de 1060 clones da biblioteca foram selecionados aleatoriamente, distribuídos em placas de cultura de 96 poços contendo meio LB líquido e carbenicilina (50 µg/mL). Estas placas foram incubadas a 37 °C por 16h sem agitação. Os plasmídeos foram amplificados através de PCR de colônia e a partir do material amplificado de cada colônia foi feito o seqüenciamento automático no equipamento ABI100 (Applied Biosystems). Foram seqüenciados clones a partir da extremidade 5' utilizando o iniciador universal T7.

4.12 - PROCESSAMENTO, ANÁLISE, CATEGORIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Foi realizado o processamento das leituras, onde as seqüências de vetor foram aparadas e as de baixa qualidade foram descartadas. Uma seqüência foi considerada útil quando apresentava um mínimo de 150 bases contíguas com qualidade inferida pelo Phred ≥ 20 (Ewing *et al.*, 1998 a, b).

A montagem de contíguos consiste na junção ordenada dos nucleotídeos, com base na similaridade entre as seqüências das diferentes ESTs seqüenciadas, levando em conta os critérios de qualidade de seqüenciamento e sua interpretação. Assim é possível estabelecer uma seqüência comum (consenso) a partir da montagem de várias seqüências. As seqüências que não formaram contíguos foram denominadas singletos.

Um total de 1053 seqüências curtas de alta qualidade foram analisadas e utilizadas para montagem de contíguos para evitar redundância. Montando estes ESTs por alinhamento de bases (Phrap) (Gordon *et al.*, 1998), foram produzidos 62 contíguos e 841 singletos, o que totaliza 903 seqüências únicas. Porém não se pode esperar que cada seqüência única seja um transcrito diferente, pois muitos dos ESTs pertencentes à mesma mensagem não se sobrepõem ou podem estar presentes no banco de ESTs representando “splittings” alternativos e pré-mRNAs, além de polimorfismos e regiões de baixa qualidade que dentro das condições de stringência adotadas podem levar a formação de contíguos diferentes de um mesmo transcrito. A tabela 4 mostra um resumo dos dados obtidos do seqüenciamento da biblioteca. Do total de contíguos, 54 foram formados por apenas 2 ou 3 ESTs. Apenas dois contíguos foram formados por mais de 20 ESTs.

O número de clones seqüenciados foi limitado através da observação da taxa de novidade obtida após cada placa seqüenciada, o que corresponde a 96 seqüências. Esta taxa de novidade diminuiu acentuadamente, demonstrando assim que os clones por nós seqüenciados já haviam atingido a maioria das cópias diferentes de cDNA gerado a partir do intestino médio do *D. peruvianus* (Figura 15). O seqüenciamento ao acaso foi finalizado quando a taxa de novidade se tornou aproximadamente constante. Isto aconteceu quando a taxa de novidade esteve próxima de 0,1.

O número de ESTs por contíguos variou de 2 a 27, com cerca de 70% contendo 2 EST (Figura 16). O tamanho dos contíguos variou de menos de 200 a

1400 pb, com uma média de aproximadamente 860 pb (ilustrado graficamente na Figura 17).

TABELA 4 - Resumo da análise do seqüenciamento de EST da biblioteca de cDNA do intestino médio e *Dysdercus peruvianus*

<i>Seqüências Totais</i>	<i>1056</i>
Total de seqüências aceitas	1053
Seqüências Não-redundantes	903
Número de Singletos	841
Número de contíguos	62
Número de contíguos contendo:	
2-4 ESTs	57
5-15 ESTs	3
>20	2

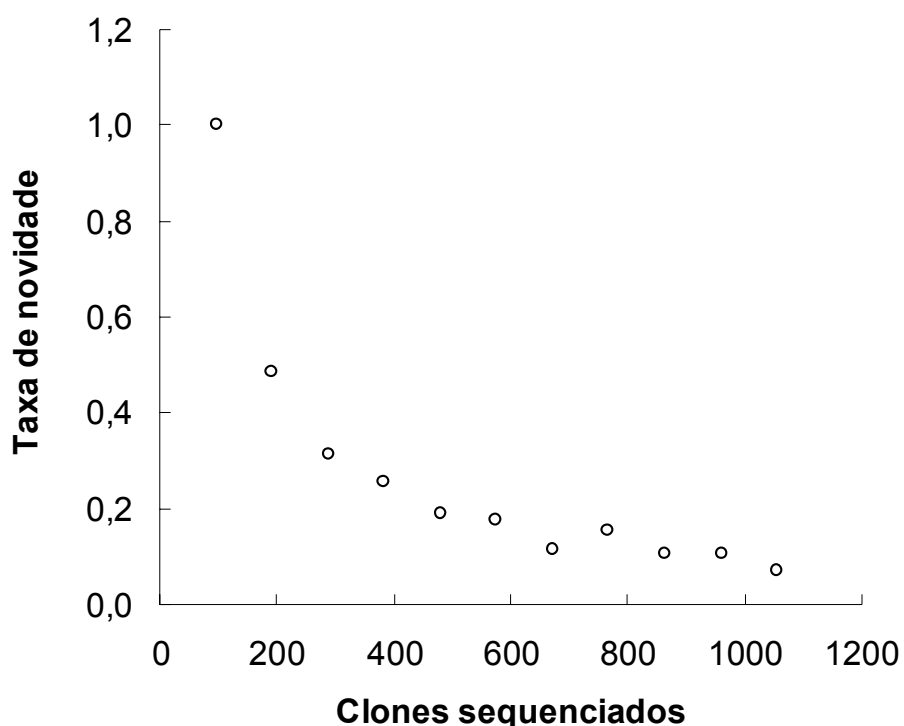


FIGURA 15 - Mudanças na taxa de novidade acompanham o seqüenciamento ao acaso da biblioteca de intestino médio de *D. peruvianus*.

A taxa de novidade corresponde à razão do número de bases novas com o numero total de bases seqüenciadas.

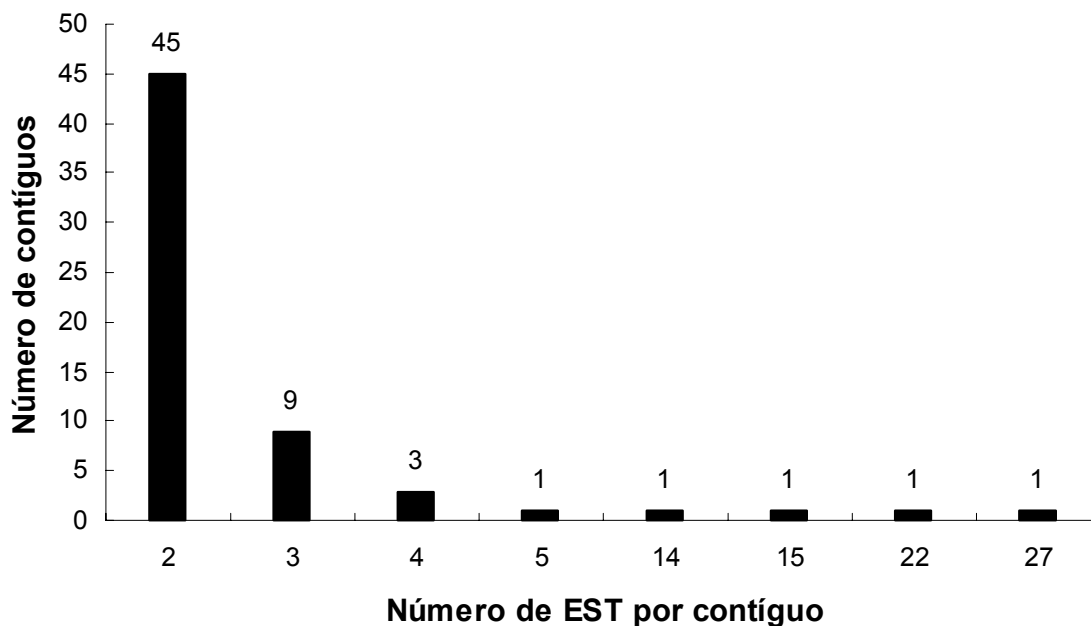


FIGURA 16 - Distribuição e número de ESTs em cada contígúo.

As ESTs foram agrupadas pelo programa Phrap. A maioria dos contígúos é formada por 2 ou 3 ESTs e o maior contígúo por 27 ESTs.

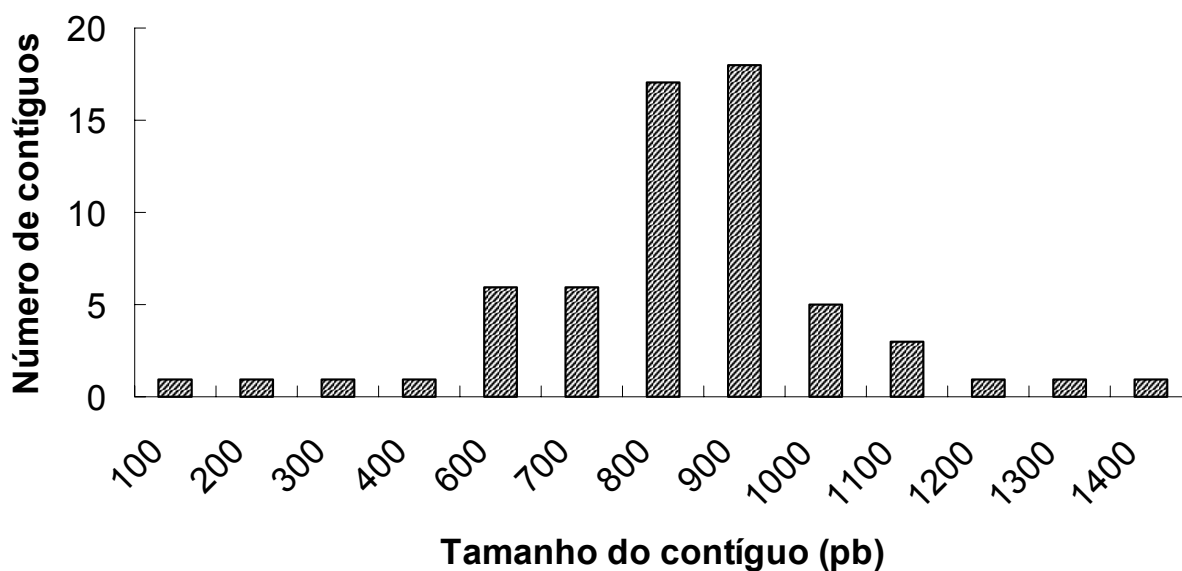


FIGURA 17 - Característica dos contígúos.

Distribuição do tamanho total das seqüências dos contígúos.

Após a clusterização e montagem, os contíguos e os singletos resultantes foram analisados através de Blastx (Altschul *et al.*, 1990) contra o banco de dados nr (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que inclui seqüências de todos os organismos. Os parâmetros utilizados foram: -p blastx -d nr -b 10 -T T. As traduções das seqüências dos contíguos e singletos quando comparadas às seqüências depositadas no GenBank, revelaram que 86% das seqüências únicas possuem similaridade com alguma proteína depositada no banco público. Destas 48,2% mostraram proteínas de insetos como maior semelhante (“best hit”) (Figura 18A), sendo que dentro do grupo dos insetos a ordem Coleoptera apresentou uma maior semelhança (32,2%) seguido por Diptera (31,7%) e Hymenoptera (28,9%), os “best hits” dos outros 7,3% destes ESTs se distribuem em proporções bem menores entre as outras ordens de insetos conforme mostra a Figura 18B.

Não é incomum encontrar nas respostas de Blastx proteínas de humanos, camundongos, entre outros organismos distantes de *D. peruvianus* como “best hit”. Em nossos resultados estes organismos representam aproximadamente 52% das respostas, podendo-se apontar diferentes motivos para encontrarmos organismos muito divergentes de *Dysdercus* ocupando a posição de maior semelhante nas comparações entre as traduções de EST e o banco de proteínas do GenBank. Proteínas muito conservadas entre diferentes filos quando comparadas entre si podem apresentar os mesmos valores de e-values e de score.

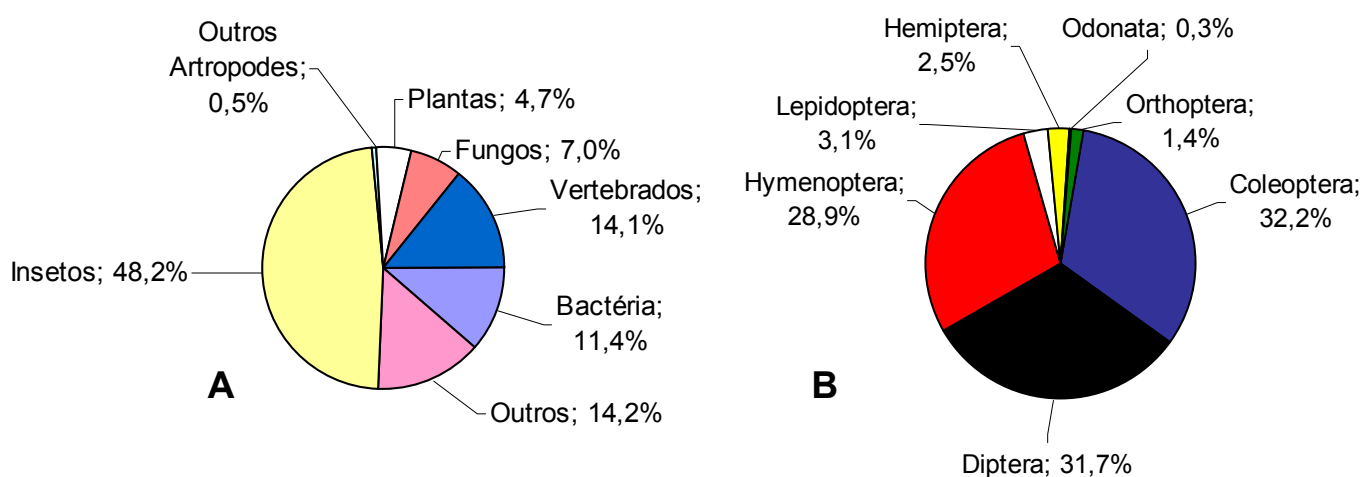


FIGURA 18 - Distribuição das similaridades de proteínas entre *Dysdercus peruvianus* e outros organismos.

Os números representam a porcentagem dos ESTs que apresentaram similaridade com algum organismo presente no GenBank.

A fim de gerar uma visão mais ampla do estado metabólico do tecido, os ESTs gerados foram categorizados segundo critérios do Gene Ontology Consortium (GO). Uma provável Função Molecular foi designada para 445 seqüências (50% do total de seqüências) (Figura 19), bem como para Processo Biológico onde foram categorizadas 390 seqüências (43% do total de seqüências) (Figura 20), as seqüências restantes não puderam ser categorizadas pelo banco de dados de proteínas anotadas pelo GO. É natural que uma quantidade menor de transcritos seja classificada no aspecto Processo Biológico, reflexo da complexidade da tarefa de associar evidências reais a cada termo do GO e de fato de não ser conhecido o perfil completo da participação em processos biológicos em que cada função de uma dada proteína é desempenhada.

Com o intuito de preservar a integridade do vocabulário do GO e seu sentido original, os seus termos não foram traduzidos para o português.

Os termos do GO relacionados à Função Molecular e Processo Biológico são mais curados e detalhados. A distribuição na categoria Componente Celular é considerada menos instrutiva e, portanto não foi aqui demonstrada.

A figura 19 ilustra a distribuição das seqüências na categoria Função Molecular, indicando maior similaridade com proteínas relacionadas com ligação (binding) e atividade catalítica (catalytic activity). A tabela 5 mostra a distribuição dos transcritos nas categorias mais comumente achadas no primeiro e segundo níveis

hierárquicos da função molecular. Foi encontrado maior número de seqüências relacionadas com ligação de proteínas (22,02%), ligação de ácidos nucleicos (10,78%) e ligação de íons metálicos (2,92%). Na categoria atividade catalítica, as hidrolases foram maioria com 13,26%, seguido das transferases (11,7%) e das oxirredutases (4,94%). Dentre as proteínas relacionadas com transporte, foram achadas similaridades com transportadoras de íons (2,92%), transportadoras de aminoácidos (0,9%), além de uma seqüência com função de transporte de carboidratos que pode ser uma provável molécula envolvida na internalização de açúcares no intestino médio do inseto estudado.

Na categorização de Processo Biológico podemos observar (Tabela 6) que a maioria das proteínas foi distribuída dentro da categoria processo fisiológico (physiological process) (68,97%), sendo que a subcategoria com maior número de seqüências está relacionada com metabolismo (metabolism), com 169 seqüências (43,33%). Outra categoria com representatividade de seqüências foi regulação de processos biológicos (Regulation of biological process) com 15,90%, sendo a sua maioria classificada dentro a subcategoria regulação de processos fisiológicos (Regulation of physiological process) com 14,36%.

O perfil da categorização está condizente com o tecido estudado, envolvido com digestão, já tendo sido observado em outros transcriptomas de intestino médio de insetos (Siegfried *et al.*, 2005) esta mesma proporção de proteínas com função de ligação e de catálise.

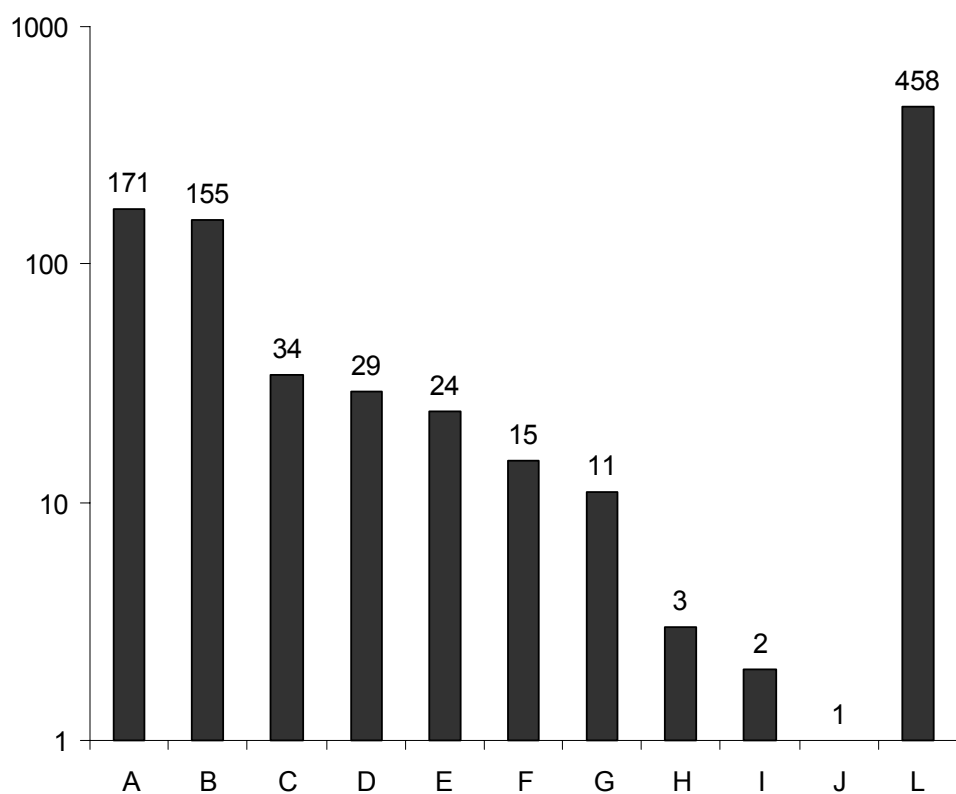


FIGURA 19 - Perfil de expressão de genes da biblioteca de cDNAs de intestino médio de *D. peruvianus* nas categorias de Função Molecular Ontology.

Os valores indicam os números de clones seqüenciados da biblioteca agrupados nas categorias de Função Molecular Ontology. A – Binding, B - Catalytic activity, C - Transporter activity, D - Structural molecule activity, E - Transcription regulator activity, F - Signal transducer activity, G - Enzyme regulator activity, H - Motor activity, I - Translation regulator activity, J - Nutrient reservoir activity, L - Molecular function unknown.

TABELA 5 - Distribuição dos transcritos do inseto *D. peruvianus* na categoria Função Molecular do Gene Ontology.

Função Molecular (GO)	Número de seqüências	Porcentagem em relação ao n°. total de seqüências categorizadas (%)
Binding	171	38,42
Carbohydrate binding	1	0,22
Lipid binding	2	0,45
Metal ion binding	13	2,92
Nucleic acid binding	48	10,78
Nucleotide binding	5	1,12
Peptide binding	1	0,22
Protein binding	98	22,02
Ribonucleoprotein binding	1	0,22
Vitamin binding	2	0,45
Catalytic activity	155	34,83
Helicase activity	4	0,9
Hydrolase activity	59	13,26
Isomerase activity	3	0,67
Ligase activity	3	0,67
Lyase activity	2	0,45
Oxidoreductase activity	22	4,94
Small protein conjugating enzyme activity	1	0,22
Thiolase activity	1	0,22
Transferase activity	52	11,70
Transposase activity	3	0,67
Other Catalytic activity	5	1,12
Enzyme regulator activity	11	2,47
Motor activity	3	0,67
Nutrient reservoir activity	1	0,22
Signal transducer activity	15	3,37
Receptor activity	6	1,35
Rceptor binding	6	1,35
Other transducer activity	3	0,67
Structural molecule activity	29	6,52
Extracellular matrix structural constituent	13	2,92
Structural constituent of cell wall	1	0,22
Structural constituent of cuticle (sensu Insecta)	2	0,45
Structural constituent of cytoskeleton	5	1,12
Structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta)	1	0,22
Structural constituent of ribosome	3	0,67
Other structural molecule activity	4	0,9
Transcription regulator activity	24	5,4
Translation regulator activity	2	0,45
Transporter activity	34	7,64
Amine transporter activity	1	0,22
Amino acid transporter activity	4	0,9
Carbohydrate transporter activity	1	0,22
Carrier activity	1	0,22
Channel or pore class transporter activity	1	0,22
Intracellular transporter activity	1	0,22
Intracellular transporter activity	1	0,22
Ion transporter activity	13	2,92
Nucleobase\, nucleoside\, nucleotide and nucleic acid transporter activity	1	0,22
Organic acid transporter activity	2	0,45
Peptide transporter activity	1	0,22
Vitamin transporter activity	1	0,22
Other transporter activity	6	1,35

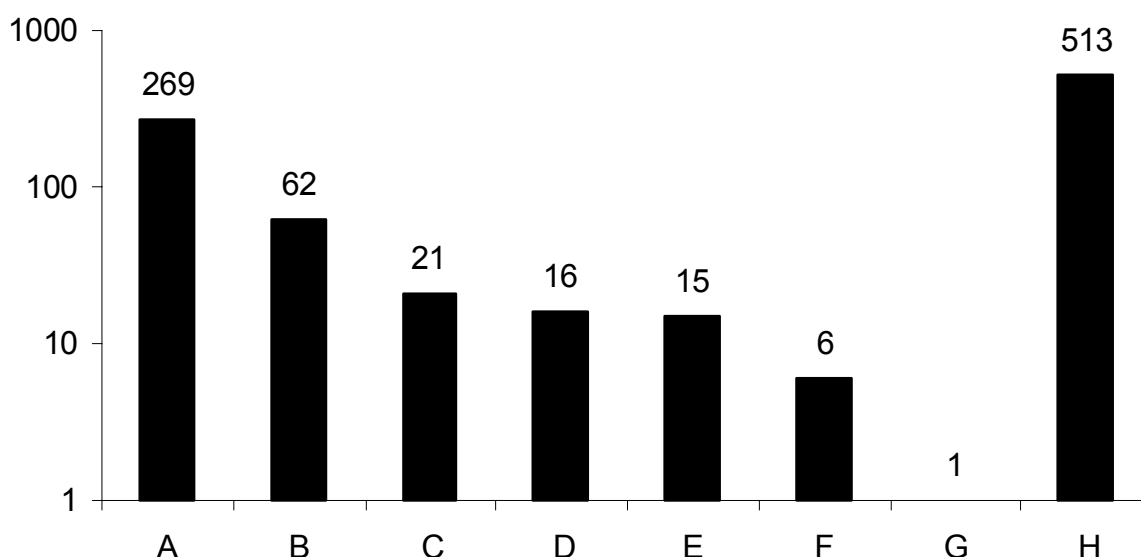


FIGURA 20 - Perfil de expressão de genes da biblioteca de cDNAs de intestino médio de *D. peruvianus* nas categorias de Processo Biológico Ontology

Os valores indicam os números de clones seqüenciados da biblioteca agrupados nas categorias de Processo Biológico Ontology. A – Physiological process, B - Regulation of biological process, C - Cellular process, D - Development, E - Response to stimulus, F - Reproduction, G - Pigmentation, H - Biological process unknown.

TABELA 6 - Distribuição dos transcritos do inseto *D. peruvianus* na categoria Processo Biológico do Gene Ontology

Processo Biológico (GO)	Número de seqüências	Porcentagem em relação ao nº. total de seqüências categorizadas (%)
Cellular process	21	5,38
Cell adhesion	3	0,77
Cell communication	18	4,62
Development	16	4,10
Pigmentation	1	0,26
Pigmentation during development	1	0,26
Physiological process	269	68,97
Cellular physiological process	39	10,00
Homeostasis	1	0,26
Localization	41	10,51
Locomotion	12	3,08
Metabolism	169	43,33
Organism physiological process	7	1,79
Regulation of biological process	62	15,90
Regulation of catalytic activity	3	0,77
Regulation of cellular process	3	0,77
Regulation of physiological process	56	14,36
Response to stimulus	15	3,85
Behavior	4	1,03
Response to abiotic stimulus	3	0,77
Response to biotic stimulus	3	0,77
Response to stress	4	1,03
Sensory perception	1	0,26
Reproduction	6	1,54
Sexual reproduction	6	1,54

4.13 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Uma porção considerável dos ESTs obtiveram similaridade com a proteinase utilizada pelo inseto praga, a cisteína proteinase, além de transportadores de aminoácidos e enzimas envolvidas com a digestão. A Tabela 7 sumariza todos os contíguos mostrando com qual organismo e proteína teve melhor alinhamento no Blastx (nr) e seus e-values. Devido ao grande número de seqüências de proteínas do banco de dados serem preditas ou hipotéticas, foi olhado todos os alinhamentos abaixo da primeira e quando havia uma informação mais curada foi citada juntamente com a mais parecida.

Dentre os contíguos mais interessantes para o presente estudo, estão: catepsina L, lipase, transportador dependente de sódio, proteína transmembrânica transportadora de aminoácidos, ATPase transportadora de cátions e canais ânionicos. Todos estes contíguos apresentam bons e-values e compartilham semelhança com proteínas de outros insetos.

Dos 841 singletos seqüenciados e analisados, 29 apresentam relevância para o estudo da fisiologia molecular do inseto em questão (Tabela 8). Dentre estes singletos estão as enzimas principais envolvidas com digestão: β e α -glicosidase, α -amilase, catepsina L e F, serino proteinase, aspartil proteinase, oligopeptidase, lipase e aminopeptidase; além de transportadores envolvidos com a internalização de glicose e aminoácidos provenientes do alimento digerido: transportador de monocarboxilato, transportadores de cátions, transportador de metal divalente, simportador sódio/soluto, permease de aminoácido, proteína transportadora de íon, canais iônicos de sódio, potássio e cálcio, V-ATPases, transportador de açúcar.

TABELA 7 - Sumário dos 62 Contíguas referentes ao seqüenciamento de ESTs da biblioteca de cDNAs do intestino médio do *D. peruvianus*.

Contíguo	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contíguo 1	2	refXP_392210.1 PREDICTED: similar to acid cluster protein 33 [<i>Apis mellifera</i>] refINP_192960.1 esterase/lipase/thioesterase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1e-025 4e-010
Contíguo 2	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 3	2	refXP_969370.1 PREDICTED: similar to CG4825-PA [<i>Tribolium castaneum</i>] refXP_001653243.1 phosphatidylserine synthase [<i>Aedes aegypti</i>]	5e-071 9e-070
Contíguo 4	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 5	2	refXP_001602102.1 PREDICTED: similar to calcineurin A [<i>Nasonia vitripennis</i>] refINP_001037025.1 calcineurin A [<i>Bombyx mori</i>]	6e-061 3e-060
Contíguo 6	2	gb/AAF90105.1 zinc finger protein Zfy [<i>Puma concolor</i>]	1e-050
Contíguo 7	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 8	2	refXP_001649552.1 sodium/nucleoside cotransporter [<i>Aedes aegypti</i>]	3e-006
Contíguo 9	2	refXP_972061.1 PREDICTED: similar to thymus-specific serine protease [<i>Tribolium castaneum</i>] refINP_501599.1 Prolyl Carboxy Peptidase like family member (pcp-2) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1e-063 1e-026
Contíguo 10	2	refXP_966504.1 PREDICTED: similar to CG9914-PA isoform 1 [<i>T. castaneum</i>] 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Lipid metabolism] refXP_001658792.1 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase [<i>Aedes aegypti</i>]	6e-017 5e-011

Contígua	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contígua 11	2	refXP_001606638.1 PREDICTED: similar to conserved hypothetical protein [Nasonia vitripennis]	5e-019
Contígua 12	2	Nenhum alinhamento	
Contígua 13	2	refXP_001600651.1 PREDICTED: similar to pyruvate kinase [Nasonia vitripennis]	1e-042
		refXP_001662712.1 pyruvate kinase [Aedes aegypti]	6e-038
Contígua 14	2	refXP_966810.1 PREDICTED: similar to CG14661-PA [T. castaneum]	0.007
		dbj BAD83405.1 takeout like protein [Phormia regina]	0.47
Contígua 15	2	refXP_001349265.1 hypothetical protein MAL8P1.24 [Plasmodium falciparum 3D7]	8e-009
		refXP_966048.1 DNA repair protein RAD50, putative [Plasmodium falciparum]	9e-007
Contígua 16	2	Nenhum alinhamento	
Contígua 17	2	refXP_001867169.1 serine/threonine-protein kinase [Culex pipiens quinquefasciatus]	0.036
Contígua 18	2	refXP_968047.1 PREDICTED: similar to CG5486-PA, isoform A [T. castaneum] A subfamily of Peptidase C19	2e-022
		refXP_001866927.1 ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 64E [Culex pipiens quinquefasciatus]	4e-020
Contígua 19	2	refXP_391841.1 PREDICTED: similar to 14-3-3-like protein (Leonardo protein) (14-3-3 zeta) isoform 1 [A. mellifera]	4e-078
		refXP_001652301.1 14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha [Aedes aegypti]	3e-077

Contíguo	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contíguo 20	2	ref XP_974687.2 PREDICTED: similar to Proteasome p44.5 subunit CG10149-PB [<i>Tribolium castaneum</i>]	9e-078
Contíguo 21	2	gb ACB59075.1 Rpn6-PB-like protein [<i>Stratiomys singularior</i>]	6e-071
Contíguo 22	2	ref XP_001660031.1 hexokinase [<i>Aedes aegypti</i>] Nenhum alinhamento	2e-083
Contíguo 23	2	ref XP_967480.1 PREDICTED: similar to voltage-dependent anion-selective channel isoform 1 [<i>Tribolium castaneum</i>]	3e-039
Contíguo 24	2	ref XP_001654143.1 voltage-dependent anion-selective channel [<i>Aedes aegypti</i>] ref XP_392350.2 PREDICTED: similar to Hexokinase A CG3001-PA, isoform A [<i>A. ellifera</i>]	2e-036 3e-079
Contíguo 25	2	gb ABO21409.1 hexokinase [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	2e-060
Contíguo 26	2	ref XP_312380.2 AGAP002559-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST] sp Q95SX7 RTBS_DROME Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS (Reverse transcriptase)	2e-031 7e-005
Contíguo 27	2	gb AAT12845.1 pol protein [<i>Drosophila melanogaster</i>] Nenhum alinhamento	0.047
Contíguo 28	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 29	2	Nenhum alinhamento	

Contíguo	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contíguo 30	2	ref XP_969864.1 PREDICTED: similar to AGAP006264-PA [<i>Tribolium castaneum</i>] 103 ref XP_001862756.1 peroxisomal targeting signal 2 receptor [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>].	2e-077 4e-063
Contíguo 31	2	ref XP_975469.1 PREDICTED: similar to factor inhibiting HIF-1 [<i>Tribolium castaneum</i>] ref NP_988915.1 hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor [<i>Xenopus tropicalis</i>]	9e-057 2e-050
Contíguo 32	2	gb AAZ67106.1 transposase [<i>Adineta vaga</i>]	0.072
Contíguo 33	2	ref XP_001311071.1 ankyrin repeat protein, putative [<i>Trichomonas vaginalis</i> G3]	2e-033
Contíguo 34	2	ref XP_001607591.1 PREDICTED: similar to conserved hypothetical protein [<i>Nasonia vitripennis</i>]	6e-016
Contíguo 35	2	ref XP_001866971.1 conserved hypothetical protein [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>] emb CAM35481.1 farnesoic acid o-methyltransferase-like isoform 1 protein [<i>Melipona scutellaris</i>].	4e-027 1e-018
Contíguo 36	2	gb AAB81850.1 chitinase [<i>Aedes aegypti</i>]	1.1
Contíguo 37	2	dbj BAD91203.1 soldier-specific protein-1 [<i>Nasutitermes takasagoensis</i>]	0.16
Contíguo 38	2	ref XP_972932.1 PREDICTED: similar to multiple inositol polyphosphate phosphatase [<i>Tribolium castaneum</i>] ref NP_524109.2 Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 CG4123-PA, isoform A [<i>Drosophila melanogaster</i>].	7e-016 2e-010

Contíguo	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contíguo 39	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 40	2	refXP_982417.1] PREDICTED: hypothetical protein [<i>Mus musculus</i>]	0.010
Contíguo 41	2	refXP_625100.1] PREDICTED: similar to CG1532-PA [<i>A. mellifera</i>] refXP_001660129.1] lactoylglutathione lyase [<i>Aedes aegypti</i>]	9e-026 4e-023
Contíguo 42	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 43	2	refXP_001865950.1] cation-transporting ATPase [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>]	2e-015
Contíguo 44	2	Nenhum alinhamento	
Contíguo 45	2	refXP_001865844.1] conserved hypothetical protein [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>]	6e-004
Contíguo 46	3	Nenhum alinhamento	
Contíguo 47	3	refXP_967394.1] PREDICTED: similar to AGAP004792-PA [<i>Tribolium castaneum</i>]	6e-018
Contíguo 48	3	Nenhum alinhamento	
Contíguo 49	3	refXP_969746.1] PREDICTED: similar to Cytochrome P450 6a2 (CYPVIA2) (P450-B1), prtial [<i>T. castaneum</i>] refXP_001653671.1] cytochrome P450 [<i>Aedes aegypti</i>]	1e-008 3e-007
Contíguo 50	3	gb AA101074.1] putative arginine kinase [<i>Homalodisca coagulata</i>] gb AA177152.1] arginine kinase [<i>Periplaneta americana</i>]	e-102 e-100
Contíguo 51	3	refXP_972957.2] PREDICTED: similar to lysosomal acid lipase [<i>Tribolium castaneum</i>] refXP_001662499.1] lipase 1 precursor [<i>Aedes aegypti</i>]	3e-069 2e-064
Contíguo 52	3	gb AAL14979.1] reverse transcriptase [<i>Drosophila virilis</i>]	7e-013

Contíguo	Número de ESTs	Melhor alinhamento	E-value
Contíguo 53	3	ref XP_970568.2 PREDICTED: similar to HRP130 protein [<i>Tribolium castaneum</i>]	1e-013
Contíguo 54	3	Nenhum alinhamento	
Contíguo 55	4	gb ABB91778.1 cathepsin L [<i>Hymeniacidon perlevis</i>]	6e-099
Contíguo 56	4	emb CAA56915.1 cathepsin 1 [<i>Nephrops norvegicus</i>]	7e-067
Contíguo 57	4	gb AAU95193.1 putative mitochondrial ADP/ATP translocase [<i>Oncometopia nigrigans</i>]	1e-018
		ref NP_001010975.1 ADP/ATP translocase [<i>Apis mellifera</i>]	5e-018
Contíguo 58	5	gb AAL14979.1 reverse transcriptase [<i>Drosophila virilis</i>]	9e-028
Contíguo 59	14	ref XP_001689357.1 AGAP001353-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	2e-004
Contíguo 60	15	gb ABB91778.1 cathepsin L [<i>H. perlevis</i>]	1e-075
Contíguo 61	22	ref XP_001603237.1 PREDICTED: similar to RE03018p, partial [<i>Nasonia vitripennis</i>]	4e-016
		gb AAN85439.1 inositol 5-phosphatase 3 [<i>Dictyostelium</i>]	9e-006
Contíguo 62	27	ref XP_397368.3 PREDICTED: similar to Egl nine homolog 1 (Hypoxia-inducible factor polyI hydroxylase 2) (HIF-prolyl hydroxylase 2) HIF-PH2) (HPH-2) (SM-20) [<i>A. mellifera</i>]	1e-057

TABELA 8 - Sumário com alguns Singletos referentes ao seqüenciamento de ESTs da biblioteca de cDNAs do intestino médio do *D. peruvianus* mais interessantes.

Singletos interessantes	Melhor alinhamento	E-value
Singleto	ref XP_001862227.1 lysosomal acid lipase [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>]	0.001
Singleto	ref XP_001648990.1 alpha-glucosidase [<i>Aedes aegypti</i>]	4e-026
Singleto	gb AAL15154.1 serine protease [<i>Creontiades dilutus</i>]	1e-042
Singleto	ref XP_394281.2 PREDICTED: similar to Open rectifier potassium channel protein 1 (Two pore domain potassium channel Ork1) [<i>Apis mellifera</i>]	2e-040
Singleto	ref XP_001660130.1 oligopeptidase [<i>Aedes aegypti</i>]	2e-028
Singleto	ref NP_001040138.1 vacuolar ATPase subunit C [<i>Bombyx mori</i>]	6e-071
Singleto	ref XP_001652442.1 lipase [<i>Aedes aegypti</i>]	1e-033
Singleto	dbj BAB91145.1 beta-glucosidase [<i>Neotermes koshunensis</i>]	6e-043
Singleto	ref XP_393387.2 PREDICTED: similar to Amino acid Transporter Glycoprotein subunit family member (atg-2) [<i>Apis mellifera</i>]	3e-026
Singleto	ref XP_001655208.1 monocarboxylate transporter [<i>Aedes aegypti</i>]	8e-035
Singleto	ref XP_001867470.1 cathepsin I [<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>]	2e-073
Singleto	gb ABH07377.2 aminopeptidase [<i>Achaea janata</i>]	2e-006
Singleto	gb AAS72876.1 aspartyl protease [<i>Triatoma infestans</i>]	3e-033
Singleto	ref XP_972470.2 PREDICTED: similar to oligopeptide transporter [<i>Tribolium castaneum</i>]	7e-048
Singleto	ref XP_001652483.1 sodium/solute symporter [<i>Aedes aegypti</i>]	1e-030
Singleto	dbj BAF94154.1 cathepsin F-like cysteine protease [<i>Plautia stali</i>]	1e-004

Singletons interessantes	Melhor alinhamento	E-value
Singleto	ref XP_001656434.1 monocarboxylate transporter [<i>Aedes aegypti</i>]	1e-072
Singleto	ref XP_001601569.1 PREDICTED: similar to cation chloride cotransporter [<i>Nasonia vitripennis</i>]	3e-021
Singleto	gb ABL84270.1 aspartic protease [<i>Musca domestica</i>]	6e-010
Singleto	ref XP_001653371.1 bile acid beta-glucosidase, putative [<i>Aedes aegypti</i>]	8e-052
Singleto	ref XP_001648990.1 alpha-glucosidase [<i>Aedes aegypti</i>]	5e-034
Singleto	ref XP_001662499.1 lipase 1 precursor [<i>Aedes aegypti</i>]	3e-023
Singleto	ref XP_001660906.1 alpha-amylase [<i>Aedes aegypti</i>]	7e-028
Singleto	ref XP_001652873.1 sugar transporter [<i>Aedes aegypti</i>]	3e-005
Singleto	sp P31401 VATB_MANSE Vacuolar ATP synthase subunit B (V-ATPase subunit B) (Vacuolar proton pump subunit B)	e-110
Singleto	ref XP_001659801.1 organic cation transporter [<i>Aedes aegypti</i>]	3e-032
Singleto	ref XP_001659801.1 organic cation transporter [<i>Aedes aegypti</i>]	1e-041
Singleto	dbj BAD99106.1 divalent metal transporter [<i>Mizuhopecten</i>]	7e-055
Singleto	gb ABV44751.1 peritrophin-like protein [<i>Phlebotomus papatasi</i>]	8e-006

4.14 - SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS OBTIDAS ATRAVÉS DE SEQÜENCIAMENTO AO ACASO DE BIBLIOTECA DE cDNA DE INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Através da análise do transcriptoma intestinal, foram encontradas seqüências relacionadas com enzimas marcadoras que hipoteticamente participam do processo secretório de enzimas digestivas em Hemiptera (Figura 21). O modelo proposto, vesículas (contendo enzimas digestivas) com duas membranas são formadas a partir de cisternas com dupla membrana provenientes da região do trans-Golgi. Essas vesículas com dupla membrana originariam as membranas perimicrovilares após dois eventos sucessivos de fusão: primeiro da membrana externa da vesícula com a membrana microvilar e, segundo, da membrana interna vesicular com a membrana perimicrovilar (Silva *et al.*, 1995). Esta hipótese foi reforçada após a imunolocalização de α -glicosidase em algumas áreas do complexo de Golgi e na membrana interna dessas vesículas de dupla membrana (Silva *et al.*, 1995), a qual se especulava ser a membrana que daria origem às membranas perimicrovilares.

Uma β -glicosidase, duas α -glicosidases, uma aminopeptidase e quatro catepsinas L, foram as seqüências encontradas dentre os ESTs analisados que podem ajudar a afirmar a hipótese postulada (Figura 22 A-I) (Tabela 9). A escolha baseia-se no fato de que enzimas com essas atividades foram identificadas como marcadoras (Silva e Terra, 1994; Silva *et al.*, 1996): β -glicosidase, marcadora de membranas microvilares; α -glicosidase, marcadora de membranas perimicrovilares; aminopeptidase, encontrada no espaço perimicrovilar e catepsinas L, proteinase que podem ser encontradas em vesículas secretoras ou em lisossomos.

Cada singleto referente à seqüência similar a β -glicosidase, as duas α -glicosidases, a aminopeptidase, ao transportador de açúcar e aos contíguos das catepsinas L foram detalhadamente analisados a fim de recuperar os plasmídeos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol referente a cada EST para tentar obter seqüências maiores e com melhor qualidade de bases. Após o crescimento em meio líquido e purificação do DNA, este foi seqüenciado utilizando dois oligonucleotídeos universais, T7 e T3 obtendo ao final seqüências que foram analisadas e montadas. A partir destas seqüências (Figura 22 A-I) foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 1) para análise de transcrição tecidual.

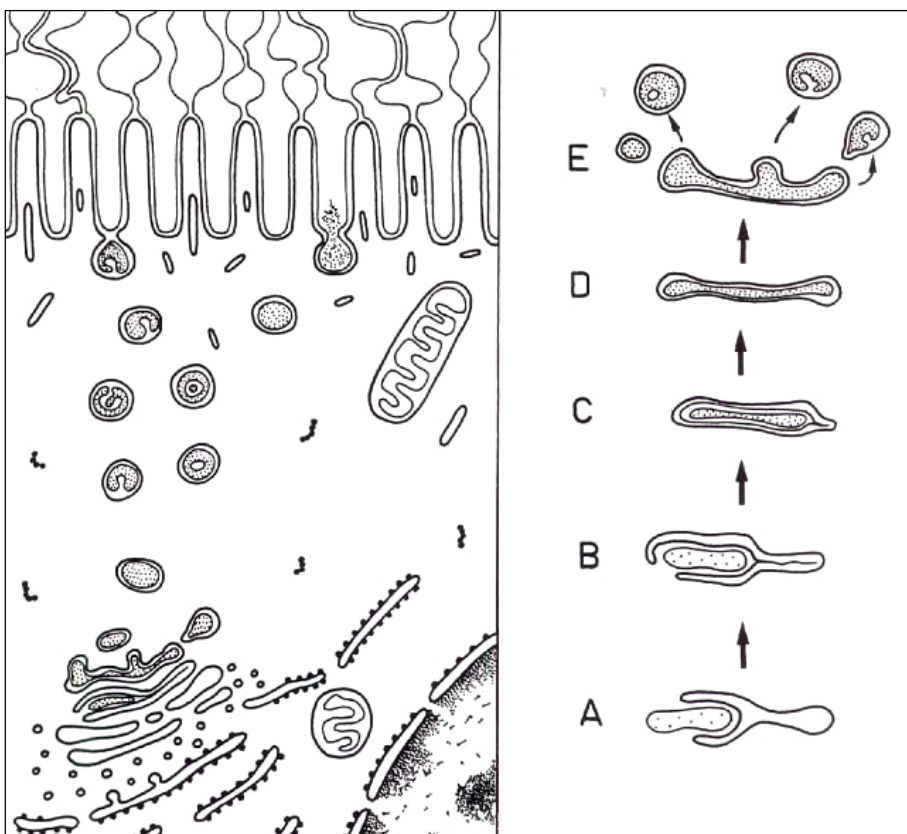


FIGURA 21 - Modelo proposto para a origem das membranas perimicrovilares.

A figura à esquerda mostra vesículas de dupla membrana brotando do Golgi e transportando proteínas secretórias que são liberadas no lúmen após a fusão da membrana externa da vesícula com a membrana microvilar e da membrana interna com a membrana perimicrovilar. A figura à direita mostra em detalhes a origem das vesículas de dupla membrana a partir de uma cisterna do complexo de Golgi (A) que é envolvida por outra cisterna (B) e (C). A membrana mais interna desaparece dando origem a uma cisterna de dupla membrana da qual brotam as vesículas (Silva *et al.*, 1995).

TABELA 9 - Sumário dos 9 contíguas de interesse da biblioteca de cDNAs do intestino médio do *D. peruvianus* utilizadas para estudo de distribuição e localização tecidual.

Contíguo	Proteína traduzida	Tamanho (pb)	Nº de seqüências	Melhor alinhamento (Genbank)	e-value	Identidade	Melhor alinhamento (Swissprot)	e-value	Identidade
1	Aminopectidase	935	2	gb ABH07377.2 aminopectidase (<i>Achaeta janata</i>)	2e-008	22%	sp P91887 AMPN PLUXY Aminopectidase N precursor (Microsomal aminopectidase)	7e-004	19%
2	Transportador de açúcar	844	2	ref XP_973941.1 PREDICTED: similar to H17B01.1a (<i>Tribolium castaneum</i>)	9e-052	47%	sp P20303 GTR1 PIG Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1(Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain) (GLUT-1)	2e-042	40%
3	β -glucosidase	905	3	ref XP_001653371.1 bile acid beta-glucosidase, putative (<i>Aedes aegypti</i>)	5e-068	46%	sp Q7KT91 C3390_1 DROME Non-lysosomal glucosylceramidase (NLGase)	1e-066	48%
4	α -glucosidase 1	855	3	ref XP_001648990.1 alpha-glucosidase (<i>Aedes aegypti</i>)	7e-042	45%	sp Q6NSJ0.2 K1161_HUMAN Uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	7e-038	41%

Contígua	Proteína traduzida	Tamanho (pb)	Nº. de seqüências	Melhor alinhamento (Genbank)	e-value	Identidade	Melhor alinhamento (Swissprot)	e-value	Identidade
5	α -glucosidase 2	850	3	ref XP_001648990.1 alpha-glucosidase (<i>Aedes aegypti</i>)	3e-028	37%	sp Q6NSJ0.2 K116 1_HUMAN Uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	4e-18	31%
6	DpCaL 1	910	9	gb AAR12010.1 cathepsin L-like proteinase (<i>Triatoma infestans</i>)	e-107	67%	sp Q26636 CATL_ SARPE_Cathepsin L_precursor	e-101	61%
7	DpCaL 2	666	3	dbj BAA8691.1.1 homologue of Sarcophaga proteinase (<i>Periplaneta americana</i>)	5e-091	80%	sp P13277 CYSP1 _HOMAM Digestive cysteine proteinase 1_precursor	1e-044	48%
8	DpCaL 3	955	4	gb AAL34984.1 AF32 0565_1 cathepsine L-like cysteine protease (<i>Rhodnius prolixus</i>)	e-100	59%	sp P25784 CYSP3 _HOMAM Digestive cysteine proteinase 3 precursor	2e-97	59%
9	DpCaL 4	965	32	gb AAL34984.1 AF32 0565_1 cathepsine L-like cysteine protease (<i>Rhodnius prolixus</i>)	8e-088	59%	sp P25784 CYSP3 _HOMAM Digestive cysteine proteinase 3 precursor	1e-85	58%

FIGURA 22 - Seqüência de nucleotídeos e seqüência de aminoácidos.

Seqüências deduzidas a partir dos cDNAs que codificam: **A**, a aminopeptidase; **B**, o transportador de açúcar; **C**, a β -glicosidase; **D**, a α -glicosidase 1, **E**, α -glicosidase 2; **F**, a DpCaL 1; **G**, DpCaL 2; **H**, DpCaL 3; **I**, DpCaL 4 de *D. peruvianus*.

```

ggggcagtttcaagagtaatgagctttccagtaacaaaggaaataaaaatgaatatatcg
  G A V S R V M S F P V T K E I K M N I S
gccaaagataacttttggtgatggagaacgtaataaattacattgcctttaacgacacgaca
  A K I L L L M E N V I N Y I A F N D T T
aatatgggccataccagaagttgcatcagatgaacataacttaaacattgctgtagtttt
  N M G H T Q K L H Q M N I L K H C C S F
ggacacaaaggctgcctaaaggaagccgagcggctgtctctggacataagttctggaagt
  G H K G C L K E A E R L S L D I S S G S
ccagagaagcggagtgccctcctttgcacagttgtcaaacttgaaactcaagtgtctgg
  P E K R S A L L C T V V K L G N S S V W
gaatcagtattgggaaggatgaaaacgcaaatacaccagcatgggccttactgatgctc
  E S V L G R Y E N A K S P A W A L L M L
agatcacttgcatgtacaaacaatgagaccctcacaaaaaggctactcaagttactgttt
  R S L A C T N N E T L T K R L L K L L F
acggacaaagtgagaaggcatgatattgtaagtatcatcaccctaattagttctagcagc
  T D K V R R H D I V S I I T L I S S S S
gatggagcagatatcgtgttcacatatttcatcgagaacatttacaacatttatcagcgt
  D G A D I V F T Y F I E N I Y N I Y Q R
tttggagaattcacaagtttaagaaaaataatgagatccataagtaaataatgactgaa
  F G E F T S L R K I M R S I S K Y M T E
agtcacttaacaaagctcaaacaatatagg
  S H L T K L K Q I

```

A

```

catcaggcagaggacgagacagaacgcagaaacactgtggccacttctcatgggactcatt
  I R Q R T R Q N A E T L W P L L M G L I
ggaatcgttggtttcctccaactagtcggggtttttcttctgcccagaaagtccaaaatat
  G I V G F L Q L V G F F F C P E S P K Y
atattggagaaaaaaaatgacgaacaaggaacaaaaatgggttttagacaggctagtagga

```

I L E K K N D E Q G T K M V L D R L V G
 agtaattcacaccaacagtttatagaattgaaaaaagatatagaagatgcacaaagtctc
 S N S H Q Q F I E L K K D I E D A Q S L
 ccgaaagttactttaagccaaatggtacgacaaaaaaaactgagaactcctcttattata
 P K V T L S Q M V R Q K K L R T P L I I
 atcgggtgattgatggcggcacaacagctttctggtgtaaacgctgtaatcttctattca
 I G V L M A A Q Q L S G V N A V I F Y S
 acagaaatcttttaaaatgggaaagctcagtgatgaagcagctcaatacgcacccgtaggt
 T E I F K M G K L S D E A A Q Y A T V G
 gtaggagtaatcaatgtactgacgaccattgtttcagtggtgcttggtgaaaaatttggg
 V G V I N V L T T I V S V W L V E K F G
 aggaaaccacttctactgggtgcttttggtggattgactatctgcatgacaatacttttt
 R K P L L L V A F G G L T I C M T I L F
 atctgtctttatctttgtcgaacaagcccttttgcaaagtatttatcaattgtcatcgta
 I C L Y F V E T S P F A K Y L S I V I V
 tttgcttacttggtcttttttgccattggagcgggttcgattccatggctcctaggacct
 F V Y L V F F A I G A G S I P W L L G P
 gaattatcttaatactgctgctcgtcccactgcc
 E L F N T A A R P T A

B

catcaggcagaggacgagacagaacgcaaacacattaattcagacaatattcaaagtgaa
 H Q A E D E T E R K H I N S D N I Q S E
 aactttgaaaaaacctctgagcatagtagtactggtgagggttttttaataaaacaatttgtc
 N F E K T S E H S T V E G F L I K Q F V
 agtgaactgcctctcacctatggcatttctgcaataaaaaaggaaaattattctaacact
 S E L P L T Y G I S A I K K E N Y S N T
 tcaatggctctttgatccaactagtgatggacaagaaatttgggaataaattgacaaaaaat
 S M V F D P T S D G Q E I W N K L T K N
 ggggaattactttctatttcaacaccttttagagaaattaggaaaaagggtcagggaca
 G E L L S I S T P L E K L G K K G S G T
 gcttggtgctgtgtactaggactggtggttattcttctacaccaacaccttttgtattt
 A C G L C T R T V V Y S S T P T P F V F
 tcattgtcatgggacaatccgaaggtaaaattcccaaagtcagctgtacaaaaagggtat

S L S W D N P K V K F P K S A V Q K R Y
 tataccaagttctttggcgatgaaggaaattctgctcctgaaatatgtttatattgtata
 Y T K F F G D E G N S A P E I C L Y C I
 gataattataataattgggaaaaagaaatatctgattggcaaaccaccaattcttaaagat
 D N Y N N W E K E I S D W Q T P I L K D
 aaaggattaccggactgggtataaaagtgcattatttaatgagctttattatgtatctgat
 K G L P D W Y K S A L F N E L Y Y V S D
 ggagggacaatttggcttttagttgaaaatgaagacctcccatcgggagatcctaggatc
 G G T I W L L V E N E D L P S G D P R I
 gaatatggaagatttggttatttagagggccatgaatacagaatgtataatacatatgat
 E Y G R F G Y L E G H E Y R M Y N T Y D
 gtacattattatgcttcttttggctcttgcaatgctgtggcctaaacttcaacttaccatc
 V H Y Y A S F A L A M L W P K L Q L T I
 caatatgattttcgtgatgcaattactgttgaagataagaggaaaatttggtttttatat
 Q Y D F R D A I T V E D K R K I W F L Y
 aatggagaacgtggatacaggaaaattaaaaatagggtacctcgaggggggcccgtacc
 N G E R G Y R K I K N R V P R G G P V P
 atc

I

C

tgctggagaagcagcatacataccgggactggaatagacgaacaacaacttggacttact
 C W R S S I H T G T G I D E Q Q L G L T
 cgaccaacaattttactaccaactacgtcaaggctgcctctaaatttgggtccactggcg
 R P N N F T T N Y V K A A S K F G P L A
 gaggtgagagtaggttctgaagcagctaaattcaatctgatgcaaaggctgcaagacacc
 E V R V G S E A A K F N L M Q R L Q D T
 ttctctgagtgagcgcagagaagtggggtcttaagtctgtgcttatgtccgttttccaa
 F S E W S A E K W G L K S V L M S V F Q
 ctgtctctgcatggctatgggtgccatcttgccagatatgggtcggaggttaactgctatgga
 L S L H G Y G A I L P D M V G G N C Y G
 acacaggccactaaagaattgtacatcaggtgggttacagctaaacacattcctgcctatc
 T Q A T K E L Y I R W L Q L N T F L P I
 atacagttctcattggcaccctggaagttcgaccaagagacaatagaccttgaagacgt

I Q F S L A P W K F D Q E T I D L A R R
 ttttccgaccttcattacttctataagggtaaaattatgtctgaatttaaggacacgacg
 F S D L H Y F Y K G K I M S E F K D T T
 caccggtcatcaaccctatgttggtggatagcacctgaagaccggtcgctcaagacatt
 H P V I N P I W W I A P E D P V A Q D I
 gacacagaattcctgcttggcgaagaccttttagttgcacctgtcttagaagaaggagct
 D T E F L L G E D L L V A P V L E E G A
 acatcgggaactctatctaccgcaggaatcttgccggacttaataacaccgtttaataaa
 T S G T L S T A G I L P D L I T P F N K
 gaccgtcccctcgggggggcccggaccatccgcctatgggagcga
 D R P L G G A G P I R L W E R

D

tcaggcagaggccgagacagaacgcaaacgactgaaaccgttgataacggcagaaccaag
 S G R G R D R T Q T T E T V D N G R T K
 gttaccctacactcggaggccccctcaagatgtgctgggtcccttaggaaccagcatctc
 V T L H S E A P F K M C W S L R N Q H L
 tacggtggaccatcctcaacacctaccctctgagaaatcaaccatataccaacttgga
 Y G G P I L N T Y P S E K S T I S N L A
 tacatcaccggtgacaagactagattcgggtgtagcacaagcagtcaccgaaaggattgg
 Y I T G D K T R F G V A Q A V T E R Y W
 tacacgtcttctgggtgtaaacctcaaagttgatccgaacgtgcctctcttccctcagccag
 Y T S S G V N L K V D P N V P L F L S Q
 aacaccgaagaactttgtcttcacgccaacaacacctaccatactcagaggacacccca
 N T E E L C L H A N N T Y P Y S E D T P
 gtatttatcagctatgagacatgtctcgctagttctaacctgagagaagcagtcgggctgc
 V F I S Y E T C L A S S N L R E A V G C
 ttttacaagagctacgagaagccatccccccggagtcgggtcatcgccaaacctatctgg
 F Y K S Y E K P I P P E S V I A K P I W
 tccacttgggtggagtacgaaaggaacatcactcaggagacgggtcttggagttttatgaa
 S T W V E Y E R N I T Q E T V L E F Y E
 aaaatcaaggcacaaaatctgccaatcagcgtcctcgaactggacgacagctgggaaacc
 K I K A Q N L P I S V L E L D D S W E T
 tgttacggaagtgaagtgttcgattcgaagagatttccctgatcccaaagccttggtagac

C Y G S E V F D S K R F P D P K A L V D
aaggttcactctgatggcaacctcgccactctctgggtccatcgttcatccgactggatg
K V H S D G N L A T L W V H R S S D W M
tccagcttaaacacgacgcattcaacctcgaggggggcccgggtaccaaattcgcctatgtg
S S L N T T H S T S R G A G T K F A Y V
atcgta

I V

E

tcaggcagaggacgagacagaacgcaagaacacaacaagaactacgagagcgggtgatggt
S G R G R D R T Q E H N K N Y E S G D V
tcgtttcaaataagatgaaccatttcgggtgacttgactccagaagaattcaaagaaaga
S F Q M K M N H F G D L T P E E F K E R
atgaacaagtacaagagttccggtaaaccaaaacagctcggctcagtggtcgtcgaacca
M N K Y K S S G K P K Q L G S V F V E P
aacgttgaagttcccgcctccgctcgactggagggaaaagggtgcagttactccggtgaaa
N V E V P A S V D W R E K G A V T P V K
gatcagggggcagtgcggtcctgctgggcattcagtacaaccggatctttggaaggccaa
D Q G Q C G S C W A F S T T G S L E G Q
cattttctcaaaactggaaaacttgatcattgagcgaacagaacttagtcgattgtgct
H F L K T G K L V S L S E Q N L V D C A
ggaaggtacggcaatgatgggtgcaacgggtgggctgatggacagtgctttcaaatttatc
G R Y G N D G C N G G L M D S A F K F I
aaagcaaacggaggactagacaccgaagcatcttaccctacgaagcaatggacggaaga
K A N G G L D T E A S Y P Y E A M D G R
tgcagatttaagaaagcaaacgttggagctactctaaacagttttggttgacattcctcaa
C R F K K A N V G A T L N S F V D I P Q
ggcgatgaagaagctctcaagaaagctatagcgcggtaggacctatttccgtggccatt
G D E E A L K K A I A T V G P I S V A I
gacgctggagaaagttcgttccaattttactccggaggcgtatactacgagaagagatgc
D A G E S S F Q F Y S G G V Y Y E K R C
agtccttacaacctcgaccacggagtcctcgcagtcggctacggttcagaaaacggccaa
S P Y N L D H G V L A V G Y G S E N G Q
gattactggctgggtcaagaactcctggaacgcaaaatggggagaaaacggttacatcaag

D Y W L V K N S W N A K W G E N G Y I K
 atggcaaggaacaagaacaaccactgcggaatcgctactgaagcaagctaccccggtggtt
 M A R N K N N H C G I A T E A S Y P V V

F

catcaggcagaggacgagacagaacgcaggggcaattgaaggagcttatTTTTgtaaagtat
 I R Q R T R Q N A G A I E G A Y F V K Y
 gaaaattgcttcgtctttcacagcaggctctcatagactgcagttggggctatggaaat
 G K L L R L S Q Q A L I D C S W G Y G N
 aatggttgtgacggagggtgaagatttccgatcatatcagtggatgttaaaacatggaggt
 N G C D G G E D F R S Y Q W M L K H G G
 ttgccactggaatcagattatgggtggttaccttggacaggatggtttctgtcatgtagac
 L P L E S D Y G G Y L G Q D G F C H V D
 aaagttccattagtcgccaaaataacagggttatgtaaataacgactggtgatgaaagt
 K V P L V A K I T G Y V N V T T G D E S
 gctttaaattggccattttcaaacatggtccaatatctgttgcaattgatgcttcacca
 A L K L A I F K H G P I S V A I D A S P
 aagacattttccttctacagcaatggagtatattatgacccaaaatgcaaaaatactcct
 K T F S F Y S N G V Y Y D P K C K N T P
 gatggactagatcatgctgtgcttgctgtaggttatggtaaactaaatggacaatcatat
 D G L D H A V L A V G Y G K L N G Q S Y
 tggctagttaaaaactcttgggtccaacttatggggcaatgatggatacattctcatgtca
 W L V K N S W S N L W G N D G Y I L M S
 Gcaaaagacaataattgtggcgttatgacacaaccaacttatgtaacaatg
 A K D N N C G V M T Q P T Y V T M

G

tcaggcagaggacgagacagaacgcagaaccaaagagaagaaaactaccgtcagaacgtg
 S G R G R D R T Q N Q R E E N Y R Q N V
 ttctacaaaacaaacagaaaatagacgaacacaacaaacagtactcacttggaggacc
 F L Q N K Q K I D E H N K Q Y S L G R T
 acgttactgttaaaattaacaagttcgctgacctgacaaacgaagagttcaggaaatta
 T F T V K I N K F A D L T N E E F R K L
 aacggtttcaaacaagggcccagggatcctgcagtacctgaatacaaagcaccggagaac

N G F K Q G P R D P A V P E Y K A P E N
 gaacagttacccgcgctcgggtggattggagacctaaggggtgctgtgaccgccatcaaggac
 E Q L P A S V D W R P K G A V T A I K D
 caaggacagtgcggtatcgtgctgggctttctctacgactggatctcttgagggacagcag
 Q G Q C G S C W A F S T T G S L E G Q Q
 ttctgaagaaaggaaagctggtatctcttagcgaacagaacctgatggactgctcgtac
 F L K K G K L V S L S E Q N L M D C S Y
 gatgaaggaaacgagtcctgcaatggcggcctcatgactgcagccttcgattacataaag
 D E G N E S C N G G L M T A A F D Y I K
 aagaacgggtggcattgacactgaaaagtcttaccctacctagaaaaggactccagctgt
 K N G G I D T E K S Y P Y L E K D S S C
 aagttctccaaggcgaacatcgggtgccacaatccagagttacaccaacatcaaggaagga
 K F S K A N I G A T I Q S Y T N I K E G
 agtgaggccgatctccagtcgcccgtggccaacgtaggtcctgtatctgtggccatcgac
 S E A D L Q S A V A N V G P V S V A I D
 gcaggagagtggtcgttccaattctacagctcaggtatctactacgagagctcttgcagc
 A G E W S F Q F Y S S G I Y Y E S S C S
 ccgagtttcttgatcacgggtgctcctggctgtgggatacgggaagtcaaaacggtcacgac
 P S F L D H G V L A V G Y G S Q N G H D
 cactggatcgtcaagaactcctggggctccggctgggggtctaagcggctacatcctaatg
 H W I V K N S W G S G W G L S G Y I L M
 tcaagaaataggaacaacaactgcggaatagcttccatggccacataccctaacgttaaa
 S R N R N N N C G I A S M A T Y P N V K
 tcaacttttagaggtgtctctcgagggggggtcagacccatcg
 S T F R G V S R G G V R P I

H

caatatgagctgggcttgactacatttgatttgaaaattaatcaatttgctgatctgaca
 Q Y E L G L T T F D L K I N Q F A D L T
 aacgctgagttcagaaaaatgaacgggttgaaataaaatacaaaggacgcattgaaaccg
 N A E F R K M N G L N K I Q R D A L K P
 gaatacaaagcaccgcgagaacgaacagttacccgagtcagtagattggagaccaagggga
 E Y K A P E N E Q L P E S V D W R P K G
 gctgtgaccgccatcaaggaccaaggacagtgcggtatcgtgctgggctttctctgagacc

A V T A I K D Q G Q C G S C W A F S A T
 ggatctctggaaggacagcacttcttgaagtcaggatctttggtgtcgctgagcgaacag
 G S L E G Q H F L K S G S L V S L S E Q
 aacctgatggactgctcgtacgatcaggggaaccaggcttgccggtggcggcctcatgacc
 N L M D C S Y D Q G N Q A C G G G L M T
 tcagctttcgactacatactccagaacgggtggcattgacacggaacagtcttatccgtac
 S A F D Y I L Q N G G I D T E Q S Y P Y
 acggcaacgaactcccgcaactgtaagttctccaaggcgaacatcgggtgcgaccatcagt
 T A T N S R N C K F S K A N I G A T I S
 ggctacaccaacatccgagaatacagtgagtcagatttacagtcagctgtcgcgaatggt
 G Y T N I R E Y S E S D L Q S A V A N V
 ggaccggtatctgtggcaatcgacgccggggagtccttggttccaattttacaactcaggt
 G P V S V A I D A G E S W F Q F Y N S G
 gtatattacgagagttattgcagccaatatttcttgaaccacgggtgtcctggcagtagga
 V Y Y E S Y C S Q Y F L N H G V L A V G
 tacgcaagttcgaatgggtctgaccactggatcgtcaagaattcctggggagccagctgg
 Y A S S N G S D H W I V K N S W G A S W
 ggtcagagcggctacatcctcatgtcaagaataagaacaacaactgtggaatagcttcc
 G Q S G Y I L M S R N K N N N C G I A S
 atggctacataccccaatgtccctcgagggggggcc
 M A T Y P N V P R G G A

I

4.15 - LOCALIZAÇÃO DAS ENZIMAS MARCADORAS QUE HIPOTETICAMENTE PARTICIPAM DO PROCESSO SECRETÓRIO DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM HEMIPTERA E DE UM TRANSPORTADOR DE GLICOSE ATRAVÉS DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

A fim de investigar a distribuição dos transcritos das enzimas supostamente marcadoras e do transportador de açúcar, fêmeas do inseto *D. peruvianus* foram dissecadas separando-se as regiões: intestino médio, corpo gorduroso, glândula salivar, túbulo de Malpighi, ventrículo 1, ventrículo 2 e ventrículo 3 do intestino médio. Após extração do RNA total destes tecidos (Figura 23), foi realizada a etapa de transcrição reversa partir de amostras de RNA total previamente tratadas com DNase I, utilizando-se o iniciador oligo (dT)₁₂₋₁₈ na síntese da primeira fita. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos

específicos para cada seqüência de interesse selecionada. O resultado foi analisado através da observação de bandas de DNA amplificadas pelo PCR em eletroforese em gel de agarose. Só nos interessa respostas sim e não, isto é, se determinada seqüência é expressa ou não em determinado tecido.

α -Glicosidase 1 é transcrita em corpo gorduroso e intestino, enquanto que a α -glicosidase 2 foi encontrada apenas no intestino médio, mais especificamente no ventrículo 1 (Figura 24 C e D). Como corpo gorduroso não tem membrana perimicrovilar, a α -glicosidase 2 é que deve ser a marcadora dessa membrana. A ausência de transcrição de α -glicosidase em V2 e V3 contrasta com o fato de que as membranas perimicrovillares nessas regiões são mais desenvolvidas que em V1 (Silva e Terra, 1994; 1995; Silva *et al.*, 1995; 1996). Assim, a baixa atividade de α -glicosidase associada com as MPM em V2 e V3 (Silva e Terra, 1994; 1995; Silva *et al.*, 1995; 1996) deve corresponder a outra enzima ou à mesma enzima que é muito pouco transcrita.

A seqüência de β -glicosidase foi encontrada nos três ventrículos do intestino médio e nos túbulos de Malpighi (Figura 24 B). Como esta enzima está ligada nas microvilosidades do intestino médio (Silva *et al.*, 1994), este resultado mostra o que já era esperado e sugere que as microvilosidades do túbulo de Malpighi sejam pelo menos em parte similares às intestinais. Através de estudos morfológicos em túbulos de Malpighi de *Drosophila melanogaster* foi observado membrana microvilar na região apical nos dois tipos celulares encontrados neste tecido (Wessing e Eichelberg, 1978; Dow e Davis, 2001). Além disso, a comparação desta seqüência similar a β -glicosidase com as depositadas no banco de dados do Swissprot demonstra que se trata de uma provável glicosilceramidase (Tabela 9). Já foi descrito que glicosilceramidases hidrolisam bem o substrato sintético NP β Glu e não têm atividade sobre celbiose (Ferreira *et al.*, 1998). Para confirmar esta hipótese, foi dosada atividade frente estes dois substratos no homogeneizado do intestino médio de *D. peruvianus*, onde foi verificado hidrólise de NP β Glu e ausência de hidrólise de celbiose (dado não mostrado). Isto confirma a hipótese da presença de uma glicosilceramidase no intestino médio de *D. peruvianus*.

A aminopeptidase foi encontrada em todos os tecidos estudados, menos na glândula salivar (Figura 24 A), o que não confirma, mas também não descarta a possibilidade de ser o marcador procurado.

Quatro seqüências de catepsinas L foram estudadas e denominadas, DpCaL 1, 2, 3 e 4. A DpCaL 1 foi encontrada apenas no intestino médio, mais especificamente no ventrículo 2; DpCaL 2 foi encontrada em todos os tecidos menos na glândula salivar e no ventrículo 2 e 3, DpCaL 3 nos três ventrículos do intestino médio e DpCaL 4 nos ventrículos 2 e 3 do intestino médio e túbulos de Malpighi. De acordo com o padrão de expressão das catepsinas L transcritas nos diferentes tecidos, uma forte candidata a proteinase digestiva majoritária seria a DpCaL 1, já que esta encontra-se somente no ventrículo 2 do intestino médio, local com maior atividade específica de cisteína proteinase dentre os três ventrículos, determinada através ensaios enzimáticos com o substrato Z-FR-MCA e quantificação de proteínas (14.500 U/mg de proteína). A DpCaL 2 apesar de não ser expressa em V2 e V3 parece ser lisossômica, já que está visível nos demais tecidos. A DpCaL 3 pode ser uma segunda cisteína proteinase digestiva, sendo minoritária. A DpCaL 4 deve ser lisossômica pois está presente em túbulo de Malpighi apesar de não estar sendo expressa em corpo gorduroso.

O transportador de glicose, provavelmente do tipo GLUT (Tabela 8) foi observado apenas no intestino médio, estando predominantemente no ventrículo 1 e ventrículo 2 (Figura 24 I). Como já evidenciado por Silva e Terra (1994), V1 seria o principal sítio de absorção de água e glicose. Provavelmente V2 pode ter uma pequena participação em absorver a glicose remanescente que não foi completamente absorvida em V1. O tipo de experimento realizado por Silva e Terra (1994), assim como o descrito abaixo, não permitem confirmar ou descartar essa possibilidade de envolvimento de V2. O sítio de transcrição desse transportador é compatível com o seu envolvimento na absorção de glicose em V1.

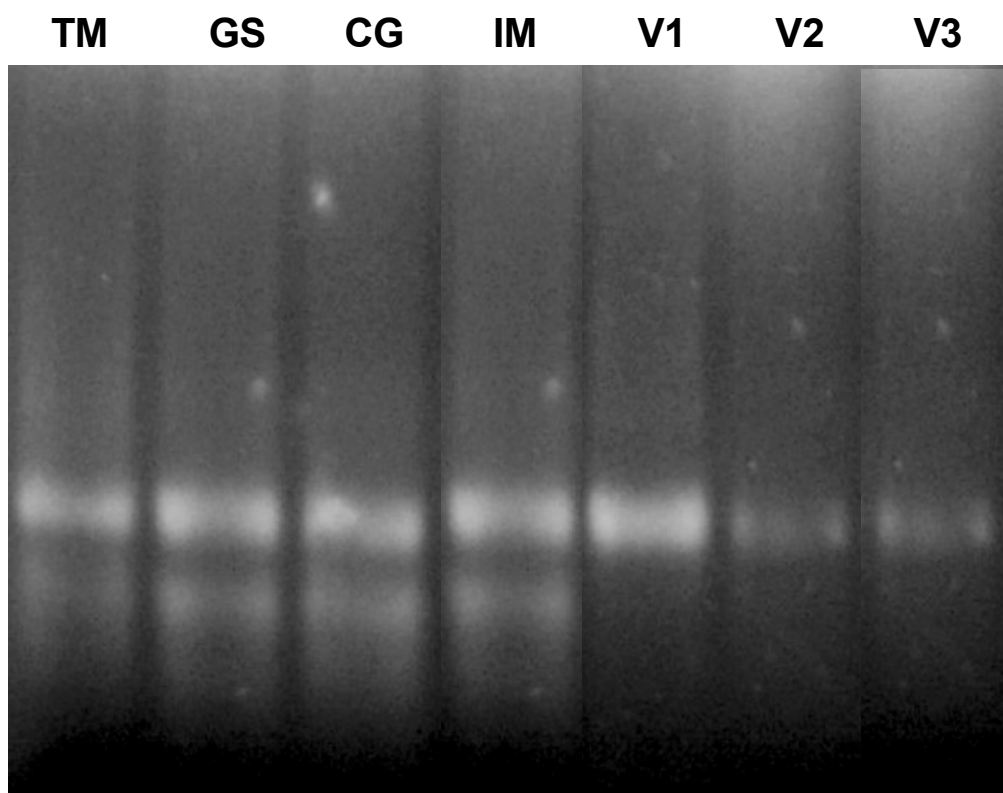


FIGURA 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do RNA total extraído dos diferentes órgãos de *D. Peruvianus*.

TM, túbulos de Malpighi; GS, glândula salivar; CG, corpo gorduroso; IM, intestino médio; V1, ventrículo 1; V2, ventrículo 2; V3, ventrículo 3. Foi aplicado o volume de 10 μ l de amostra, TM, GS, CG e IM cada um contendo 400 ng de RNA; V1, V2 e V3 cada um contendo 500 ng de RNA. O gel foi submetido ao tratamento por brometo de etídio e a banda de RNA total visualizada em transiluminador de UV 312 nm.

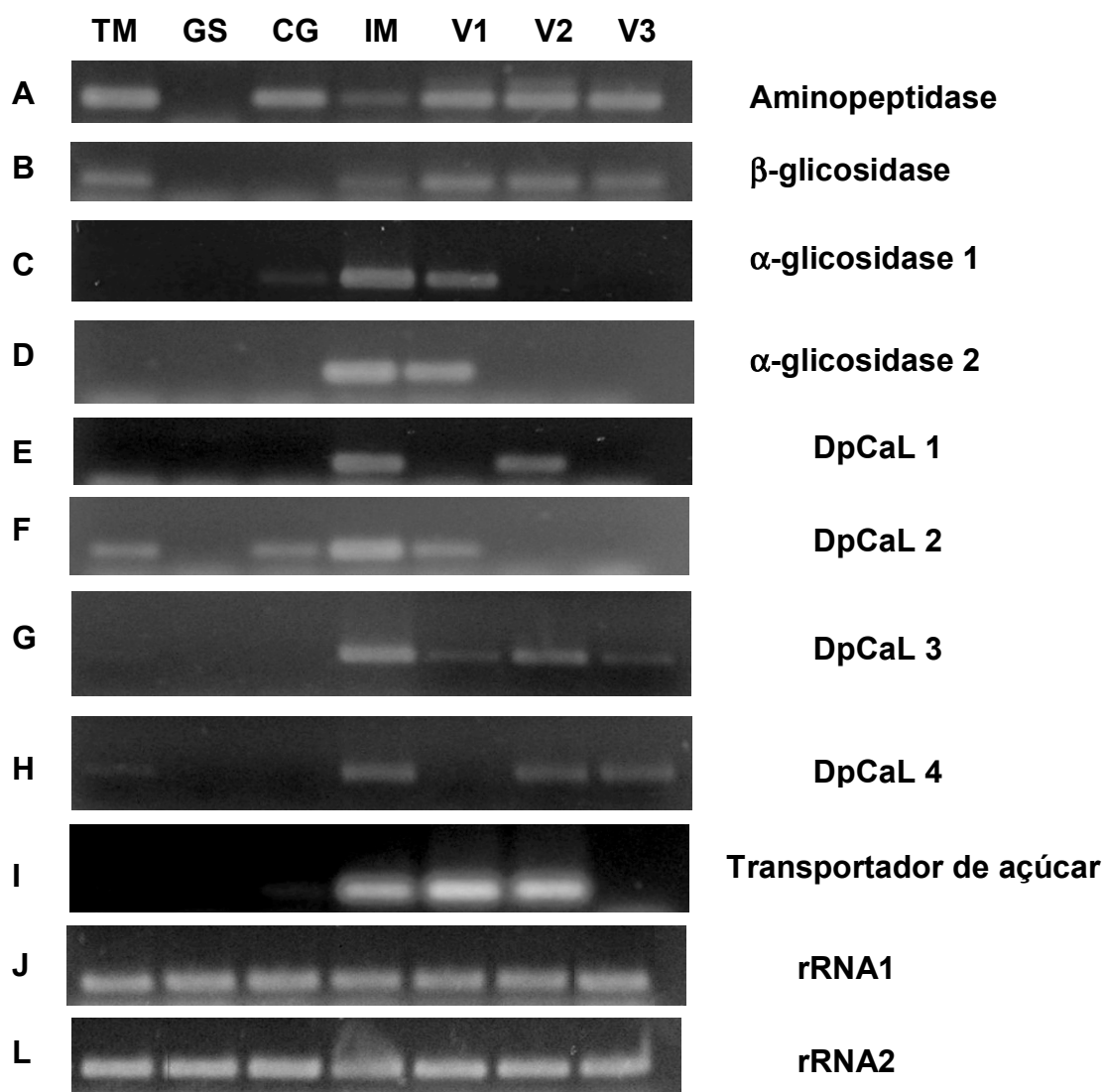


FIGURA 24 - Transcrição dos mRNAs correspondentes a proteínas escolhidas (Tabela 9) em vários tecidos de *D. peruvianus* mostrada através de RT-PCR semiquantitativo.

Quantidades iguais (5 μ g) de RNA total dos diferentes tecidos foram extraídos, tratados com DNase e utilizados como molde para a reação RT. O produto desta reação foi usado para amplificação em termociclador, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada seqüência de cDNA e para o RNA ribossomal. O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose 2% em TAE. As bandas amplificadas aparecem no tecido quando o

mRNA correspondente é transcrito. **TM**, túbulos de Malpighi; **GS**, glândula salivar; **CG**, corpo gorduroso; **IM**, intestino médio; **V1**, ventrículo 1 do intestino médio; **V2**, ventrículo 2; **V3**, ventrículo 3; **rRNA**, RNA ribossomal. O número de ciclos de amplificação foi escolhido, após diversas tentativas, para assegurar que a amplificação estivesse na fase log e resultando numa banda amplificada clara e visível em gel.

IDENTIFICAÇÃO DE TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NA ABSORÇÃO DE GLICOSE E ÁGUA NA PORÇÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DO *DYSDERCUS PERUVIANUS*

4.16 - CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE GLICOSE EM V1 DE *D. PERUVIANUS*

Processos que envolvem transporte através de membranas biológicas representam alvos em potencial, já que envolvem a entrada de nutrientes essenciais, sem os quais o parasita ou praga agrícola pode morrer. Transportadores de glicose estão entre um dos mais bem estudados sistemas de transporte em mamíferos.

O movimento de hexoses através do intestino de mamíferos é quase exclusivamente transcelular e já se sabe que ocorre por co-transporte sódio-glicose (SGLT) e por dois membros da família dos transportadores facilitativos, GLUT2 e GLUT5. Os genes que codificam estes transportadores foram identificados, e as propriedades funcionais de cada uma destas proteínas foram completamente caracterizadas (Uldry e Thorens, 2004; Wright e Turk, 2004). O modelo clássico da absorção de açúcar no intestino de mamíferos foi exaustivamente estudado, predizendo a presença de dois transportadores SGLT1 e GLUT5 (expresso transientemente) na membrana apical das células intestinais, favorecendo a entrada de glicose e frutose e uma saída para a corrente sanguínea para os dois açúcares por GLUT2, constitutivamente expresso na membrana basolateral das células intestinais (Caccia *et al.*, 2007). Pouco ou quase nada se sabe do modelo de absorção de glicose pelas células intestinais em outros vertebrados não mamíferos e em invertebrados.

Pouco se sabe sobre absorção de açúcar em insetos. Alguns estudos iniciais (Treherne, 1957; Treherne, 1958; Shyamala e Bhat, 1965; Crailsheim, 1988), sugerindo a ausência de transportadores de açúcar em intestino de insetos, descrevem a absorção como passiva, possivelmente difusional, processo sustentado pela extrema rapidez com que a glicose é transformada no dissacarídeo trealose. No

entanto, estudos moleculares e funcionais demonstraram recentemente que transportadores facilitativos (GLUT) estão presentes em insetos de diferentes ordens, embora a localização membranar em células que absorvem glicose tenha sido demonstrado apenas em dois dos artigos citados (Caccia *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2007).

O grupo da pesquisadora Bárbara Giordana imunocitocalizou com anticorpos anti GLUT2 de camundongo transportadores do tipo GLUT2 em células do intestino médio das larvas de 2º e 3º instar de *Aphidius ervi*, além de observar inibição de absorção de glicose no intestino médio de larvas de 2º instar por citocalasina B e por excesso de glicose e frutose (Caccia *et al.*, 2005). Pela primeira vez um GLUT8 de inseto, da formiga *Solenopsis invicta*, foi clonado e caracterizado molecularmente, estando presente transcrito deste uniportador em cérebro, intestino médio e posterior, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso e ovário (Chen *et al.*, 2006). Um cDNA com 68% de similaridade com GLUT1 de mamífero foi seqüenciado e clonado de *D. melanogaster*, além disso, foi realizado estudo de estrutura secundária e análise filogenética (Escher e Rasmuson-Lestander, 1999). No gafanhoto *Locusta migratoria* foi estudado o transporte de D-galactose *in vitro* utilizando regiões isoladas do trato digestivo (intestino anterior, cecos gástricos, ventrículos, íleum e ampola retal) encubadas com uma solução fisiológica contendo galactose e açúcar radioativo. Além disso, foi verificada a absorção de açúcar por oócitos de *X. laevis* injetados com poli A⁺ RNA de ceco gástrico do gafanhoto independente da presença de sódio, indicando a presença do transportador do tipo GLUT, confirmando experimentos *in vitro* onde foi observada inibição do transporte de glicose com adição de floretina e citocalasina B na solução fisiológica que banhava as regiões isoladas do trato digestivo (Pascual *et al.*, 2006). Em células Kc de *D. melanogaster* foi caracterizado o transportador de glicose definido como do tipo GLUT já que teve a absorção da glicose radioativa inibida por citocalasina B e floretina (Wang e Wang, 1993). Foi encontrada uma seqüência similar a GLUT através da análise de uma biblioteca de cDNAs de intestino do Hemiptera *Nilaparvata lugens*. Este transportador foi expresso em vesículas da levedura *Pichia pastoris* para estudo de absorção de glicose e a proteína foi detectada através de RT-PCR e hibridização *in situ* apenas no intestino (Price *et al.*, 2007)

O transporte de água em intestino de insetos nunca foi estudado em detalhe, além de ainda não ter sido verificado transportador do tipo SGLT em insetos. Desta

forma, o intuito deste estudo está em contribuir para o cenário de transportadores de glicose e água em intestino de insetos, ao mesmo tempo em que ilustra um mecanismo absorptivo através de duas membranas apicais (perimicrovilar e microvilar).

O açúcar majoritário presente nas sementes de algodão é rafinose. Essa é hidrolisada a uma mistura equimolecular de galactose, frutose e glicose pela ação sucessiva de duas enzimas presentes em *D. peruvianus*, α -galactosidase e α -glicosidase (Silva e Terra, 1997).

A metodologia utilizada para o estudo da absorção de glicose no primeiro ventrículo do intestino médio envolveu a preparação de uma dieta contendo azul de Evans (um corante não absorvível pelo intestino do inseto), glicose (substrato transportado) e glicerol (acrescentado para resultar numa osmolaridade final de 430 Osmolar) que foi oferecida a fêmeas em jejum de *D. peruvianus*. Durante 20 minutos, os insetos foram forçados a sugar esta dieta, permanecendo imóveis, com seus estiletos imersos na solução oferecida. Após diferentes intervalos de tempo, grupos de animais foram dissecados para observação da tomada de glicose. O sucesso do experimento dependia da observação do corante ficando cada vez mais concentrado na medida em que ocorria a absorção de água. Além disso, a glicose remanescente no V1 foi medida e, portanto, sabendo a concentração inicial da dieta oferecida, a tendência seria observar uma diminuição da quantidade de glicose no intestino. A razão glicose/azul de Evans decresce rapidamente no lúmen de V1, assim como a água remanescente. Este comportamento confirma o resultado obtido por Silva e Terra (1994), onde sugeriram que V1 é o principal sítio de absorção de água e glicose. Até 40 minutos após o início do experimento a maior parte da glicose ingerida é absorvida do conteúdo luminal de V1 juntamente com a água (Figura 25).

Nos experimentos efetuados na presença do sal K_2SO_4 é possível observar um aumento da absorção de glicose e água, sugerindo co-transporte efetuado por transportadores do tipo SGLT (Figura 25 e 26). Quando é acrescido florizina com o K_2SO_4 , podemos observar uma diminuição da absorção de glicose e água, reafirmando o resultado anterior de que há um transportador do tipo SGLT em V1 (Figura 25 e 26). O Na_2SO_4 não interfere na absorção de glicose, mas aumenta a demanda de água (Figura 25 e 26). O aumento da absorção de água na presença de Na^+ , sem afetar o transporte de glicose, sugere a possibilidade de ser co-transporte associado a íons. A propósito o co-transportador K^+-Cl^- observado na

membrana basal de enterócitos é capaz de transportar 500 moléculas de água por par de íons na direção do transporte de K^+ e Cl^- (Zeuthen, 1991; 1994).

Na presença de floretina com K_2SO_4 , verificamos uma alta inibição de absorção de glicose (Figura 25 e 26), o que nos leva a concluir que provavelmente além de transportadores do tipo SGLT, há transportadores do tipo GLUT.

A absorção de glicose e água observada na presença de florizina deve corresponder a transportador do tipo GLUT, enquanto que na presença de floretina a absorção de glicose e água deve ser mediada por SGLT (Figura 27). A figura 27 mostra que a contribuição do GLUT hipotético na absorção de glicose é superior a de SGLT. A figura 27 mostra também que SGLT transporta mais água em relação a glicose que GLUT. Esse resultado concorda com os dados obtidos para mamíferos onde se verifica que o número de moléculas de água transportadas por glicose é de 200-260 no caso de SGLT (Loo *et al.*, 1996) e 35, em se tratando de GLUT (Zeuthen *et al.*, 2007).

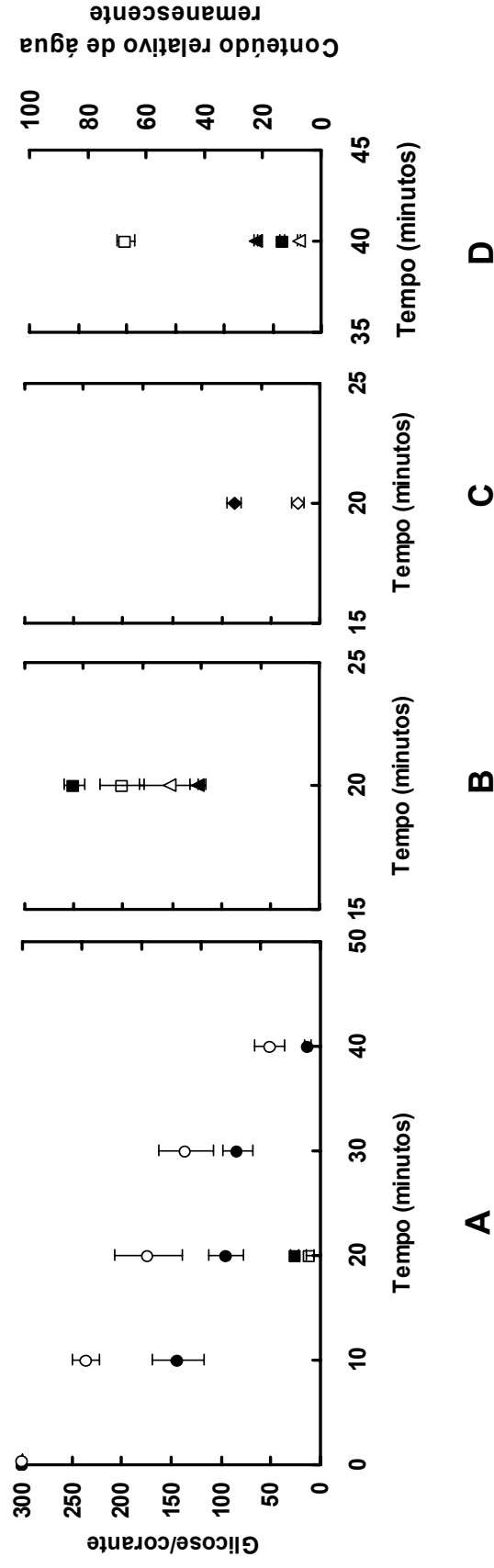


FIGURA 25 - Absorção por V1 de água (símbolos abertos) e glicose (símbolos fechados), na presença e ausência de diferentes reagentes.

A absorção de glicose foi seguida pelas medidas das razões entre a massa de glicose e de um corante não absorvível (azul de Evans) (●, ▲, ■, ◆), enquanto a absorção de água foi acompanhada pela determinação do aumento da concentração do corante (○, △, □, ◇). Este aumento resulta do decréscimo de água no conteúdo luminal. (A) (●, ○) Solução controle contendo glicose, glicerol e azul de Evans, (■, □) controle com 100 mM de K^+ ; (B) (▲, △) controle com 100 mM de K^+ + 0,1 mM de Florizina, (■, □) controle com 100 mM de K^+ + 0,2 mM de Florizina; (C) (◆, ◇) controle com 100 mM de Na^+ ; (D) (■, □) controle com 100 mM de K^+ + 0,2 mM de Florizina, (▲, △) controle com 100 mM de K^+ + 0,1 mM de Florizina. Ver materiais e métodos (3.3) para maiores detalhes. Os dados são médias e desvio padrão da média de 4 preparações obtidas a partir de 10 animais cada.

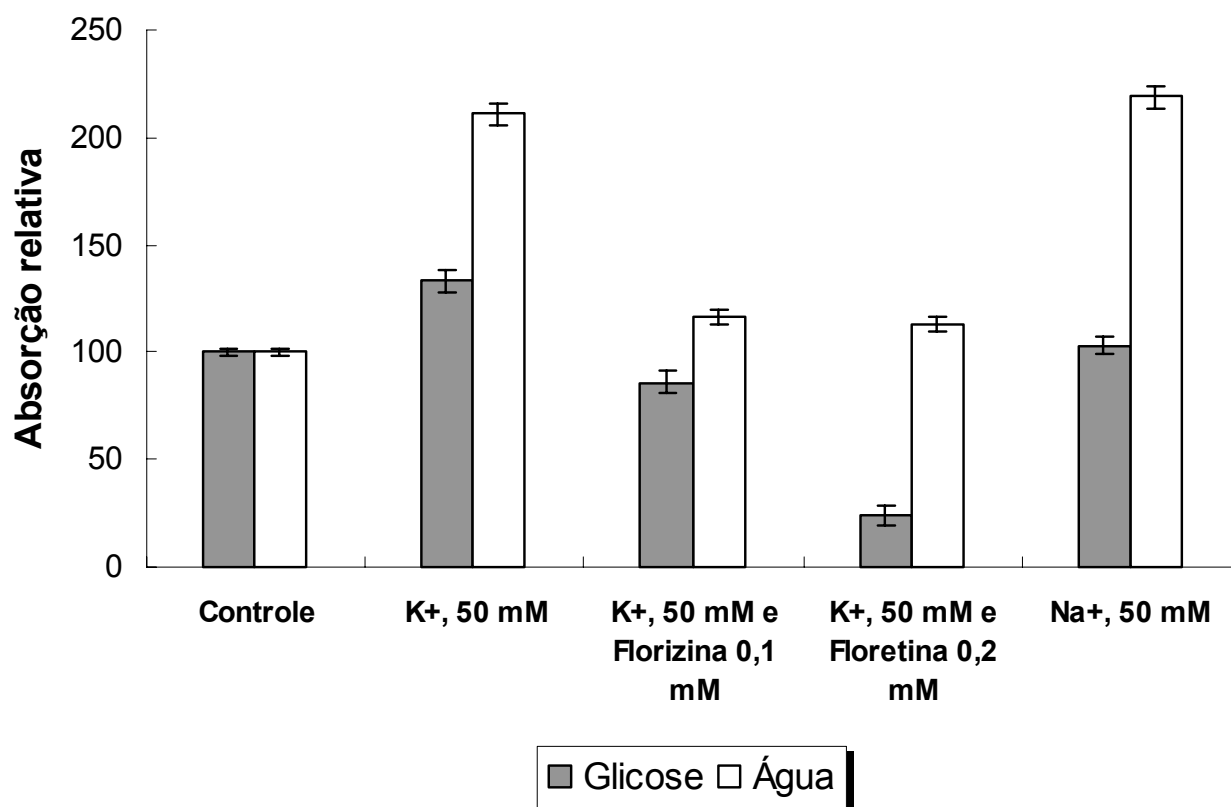


FIGURA 26 - Efeito da absorção de água e glicose na presença dos sais sulfato de potássio e sulfato de sódio, a partir do lúmen de V1.

Após 20 minutos absorvendo glicose e água os insetos foram dissecados para determinação dos valores de absorção, cujos resultados foram apresentados na figura 25. Foi estipulado 100% de absorção relativa para a absorção de glicose e água na ausência de sais (controle). Os valores, da absorção relativa dos experimentos contendo sais e inibidor foram obtidos através de cálculo comparativo com o experimento controle. Os dados são médias e desvio padrão da média de 4 preparações obtidas a partir de 10 animais cada.

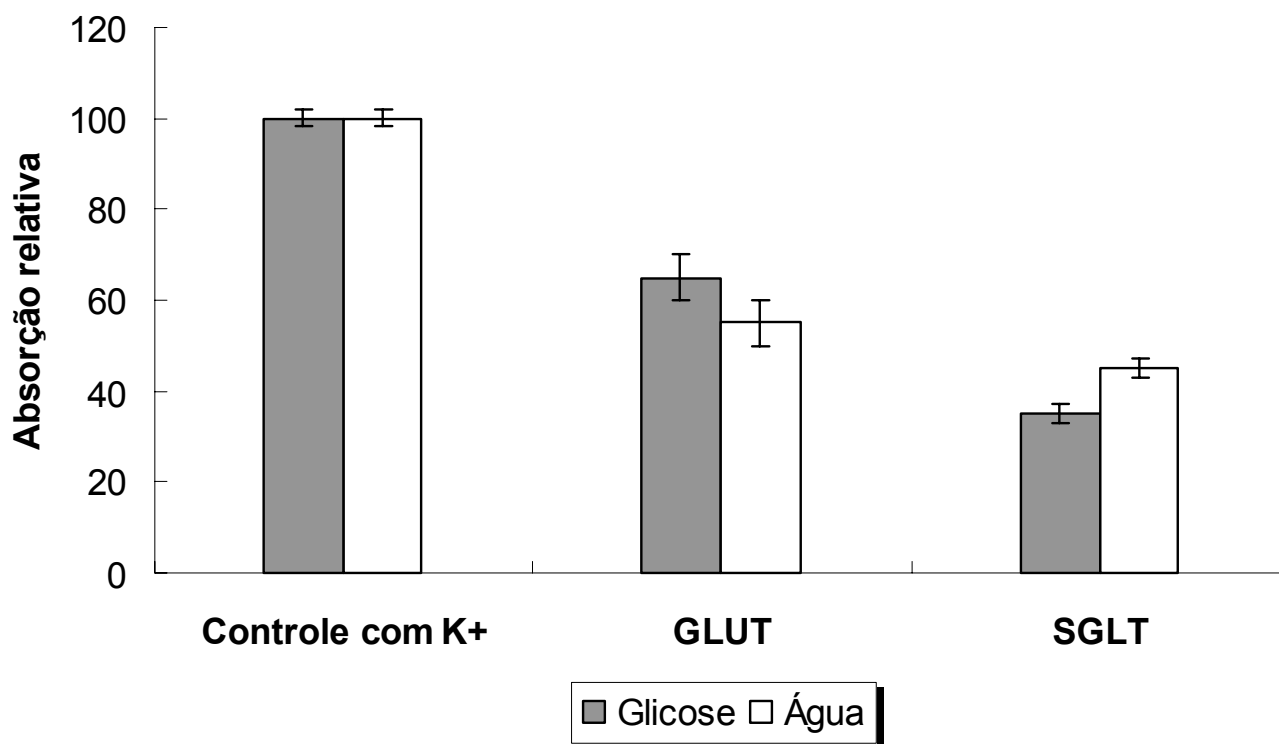


FIGURA 27 - Contribuição de GLUT e SGLT na absorção de água e glicose a partir do lúmen de V1 em 20 minutos.

Foi estipulado 100% para o valor da absorção de água e glicose dos insetos que absorveram por 20 minutos solução contendo glicose e o íon potássio (ver figura 26). Os valores de absorção relativa de açúcar e água de GLUT e SGLT foram calculados pelos decréscimos na absorção relativa ao controle na presença de florizina e floretina, respectivamente (Figura 26). Os dados são médias e desvio padrão da média de 4 preparações obtidas a partir de 10 animais cada.

A existência de transportadores do tipo GLUT e SGLT foi reafirmada experimentalmente ao se observar a inibição da absorção de glicose e água por floretina e florizina agora após 40 minutos de absorção e pelo fato de que a atividade transportadora remanescente na presença de florizina corresponde aproximadamente ao decréscimo observado no transporte por adição de floretina (Figura 28).

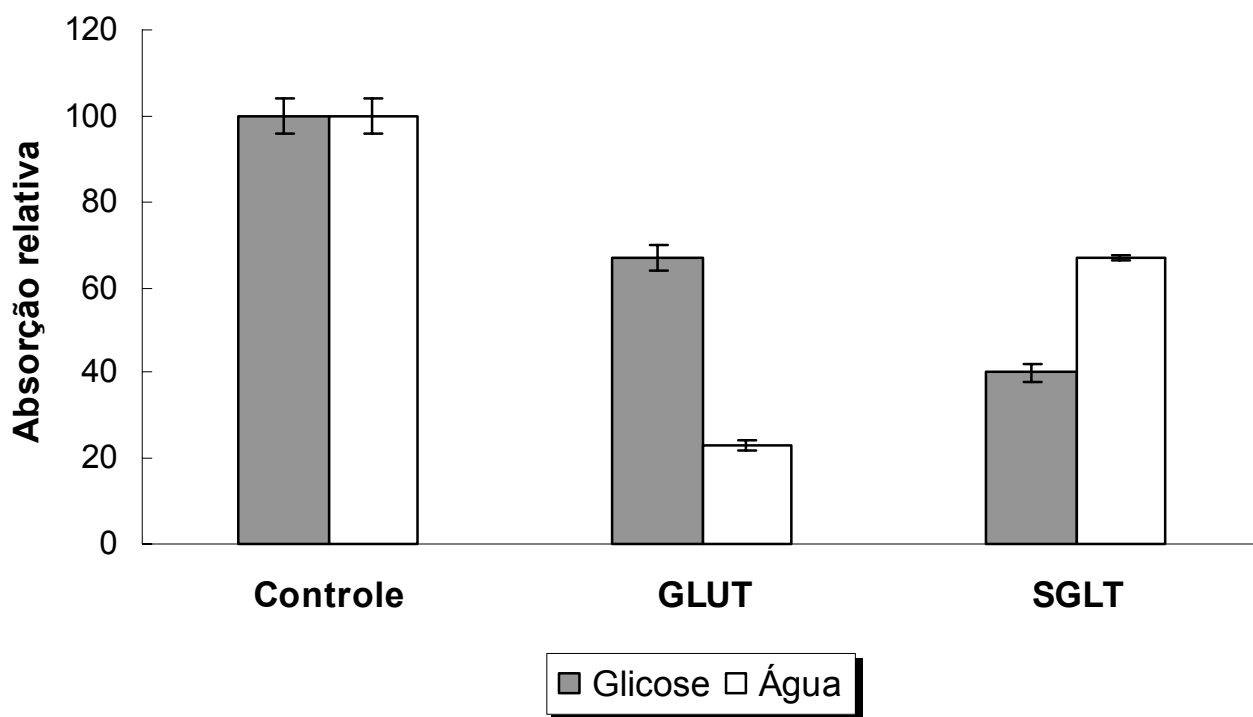


FIGURA 28 - Contribuição de GLUT e SGLT na absorção de água e glicose a partir do lúmen de V1 em 40 minutos.

Foi estipulado 100% para o valor da absorção de água e glicose dos insetos que absorveram por 40 minutos solução contendo glicose e o íon potássio (ver figura 26). Os valores de absorção relativa de açúcar e água de GLUT e SGLT foram calculados pelos decréscimos na absorção relativa ao controle na presença de florizina e floretina, respectivamente (Figura 26). Os dados são médias e desvio padrão da média de 4 preparações obtidas a partir de 10 animais cada.

Os resultados sugerem, pois, a existência de dois tipos de transportadores: GLUT (o mais importante) e o SGLT que devem ocorrer nas membranas perimicrovilares. O transportador SGLT deve operar com K^+ no lugar de Na^+ , que é observado em mamíferos. Potássio é o íon abundante em fontes vegetais e, por isso é o íon co-transportado com a glicose para as células intestinais nesse inseto. Esse resultado é paralelo a absorção de aminoácidos descrita em larvas de Lepidoptera. Nesses insetos os aminoácidos são co-transportados com K^+ (mamíferos com Na^+), utilizando um transportador característico de insetos (Giordana *et al.*, 1998). O açúcar, uma vez no espaço perimicrovilar da célula intestinal de *D. peruvianus* deve adentrar a célula através de transportador do tipo GLUT, que talvez ocorra também

na membrana baso-lateral de forma a permitir a saída de glicose para a hemolinfa. Alternativamente, o último GLUT pode não existir se a glicose for usada para sintetizar trealose na célula intestinal antes de ser transportada para a hemolinfa. Como se recorda, trealose é o açúcar circulante dos insetos (Becker *et al.*, 1996).

Esta é a primeira demonstração a partir de estudos fisiológicos em organismo vivo da existência dos transportadores do tipo GLUT e SGLT intestinal em insetos. Outros trabalhos já haviam chamado a atenção para o transportador uniportador através de isolamento de mRNA e clonagem em oócitos seqüenciamento com iniciadores específicos, imunoenaios, experimentos fisiológicos de regiões do trato digestivo, mas até então nenhum grupo demonstrou a presença do co-transporte. Provavelmente porque ao invés de utilizar o íon potássio como possível molécula co-transportada com açúcar e água, estavam utilizando o sódio. Como verificado por nós, o íon sódio não tem efeito algum sobre a internalização de glicose. Além disso, as seqüências de proteínas de SGLT não são muito parecidas entre os diferentes organismos e dessa forma fica muito difícil a confecção de iniciadores específicos para utilização na busca de seqüências em bibliotecas de cDNA. Outro resultado inédito foi o do transporte de água junto com a glicose tanto pelo GLUT quanto pelo SGLT, já observado amplamente em mamíferos, mas ignorado em insetos.

4.17 - ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DO SUPOSTO TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR DO TIPO FACILITADOR, GLUT DO INTESTINO MÉDIO DE *D. PERUVIANUS*

Um singleto similar a um transportador de açúcar facilitativo foi identificado na biblioteca de intestino médio de *D. peruvianus* através de um seqüenciamento ao acaso (DpGLUT) (Tabela 6). A seqüência foi verificada e primers específicos foram desenhados com o propósito de aumentar a seqüência e de confirmar o resultado de identidade. Além disso, foi realizado estudo de localização tecidual através de RT-PCR semiquantitativo (Figura 24), onde foi extraído RNA de diversos tecidos do inseto com o propósito de analisar se este transportador do tipo GLUT estaria envolvido com transporte de açúcar no intestino médio. Como mostrado anteriormente, foram detectados transcritos nos ventrículos 1 e 2 do intestino médio e não detectados em túbulos de Malpighi, confirmando a provável função de transportador de glicose e água no intestino médio do *D. peruvianus*.

Após diversas tentativas de aumentar a seqüência de cDNA encontrada no transcriptoma, através de PCR utilizando primers específicos e a biblioteca de

cDNAs de intestino médio de *D. peruvianus* como molde, foi conseguido uma seqüência com 1182 nucleotídeos que codificam uma provável proteína de 394 aminoácidos (Figura 29). De acordo com outros GLUTs detectados em outros insetos estariam faltando de 100-200 aminoácidos para completar a seqüência (Chen *et al.*, 2006, Price *et al.*, 2007).

DpGLUT apresenta algumas características de membros da superfamília de transportadores facilitativos de açúcar (InterPro IPR003663, IPR005828, IPR005829) incluindo 10 regiões transmembrânicas preditas pelo programa TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), assinaturas específicas deste tipo de proteína (IIGINCGLNAGLAPLYINEVSPTKIR, SVWLVEKFGRKPLLLVA) de acordo com o programa NPS@PROSCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) (Combet *et al.*, 2000) além de 7 sítios de glicosilação de acordo com o programa NetGlycate 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>) (Johansen *et al.*, 2006) (Figura 29).

catcaggcagaggacgagacagaacgcaggatcacagattacggcaaccttcaccccttgct 61
 I R Q R T R Q N A G S Q I T A T F I L A 20
 gtagcaattacttctattggatcaggttttcagcatgggtataaacacaggagtactcaac 121
 V A I T S I G S G F Q H G Y N T G V L N 40
 acacctgaagaggtgataaaaggatggatgtcagcagaacttgacacacctagtacttcc 181
 T P E E V I K G W M S A E L D T P S T S 60
 agtatgaaaataatatgggtccactgtagtatccatattttgtatcgggtgcatggtgggt 241
 S M K I I W S T V V S I F C I G A M V G 80
 ggtggatttgctgggtgcttgtgcaaataacttaggaaggaaaggagcgctcatgatgaat 301
 G G F A G A C A N N L G R K G A L M M N 100
 aatgtgtttgcgtttatagcagcaatcattatgggaatcacaaggacaactgaggttccc 361
 N V F A F I A A I I M G I T R T T E V P 120
 tacttgctgatggtagggagatttataataggtatcaattgtggattaatgctggtttg 421
 Y L L M V G R F I I G I N C G L N A G L 140
 gctccgctatatataaacgaagtatcgccaactaaaataagaggagcgatgggctcattg 481
 A P L Y I N E V S P T K I R G A M G S L 160
 taccaacttaataattacaatagccatttcttatagcccagctacttggaactagtacagct 541
 Y Q L N I T I A I L I A Q L L G T S T A 180
 cttggtagccgaaacactgtggccacttctcatgggactcattggaatcgttggtttcctc 601
 L G T E T L W P L L M G L I G I V G F L 200
 caactagtcgggtttttcttctgcccagaaagtccaaaatatattggagaaaaaaat 661
 Q L V G F F F C P E S P K Y I L E K K N 220
 gacgaacaaggaacaaaaatggtttttagacaggctagtaggaagtaattcacaccaacag 721
 D E Q G T K M V L D R L V G S N S H Q Q 240
 ttatagaattgaaaaagatatagaagatgcacaaagtctcccgaagttactttaagc 781
 F I E L K K D I E D A Q S L P K V T L S 260
 caaatggtacgacaaaaaaaactgagaactcctcttattataatcgggtgtattgatggcg 841
 Q M V R Q K K L R T P L I I I G V L M A 280
 TM7

```

gcacaacagctttctggtgtaaacgctgtaatcttctattcaacagaaatcttttaaaatg 901
A Q Q L S G V N A V I F Y S T E I F K M 300
ggaaagctcagtgatgaagcagctcaatacgcgaactgtaggtgtaggagtaatcaatgta 961
G K L S D E A A Q Y A T V G V G V I N V 320
ctgacgaccattggtttcagtggtgcttgttgaaaaatctgggaggaaaccacttctactg 1021
L T T I V S V W L V E K F G R K P L L L 340
gttgcttttggtggattgactatctgcatgacaatactttttatctgtctttatctttgtc 1081
V A F G G L T I C M T I L F I C L Y F V 360
gaaacaagcccttttgcaaagtatcttcaattgtcatcgtatctgtttacttggtcttt 1141
E T S P F A K Y L S I V I V F V Y L V F 380
tttgccattggagcgggttcgattccatggctcctaaatcactag 1186
F A I G A G S I P W L L N H 394

```

FIGURA 29 - Seqüência de aminoácidos e nucleotídeos de cDNA de um provável transportador de açúcar do tipo GLUT de intestino médio de *D. peruvianus* (DpGLUT).

Aminoácidos correspondentes a prováveis regiões transmembrânicas, preditas por TMHMM estão sublinhadas (TM 1-10); resíduos de lisina glicosiladas preditas por NetGlycate estão realçadas em cinza; assinatura característica de transportadores de açúcar preditas por NPS@PROSCAN estão realçadas em amarelo; peptídeo sinal predito por SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) está realçado em verde e códon de parada em negrito.

4.18 - CLASSES E SUBCLASSES DA FAMÍLIA DOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE GLICOSE GLUT

Em mamíferos, quatorze membros da família de transportadores facilitativos de glicose (GLUT) foram identificados (GLUT1-14) (Scheepers *et al.*, 2004) e todos apresentam as seguintes assinaturas características: (1) a presença de doze hélices que atravessam a membrana plasmática com a região N-terminal direcionada para o interior celular assim com as alças 2, 4, 6, 8 e 10 sendo as alças 1, 3, 5, 7, 9 e 11 direcionadas para o meio extracelular; (2) sete resíduos de glicina conservados nas hélices 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 10; (3) vários aminoácidos ácidos e básicos na superfície intracelular das proteínas; (4) dois resíduos de triptofano conservados nas hélices 6 e 11; (5) dois resíduos de tirosina nas hélices 4 e 7 (Joost e Thorens, 2001; Wood e Trayhurn, 2003; Scheepers *et al.*, 2004).

Baseado em homologia de seqüências e elementos característicos, a família GLUT pode ser dividida em três classes, denominadas classe 1, 2 e 3 (Joost e Thorens, 2001; Wood e Trayhurn, 2003; Scheepers *et al.*, 2004).

A classe 1 dos transportadores facilitativos de glicose compreende as isoformas GLUT1-4 e GLUT14, as quais se distinguem majoritariamente por sua distribuição tecidual, afinidade por glicose e regulação hormonal. GLUT1 exibe altos níveis de expressão em eritrócitos, em células endoteliais do cérebro e é responsável pelo suprimento básico de glicose em células (Mueckler *et al.*, 1985). GLUT2 é um transportador com baixa afinidade por glicose com predominante expressão em células pancreáticas, fígado e rim (Fukumoto, *et al.*, 1988). Em todos estes tecidos, a absorção de glicose não é dependente do número e da atividade dos transportadores de glicose, mas da concentração de glicose no sangue (Gould e Holman, 1993). Desta forma, atividade de transporte de GLUT2 não pode ser saturada por concentração fisiológica de glicose no sangue. Além de glicose, GLUT2 pode transportar frutose e com grande afinidade glicosamina (Wood e Trayhurn, 2003). GLUT3 é um transportador com alta afinidade por glicose com expressão predominante em tecidos com grande necessidade de glicose como o cérebro (Uldry, *et al.*, 2002). GLUT4 é um transportador com alta afinidade por glicose expresso em tecidos insulino-sensíveis (coração, músculo esquelético e tecido adiposo) (Fukumoto, *et al.*, 1989). Insulina estimula a translocação do GLUT4 de membranas intracelulares para a membrana plasmática, resultando em um aumento imediato de 10-20 vezes o transporte de glicose (Simpson e Cushman, 1986;

Sheperd e Kahn, 1999; Bryant *et al.*, 2002). GLUT14 parece representar uma duplicação do gene SLC2A3 (que codifica GLUT3) sendo a sua seqüência de aminoácidos 95% idêntica a de GLUT3 (Wu e Freeze, 2002).

A classe 2 inclui o transportador específico de frutose, o GLUT5, além dos GLUTs 7, 9 e 11. O mRNA de GLUT5 é predominantemente expresso em intestino, testículos e rim (Kayano *et al.*, 1990). GLUT5 não transporta glicose e é responsável pela absorção de frutose nos tecidos mencionados acima. GLUT7 é um transportador com alta afinidade em transportar glicose e frutose e pode ser detectado em intestino, cólon, testículos sendo predominantemente expresso em membranas microvilares de enterócitos (Li *et al.*, 2004). GLUT9 exibe altos níveis de expressão em rim e fígado e baixos níveis de mRNA em intestino, placenta, pulmão e leucócitos (Phay *et al.*, 2000). Em GLUT11 o transporte de glicose pode ser inibido por frutose, desta forma, sugere-se que GLUT11 transporta frutose com baixa afinidade por glicose (Doege *et al.*, 2001) Ele é expresso predominantemente em pâncreas, rim e placenta e possui moderada expressão em coração e músculo esquelético.

A classe 3 compreende as isoformas GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 e HMIT (GLUT13). Em contraste com as classes 1 e 2, todos os membros desta classe são caracterizados por possuírem a alça número 1 mais curta com ausência do motivo de glicosilação na porção extracelular e presença da alça número 9 maior contendo um sítio de glicosilação (Joost e Thorens, 2001). Como os transportadores de açúcar da classe 3 apresentam alta homologia com diferentes transportadores de bactérias, levedura e *D. melanogaster*, especula-se que evoluíram antes das classes 1 e 2, esta última deve refletir um ajuste evolutivo para necessidades adicionais de homeostase de glicose em mamíferos (Joost e Thorens, 2001). O transportador com baixa afinidade por glicose, o GLUT6 é predominantemente expresso em cérebro, baço e leucócitos (Doege *et al.*, 2001). GLUT8 possui alta afinidade por glicose podendo este transporte ser inibido D-frutose e D-galactose, o que faz deste transportador multifuncional (Ibberson *et al.*, 2000). É expresso predominantemente em testículos e pouca quantidade foi observada em tecidos sensíveis a insulina como coração e músculo esquelético. GLUT10 é encontrado em fígado e pâncreas (McVie-Wylie *et al.*, 2001). GLUT12 é observado em coração e próstata (Macheda *et al.*, 2002). O transportador mio-inositol HMIT é expresso em cérebro, transporta mio-inositol e esterioisômeros, mas não transporta açúcar (Uldry *et al.*, 2001).

Com intuito de classificar a DpGLUT de *D. peruvianus* dentro destas três classes de transportadores de glicose, foi feita uma árvore filogenética contendo além das seqüências de GLUTs de humanos, uma seqüência de GLUT de *D. melanogaster* (DmHT1), uma da formiga *S. invicta*, cuja seqüência já foi caracterizada como uma GLUT8 (Chen *et al.*, 2006) e uma seqüência do hemíptera *N. lugens* (NIHT1) (Price *et al.*, 2007) (Figura 30). A árvore, construída através do programa Mega 3.1, se divide em dois ramos polifiléticos, um contendo as classes 1 e 2 separadamente e um outro ramo contendo a classe 3 (Boodstrap 100) (Figura 30). Através da análise da seqüência de DpGLUT contra o banco de dados do Swissprot utilizando o BlastX, foi observado uma identidade de 40% com GLUT1 de porco (Tabela 9). Ao construir está árvore filogenética esta característica ficou mais evidente, já que o DpGLUT foi posicionado próximo aos GLUTs humanos pertencentes à classe 1 da família dos transportadores facilitativos de glicose juntamente com o DmHT1 de *D. melanogaster*.

De acordo com as características comuns entre os GLUTs e baseado no modelo proposto por Joost e Thorens (2001), foi desenhado um modelo esquemático do DpGLUT com suas 10 regiões transmembrânicas (Figura 31). Como a seqüência não está completa a análise foi feita até a décima hélice. Além dos resíduos conservados entre os membros da família GLUT, podemos observar resíduos típicos e específicos de GLUTs da classe 1.

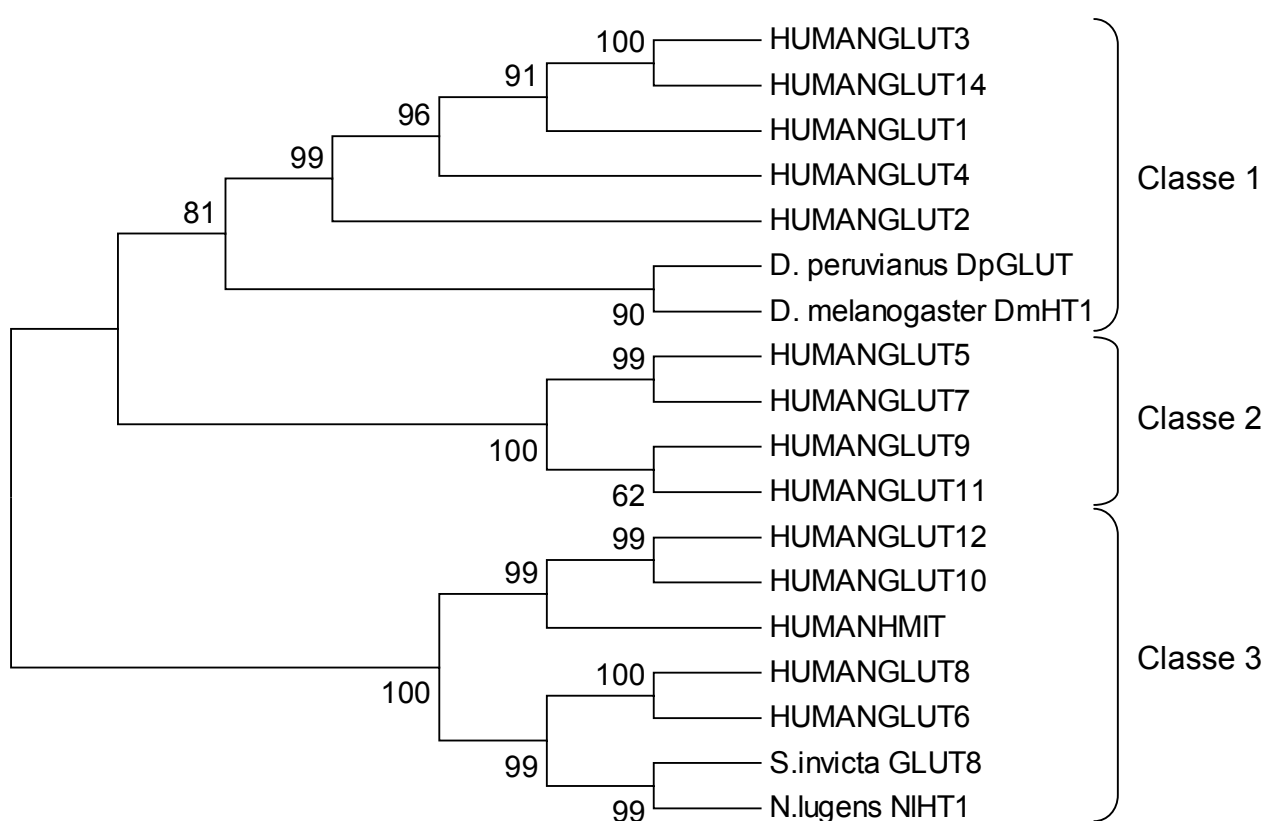


FIGURA 30 - Cladograma de seqüências de transportadores de glicose do tipo facilitativo de humano e de insetos depositadas no GenBank

As ramificações foram estatisticamente calculadas através do programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) com análise de Bootstrap (corte de 50). HUMANGLUT1, (P11166); HUMANGLUT2, (NP000331); HUMANGLUT3, (NP008862); HUMANGLUT4, (NP001033); HUMANGLUT5, (NP003030); HUMANGLUT6, (NP060055); HUMANGLUT7, (NP997303); HUMANGLUT8, (NP055395); HUMANGLUT9, (NP001001290); HUMANGLUT10, (NP110404); HUMANGLUT11, (AAI00809); HUMANGLUT12, (NP660159); S. invicta GLUT8, (AAX92638) (*Solenopsis invicta*); N. luguens NIHT1, (ABM01870) (*Nilaparvata lugens*); D. peruvianus DpGLUT (*Dysdercus peruvianus*); D. melanogaster DmHT1, (Q8IRI6) (*Drosophila melanogaster*).

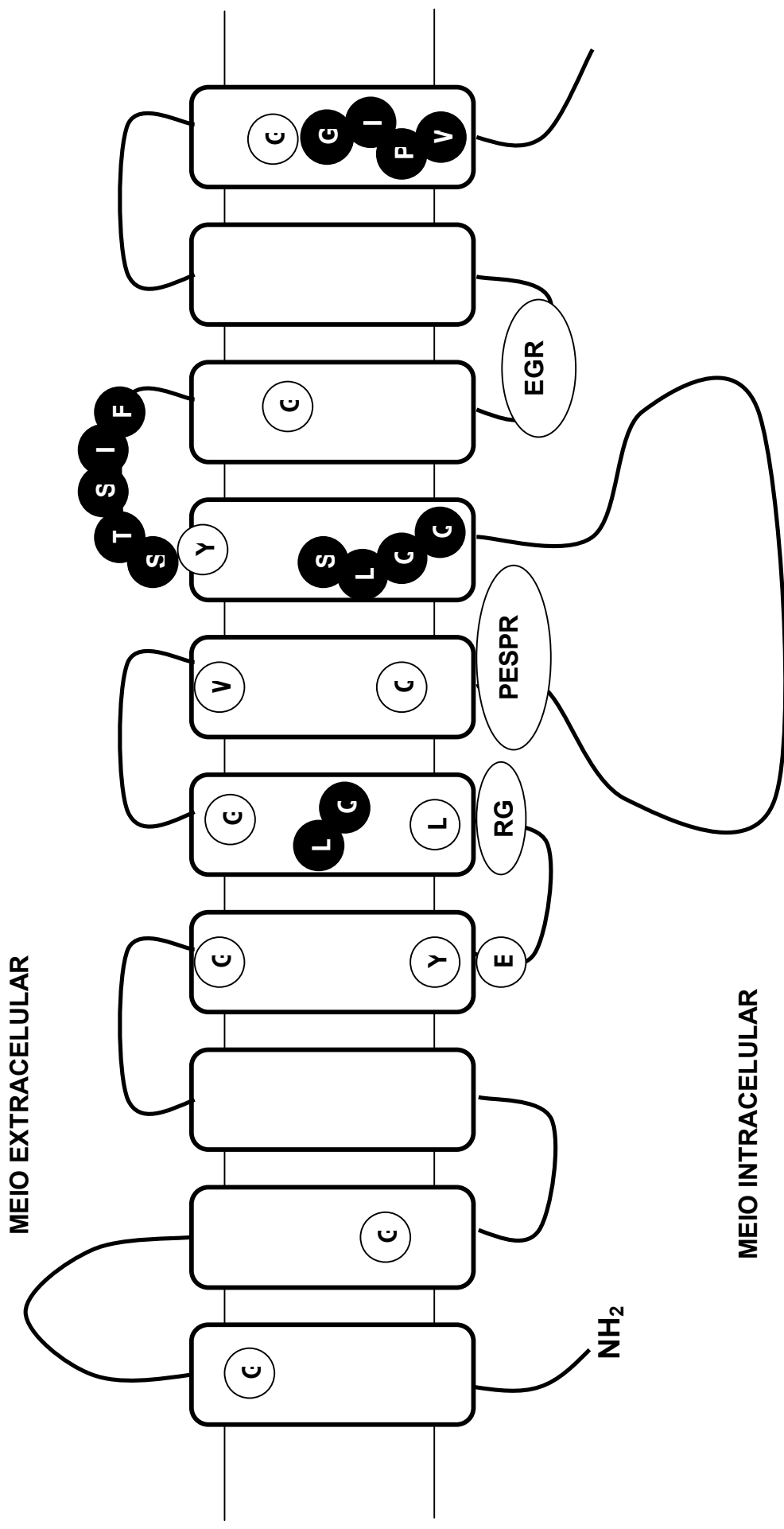


FIGURA 31 - Modelo esquemático do DpGLUT com suas 10 regiões transmembrânicas.

Resíduos altamente conservados em todos os membros da família GLUT estão em círculos com fundo branco; resíduos considerados característicos da classe 1 estão mostrados em círculos com fundo preto.

5 - CONCLUSÕES

- A maior atividade específica de cisteína proteinase encontra-se no conteúdo luminal de V2 e, portanto esta foi a região escolhida para purificação desta enzima.
- Duas cisteínas proteinases foram purificadas de V2, denominadas cis 1 (32 kDa) e cis 2 (45 kDa). Elas possuem o mesmo pH ótimo igual a 6,3, são inativadas a 40 °C com meia vida de 5 minutos para cis 1 e 4,8 minutos para cis 2. A constante de dissociação (K_D) enzima-E-64 foi de 17,3 nM para cis 1 e 7,1 nM para cis 2. O Z-FR-MCA constitui o melhor substrato para ambas cis 1 e cis 2 quando comparado com a porcentagem de eficiência do Z-RR-MCA, demonstrando que possivelmente as cisteína proteinases aqui estudadas são do tipo catepsinas L.
- A catepsina L seqüenciada de *D. peruvianus* (DpCaL1) consiste de 927 nucleotídeos que codifica uma proteína de 309 aminoácidos.
- Através de estudo de filogenia foi observado que catepsinas L digestivas de Hemiptera são similares as lisossomais de *T. molitor*, enquanto as de Coleoptera são similares as digestivas de *T. molitor*.
- Através de um levantamento do transcriptoma do intestino médio do Hemiptera, *Dysdercus peruvianus*, utilizando seqüenciamento de ESTs foram encontrados catepsina L e F, lipase, β e α -glicosidase, α -amilase, serino proteinase, aspartil proteinase, oligopeptidase, e aminopeptidase além de transportadores envolvidos com a internalização de glicose e aminoácidos provenientes do alimento digerido: transportador de monocarboxilato, transportadores de cátions, transportador de metal divalente, simportador sódio/soluto, permease de aminoácido, proteína transportadora de íon, canais iônicos de sódio, potássio e cálcio, V-ATPases, transportador de açúcar.
- RT-PCR semiquantitativo mostrou que a seqüência relacionada com α -glicosidase 2 provavelmente é da enzima marcadora de membrana perimicrovilar; a seqüência de β -glicosidase pode ser da enzima marcadora de membrana microvilar; a aminopeptidase tem possibilidade de ser o marcador de espaço perimicrovilar; DpCaL 1 é uma forte candidata a proteinase digestiva majoritária; DpCaL 2 parece ser lisossômica, DpCaL 3 pode ser uma segunda cisteína proteinase digestiva; DpCaL 4 deve ser

lisossômica; O transportador de glicose do tipo GLUT deve participar da absorção de água e glicose na porção anterior do intestino médio de *D. peruvianus*.

- Foi realizada identificação de transportadores envolvidos na absorção de glicose e água na porção anterior do intestino médio do *D. peruvianus* através de experimentos de fisiologia *in vivo* onde foi confirmada a existência de transportadores do tipo GLUT e SGLT.
- Alongado EST correspondendo a suposto transportador de açúcar do tipo facilitador, GLUT do intestino médio de *D. peruvianus*, foi obtida uma seqüência denominada DpGLUT com 39% de identidade com GLUT 1 de humano, contendo 1182 nucleotídeos que codificam uma provável proteína de 394 aminoácidos. O DpGLUT apresenta 10 regiões transmembrânicas e 7 sítios de glicosilação.

6 - BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C., 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. L., 1990. Basic local alignment serrate tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Alves, L.C., Almeida, P.C., Franzoni, L., Juliano, L., Juliano, M.A., 1996. Synthesis of No-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Peptide Res.* 9, 92-96.
- Andries, N.J., Torpier, G., 1982. An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. *Biol. Cell*, 46, 195-202.
- Anuário brasileiro do algodão, 2004. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 144.
- Apoema, 2000. Artigo projeto – vida educação ambiental. O biopesticida transgênico. Informativo da lista educação ambiental nº 4.
- Applebaum, S.W., 1985. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 4. Pergamon, Oxford, 279-312.
- Aronson, N.N., Barrett, A.J., 1978. The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem. J.* 171, 759-765.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstom, R.E., 1990. *Current protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience, 1990.
- Azevedo, T.R., Terra, W.R., Ferreira, C., 2003. Purification and characterization of three beta-glycosidases from midgut of the sugar borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33, 81-92.
- Baerwald, R.J., Delcaprio, J.B., 1983. Double membrane-bound intestinal microvilli in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell Tiss. Res.*, 232, 593-600.
- Baker, J.E., 1991. Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Insect Biochem.*, 21, 615-621.

- Balamurugan, K., Ortiz, A., Said, A. M., 2003. Biotin uptake by human intestinal and liver epithelial cells: role of the SMVT system. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 285:G73-G77.
- Barnes, W.M., 1994. PCR Amplification of up to 35-kb DNA with High Fidelity and High Yield from λ Bacteriophage Templates. *PNAS* 91, 2216-2220.
- Barrett, A.J., 1994. Classification of peptidases. *Meth. Enzymol.*, 244, 1-15.
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M., Hanada, K., 1982. L-trans-epoxysuccinylleucylamido(4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201,189-198.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (Eds.), 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (Eds.), 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2^a ed. Elsevier, Oxford, 2140 pp.
- Becker, A., Schlöder, P., Steele, J.E., Wegener, G., 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52, 433-439.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., 1990. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*; 13:198-208.
- Berridge, M.J., 1970. A structural analysis of intestinal absorption. *Symp. R. Ent. Soc. (Lond.)*, 5, 135-151.
- Berry, G. T., Mallee, J. J., Kwon, H. M., 1995. The human osmoregulatory Na⁺/myo-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21. *Genomics.*, 25:507-513.
- Berti, P.J., Storer, A.C., 1995. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.*, 246, 273-283.
- Beynon, R.J., Salvesen, G., 1989. Commercially available protease inhibitors. In: R. Beynon and J.S. Bond, Editors, *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 241-249.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1983. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Can. J. Zool.*, 61, 2574-2586.

- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1988. Ultrastructural localization of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Int. J. Insect. Morphol. Embryo.*, 17, 295-302.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 35, 219-248.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boguski, M.S., Lowe, T.M., Tolstoshev, C.M., 1993. dbEST-database for "expressed sequence tags". *Nat. Genet.* 4, 332-333.
- Bonaldo, M.F., Lennon, G., Soares, M.B., 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.*6, 791-806.
- Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Jongsma, M.A., Gatehouse, J.A., 2004. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larva western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34, 305-320.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brues, C.T., 1920. The selection of food-plants by insects, with special reference to lepidopterous larvae. *Amer. Nature*, 54, 313-332. apud Panizzi, A. R., Parra, J. R. P., 1991. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Ed. Manole. São Paulo.
- Brunke, K.J., Meeusen, R.L., 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Trends in Biotech.*, 9, 197-200.
- Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 267-277.
- Burgos, M.H., Gutierrez, L.S., 1976. The intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut. *J. Ultras. Molec. Struc. Res.*, 57, 1-9.
- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., de Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B., 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 292, 2284-2291.

- Caccia, S., Leonardi, M.G., Casartelli, M., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B., 2005. Nutrient absorption by *Aphidius ervi* larvae. *J. Insect Physiol.*, 51, 1183-1192.
- Calvo, E., Andersen, J., Francischetti, I.M., Capurro, M. De L., deBianchi, A.G., James, A.A., Ribeiro, J.M.C., Marinotti, O., 2004. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Mol. Biol.*, 13, (1), 73-88
- Calvo, E., Pham, V.M., Lombardo, F., Arcà, B., Ribeiro, J.M.C., 2006. The sialotranscriptome of adult male *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 36, 570-575.
- Carmona, E., Dufour, E., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J.S., Me´nard, R., 1996. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochem.* 35, 8149-8157.
- Carruthers, A., 1990. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev.*, 70:1135-1176.
- Carvalho, N.M., Nakagawa, J., 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Campinas, Fundação Cargill, 2^a ed.
- Chauhan, S., Ray, D., Kane, S., Willingham, M., Gottesman, M., 1998. Involvement of carboxy-terminal amino acids in secretion of human lysosomal protease cathepsin L. *Biochem.*, 37, 8584-8594.
- Chen, M.E., Holmes, S.P., Pietrantonio, P.V., 2006. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 62, 55-72.
- Chippendale, G.M., 1978. The functions of carbohydrates in insect life processes. In: Rockstein M editor. *Biochemistry of insects*. New York: Academic Press. p 1-55.
- Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S., Raikhel, S., 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.* 274, 13311-13321.
- Christeller, J.T., Laing, W.A., Marwick, N.P., Burgess, E.P.J., 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 735-746.

- Coblentz, F.E., Towle, D.W., Shafer, T.H., 2006. Expressed sequence tags from normalized cDNA libraries prepared from gill and hypodermal tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. and Physiol., Part D* 1, 200-208.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deléage, G., 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis *TIBS*, 25, 3 [291]:147-150.
- CONAB (Brasília, DF). Disponível em www.conab.gov.br. Acesso em 06-08-2002.
- Crailsheim, K., 1988. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 34, 839-845.
- Cristofoletti, P.T., Mendonça de Sousa, F.A., Rahbe', Y., Terra, W.R., 2006. Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrtosiphon pisum* midgut cells. A major binding site for toxic mannose lectins. *FEBS J.*, 273, 5574-5588.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbe', Y., Terra, W.R., 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.*, 49, 11-24.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1999. Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29, 807-819.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2000. The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochim. Biophys. Acta – Prot. Struct. Mol. Enzymol.*, 1479, 1-2, 185-195.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*
- Curran, P.F., McIntosh, J.R., 1962. A model system for biological water transport. *Nature*, 193, 347-348.
- Dahlqvist, A., 1968. Assay of intestinal disaccharidases. *Analyt. Biochem.*, 22, 99-107.

- Dethier, V.G., 1976. Man's plague? Insect and Agriculture, New Jersey, The Darwin Press, Inc. apud Panizzi, A. R., Parra, J. R. P., 1991. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Ed. Manole. São Paulo.
- Diamond, J.M., Bossert, W.H., 1967. Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J. Gen. Physiol.*, 50, 2061-2083.
- Doege, H., Bocianski, A., Joosti, H.G., Schurmann, A., 2000. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT 9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.*, 250, 771-776.
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., 2001. Characterization of the human glucose transporter GLUT11, a novel sugar transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.*, 359: 443-449.
- Dow, J.A.T, Davis, S.A., 2001. The *Drosophila melanogaster* Malpighian Tube. *Adv. in Insect Physiol.*, 28, 1-83.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Wolthers, B.G., 1971. Papain X-ray structure. In: *The Enzymes*, 3rd edn, vol. 3 (Boyer, P.D., ed.). New York and London: Academic Press, pp. 485-499.
- Duffus, C.M., Slaughter, J.C., 1980. Seeds and uses. Chichester, J. Wiley e Sons.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acids sequence. *J. Mol. Biol.*, 300, 1005-1016.
- Escher, S.A., Rasmuson-Lestander, Å., 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*, 130, 95-103.
- Espinoza-Fuentes, F.P., Terra, W.R., 1986. Properties of larval and imaginal membrane - bound digestive enzymes from *Trichosia pubescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3, 181-192.
- Ewing, B., Green, P., 1998a. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 1998 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L. D., Wendl, M. C., Green, P., 1998b. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment *Genome Res.*, 8: 175-185.

- Felitti, S., Shields, K., Ramsperger, M., Tian, P., Sawbridge, T., Webster, T., Logan, E., Erwin, T., Forster, J., Edwards, D., 2006. Transcriptome analysis of *Neotyphodium* and *Epichloë* grass endophytes. *Fungal Genetics and Biol.*, 43, 465-475.
- Ferreira, A.H.P., Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C., 2001. Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31, 1065-1076.
- Ferreira, A.H.P., Terra, W.R., Ferreira, C., 2003. Characterization of a beta-glycosidase highly active on disaccharides and of a beta-galactosidase from *Tenebrio molitor* midgut lumen. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33, 253-265.
- Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Garcia, E.S., Terra, W.R., 1988. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.*, 18, 521-530.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. Soluble aminopeptidases from cytosol and luminal contents of *Rhynchosciara americana* midgut caeca: properties and phenanthroline inhibition. *Insect Biochem.*, 14, 145-150.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1985. Minor aminopeptidases purified from the plasma membrane of midgut caeca cells of an insect (*Rhynchosciara americana*) larva. *Insect Biochem.*, 15, 619-625.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1986a. The detergent form of the major aminopeptidase from the plasma membrane of midgut caeca cells of *Rhynchosciara americana* (Diptera) larva. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B, 373-376.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1986b. Substrate specificity and binding loci for inhibitors in an aminopeptidase purified from the plasma membrane of midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana*) larva. *Arch. Biochem. Biophys.*, 244, 478-485.
- Ferreira, C., Torres, B.B., Terra, W.R., 1998. Substrate specificities of midgut β -glycosidases from insects of different orders. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 119, 219-225.
- Fersht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman, New York 631.

- Fischbarg, J., Kuang, K., Vera, J.C., Arant, S., Silverstein, S.C., Loike, J., Rosen, O.M., 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87, 3244-3247.
- Freire, E.C., Santos, W.J., 1999. *Cultura do Algodoeiro*. Ed. Edivaldo Cia (POTAFOS), Piracicaba/SP.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., 1989. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem.*, 264: 7776-7779.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M. G., Shows, T.B. and Bell, G.I., 1988. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 85, 5434- 5438.
- Gabriel, O., Gersten, D.M., 1992. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Analytical Biochemistry*, 203, 1-21.
- Gallo, D., 1978. *Manual de entomologia agrícola*. Ed. Agronômica Ceres. São Paulo.
- Gallo, D.O., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S. B., 1988. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: Ed. Ceres, p 327.
- Garcia, E. S., 1987. The digestion of Triatominae. In: *Chaga's Disease Vectors* (Brenner R. R. & Stoka A. M., ed), Vol. 2, CRC Press, Cleveland, 47-58.
- Garczynski, S.F., Adang, M.J., 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 4, 409-415.
- Garner, K.J., Hiremath, S., Lehtoma, K., Valaitis, A.P., 1999. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 527-535.
- Gatehouse, A.M.P., Boulter, D., Glyn, E.A., Gatehouse, J.A., Hilder, V.A., 1990. Additive protective effects of different plant-derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Protection*, 9, 351-354.
- Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., Poiree, J.C., 1993. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta.*, 1151:99-104.

- Gill, S.S., Cowles, E.A., Francis, V., 1995. Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, 270, 27277-27282.
- Giordana, B., Leonardi, M.G., Casartelli, M., Consonni, P., Parenti, P., 1998. K⁺-neutral amino acid symport of *Bombyx mori* larval midgut: a system operative in extreme conditions. *Am. J. Physiol.*, 274, R1361-71
- Glazer, A.N., Smith, E.L., 1971. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. In: *The Enzymes*, 3rd edn, vol. 3 (Boyer, P.D., ed.). New York and London: Academic Press, pp. 501-546.
- Gonçalves, L., 2000. Biologia e comportamento de *Dysdercus ruficollis* (Linnaeu, 1764) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, 7, nº 1, 68-79.
- Goodchild, A.J.P., 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol. Rev.*, 41, 97-140.
- Gooding, R. H., 1969. Studies on proteinases from some blood-sucking insects. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 100, 139-145.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. *Consed*: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res.* 1998 8: 195-202.
- Gould, G.W., Holman, G.D., 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.*, 295:329-341.
- Green, N.M., Work, E., 1953. Pancreatic trypsin inhibitor. 2. Reaction with trypsin. *Biochem. J.* 54, 347-352.
- Gruden, K., Popovic, T., Cimerman, N., Krizaj, I., Strukelj, B., 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, "intestains", enable Colorado potato beetle larva to counteract the potato defense mechanism. *Biol. Chem.* 384, 305-310.
- Guerre-Millo, M., 1995. Les transporteurs d'hexoses. *Medicine/Sciences*, 11, 1111-1119.
- Gutierrez, L.S., Burgos, M.H., 1986. The surface extracellular coat of the midgut in *Triatoma infestans*. *J. ultrastruct. Res.*, 95, 75-83.

- Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I., 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42, 523-528.
- Hasnain, S., Hiramata, T., Huber, C.P., Mason, P., Mort, J.S., 1993. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. The importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *J. Biol. Chem.* 268, 235-240.
- Heber, R.E., Mathinson, R.D., 1976. Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). *Can. J. Biochem.*, 54 (2), 153-64.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293, 781-788.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.P., Shermam, S.E., Barker, R.F., Boulder, D., 1987. A novel mechanism of insect resistance engineering into tobacco. *Nature*, 330, 160-163.
- Hines, M.E., Nielsen, S.S., Shade, R.E., Pomeroy, M.A., 1990. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*. *Entomol. exp. Appl.* 57, pp. 201-207.
- Hirschorn, N., Greenough, W.B., 1991. Progress in oral rehydration therapy. *Scien. American*, 264, 50-56.
- Houseman, J.G., Downe, A.E.R., 1982. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem.*, 12, 651-655.
- Houseman, J.G., Downe, A.E.R., 1983. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. *Com. Biochem. Physio.*, 75B, 509-512.

- Houseman, J.G., MacNaughton, W.K., Downe, A.E.R., 1984. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Euchistus euchistoides* (Hemiptera: Pentatomidae). *Can. Entomol.* 116, 1393-1396.
- Houseman, J.G., Morrison, P.E., Downe, A.E.R., 1985. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolfii* (Hemiptera: Phymatidae). *Can. J. Zool.*, 63, 1288-1291.
- Huber, R.E., Mathison, R.D., 1976. Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrose of honey bees (*Apis mellifera*) *Can. J. Biochem.*, 54, (2):153-64.
- Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B., 2000. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.*, 275: 4607-4612.
- Janzen, D.H., 1971. Seed predation by animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 2, 465-492.
- Janzen, D.H., 1977. The interaction of seed predators and seed chemistry. In: Laberyrie, V. ed., *Colloques Internationaux du C.N.R.S.*, Paris, 415-428.
- Janzen, D.H., 1978. The ecology and evolutionary biology of seed chemistry as relates to seed predation. In: Harborne, J. B. ed., *Biochemical aspects of plant and animal coevolution*, Academic press. New York, 163-206.
- Jia, Z., Hasnain, S., Hiramata, T., Lee, X., Mort, J.S., To, R., Huber, C.P., 1995. Crystal structure of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *J. Biol. Chem.* 270, 5527-5533.
- Johansen, M. B., Kiemer, L., Brunak, S., 2006. Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology*, 16:844-853.
- Joost, H.G., Thorens, B., 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.*, 18:247-256.
- Jordão, B.P., Terra, W.R., 1991. Regional distribution and substrate specificity of digestive enzymes involved in terminal digestion in *Musca domestica* hind-midguts. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 17, 157-168.
- Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B.A., Drenth, J., 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 179, 233-256.

- Karrer, K.M., Peiffer, S.L. and Ditomas, M.E., 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 3063-3067.
- Kawamura, N., Sahara, K., Fugo, H., 2003. Glucose and ecdysteroid increase apyrene sperm production in in vitro cultivation of spermatocysts of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 49:25-30.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., 1990. Human facilitative glucose transporters: isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.*, 265: 13276-13282.
- Khan, A.R., James, M.N.G., 1998. Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Prot. Science* 7, 815-836.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., 1994. Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Meth. Enzymol.*, 244, 500-511.
- Klinkowstrom, A.M., Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Aminopeptidase A from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larval midguts. Properties and midgut distribution. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 27, 301-305.
- Knight, C.G., Barrett, A.J., 1976. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem. J.* 155, 117-125.
- Knight, P.J.K., Knowles, B.H., Eller, D.J., 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry 1a (c) toxin. *J. Biol. Chem.*, 270, 17765-17770.
- Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2000. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Lett.* 471, 67-70.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lane, N.J., Harrison, J.B., 1979. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J. of Cell Science*, 39, 355-372.
- Lee, M.J., Anstee, J.H., 1995. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 49-61.
- Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cotrill, J.A., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 1996. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry IAc toxin. *Applied Envir, Microbiol.*, 62, 2845-2849.
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., 2004. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform (SLC2A7) from the small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284 :G236-G242.
- Lienhard, G.E., SLOTT, J.W., James, D.E., Mueckler, M., 1992. How cells absorb glucose. *Sci. Am.*, 266, 86-91.
- Lizotte-Waniewski, M., Tawe, W., Guiliano, D.B., Lu, W., Liu, J., Williams, S.A., Lustigman, S., 2000. Identification of potential vaccine and drug target candidates by expressed sequence tag analysis and immunoscreening of *Onchocerca volvulus* larval cDNA libraries. *Infect. Immun.*, 68, 3491-3501.
- Loike, J.D., Hickman, S., Kuang, K., Xu, M., Cao, L., Vera, J.C., Silverstein, S. C., Fischbarg, J., 1996. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *Am. J. Physiol.*, 271, C1774-1779.
- Loo, D.D.F., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E., Wright, E.M., 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. National Acad. Scien. USA*, 90, 767-5771.
- Loo, D.D.F., Hirayama, B.A., Meinild, A., Chandy, G., Zeuthen, T., Wrigh E.M., 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *J. Physiol.*, 518, 195-202.
- Loo, D.D.F., Zeuthen, T., Chandy, G., Wright, E.M., 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 13.367-13.370.
- Lopez-Ordoñez, T., Rodriguez, M.H., de la Cruz Hernández-Hernández, F., 2001. Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.*, 10 (5), 505-511.
- Lowe, G., 1976. The cysteine proteinases. *Tetrahedron* 32, 291-302.

- Macheda, M.L., Kelly, D.J., Best, J.D., Rogers, S., 2002. Expression during rat fetal development of GLUT12—a member of the class III hexose transporter family. *Anat. Embryol.*, 205: 441-452.
- Manchenko, G.P., 1994. Handbook of detection of enzymes on eletrophoretic gels. Boca Raton: CRC Pres, p. 226.
- Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C., 2000. Purification and properties of a beta-glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larva. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30, 1139-1146.
- Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C.F., 1995. Midgut β -d-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities, and function. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 835-843.
- Maranhão, Z.C., 1977. Entomologia Geral 2ª Edição. Ed. Nobel, São Paulo.
- Marshall, A.T., Cheung, W.W.K., 1974. Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of cicadoid and cercopoid Malpighian tubules and filter chamber. *Tiss. Cell*, 6, 153-171.
- Mason, R.W., Gal, S., Gottesman, M.M., 1987. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem. J.* 248, 449-454.
- Mason, R.W., Wilcox, D., 1993. Chemistry of lysosomal cysteine proteases. *Adv. Cell Mol. Biol. Membr.* 1:81-116.
- Matthews, B.W., Sigler, P.B., Henderson, R., Blow, D.M., 1967. Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin. *Nature*, 214:652-56.
- Maugh, T.H., 1982. Exploring plant resistance to insects. *Science*, 216, 722-723
- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R., Chen, Y.T., 2001. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72: 113-117.
- Meinild, A.-K., Hirayama, B.A., Wright, E.M., Loo, D.D.F., 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biochem.*, 41, 1250-1258.
- Meinild, A.-K., Klaerke, D.A., Loo, D.D.F., Wright, E.M., Zeuthen, T., 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J. Physiol.*, 508, 15-21.

- Menard, R., Storer, A., 1992. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Hoppe-Seyler's Z. Biol. Chem.*, 373:393-400
- Miles, P. W., 1972. The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect physiol.* 9, 183-55.
- Morgan, M.R., 1975. Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl β -galactosidase activities of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 5, 609–617.
- Morton, R.E., Evans, T.A., 1992. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical Biochemistry* 204, 332-34.
- Mueckler, M., 1994. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry* 219, 713-725.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F., 1985. Sequence and structure of human glucose transporter. *Science*, 229, 941- 945.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H., Wolfson, J.L., 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 783-787.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., Shibata, Y., Katsumoto, T., 1998. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 718-726.
- Neurath, H., Walsh, K.A., 1976. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:3825-32.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Engine.*, 10:1-6.
- Norén, O., Sjortrom, H, Danielsen, E.M., Cowell, G.M., Skovbjerg, H., 1986. The enzymes of the enterocyte plasma membrane. In: *Molecular and Cellular Basis of Digestion* (Eds. Desnuelle, P., Sjostrom, H., Norén, O.), Elsevier, Amsterdam, 335-365.
- Ortego, F., Novillo, C., Castafiera, P., 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk com borer *Sesamia nonagrioides* Lef. In: *Lepidoptera: Noctuidae Arch. Insect Biochem. Physiol.* 33, 163-180.

- Panizzi, A.R., Parra, J.R.P., 1991. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Ed. Manole. São Paulo.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., Wright, E.M., 1992b. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J. Mem. Biol.*, 125, 63-79.
- Parkes, C., Kembhavi, A.A., Barrett, A.J., 1985. Calpain inhibition by peptide poxides. *Biochem. J.* 230, 509-516.
- Pascual, I., Berrjo'n, A., Lostao, M.P., Barber, A., 2006. Transport of D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 143, 20-26.
- Pedra, J.H.F., Brandt, A., Li, H-M., Westerman, Romero-Severson, Pollack , R.J.J., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R., 2003a. Transcriptome identification of putative genes involved in protein catabolism and innate immune response in human body louse (Pediculicidae: *Pediculus humanus*). *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 33, 1135-1143.
- Pedra, J.H.F., Brandt, A., Westerman, R., Lobo, N., Li, H-M., Romero-Severson, J., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R., 2003b. Transcriptome analysis of the cowpea weevilbruchid: identification of putative proteinases and α -amylases associated with food breakdown. *Insect Mol. Biol.*, 12 (4), 405-412.
- Phay, J.E., Hussain, H.B., Moley, J.F., 2000. Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internetbased genomic databases. *Surgery*, 128: 946-951.
- Polgar, L., 1989a. General aspects of proteases. In *Mechanisms of Protease Action*, ed. L Polar, pp. 43-76. Boca Ratan, FL: CRC Press.
- Polgar, L., ed. 1989b. Metalloproteases. In *Mechanisms of Protease Action*, pp. 208-210. Boca Ratan, FL: CRC Press.
- Pratviel-Souza, F., Clermont, S., Percheron, F., Chararas, C., 1986. Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopea pityocampa* larvae. Part 1. Purification and some properties of an α -glucosidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B, 77-81.

- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., Agre, P., 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387.
- Price, D.R.G., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J. A., 2007. Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 11, 1138-1148.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Sammons, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 41-47.
- Rawlings, N.D, Barrett, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biocem. J.*, 290, 205-218.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1994. Families of cysteine peptidases. *Meth. Enzymol.* 244, 461-486.
- Reger, J.F., 1971. Fine structure of the surface coat of midgut epithelial cells in the homopteran *Phylloscelis atra*. (Fulgorid). *J. Submicroscopic Cytol.*, 3, 353-358.
- Reid, E.W., 1892. Preliminary report on experiments upon intestinal absorption without osmosis. *British Med. J.*, 2, 1133-1134.
- Ribeiro, J.M.C, 2003. A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33, 865-882.
- Ribeiro, J.M.C., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I.M.B., Mans, B.J., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Wikel, S.K., 2006. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 36, 111-129.
- Ribeiro, J.M.C., Andersen, J., Silva-Neto, M.A., Pham, V.M., Garfield, M.K., Valenzuela, J. G., 2004a. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 61-79.
- Ribeiro, J.M.C., Charla, R., Pham, V.M., Garfield, M., Valenzuela, J.G., 2004b. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female

- mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 34, 543-563.
- Rogers, S., Macheda M. L., Docherty, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., 2002. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol.*, 282, E733-738.
- Rudd, S., 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci.* 8, 321- 329.
- Sabater-Muñoz, B., Legeai, F., Rispe, C., Bonhomme, J., Dearden, P., Dossat, C., Duclert, A. Gauthier, J., Ducray, D.G., Hunter, W., Dang, P, Kambhampati, S., Martinez-Torres, D., Cortes, T., Moya, A., Nakabachi, A., Philippe, C., Prunier-Leterme, N., Rahbé, Y., Simon, J., Stern, D.L., Wincker, P., Tagu, D., 2006. Large-scale gene discovery in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera). *Genome Biology*, 7:R21.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniats, E., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratorial Manual*. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*. 74, 5463-5467.
- Santos, C.D.; Terra, W.R., 1986. Midgut α -glucosidase and β -fructosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes: physical and kinetic properties. *Insect Biochem.*, 16, 819-824.
- Saxena, K. N., 1963. Mode of ingestion in a heteropterous insect *Dysdercus koenigii* (F.) (Pyrrhocoridae). *J. Insect Physiol.* 9, 47 71.
- Scheepers A, Joost H-G, Schürmann A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 28:364-371.
- Schnepf, E., Crickmore, J., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 62, 775-806.
- Schumaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T., Terra, W.R., 1993. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie*, 24, 3-17.

- Sheperd, P.R., Kahn, B.B., 1999 Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 341: 248-257.
- Shyamala, B.M., Bhat, V.J., 1965. Intestinal transport of glucose in the silkworm *Bombyx mori*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2, 101-104.
- Siegfried, B.D., Waterfield, N., French-Constant, R.H., 2005. Expressed sequence tags from *Diabrotica virgifera virgifera* midgut identify a coleopteran cadherin and a diversity of cathepsins. *Insect Mol. Biol.*, 14, (2), 137-143.
- Silva, C. P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1996. Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. *Insect Biochem. Mol. Biolol.*, 26, 1011-1018.
- Silva, C.P., Ribeiro, F.A., Gulbenkian, S., Terra, W.R., 1995. Organization origin and functions of the outer microvillar (perimicrovillar) membrane of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.*, 41, 1093-1103.
- Silva, C.P., Silva, J.R., Vasconcelos, F.F., Petretski, M.D.A., DaMatta, R.A., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2004. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneoptera insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arth. Structure Develo.*, 33, 139-148.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1994. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 493-505.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1995. An Alpha-Glucosidase From The Perimicrovillar Membranes Of *Dysdercus peruvianus* midgut Cells. Purification And Properties. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, 4, 487-494.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1997. Alpha-Galactosidase activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34: 443-460.
- Simpson, I.A., Cushman, S.W., 1986. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 1059-1089.
- Siviero, F., Rezende-Teixeira, P., Andrade, A., Machado-Santelli, G.M., Santelli, R. V., 2006. Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands. *Insect Mol. Biol.*, 15 (2), 109-118.
- Smanik, P.A., Liu, Q., Furminger, T.L., 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun.*, 226:339-345.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- Soares, J.J., 2000. Algodão: tecnologias para redução de agrotóxicos. Artigos Embrapa.
- Souza-Neto, J.A., Machado, F.P., Lima, J.B., Valle, D., Ribolla, P.E.M., 2007. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, 147, 4, 993-1000.
- Spencer, K.C., 1988. Chemical mediation of coevolution in the Passiflora-Heliconius interaction. In: Spencer, K. C. (Ed.), *Chemical Mediation of Coevolution*. Academic Press, London, 167-240.
- Sreedharan, S.K., Verma, C., Caves, L.S.D., Brocklehurst, S.M., Gharbias, S.E., Shah, H.N., Brocklehurst, K., 1996. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. In: *Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64- β -trypsin complex* *Biochem. J.* 316, 777-786.
- Storer, A.C., Ménard, R., 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 486-500.
- Storer, A.C., Ménard, R., 1996. Recent insights into cysteine protease specificity: lessons for drug design. *Perspect. Drug Discovery Design* 6, 33-46.
- Takahashi, N., Kurata, S., Natori, S., 1993. Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body, during metamorphosis of *Sarcophaga peregrine* (flesh fly). *FEBS Lett.* 334, 153-157.
- Tanimura, T., Kitamura, K., Fukuda, T., Kikuchi, T., 1979. Purification and partial characterization of three forms of α -glucosidase from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.*, 85, 123-130.
- Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.*, 7, 290-298

- Terra, W.R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol Res.*, 21, 675-734.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 35, 181-200.
- Terra, W.R., Cristofolletti, P.T., 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 725-730.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B, 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of Diestion. Gilbert, L.I., Iatrov, K., Gill, S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, 4: 171-224.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S., 1988. Origin, distribution, properties, and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.*, 18, 423-434.
- Terra, W.R., Jordão, B.P., 1989. Final digestion of starch in *Musca domestica* larvae: distribution and properties of midgut α -glucosidases and glucoamylase. *Insect Biochem.*, 19, 285-292.
- Têxtil: Setor volta a contratar, 2004. As melhores da Dinheiro. *Isto é Dinheiro*, 370A, 220-221.
- Theodorides, K., De Riva, A., Gómez-Zurita, J., Foster, P.G., Vogler A.P., 2002. Comparison of EST libraries from seven beetle species towards a framework for phylogenomics of the Coleoptera. *I. Mol. Bio.*, 11 (5), 467-475.
- Thie, N.M.R., Houseman, J.G., 1990. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem.*, 20, 313-318.
- Thorsteinson, A.J., 1960. Host selection in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 5, 193-218, apud Panizzi, A. R., Parra, J. R. P., 1991. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Ed. Manole. São Paulo.
- Treherne, J.E., 1957. Glucose absorption in the coackroach. *J. Exp. Biol.*, 34, 478-485.

- Treherne, J.E., 1958. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.*, 35, 297-306.
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., Thorens, B., 2002. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.*; 524:199-203.
- Uldry, M., Thorens, B., 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.*, 447, 480-489.
- Uldry, N., Ibberson M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M., Thorens, B., 2001. Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.*, 20, 4467-4477.
- Vaeck, M., Reynarerts, A., Hofte, J.S., De Beuckleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Montagu, M., Leemans, J.C, 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328, 33-37.
- Valaitis, A.P., Mazza, A., Brousseau, R., Masson, L., 1997. Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 6, 529-539.
- Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M., F., Francischetti, Ribeiro, J.M.C., 2002. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 32,1101-1122.
- Varughese, K. L., Ahmed, F. R., Careys, P.R., Hasnain, S., Huber, C. P., Storer, A. C., 1989. Crystal structure of papain-E-64 complex. *Biochemistry* 28:1330–32.
- Wang, M., Wang, C., 1993. Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Lett.*, 317, 241-244.
- Wegener, G., Tschiedel, V., Schlöder, P., Ando, O., 2003. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J. Exp. Biol.*, 206:1233-1240.
- Wessing, A., Eichelberg, D., 1978. Malpighian tubules, rectal papillae and excretion. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*, 2c (eds Ashburner, A. e Wright, T.R.F.), 1-42. London: Academic Press.
- Wheeler, D.L., Chappey, C., Lash, A.E., Leipe, D.D., Madden, T.L., Schuler, G. D., Tatusova, T.A., Rapp, B.A., 2000. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, 28 (1): 10-14.
- Wigglesworth, V.B., 1972. *The principles of insect physiology*. 7 th ed., Londres, Methuen.

- Wolfson, J.L., Murdock, L.L., 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16, pp. 1089-1102.
- Wongchawalit, J., Yamamoto, T., Nakai, H., Kim, Y.M., Sato, N., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Saji, O., Chanchao, C., Wongsiri, S., Surarit, R., Svasti, J., Chiba, S., Kimura, A., 2006. Purification and characterization of alpha-glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70 (12), 2889-98.
- Wood, I.S., Trayhurn, P., 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.*, 89:3-9.
- Wright, E.M., 2001. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.*, 280, F10-F18.
- Wright, E.M., Turk, E., 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.*, 447, 510-518.
- Wu, X., Freeze, H.H., 2002. GLUT14, a duplication of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80: 553-557.
- Zampighi, G.A., Kreman, M., Boorer, K.J., Loo, D.D.F., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J.E., Wright, E.M., 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Mem. Biol.*, 148, 65-78.
- Zeuthen, T., 1991. Secondary active transport of water across ventricular cell membrane of choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J. Physiol.*, 444, 153-173.
- Zeuthen, T., 1994. Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J. Physiol.*, 478, 203-219.
- Zeuthen, T., Hamann, S., La Cour, M., 1996. Cotransport of H⁺, lactate and H₂O by membrane proteins in retinal pigment epithelium of bullfrog. *J. Physiol.*, 497, 3-17.
- Zeuthen, T., Meinild, A.-K., Klaerke, D., Wright, E.M., Belhage, B., Loo, D. D.F., Litman, T., 1997. Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol. Cell* , 89, 307-312.
- Zeuthen, T., Zeuthen, E., Klaerke, D.A., 2001. Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na⁺-coupled sugar transporters SGLT1. *J. Physiol.*, 542, 71-87.

Zeuthen, T., Zeuthen, E., MacAulay, N., 2007. Water transport by GLUT2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol.*, 579 (2), 345-361.

7- SÚMULA CURRICULAR

7.1- DADOS PESSOAIS

Nome: Thaís Duarte Bifano

Local e data de nascimento: Campos dos Goytacazes/RJ, 21 de julho de 1978.

7.2- EDUCAÇÃO

Colégio, local, ano: Liceu de Humanidades de Campos, Campos dos Goytacazes/RJ, 1995.

Universidade, local, ano: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes/RJ, 2001.

Graduação (Modalidade): Ciências Biológicas (Bacharelado)

Universidade, local, ano: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes/RJ, 2004.

Mestrado em Biociências e Biotecnologia

7.3- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2001 - 2001 Curso de curta duração em Curso de curta duração em Biossegurança. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, Brasil.

7.4- OCUPAÇÃO

2004 - 2008 Bolsista de Doutorado pela FAPESP

2002 - 2004 Bolsista de Mestrado pela FENORTE

1998 - 2002 Bolsista de Iniciação Científica pela FAPERJ

7.5- PUBLICAÇÕES

7.5.1- ARTIGOS COMPLETOS

1. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., ISEJIMA E.M., XAVIER FILHO, J., SÁ, M. F. G., DAMATTA R.A, TERRA, W. R., MIGUENS, F. C. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of alpha-amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Molec. Biol.* , v.31, p.41 - 50, 2001.

2. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., TERRA, W. R., SÁ, M. F. G., ISEJIMA E.M.,

SAMUELS, R.I., ALMEIDA, J. S. Induction of digestive alpha-amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean alphaamylase inhibitor 1. *Journal of Insect Physiology.* , v.47, p.1283 - 1290, 2001.

7.5.2- RESUMOS EM CONGRESSOS

1. BIFANO, T. D., TERRA, W. R.

Identification of transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* anterior midgut. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia/SP.

2. BIFANO, T. D., TERRA W.R

Two digestive cysteine proteinases from *Dysdercus peruvianus* 32^o FEBS Congress, 2007, Vienna, Austria.

3. BIFANO, T. D., TERRA, W. R.

Ventriculome: a rapid insight into the midgut molecular physiology of the hemiptera *Dysdercus peruvianus*. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador/BA.

4. CRIVELARI, A. C., ALEGRIA, T. G. P., BIFANO, T. D., TERRA, W. R.

Partial characterization of two digestive cysteine proteinases from the midguts of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador/BA.

5. MOREIRA, N. R., BIFANO, T. D., TERRA, W. R.

Distribution and partial characterization of two alpha-mannosidases of *Tenebrio molitor* (coleoptera). XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador/BA.

6. BIFANO, T. D., TERRA, W. R.

Analysis of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut transcriptome. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular., 2006, Águas de Lindóia/SP.

7. BIFANO, T. D., TERRA, W. R., LOPES, A. R., CRIVELARI, A. C.

Purification of a digestive cysteine protease from the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia/SP.

8. BIFANO, T. D., TERRA W. R, TAMAKI, F. K., LOPES, A. R., ORNELAS, C. C. Distribution, isolation and partial characterization of cysteine proteinase of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2005, Águas de Lindóia/SP.

9. BIFANO, T. D., SANTOS, C. M., SILVA, C. P., MEIRELES, E. A. Digestion of starch granules by granivorous insects. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2004, Caxambu/MG.

10. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., TERRA, W. R., SÁ, M. F. G., DAMASCENO DE SÁ, J. C.

Fragments of the alpha-amylase inhibitor 1 are recognized by receptors in the cell microvilli of larval *Zabrotes subfasciatus* midgut epithelium. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu/MG.

11. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., SÁ, M. F. G., SAMUELS, R.I., TERRA, W. R. Bean lectin (PHA) as inductor of alpha-amylases in larval *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxamabu/MG.

12. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., SÁ, M. F. G., TERRA, W. R., SAMUELS, R.I. Lectina de feijão (PHA) como indutor de alpha-amilases digestivas em larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: bruchidae). VII Encontro de Iniciação Científica da UENF, 2002, Campos dos Goytacazes/RJ.

13. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., TERRA, W. R., ISEJIMA E.M., XAVIER FILHO, J., SÁ, M. F. G.

Estudo da indução de alfa-amilases digestivas em larvas do caruncho praga de feijões *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). VI Encontro de Iniciação

Científica da UENF, 2001, Campos dos Goytacazes/RJ.

14. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., SÁ, M. F. G., TERRA, W. R.

Induction of digestive amylase in larvae of the bruchid beetle *Zabrotes subfasciatus*. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2001, Caxambu/MG.

15. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., ISEJIMA E.M., DAMATTA R.A., SÁ, M. F. G., XAVIER FILHO, J., TERRA, W. R.

Digestão de grânulos de amido em larvas de *Zabrotes subfasciatus* e indução de alfa-amilases digestivas. V Encontro de Iniciação Científica da UENF, 2000, Campos dos Goytacazes/RJ.

16. BIFANO, T. D., ISEJIMA E.M., SILVA, C. P., XAVIER FILHO, J., DAMATTA R.A., TERRA, W. R.

Digestion of legume starch granules in larvae of *Zabrotes subfasciatus* and the induction of digestive alpha-amylases XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2000, Caxambu/MG.

17. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., XAVIER FILHO, J.

Indução de alfa-amilases em larvas do bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* em resposta a diferentes hospedeiros. IV Encontro de Iniciação Científica da UENF, 1999, Campos dos Goytacazes/RJ.

18. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., TERRA, W. R., XAVIER FILHO, J., SÁ, M. F. G.

Induction of alfa-amylases in larvae of the bruchid beetle *Zabrotes subfasciatus* in response to different hosts. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 1999, Caxambu/MG.

19. BIFANO, T. D., SILVA, C. P., MIGUENS, F. C., DaMatta R.A,

Digestion Pattern of starch granules from *Phaseolus vulgaris* by alpha-amylase purified from the gut of *Zabrotes subfasciatus*. XVII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis and X Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 1999, Caxambu/MG.

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](#)