Alexandre Hiroshi Utiyama

**Estudo Comparativo da Organização
Morfofuncional do Intestino Médio de Espécies
Representativas da Ordem Hemiptera**

*Comparative Study of the Morphofuncional
Organization of the Midgut of Representative
Species of the Order Hemiptera*

São Paulo

2016

Alexandre Hiroshi Utiyama

**Estudo Comparativo da Organização
Morfofuncional do Intestino Médio de Espécies
Representativas da Ordem Hemiptera**

***Comparative Study of the Morphofunctional
Organization of the Midgut of Representative
Species of the Order Hemiptera***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área
de Biologia/Genética

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

□

Utiyama, Alexandre.

Estudo Comparativo da Organização Morfofuncional do Intestino Médio de Espécies Representativas da Ordem Hemiptera.

118f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Sistema digestivo de insetos 2. Membrana perimicrovilar 3. Morfologia

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro
(Orientador)

Dedicatória

Aos meus pais, Reika e Akimitsu, que deram todo o apoio e condições para que fosse possível realizar mais este objetivo.

À minha irmã, Karen, que oferece seu suporte incondicional em todos os momentos da vida.

Agradecimentos

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, que sempre se comprometeu, além de suas obrigações, com minha formação profissional e pessoal ao longo de todo o tempo de convivência.

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, por toda sua orientação e por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP) e toda sua equipe para a realização da vertente molecular deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, por fornecer exemplares das espécies *Bucephalogonia xanthophis*, *Macugonalia leucomelas*, *Dalbulus maidis* e *Diaphoria citri* utilizadas neste estudo, além de disponibilizar a estrutura do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (Entomologia – ESALQ/USP) e sua equipe para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Nilza Maria Martinelli, por fornecer exemplares da cigarra *Quesada gigas* e por disponibilizar a estrutura do Departamento de Fitossanidade (UNESP/Jaboticabal) e sua equipe para a coleta e processamento destes insetos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, por colaborar conosco e permitir nossa interação com o Departamento de Entomologia da ESALQ/USP.

À Profa. Dra. Mariz Vainzof, coordenadora do Curso de Pós-Graduação do Programa de Ciências Biológicas/Genética, por todo o suporte e assistência prestada ao longo de todo o período de desenvolvimento da tese.

Aos amigos e companheiros de laboratório Waldir Caldeira e Márcio Valentim Cruz, por todo o suporte técnico, mas acima de tudo, pelos ótimos momentos vividos ao longo destes anos.

À querida amiga Camila Leal, que me acompanhou ao longo de todos estes anos de desenvolvimento da tese, nos bons e maus momentos, sempre oferecendo todo o seu apoio e, principalmente, amizade.

Ao doutorando e amigo André Coppe Pimentel, do Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP), por sua disposição e suporte ao longo de todo o doutorado.

À doutoranda Mariana Bossi Esteves, do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (ESALQ/USP), por todo o suporte oferecido em nossa estadia no laboratório.

À Erika Harumi Takamoto de Camargo, da Secretaria de Pós-Graduação do IB-USP, por toda a ajuda e assistência prestada em todos estes anos de pós-graduação.

À Adriana Hypólito Nogueira, diretora técnica do Serviço de Biblioteca do IB-USP, por fornecer apoio bibliográfico com obras de difícil acesso e por oferecer auxílio quanto às normas bibliográficas a serem seguidas.

À Rubia Chuartz, que ofereceu todo o seu suporte e companheirismo nos últimos meses de trabalho.

A todos os grandes amigos que me acompanharam ao longo dos anos de desenvolvimento da tese, que fizeram a jornada valer a pena.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Lista de Abreviaturas

- Amp/Mep** – Transportador de amônia/amônio
- Ap** – Apêndices do intestino médio
- ATM** – Alças transmembrana
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- B** - Brocossomos
- BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*
- CC** - Carcaça
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar
- CF** – Câmara de filtração
- CIC** – *Chloride channel*
- CDM** – *Conical domain of the midgut*
- CVC** – Clorose variegada dos citros
- DC** – Domínio cônico do intestino médio
- dCAS** – *Desktop System Annotation cDNA*
- DEPC** - Dietilpirocarbonato
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DT** – Domínio tubular do intestino médio
- DTA** – Domínio tubular anterior
- DTM** – Domínio tubular médio
- DTP** – Domínio tubular posterior
- E** – Esôfago
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM** – Espaço perimicrovilar
- FABP** – *Fatty-acid binding proteins*
- FC** – *Filter chamber*
- G** – Complexo de Golgi
- GLUT** – Transportador de glicose
- GMV** – Grânulo multivesicular
- GO** – *Gene Ontology*
- GTP** – Trifosfato de guanosina
- IL** – Invaginações lamelares da membrana plasmática basal

IMB – Invaginações da membrana plasmática basal

IP – Intestino posterior

IT – Invaginações tubulares da membrana plasmática basal

L – Lúmen

LDL – *Low density lipoprotein*

Mi – Mitocôndrias

Mv - Microvilosidades

MPM – Membranas perimicrovilares

MPMm – Membranas perimicrovilares modificadas

MLC – Membranas luminais em forma de chama

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

N – Núcleo

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PI/PM – Ponto isoeletrico/Peso molecular

PS – Peptídeo sinal

R - Reto

REG – Retículo endoplasmático granular

Rh - *Rhesus*

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SGLT – Cotransportador de sódio/glicose

SLC – *Solute carrier*

TAE – Tris-acetato-ácido etilenodiamino tetra-acético

TDM – *Tubular domain of the midgut*

TM – Túbulos de Malpighi

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

V – Vesículas do complexo de Golgi

VS – Vesícula de secreção

Sumário

INTRODUÇÃO	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
MORFOLOGIA FUNCIONAL DO SISTEMA DIGESTIVO DOS INSETOS	4
1. Fisiologia da digestão na ordem Hemiptera	7
2. A organização morfológica do sistema digestivo de hemípteros das subordens Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha	11
FISIOLOGIA MOLECULAR DA DIGESTÃO EM INSETOS	13
1. Proteínas de relevância funcional para o processo digestivo nos insetos	15
1.1. Transportadores de membrana celular	15
a) Transportadores de aminoácidos	16
b) Transportadores de açúcar	16
c) V-ATPase	17
d) Aquaporinas	19
e) Transportador de amônia/amônio	19
f) Transportadores de fosfato inorgânico e sódio	20
g) Transportador de sódio/H ⁺	21
h) Transportador de cloreto/H ⁺	21
1.2 Enzimas digestivas	22
a) α -glicosidases	22
b) Catepsinas	23
c) Aminopeptidases	23
d) Quimotripsinas	24
1.3. Outras proteínas	25
a) Proteínas ligantes de ácidos graxos	25
b) Anidrase carbônica	25

O PROJETO	26
OBJETIVOS	29
MATERIAL E MÉTODOS	33
MATERIAL	35
MÉTODOS	35
1. Microscopia eletrônica de transmissão	36
2. Biologia molecular	37
2.1. Extração de RNA	37
2.2. Purificação de RNA	38
2.3. Produção de cDNA	38
2.4. RT-PCR semi-quantitativo	39
3. Bioinformática	40
3.1. Newbler	40
3.2. dCAS	41
3.3. Curagem das sequências	42
RESULTADOS	45
ANÁLISES MORFOLÓGICAS	47
1. <i>Macugonalia leucomelas</i>	47
2. <i>Dalbulus maidis</i>	49
3. <i>Mahanarva fimbriolata</i>	50
4. <i>Quesada gigas</i>	50
5. <i>Diaphorina citri</i>	51
ANÁLISES MOLECULARES	53
1. Análise geral do pirosequenciamento e montagem dos <i>contigs</i>	53
2. Função das proteínas e banco de dados GO (<i>Gene Ontology</i>)	53
3. Sequências de interesse ao processo digestivo	
Identificadas no intestino médio de <i>B. xanthophis</i>	55
3.1. Transportadores	55
a) Transportadores de aminoácidos	55

b) Transportadores de açúcar	56
c) V-ATPase	57
d) Aquaporinas	57
e) Transportador de amônia/amônio	58
f) Transportador de fosfato inorgânico e sódio	58
g) Transportador de sódio/H ⁺	58
h) Transportador de cloreto/H ⁺	59
3.2. Enzimas digestivas	59
a) α-glicosidases	59
b) Catepsinas	60
c) Aminopeptidases	60
d) Quimotripsinas	61
3.3. Outras proteínas	61
a) Proteínas ligantes de ácidos graxos	61
b) Anidrase carbônica	62

DISCUSSÃO **65**

ANÁLISE MORFOLÓGICA	67
1. Anatomia do sistema digestivo	67
2. Ultraestrutura do intestino médio	70
3. Panorama da digestão em Hemiptera	76

ANÁLISE MOLECULAR	82
1. Transportadores de membrana	83
1.1. Transporte de aminoácidos e outros compostos nitrogenados	83
1.2. Transporte de açúcares	86
1.3. Transporte de água	88
1.4. Outros transportadores	90
2. Enzimas digestivas	91
3. Outras proteínas	94
4. Considerações gerais sobre a fisiologia molecular da digestão	95

CONCLUSÕES **99**

RESUMO	105
ABSTRACT	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
FIGURAS	145
TABELAS	195

INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os insetos compõem o grupo de maior diversidade dentro do filo Arthropoda, sendo encontrados nos mais diversos habitats (Triplehorn & Johnson, 2005). Sua origem nos registros fósseis data do período Devoniano, há cerca de 400 milhões de anos (Grimaldi & Engels, 2005) e, atualmente, são os animais mais abundantes em nosso planeta (Terra, 1988).

Praticamente todo material orgânico encontrado na natureza pode ser utilizado como alimento pelos insetos (Wigglesworth, 1972). Essa diversidade alimentar associada a um íntimo contato com a flora e fauna favoreceu o desenvolvimento de espécies que competem com os humanos por alimento, sendo consideradas pragas agrícolas (Medeiros, 2000).

Estima-se que exista um milhão de espécies de insetos, representando cerca de 70% de todas as espécies de animais (Rupert & Barnes, 1996). Dentre elas, aproximadamente 90.000 são pragas (Gallo et al., 1988). Os danos causados à agricultura estão relacionados, principalmente, aos hábitos alimentares. Além dos danos causados diretamente (ingestão de seiva e ingestão de tecidos vegetais), ocorrem perdas na produção de alimentos pela oviposição e pela transmissão de doenças às plantas, visto que os insetos são vetores de diversos patógenos vegetais. No Brasil, os prejuízos causados por insetos à agricultura podem chegar a 79%, dependendo da cultura considerada (Pfadt, 1978; Gallo et al., 1988).

A utilização dos tradicionais defensivos químicos na agricultura para o combate destas pragas resultam em graves consequências ambientais. Além disso, essas drogas são ineficientes contra os insetos herbívoros, pois eles estão adaptados para resistir ao grande arsenal químico de defesa das plantas. Os verdadeiros afetados são os insetívoros, que são insetos que se alimentam de outros insetos, visto que estes animais não possuem as mesmas defesas químicas. Deste modo, a utilização destes inseticidas não somente são pouco efetivos no combate à essas pragas, como também selecionam artificialmente linhagens mais resistentes, além de eliminar seus predadores (Burg & Mayer, 1999). Assim, ao longo das últimas décadas, têm ocorrido avanços significativos nas linhas de pesquisa que buscam alternativas mais eficientes e ecologicamente corretas para o controle dessas pragas (Ribeiro et al., 1990). O

estudo dos processos digestivos em insetos, com ênfase na biologia celular das células intestinais e na caracterização de enzimas digestivas, emerge como uma linha de pesquisa promissora no combate de pragas. Espera-se que um maior conhecimento nessa área leve à obtenção de inibidores específicos de enzimas digestivas que poderão ser utilizados como uma nova geração de praguicidas (Terra, 1988; 1990; Ribeiro et al., 1990; Terra & Ferreira, 1994; Terra et al., 1996 a; b).

O desenvolvimento desta área de aplicação está relacionado à ampliação do conhecimento sobre os eventos moleculares acerca dos fenômenos fisiológicos intestinais, o que exige conhecimento sobre as enzimas digestivas em detalhe estrutural e de proteínas relacionadas a uma diversidade de funções intestinais, tais como transportadores, receptores, bombas e proteínas relacionadas a mecanismos de secreção.

Ao se analisar a diversidade de sequências de DNA e proteínas de insetos disponíveis em bancos de dados (como, por exemplo, o NCBI), é possível observar que a maioria é referente a espécies modelo, como *Drosophila melanogaster*, de interesse econômico ou relacionadas à saúde pública, como *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae*. Este fato limita consideravelmente o alcance das análises comparativas que podem ser realizadas usando sequências de DNA e proteínas de insetos disponíveis.

MORFOLOGIA FUNCIONAL DO SISTEMA DIGESTIVO DOS INSETOS

O sistema digestivo representa a principal interface de interação entre os animais e o ambiente. Ele exhibe grande variedade morfológica e funcional, com processos de digestão e assimilação de nutrientes apropriados aos diferentes tipos de alimento (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012).

Anatomicamente, é possível dividir o sistema digestivo dos insetos em três regiões: o intestino anterior, o médio e o posterior (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1998). O intestino anterior tem início na boca e inclui a cavidade bucal (que recebe secreções das glândulas salivares), a faringe, o esôfago, o papo e o proventrículo (ou

moela). Estas duas últimas regiões podem não estar presentes em algumas espécies. O papo é, em geral, um órgão de estoque, podendo ser, também, utilizado como sítio de digestão. O proventrículo pode ser uma estrutura com função trituradora em algumas espécies, mas, na maioria dos casos, se restringe ao papel de válvula para a passagem do alimento para o intestino médio. O intestino anterior tem origem ectodérmica e apresenta uma fina camada de cutícula recobrindo suas células, podendo apresentar projeções na forma de dentículos ou espículas (Wigglesworth, 1972). Os principais eventos da digestão e absorção de nutrientes ocorrem no intestino médio. Ele é formado por um tubo simples, de origem endodérmica e pode apresentar um número variado de projeções na forma de sacos de fundo cego, chamados de cecos gástricos (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). O epitélio do intestino médio é composto, principalmente, por células denominadas enterócitos, responsáveis pelos eventos mais significativos do processo digestivo, como, por exemplo, a secreção de água e enzimas digestivas, absorção de água e nutrientes e a digestão final do alimento (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Além dos enterócitos, podem ser observados outros dois tipos celulares: células regenerativas e endócrinas. As primeiras são uma população de células indiferenciadas que estão comprometidas com a renovação celular do epitélio digestivo (Terra, 1988; Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996; Chapman, 1998). As últimas estão relacionadas com a síntese de hormônios que podem atuar na diferenciação celular e na regulação da produção de enzimas digestivas (Iwanaga et al., 1981; Chapman, 1998).

A transição entre o intestino médio e o posterior é marcada pela presença de um esfíncter denominado de piloro. Nesta região, inserem-se os túbulos de Malpighi, que são órgãos do sistema excretor. O intestino posterior tem origem ectodérmica e, assim como o intestino anterior, também apresenta uma fina camada de cutícula recobrindo suas células. Esta região tem a função geral de absorção de água e íons e pode ser dividida em íleo, cólon e reto, terminando no ânus. Em algumas espécies de insetos, o intestino posterior é reduzido a um tubo delgado. Em outras, podem ser observadas a presença de câmaras de fermentação ou rúmen, que abrigam microrganismos que podem auxiliar na digestão de celulose (Wigglesworth, 1972; Terra, 1990; Chapman, 1998).

Com exceção dos integrantes do grupo Paraneoptera (que incluem as ordens Hemiptera e Thysanoptera, além de Psocoptera e Phthiraptera) os insetos apresentam uma membrana acelular, de constituição quitino-proteica, que reveste o alimento no

lúmen do intestino médio, chamada de membrana peritrófica (Terra et al., 1996a; b; Lehane, 1997; Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2012). Esta estrutura separa o conteúdo luminal em dois compartimentos: o espaço endo-peritrófico (interior da membrana peritrófica) e o ecto-peritrófico (entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal) (Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2012). A função da membrana peritrófica foi inicialmente relacionada à proteção do epitélio contra microrganismos e contra a abrasão das células epiteliais pela passagem do alimento, além da conservação de enzimas digestivas, pois esta membrana apresenta uma permeabilidade diferencial à essas enzimas e aos produtos de digestão (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Estudos posteriores mostraram que a membrana peritrófica possui também um papel importante no processo digestivo em insetos, prevenindo, significativamente, a ligação não específica de material não digerido à superfície das células do intestino médio e a remoção de moléculas oligoméricas do espaço endo-peritrófico (Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2012).

Um estudo realizado por Ferreira et al. (1981) relacionou os diferentes compartimentos do intestino médio da larva de *Rhynchosciara americana* (Diptera) com as fases da digestão. Neste trabalho, foi-se constatado de a digestão inicial ocorre no espaço endo-peritrófico, enquanto que a digestão intermediária acontece no espaço ecto-peritrófico e a final ocorre ao nível das células do intestino médio, também no espaço ecto-peritrófico (Ferreira et al., 1981). Posteriormente, foi demonstrado a capacidade de secreção de água pelas células da região posterior do intestino médio, enquanto as células do ceco gástrico, na região anterior do intestino médio, tem a capacidade de absorve-la. Desta forma, cria-se um contrafluxo de líquido no espaço ecto-peritrófico, no sentido póstero-anterior. A digestão nos insetos ocorre de forma compartimentalizada. A digestão inicial dos grandes polímeros (amido, proteínas, entre outros) ocorre no espaço endo-peritrófico, enquanto o alimento é encaminhado em direção ao intestino posterior. Os oligômeros resultantes deste processo se difundem para o espaço ecto-peritrófico, onde ocorre a digestão intermediária. Devido ao contrafluxo de fluido existente nesse compartimento, a digestão final ocorre a nível das microvilosidades, na região anterior do intestino médio ou nos cecos gástricos (quando presentes). Nesses locais, os dímeros originados pela digestão intermediária, são hidrolisados por enzimas integrantes de membrana ou imobilizadas no glicocálix e, por fim, absorvidos pelos enterócitos (Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2012).

1. Fisiologia da digestão na ordem Hemiptera

A ordem Hemiptera constitui um enorme grupo sistemático de insetos com metamorfose simples que apresentam uma considerável variabilidade em termos de morfologia corporal, biologia e hábitos alimentares. Classificações clássicas destes insetos os dividiam em dois grupos: Homoptera e Heteroptera (Gillot, 1995; Resh & Cardé, 2003; Triplehorn & Johnson, 2005). Os homópteros ainda se dividiam em dois outros táxons: Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha. A classificação atual destes organismos considera apenas uma ordem, Hemiptera, que compreende três subordens: Heteroptera (percevejos), Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) e Sternorrhyncha (pulgões e afídeos) (Gillot, 1995; Resh & Cardé, 2003; Triplehorn & Johnson, 2005; Cryan & Urban, 2011). As subordens Sternorrhyncha e Heteroptera são consideradas monofiléticas pelas classificações atuais. Por outro lado, o monofiletismo da subordem Auchenorrhyncha ainda é motivo de controvérsia. De fato, há classificações em que o clado “Auchenorrhyncha” é considerado parafilético (Muséum National D’Histoire Naturelle. Hem-bases). Este grupo é composto por duas infraordens: Cicadomorpha, que compreende as superfamílias Cercopoidea, Cicadoidea e Membracoidea, e Fulgoromorpha, que contém apenas a superfamília Fulgoroidea (Resh & Cardé, 2003; Grimaldi & Engels, 2005; Cryan & Urban, 2011). Embora seja aceito que estas quatro superfamílias sejam monofiléticas, não há consenso sobre as relações filogenéticas destes grupos entre si e com os grupos fósseis. Consequentemente, nenhuma classificação foi aceita universalmente e a nomenclatura de alguns desses grupos não é definitiva (Resh & Cardé, 2003). Neste particular, o presente projeto pode gerar contribuições importantes no sentido de contribuir para a elucidação de aspectos controversos das relações filogenéticas dos hemípteros.

Muitos integrantes da ordem Hemiptera interagem com o homem e são de grande importância econômica. As espécies de Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha são parasitas de plantas, enquanto que as de Heteroptera, em geral, são predadoras de animais, embora alguns grupos desta subordem tenham retornado ao comportamento fitofágico. Alguns heterópteros são parasitas de vertebrados de sangue quente, incluindo os humanos, sendo de grande importância à saúde pública (Triplehorn & Johnson, 2005). A eficiência destes animais para se alimentarem de fluidos de plantas

e animais se deve, em grande parte, ao seus aparelhos bucais finamente adaptados ao hábito sugador (Grimaldi & Engels, 2005).

Integrantes das subordens Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha se adaptaram a uma alimentação baseada em uma fonte nutricionalmente desbalanceada, como o floema, que possui altas concentrações de açúcares, e o xilema, que é extremamente diluído. Além do complexo luminal de membranas presentes no intestino médio destes animais, alguns destes insetos podem apresentar um arranjo denominado de câmara de filtração em seus sistemas digestivos que auxilia na absorção de nutrientes. Este órgão consiste na aposição entre o intestino médio anterior, o posterior e as porções proximais dos túbulos de Malpighi (quando presentes), possibilitando a passagem de água entre estes tecidos e facilitando a absorção de nutrientes na porção média do intestino médio (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974).

O grupo Auchenorrhyncha contém algumas das mais destrutivas pragas agrícolas. Os danos às culturas podem ser diretos (pela destruição dos tecidos vegetais via alimentação ou oviposição) ou indiretos (pela transmissão de patógenos) (Resh & Cardé, 2003). Insetos das famílias Cicadellidae e Cercopidae são as principais pragas dos pomares de citricultura nacional (De Nigri, 1990). Estes animais são vetores de estirpes de *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora da clorose variegada dos citros (CVC), patologia que causa enormes prejuízos às culturas de citros em nosso país (Rossetti et al., 1990; Beretta et al., 1993; Donadio & Moreira, 1997).

A cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis*, integrante da família Cicadellidae e um dos objetos de estudo deste trabalho, alimenta-se de xilema de espécies cítricas e de gramíneas. Além de ser uma das espécies responsáveis pela transmissão de CVC pelos pomares brasileiros, foi descoberto que ela também é vetor de uma estirpe de *X. fastidiosa* responsável pela doença da folha queimada em cafeeiros (Marucci et al., 1999; Marucci et al., 2001).

Na ordem Hemiptera (assim como em Thysanoptera) observa-se a ocorrência de um outro modelo de digestão diverso do observado nas demais ordens de insetos que apresentam uma membrana peritrófica em seus intestinos médios. Nesse caso, tal estrutura está ausente (Silva et al., 1995; Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2012) e, em seu lugar, observa-se a ocorrência de um complexo luminal de membranas lipoproteicas associado às microvilosidades dos enterócitos. Em algumas espécies de hemípteros, essas membranas, denominadas de membranas perimicrovilares (MPM),

revestem as microvilosidades a uma distância regular e suas extremidades se projetam para a luz do intestino, terminando em fundo cego (Lane & Harrison, 1979; Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Deste modo, cria-se compartimento delimitado pela MPM e as microvilosidades, denominado espaço perimicrovilar (EPM) (Silva et al., 1995; Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Acredita-se que as MPM surgiram ao longo da evolução em um ancestral das ordens Hemiptera e Thysanoptera, que se alimentava de seiva de plantas, provavelmente floema (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). As MPM possuem poucas proteínas integrantes em sua composição, em contraposição às membranas microvillares, que possuem muitas delas (Lane & Harrison, 1979; Andries & Torpier, 1982). Acredita-se que as microvilosidades possuam proteínas que transportam, ativamente, íons potássio (o íon mais importante na seiva) a partir do EPM para o interior dos enterócitos, gerando, assim, um gradiente de concentração entre a seiva no lúmen do intestino médio e o epitélio. Este gradiente seria a força motriz para a absorção de componentes orgânicos, tais como aminoácidos (presentes em baixas concentrações na seiva), através de proteínas transportadoras presentes na MPM. Estes nutrientes se difundiriam pelo EPM e seriam absorvidos pelos enterócitos graças à ação de transportadores específicos (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). O fato do floema ser composto por monômeros ou dímeros orgânicos, como a sacarose, faz com que praticamente nenhuma digestão de alimento seja necessária, além da hidrólise de dímeros (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Alguns hemípteros atuais estão adaptados a se alimentar tanto de floema quanto de xilema. Ambas as fontes de alimento são extremamente pobres em aminoácidos e sua absorção parece ser dependente da MPM, pelo mecanismo descrito acima (Terra & Ferreira, 1994; 2012). Outros grupos de Hemiptera se adaptaram secundariamente a uma fonte alimentar composta por polímeros orgânicos (hematofagia, tecidos vegetais, tecidos animais) e, nestes insetos, as MPM foram mantidas ao longo da evolução, passando a atuar de modo análogo ao da membrana peritrófica (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisadores comprovaram a existência de MPM em duas espécies de hemípteros: o hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) (Ferreira et al., 1988) e o sugador de sementes *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) (Silva et al., 1995; 1996). No afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) (Cristofolletti et al., 2003), não há uma MPM clássica como as descritas para as espécies anteriores, mas sim um complexo de

membranas enoveladas ligadas às microvilosidades dos enterócitos. Estas membranas foram chamadas de membranas perimicrovilares modificadas (MPMm) por possuírem características distintas das MPM, visto que suas membranas não recobrem as microvilosidades e não delimitam nenhum compartimento.

Em uma análise realizada com a utilização de técnicas de imunolocalização de α -glicosidase (marcador bioquímico de MPM e MPMm) em *D. peruvianus*, foi sugerido que o complexo luminal de membranas do tipo MPM é originado a partir da membrana interna de vesículas de secreção de dupla membrana, após dois eventos consecutivos de fusão de membranas (Silva et al., 1995). O primeiro evento consiste na fusão da membrana externa das vesículas de dupla membrana com a membrana das microvilosidades. Em seguida, a membrana interna desta mesma vesícula se funde com as MPM (Silva et al., 1995). Estas vesículas são formadas a partir de cisternas trans-Golgi que são envoltas por cisternas adjacentes (Andries & Torpier, 1982; Werner et al., 1991; Silva et al., 1995). A existência da MPM forma uma dupla barreira membranosa que impede o mecanismo exocítico (assim como endocítico) clássico. Um trabalho semelhante foi realizado com o afídeo *A. pisum* e foi possível presumir que, neste caso, as MPMm parecem ser originadas a partir de vesículas de secreção, limitadas por membrana simples e produzidas pelo complexo de Golgi, que são envolvidas por elementos do retículo endoplasmático granular (Cristofolletti et al., 2003). Em ambos os casos o complexo de membranas luminais parece ser um produto da rota intracelular de secreção.

Em um projeto recentemente desenvolvido em nosso laboratório, no qual se estudou o sistema digestivo da mesma espécie de cigarrinha do presente trabalho, *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae), foi descrito um terceiro modelo de organização do complexo luminal de membranas. Neste modelo, membranas associadas às microvilosidades dos enterócitos do intestino médio se projetam em direção ao lúmen, formando compartimentos fechados em um padrão que lembram chamas, sendo, assim, denominadas de membranas luminais em forma de chama (MLC). Este resultado sugere, claramente, que o complexo luminal de membranas em Hemiptera seja muito mais variado em organização do que se presumia inicialmente (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016).

2. A organização morfológica do sistema digestivo de hemípteros das subordens Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha

O sistema digestivo dos insetos integrantes da subordem Auchenorrhyncha apresenta um alto grau de complexidade, sendo bem adaptado ao hábito alimentar de organismos sugadores de seiva de plantas. Anatomicamente, o tubo digestivo destes animais apresenta um padrão geral que pode ser observado em diferentes espécies - particularmente da infraordem Cicadomorpha (Cheung & Purcell, 1993; Tsai & Perrier, 1996; Wiesenborn, 2004) - que pode ser bem ilustrado pelos resultados de morfologia previamente obtidos com a espécie de cigarrinha *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016) e detalhados no presente trabalho. Assim, nos hemípteros desta subordem, o sistema digestivo tem início, em geral, em um longo e delgado tubo, o esôfago, que conecta a boca ao intestino médio. A seiva ingerida é levada até a câmara de filtração, um órgão formado pela aposição das porções anterior e posterior do intestino médio e as regiões proximais dos túbulos de Malpighi. Esta estrutura é composta por um epitélio pouco espesso, com células que possuem especializações voltadas para o transporte de água e íons, como a membrana plasmática apical modificada em microvilosidades e a basal apresentando invaginações associadas à mitocôndrias (Ribeiro et al., 1990). A câmara de filtração realiza o transporte do excesso de água presente na seiva diretamente do início do intestino médio para o intestino posterior, permitindo a concentração dos nutrientes na porção mediana do intestino médio (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974).

O intestino médio segue externamente à câmara e apresenta dois domínios distintos: os domínios cônico (caracterizado por uma região expandida) e tubular (formado por um delgado tubo de que retorna à câmara de filtração) (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Apesar desta distinção anatômica, as células do intestino médio (os enterócitos) possuem poucas diferenças entre si. Os enterócitos também apresentam as adaptações relacionadas ao transporte de água e íons e são responsáveis pelos principais eventos relacionados à digestão e absorção de nutrientes. Estas células possuem um citoplasma extenso, apresentando organelas relacionadas à rota exocítica de substâncias, como retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi (ou dictiossomos) e vesículas de secreção.

A transição para o intestino posterior ocorre no interior da câmara de filtração, em uma estrutura em forma de válvula chamada de piloro, onde ocorre a comunicação entre os epitélios do tubo digestivo com os túbulos de Malpighi (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). O intestino posterior segue livre pela cavidade corporal em direção à região posterior do corpo. Antes de se ligar ao exoesqueleto e formar o ânus, pode-se observar uma pequena dilatação, o reto, ao qual se associam as extremidades distais dos quatro túbulos de Malpighi.

No intestino médio destes insetos, pode ser observado um complexo luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos do tipo membranas luminais em forma de chama (MLC) (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Estas membranas são originadas a partir da vesiculação das extremidades apicais das microvilosidades, que formam vesículas que colapsam à medida que se projetam ao lúmen do intestino (ver esquema abaixo). Experimentos realizados com a aplicação de lantânio, um traçador utilizado em microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou que as MLC delimitam inúmeros compartimentos de acesso aparentemente restrito em relação ao conteúdo luminal.

Os túbulos de Malpighi de algumas espécies da subordem Auchenorrhyncha podem apresentar uma região expandida adaptada para a produção e secreção de

brocossomos (Raikítov, 1995; Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Os brocossomos são estruturas formadas por lipídios e proteínas com formato regular e são liberadas pelos túbulos de Malpighi, sendo enviados ao intestino posterior para a excreção. Após serem eliminados pelo ânus, os brocossomos são coletados pelas pernas traseiras e aplicados sobre o tegumento, impermeabilizando o corpo do inseto.

Com relação aos Sternorrhyncha, são poucos os dados disponíveis na literatura acerca da anatomia do sistema digestivo destes animais. Sua organização geral parece ser mais diversa do que a observada nos Auchenorrhyncha, com espécies que apresentam um tubo digestivo com diferentes níveis de diferenciação anatômica e câmaras de filtração com variados níveis de complexidade (Ponsen, 1979; 1990; 1991; Douglas, 2003; Cicero et al., 2009; Shakesby et al., 2009). Deste modo, o estudo da organização do sistema digestivo de espécies da subordem Sternorrhyncha é de grande valia para este trabalho.

A organização morfológica do sistema digestivo descrita em *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016) serviu como base para um estudo morfológico comparativo em outras espécies de hemípteros, assim como referência principal para uma análise funcional de fisiologia molecular do presente trabalho.

FISIOLOGIA MOLECULAR DA DIGESTÃO EM INSETOS

Neste século, as abordagens metodológicas na pesquisa na Biologia e na Medicina foram revolucionadas pelo desenvolvimento dos projetos genoma (Collins et al., 1998). O sequenciamento total do genoma humano e de outras espécies e a disponibilidade de bibliotecas de cDNA tornou possível um novo enfoque para pesquisa em Genética, chamada de Genômica Funcional, que consiste na interpretação das sequências de DNA e suas funções em uma escala genômica. Tais estudos se baseiam na caracterização molecular, em larga escala, de transcritos (RNAs) e suas respectivas proteínas caracterizam esta nova área de estudo. De modo análogo à origem do termo “genoma”, que corresponde ao conjunto completo dos genes (DNA) de um organismo, criou-se o termo transcriptoma, que representa a totalidade de transcritos (RNA) de uma espécie (Wang et al., 2009). Atualmente, os

recursos metodológicos que possibilitam os estudos do transcriptoma estão sendo padronizados com sucesso. Dentre as técnicas, o primeiro recurso disponível foram as bibliotecas de DNA complementares (cDNA), que correspondem a um conjunto de clones (fagos ou plasmídeos) que abrigam cópias de todos os RNAs mensageiros de uma linhagem celular ou órgão na forma de cDNA (http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio06/6_e.pdf, visualizado em 19/05/2016).

Desde as primeiras publicações sobre o genoma humano (Venter et al., 2001), a capacidade de produção de dados genômicos tem crescido exponencialmente, guiados principalmente pelo desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, os chamados “sequenciadores de nova geração”. Atualmente, existem uma grande diversidade destas tecnologias disponíveis no mercado voltadas para o sequenciamento de DNA em larga escala, diferindo entre si quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados, à precisão das bases nitrogenadas lidas, à tecnologia de operação, ao tamanho do fragmento gerado por leitura e ao custo operacional. De modo geral, a escolha da tecnologia é baseada principalmente no suprimento dos dados necessários para a abordagem experimental (Maclean et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, o transcriptoma pode ser definido como sendo o conjunto completo de transcritos de uma célula em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica (Wang et al., 2009), incluindo RNAs codificantes (mRNA) e não codificantes (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório e outros tipos). Desde os primórdios da Biologia Molecular, diversos estudos vêm sendo realizados na tentativa de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição das células (Seshasayee et al., 2006), de modo que a alteração nos níveis de expressão está diretamente relacionada às modificações na fisiologia, metabolismo e, conseqüentemente, ao processo de adaptação celular (Van Vilet, 2010).

Os recentes avanços das tecnologias de sequenciamento de DNA tem possibilitado uma revolução nos mais diversos contextos das ciências biológicas, em especial àqueles aplicados à transcriptômica. As plataformas atuais de sequenciamento em larga escala vêm sendo empregadas na área da fisiologia intestinal de insetos com o objetivo de compreender melhor a ampla diversidade dos tipos de ordens de insetos e especializações de seu sistema digestivo, visando encontrar as principais características da expressão gênica e componentes chave do

intestino médio de insetos responsáveis pelos fenômenos fundamentais do processo digestivo.

1. Proteínas de relevância funcional para o processo digestivo nos insetos

A identificação e caracterização molecular de proteínas transportadoras e enzimáticas no sistema digestivo são fundamentais para uma compreensão mais abrangente do fenômeno da digestão. Neste particular torna-se importante salientar algumas das principais categorias de transportadores e enzimas digestivas, e de outras proteínas que não se enquadram nessas duas categorias, que foram selecionadas para estudo devido a sua importância para o fenômeno da digestão nos insetos.

1.1. Transportadores de membrana celular

O transporte de substâncias através da membrana celular pode ocorrer por dois mecanismos básicos: o transporte passivo (ou difusão) ou o transporte ativo. O primeiro processo acontece a favor de um gradiente de concentração (de um meio mais concentrado para um menos concentrado) e, portanto, não há gasto de energia. A difusão pode ser simples ou facilitada, quando uma proteína transportadora integrante de membrana (permease) assiste a passagem da substância. O transporte ativo, por outro lado, realiza o transporte contra o gradiente de concentração em combinação com uma proteína transportadora que transfere energia para a substância transportada (Alberts et al., 2015).

As proteínas de transporte de membrana são proteínas integrantes que possibilitam o transporte de moléculas essenciais para a sobrevivência da célula, tais como água, glicose, aminoácidos, íons diversos, entre outros, e a eliminação de produtos do metabolismo celular que não serão mais necessários.

As membranas celulares apresentam permeabilidade seletiva. De modo geral, moléculas lipossolúveis, como gases (O_2 , N_2 , CO_2) e álcoois são capazes de se difundir com maior facilidade pela membrana celular. Por outro lado, moléculas polares ou carregadas são praticamente incapazes de atravessar a membrana sem o auxílio de uma proteína transportadora.

Em geral, os transportadores de membrana apresentam especificidade quanto aos tipos de íons ou moléculas a serem transportadas. Eles atuam na manutenção da homeostase celular, mantendo as diferenças entre o meio intra e extracelular. O interior da célula exibe altas concentrações de íons potássio, magnésio e fosfato. Já o meio extracelular possui altas concentrações de íons cloreto, sódio e bicarbonato, além de nutrientes para as células, como oxigênio, glicose, ácidos graxos e aminoácidos.

a) Transportadores de aminoácidos

Os transportadores de aminoácidos realizam o transporte destas moléculas através da membrana plasmática, regulando o fluxo destes nutrientes entre o meio extra e intracelular. Os principais critérios utilizados para classificar os transportadores de aminoácidos são: o tipo de aminoácido (ácido, básicos e diferentes características da cadeia lateral) e as propriedades termodinâmicas do transporte (se é equilibrativo ou contracorrente) (Palacín et al., 1998).

Os transportadores de aminoácidos estão agrupados em seis grandes categorias, das quais se destaca o cotransportador de aminoácidos com íons H^+ .

b) Transportadores de açúcar

A absorção de glicose no sistema digestivo de mamíferos é realizada por duas classes de transportadores distintos: o transportador facilitativo ou uniportador (GLUT2) e o cotransportador ou simportador Na^+ /glicose (SGLT1). O uniportador é encontrado na membrana basal e o simportador pode ser observado na membrana apical dos enterócitos (Hediger et al., 1987; Takata, 1996; Kellett, 2001 e Giordana et al., 2003). Estes transportadores apresentam entre 10 e 14 alças transmembranas e um sítio de ligação para cátions em sua porção N-terminal (Wright, 2001).

A família GLUT de transportadores de glicose é formada por 14 genes humanos que podem ser divididos em três subfamílias de acordo com a similaridade da sequência. Os GLUT1 são expressos em eritrócitos e os GLUT2 são produzidos na membrana basolateral dos enterócitos (Scheepers et al., 2004; Kellett et al., 2008). Quando ocorre o aumento da concentração de glicose sanguínea após uma refeição, o GLUT2, localizado na membrana de endossomos à base das microvilosidades, é

inserido na membrana apical do enterócito (Kellett et al., 2008). A família SGLT agrupa 11 diferentes genes humanos que são expressos em todos os tecidos. O SGLT1 pode ser observado no intestino e atua no transporte de glicose ou galactose juntamente com Na^+ e água (Wright, 2001; Wright & Turk, 2004; Scheepers et al., 2004).

A absorção de glicose pelo intestino médio de insetos é estudada há mais de 50 anos (Treherne, 1957; 1958; Crailsheim, 1988; Turunen & Crailsheim, 1996). Estudos mais recentes demonstraram a participação de GLUTs na epiderme (Giordana et al., 2003) e no intestino médio de insetos (Pascual et al., 2006; Caccia et al., 2007; Bifano et al., 2010). Análises moleculares evidenciaram que os GLUTs de insetos são semelhantes aos GLUT1 de mamíferos (Escher & Rasmuson-Lestander, 1999; Chen et al., 2006; Price et al., 2007a). Além disso, foi demonstrado a presença de SGLT1 e GLUT2 no intestino médio de *Aphidius ervi* (Hymenoptera) (Caccia et al., 2007) e de SGLTs e GLUTs em enterócitos de *Dysdercus peruvianus* (Bifano et al., 2010).

c) V-ATPase

As V-ATPases vacuolares são responsáveis pela acidificação de compartimentos celulares de células eucarióticas, como as organelas relacionadas à rota endocítica (Alberts et al., 2015). Este processo resulta na dissociação de ligantes de seus receptores de membrana no lúmen dos endossomos iniciais, permitindo a degradação dos ligantes (como, por exemplo, partículas de LDL – “low density lipoproteins”) e a reciclagem dos receptores de volta à membrana plasmática. Um fenômeno semelhante ocorre na liberação de hidrolases lisossômicas dos receptores de manose-6-fosfato no endossomo tardio, recém sintetizadas na rede *trans* Golgi (Creek & Sly, 1984; Alberts et al., 2015). As V-ATPases também foram descritas na membrana plasmática, atuando em processos como a acidificação renal, reabsorção óssea, manutenção do pH citoplasmática e transporte de K^+ no intestino médio de insetos (Stevens & Forgac, 1997).

As V-ATPases também podem atuar em tipos celulares especializados, como, por exemplo, nos ductos coletores dos rins de mamíferos, onde ocorre o transporte ativo de prótons. A reabsorção da matriz óssea por osteoclastos ocorre por uma queda

de pH local gerada pela atividade de V-ATPases, que, além de solubilizar a matriz, também ativam enzimas digestivas (Blair et al., 1989).

As V-ATPases em epitélios intestinais de insetos atuam na geração de um potencial de membrana acoplado a um antiporte de H^+/K^+ , que transporta íons K^+ para o lúmen intestinal (Harvey et al., 1983; Wiczorek et al., 2009). Quando transportadores aniônicos estão ausentes em membranas ricas em V-ATPases, a acidificação é consideravelmente reduzida. Neste caso, a ação das V-ATPases gera um potencial eletroquímico com pequena variação de pH, que possibilita a ação de transportadores ativos como antiportes $nH^+/cátion$ ou simportes $nH^+/oligopeptídeo$ (Beyenbach & Wiczorek, 2006).

As V-ATPases são compostas por dois complexos proteicos. O domínio periférico V1 é responsável pela hidrólise do ATP e o domínio associado à membrana V0 realiza a translocação do próton (Stevens & Forgac, 1997). Segundo convenção, as subunidades do complexo V1 são representadas por letras maiúsculas, enquanto as subunidades de V0. O complexo V1 é formado por três domínios: um globular em anel formado por três subunidades A e B alternadas; um centro rotacional alongado formado por cópias únicas das subunidades D e F; e uma região periférica composta pelas subunidades C, E, G e H. O complexo V0 consiste de seis ou mais subunidades c, que forma uma estrutura em forma de anel. De acordo com o modelo funcional mais aceito atualmente (Beyenbach & Wiczorek, 2006), as subunidades D, F e o anel de subunidades c formam um rotor móvel, enquanto que as demais compõem a região estática da V-ATPase.

Nos metazoários, diferentes isoformas das subunidades de V-ATPase apresentam expressão específica de acordo com os tipos celulares ou tecidos específicos. Nos mamíferos, são observadas diferentes isoformas em rins, ouvido interno, cérebro, osteoclastos, células alveolares e no acrossomo (Beyenbach & Wiczorek, 2006), bem como diferentes níveis de expressão em diferentes tecidos (Murata et al., 2002; Nishi et al., 2003).

Em insetos, podem ser observadas V-ATPases no domínio apical das células de praticamente todos os epitélios e são responsáveis por promoverem o transporte ativo secundário de substâncias (Wiczorek et al., 2009). Em *Drosophila*, a V-ATPase é codificada por 33 genes diferentes (incluindo as subunidades e as proteínas acessórias). Aparentemente, há apenas uma holoenzima de membrana plasmática em

Drosophila, que consiste em uma única isoenzima formada por subunidades de genes bem definidos (Allan et al., 2005).

d) Aquaporinas

As aquaporinas são canais que realizam o transporte de água de acordo com o gradiente de concentração osmótica através da membrana. Em geral, estes gradientes são estabelecidos por uma força motriz de Na^+ e/ou H^+ (Beyenbach, 2003; Harvey et al., 2010). A descoberta das aquaporinas forneceram informações importantes em nível molecular sobre a fisiologia da regulação do balanço hídrica nos organismos (Agre, 2006; Verkman, 2005; 2009).

As aquaporinas são consideradas como principais agentes no transporte de água em epitélios de insetos (Kikawada et al., 2008; Kataoka et al., 2009 a; b; Shakesby et al., 2009; Drake et al., 2010; Goto et al., 2011, Liu et al., 2011; Matthew et al., 2011; Phillip et al., 2011). Atualmente, as aquaporinas compreendem transportadores específicos de água, ou aquaporinas ortodoxas, e aqueles que também realizam o transporte de solutos não polares (como glicerol e ureia), que são chamadas de aquagliceroporinas. De modo geral, as aquaporinas descritas em insetos são as aquaporinas ortodoxas, específicas para a água. Entretanto, estudos recentes indicam a presença de aquagliceroporinas no intestino posterior de insetos (Kataoka et al., 2009a; b).

e) Transportador de amônia/amônio

Apesar dos avanços significativos nos estudos sobre a estrutura destes transportadores nos últimos anos, ainda não há consenso sobre o substrato transportado, se amônia (NH_3) ou sua forma protonada, amônio (NH_4^+) (Andrade & Einsle, 2007).

Os transportadores de amônia(o) são conhecidos como proteínas Rh (Rhesus) e foram identificadas em mamíferos como membros da superfamília Amt/Mep (transportador de amônia(o)/metilamônia(o) permease) pela homologia entre a estrutura primária das proteínas Rh com Amt/Mep de bactérias, Archaea, fungos e plantas (Marini et al., 1997). Nos seres humanos, a família das proteínas Rh é composta por cinco membros, sendo três delas relacionadas aos eritrócitos (RhCE,

RhD e RhAG) e os outros dois (RhBG e RhCG) descritos em diversos outros tecidos. Os transportadores RhBG e RhCG realizam o transporte de amônio pela membrana de maneira rápida, bidirecional e com baixo custo energético (Zidi-Yahoui et al., 2005).

Nos insetos, os transportadores de amônia(o) foram caracterizados em *Aedes albopictus*, cuja expressão ocorre em diferentes tecidos (Wu et al., 2010). Em animais em jejum, os maiores níveis de expressão destes transportadores é observado na cabeça e túbulos de Malpighi. Em fêmeas alimentadas com sangue, ocorre aumento dos níveis de mRNA destes transportadores no corpo gorduroso, intestino médio e túbulos de Malpighi. Este padrão de expressão estaria relacionado ao papel fisiológico do transportador de amônio no intestino médio de *A. albopictus*, que teria a função de eliminar os resultados da desaminação oxidativa dos aminoácidos provenientes da alimentação.

f) Transportadores de fosfato inorgânico e sódio

Os transportadores de fosfato inorgânico e sódio são membros de duas famílias de transportadores de solutos, SLC34 e SLC20, e são responsáveis pelo simporte de fosfato inorgânico (Pi) acoplado ao transporte de Na^+ em uma grande variedade de condições fisiológicas (Forster et al., 2013).

Os transportadores da família SLC34 foram extensamente estudados, principalmente quanto ao seu papel na homeostase de mamíferos (Forster et al., 2013). Trata-se de uma classe de proteínas de membrana que não apresentam homologia com as principais famílias. A estrutura primária das diferentes isoformas pode variar de 599 a 640 aminoácidos, quer variam principalmente nas regiões N e C-terminal. As formas eucarióticas possuem cerca de 12 alças transmembranas (Forster et al., 2002; 2006; 2011; Virkki et al., 2007). Estes transportadores podem ser observados, principalmente, nos túbulos renais proximais, onde estão comprometidos com a reabsorção de Pi da urina primária (Custer et al., 1994; Segawa et al., 2002), ou nas microvilosidades intestinais, especialmente no íleo, onde atuam na reabsorção de Pi a partir do bolo fecal (Radanovic et al., 2005).

As proteínas da família SLC20 são pouco estudadas e dados sobre sua estrutura, função e distribuição ainda são escassos (Forster et al., 2013). Os produtos do gene SLC20 são membros de uma família de proteínas que pode ser observada em todos os filos (Virkki et al., 2007; Bottger & Pedersen, 2011). Existem poucos

trabalhos publicados acerca da estrutura destas proteínas e análises baseadas em previsões por bioinformática sugerem que estas proteínas apresentem cerca de 12 alças transmembranas (Salaun et al., 2001; Farrell et al., 2009; Bottger & Pedersen, 2011). Análises realizadas sobre a expressão das proteínas de SLC20 indicam que estes transportadores assumem uma função de “housekeeping” por todo o organismo, mas estudos mais recentes sugerem que elas podem estar relacionadas a funções mais diversas. No entanto, a participação relativa destas proteínas nos tecidos, tais como nos rins e no sistema digestivo, ainda é desconhecida (Forster et al., 2013).

g) Transportador de sódio/H⁺

Os transportadores de sódio/H⁺ são integrantes da diversa família SLC9 de transportadores de solutos, que são um subgrupo da superfamília de antiportes de próton e cátions monovalentes encontrados em organismos procariotos e eucariotos (Orlowski & Grinstein, 2004; Brett et al., 2005). Esta grande família de antiportes está envolvida na homeostase de pH entre o citossol e organelas celulares e também é considerada como principal responsável pela absorção de sódio nos rins e no trato gastrointestinal (Donowitz et al., 2013). Além disso, estes genes também estão associados a uma série de patologias humanas.

Todos os membros da família SLC9 apresentam uma estrutura semelhante, com uma cadeia polipeptídica que possui uma extremidade N-terminal com aproximadamente 450 aminoácidos formando 11 ou 12 alças transmembranas e uma cauda C-terminal intracelular, que varia de cerca de 125 a 440 aminoácidos (Donowitz et al., 2009).

Estes transportadores são ativados por uma acidificação do citossol, resultado do metabolismo celular normal, e catalisam a troca eletricamente neutra de uma molécula de sódio extracelular com um próton intracelular. Este transporte não consome energia metabólica, apesar de ser dependente de sódio extracelular e ATP (Aharonovitz et al., 2000; Orlowski & Grinstein, 2004).

h) Transportadores de cloreto/ H⁺

Os transportadores de cloreto/H⁺ são integrantes da família CIC, composta por canais de cloreto e antiportes cloreto/H⁺. Estes transportadores podem ser encontrados

nas membranas plasmáticas ou de compartimentos intracelulares desde bactérias, até humanos e atuam em uma grande variedade de processo fisiológicos, como o controle do potencial de repouso em células musculares, o transporte de sais através do epitélio e a acidificação de compartimentos intracelulares (Dutzler, 2006; 2007).

Estes transportadores são formados por uma organização estrutural bastante conservada que consiste em um domínio catalítico transmembrana e, em geral, um domínio citoplasmático regulador (Dutzler, 2006; 2007). Eles são formados por duas subunidades idênticas que se associam para formar o poro, cada uma com nove alças transmembranas.

1.2. Enzimas digestivas

A digestão é um processo no qual as moléculas do alimento são quebradas em moléculas menores para que sejam absorvidas pelo epitélio intestinal. Este fenômeno é controlado por enzimas digestivas e dependente de sua localização ao longo do tubo digestivo (Terra & Ferreira, 2012).

Considerando-se que a espécie aqui estudada (*B. xanthophis*), do ponto de vista fisiomolecular, é um organismo sugador de xilema, que constitui um alimento muito restrito em termos nutricionais, o foco deste trabalho recaiu na identificação e distribuição das seguintes enzimas digestivas:

a) α -glicosidases

As α -glicosidases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de ligações α -1,4-glicosídicas de resíduos de monossacarídeos pelo terminal não redutor de aril ou alquil-glicosídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos. Estas proteínas são classificadas em quatro famílias de acordo com sua similaridade de suas sequências (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993). As α -glicosidases de insetos são solúveis e podem ser observadas no lúmen do intestino (Santos & Terra, 1986; Terra & Ferreira, 2012), aprisionadas no glicocálix dos enterócitos (Schumaker et al., 1993), ligadas a membranas das microvilosidades (Terra & Ferreira, 1994; 2012) ou ao complexo luminal de membranas (Silva & Terra, 1995; Cristofolletti et al., 2003). A α -glicosidase de *Acyrtosiphon pisum* tem importante papel no processo digestivo

deste animal, que se alimenta de floema das plantas (rica em sacarose) (Cristofolletti et al., 2003). Neste caso, ocorre uma reação de transglicosilação, na qual a sacarose é hidrolisada em frutose e glicose, que são rapidamente utilizados na síntese de oligossacarídeos, levando à uma redução na osmolaridade (Rhodes et al., 1997; Cristofolletti et al., 2003; Douglas, 2003).

b) Catepsinas

As catepsinas são proteinases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas de proteínas em pH ácido (Dunn et al., 1986; Terra & Ferreira, 2012).

A catepsina D é uma enzima tipicamente lisossômica, com pH ótimo entre 3,5 e 5,0 (dependendo do substrato e condições de ensaio) e foi isolada inicialmente do baço bovino (Press et al., 1960; De Duve, 2005). Esta enzima atua preferencialmente sobre aminoácidos hidrofóbicos na ligação a ser hidrolisada da cadeia polipeptídica, atuando de modo semelhante a pepsina.

Cerca de 10% das proteínas lisossômicas solúveis de fígado de rato são catepsinas D. Esta enzima é codificada por apenas um gene em humanos e ratos e é expressa de maneira constitutiva na maioria das células, sendo encontrada em praticamente todos os tecidos. Além da atividade lisossômica, há evidências de catepsinas D secretada em alguns insetos (Padilha et al., 2009; Balczun et al., 2012).

As catepsinas B e L são proteinases encontradas no sistema digestivo de insetos, mas apenas a última é considerada quantitativamente relevantes no intestino médio de insetos (Terra & Ferreira, 2012). Estas proteinases foram descritas nas ordens Coleoptera e Hemiptera. Apesar das catepsinas L serem observadas principalmente no interior de lisossomos (Barret et al., 1998), em algumas espécies elas são encontradas no lúmen do intestino e são, portanto consideradas digestivas. Em *A. pisum*, estas proteinases estão ligadas às membranas dos enterócitos (Cristofolletti et al., 2003), mas elas são solúveis nos coleópteros *Diabrotica vigifera* (Koiwa et al., 2000) e *Tenebrio molitor* (Cristofolletti et al., 2005).

c) Aminopeptidases

As aminopeptidases são uma família de exopeptidases, ou seja, elas agem sobre os aminoácidos terminais do peptídeo, liberando, como produto, um aminoácido

ou dipeptídeo. As aminopeptidases de insetos são, geralmente, solúveis nos grupos considerados mais basais e ligados à membrana das microvilosidades em insetos derivados (Terra & Ferreira, 2012). Nos insetos, a atividade da aminopeptidase N está relacionada à clivagem do aminoácido N-terminal de peptídeos, liberando-o para o cotransporte através da membrana das células epiteliais (Adang, 2004). Aminopeptidases purificadas de *Tenebrio molitor* e *Acyrtosiphon pisum* são capazes de atuar sobre diferentes tipos de aminoácidos N-terminais, com exceção de aminoácidos ácidos. Estas enzimas apresentam preferência na hidrólise de tripeptídeos (ou tetrapeptídeos em *T. molitor*) a di e pentapeptídeos (Cristofolletti & Terra, 1999; Cristofolletti et al., 2003).

As aminopeptidases N de Lepidoptera possui grande importância econômica, sendo amplamente estudada para o controle de pragas. Estas enzimas se ligam à toxina inseticida Cry1 da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que se insere na membrana plasmática dos enterócitos e forma um poro, causando extenso dano e capaz de matar o inseto (Sangdala et al., 1994).

Dentre os Hemiptera, o afídeo *A. pisum* apresenta atividade de aminopeptidase associada às membranas lamelares (homólogas às membranas microvilares) (Cristofolletti et al., 2003). Nos heterópteros *Dysdercus peruvianus* e *Rhodnius prolixus*, a aminopeptidase é observada na forma solúvel e sua atividade foi detectada no espaço perimicrovilar (Silva et al., 1996; Ferreira et al., 1988).

d) Quimotripsinas

As quimotripsinas são uma categoria de proteinases que atuam preferencialmente sobre o lado carboxil de aminoácidos aromáticos (Terra & Ferreira, 2012). Elas ocorrem em todos os insetos, com exceção dos Hemiptera, embora a ocorrência de quimotripsinas tenha sido observada em glândulas salivares de heterópteros (Colebatch et al., 2002).

As quimotripsinas de insetos e mamíferos apresentam algumas diferenças fundamentais. Em insetos, estas enzimas atuam em pH mais alto, apresentam sítios ativos mais extensos e atuam sobre substratos maiores (Terra & Ferreira, 2012).

1.3. Outras proteínas

Além das proteínas transportadoras e enzimas digestivas, outras proteínas de importância para o processo digestivo foram identificadas no transcriptoma do sistema digestivo de *B. xanthophis*, destacando-se:

a) Proteínas ligantes de ácidos graxos

As proteínas ligantes de ácidos graxos ou *fatty-acid binding proteins* (FABP) são chaperonas intracelulares que se associam a lipídios aumentando sua solubilidade em meio aquoso, facilitando o seu transporte pelo organismo (Chmurzynska, 2006; Furuhashi & Hotamisligil, 2008). As FABPs coordenam atividades relacionadas aos ácidos graxos nas células e estão intimamente ligadas a reações metabólicas e inflamatórias (Zimmerman & Veerkamp, 2002; Haunerland & Spener, 2004).

As FABPs são encontrados em diversos tecidos animais, incluindo o epitélio intestinal, e apresentam maior nível de expressão em tecidos relacionados ao metabolismo de lipídios (Furuhashi & Hotamisligil, 2008).

b) Anidrase carbônica

A anidrase carbônica é uma enzima encontrada em praticamente todos os tecidos e tipos celulares, em diversas organelas celulares e organismos que vão desde bactérias até mamíferos (Maren, 1967; Bauer et al., 1980; Henry, 1984; 1988; 1996; Hewett-Emmett et al., 1984; Tashian & Hewett-Emmett, 1984; Dodgson et al., 1991; Hewett-Emmett & Tashian, 1991; Walsh & Henry, 1991). Ela catalisa a reação reversível que combina CO_2 e H_2O formando HCO_3^- e H^+ .

A anidrase carbônica está relacionada com uma série de processos fisiológicos, que incluem, principalmente, a respiração (transporte de CO_2 e sua excreção) e transporte de íons (Henry, 1996). No mosquito *Anopheles gambiae*, a anidrase carbônica atua na regulação do pH do intestino médio (Linser et al., 2009).

O PROJETO

Este projeto está inserido em uma perspectiva mais abrangente de estudo do sistema digestivo de insetos, no qual espécies representativas das diferentes ordens são estudadas numa perspectiva evolutiva. Informações de natureza morfológica estão sendo integradas a dados bioquímicos e moleculares de caracterização e distribuição de enzimas digestivas e de proteínas transportadoras de membrana. Assim, um estudo do sistema digestivo de insetos representantes da ordem Hemiptera reveste-se de um grande interesse, dada sua importância econômica e a escassez de trabalhos acerca de sua morfofisiologia digestiva. Na literatura especializada, é possível encontrar alguns trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisadores com este enfoque. O primeiro deles, como já mencionado, foi executado por Ferreira et al. (1988) com o percevejo hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), da subordem Heteroptera. Posteriormente, outro heteróptero foi estudado, o *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), que se alimenta de fluidos de sementes de algodão (Silva et al., 1995). Uma terceira espécie analisada foi o afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), subordem Sternorrhyncha, inseto sugador de floema de plantas de ervilha (Cristofolletti et al., 2003). Por fim, mais recentemente, foi analisada a cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae), subordem Auchenorrhyncha, que se alimenta de xilema de citros e gramíneas (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016).

Neste contexto, um estudo comparativo de caráter morfológico e molecular se mostra importante no sentido de se conhecer melhor a organização e a diversidade de fenômenos digestivos dentro da ordem Hemiptera, comparando e adicionando informações àquelas já obtidas em *R. prolixus*, *D. peruvianus*, *A. pisum* e *B. xanthophis*.

OBJETIVOS

1. Realizar um estudo comparativo de morfologia ultraestrutural do sistema digestivo de espécies representativas da ordem Hemiptera, com foco nas subordens Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha, visando estabelecer uma relação entre a filogenia destes grupos, os hábitos alimentares das espécies escolhidas e a organização do complexo luminal de membranas.

2. Efetuar uma análise molecular da fisiologia da digestão nos Hemiptera utilizando a espécie sugadora de xilema, *Bucephalogonia xanthophis*, como modelo de estudo.

a) Verificar a presença de α -glicosidase no sistema digestivo de *B. xanthophis*, importante marcador do complexo luminal de membranas em espécies das subordens Heteroptera e Sternorrhyncha.

b) Identificar outras proteínas com funções importantes para o processo digestivo, como as envolvidas no tamponamento luminal, na digestão e absorção de nutrientes e no transporte de íons.

c) Averiguar os sítios de expressão das proteínas identificadas nas diferentes regiões do sistema digestivo de *B. xanthophis*, com o intuito de propor um modelo de organização funcional de digestão para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Neste trabalho, foram utilizados indivíduos adultos de ambos os sexos das seguintes espécies:

Ordem Hemiptera

Subordem Auchenorrhyncha

Infraordem Cicadomorpha

Superfamília Membracoidea

Família Cicadellidae

Espécie *Bucephalogonia xanthophis*

Espécie *Macugonalia leucomelas*

Espécie *Dalbulus maidis*

Superfamília Cercopoidea

Família Cercopidae

Espécie *Mahanarva fimbriolata*

Superfamília Cicadoidea

Família Cicadidae

Espécie *Quesada gigas*

Subordem Sternorrhyncha

Superfamília Psylloidea

Família Psyllidae

Espécie *Diaphorina citri*

A espécie *Q. gigas* foram coletadas na região de Jaboticabal...

MÉTODOS

Os insetos foram anestesiados em gelo e dissecados para o isolamento do sistema digestivo, utilizando, para isso, pinças oftalmológicas de ponta fina e alfinetes entomológicos. Os animais foram dissecados sob microscópio estereoscópico Zeiss Stemi-2000C. Os espécimes destinados às análises morfológicas foram processados

em solução fixadora adequada para a máxima preservação de suas estruturas celulares. Os insetos reservados aos estudos moleculares (apenas da espécie *B. xanthophis*) foram dissecados em solução salina de NaCl 0,1 M preparada com água DEPC (dietilpirocarbonato) (Ausbel et al., 1997).

1. Microscopia eletrônica de transmissão

A utilização de um bom fixador em estudos de morfologia de materiais biológicos é fundamental para preservação de suas estruturas, permitindo a obtenção de resultados de boa qualidade. Para tanto, foi adotado o procedimento de uso mais comum em nosso laboratório, que consiste na utilização de uma solução de fixação de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. O sistema digestivo é submetido a esta solução por duas horas, a 4 °C. Após este período, os tecidos foram lavados por três vezes em tampão cacodilato 0,1 M com sacarose 0,2 M. Os tecidos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por uma hora a 4 °C, seguido por três lavagens em solução salina de NaCl 0,1 M, também a 4 °C.

Após a fixação, os materiais foram submetidos a uma contrastação em bloco (“en bloc” staining), com solução aquosa de acetato de uranila 1% por um período de 18 h a 4 °C.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma sequência de banhos sucessivos em soluções de concentrações crescentes de etanol (50, 70, 95 e 100%), permanecendo em cada solução por 10 minutos em temperatura ambiente.

Por fim, o material foi emblocado em resina de Spurr (1969). A polimerização da resina foi obtida em estufa a 56 °C por 72 horas.

Os blocos prontos foram cortados em um ultramicrotomo Sorvall MT2-B e os cortes ultrafinos foram recolhidos em telas de cobre de 200 mesh, recobertas previamente com um filme de parlódio e carbono. Em seguida, o material foi contrastado com uma solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963) para melhor visualização no microscópio eletrônico de transmissão.

A observação do material e a obtenção de imagens foi realizada ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM-900, operado a 80 kV.

2. Biologia Molecular

2.1. Extração de RNA

A extração de RNA dos tecidos de *B. xanthophis* foi realizada em um ambiente com o mínimo de contaminações por RNase. Para tanto, o estereomicroscópio utilizado foi inicialmente higienizado com etanol 70%. Além disso, todos os equipamentos utilizados para a manipulação dos tecidos foram tratados previamente em água DEPC (Ausbel et al., 1995) por uma hora a 37 °C. Em seguida, foram autoclavados e permaneceram em estufa a 150 °C por um período mínimo de quatro horas.

O sistema digestivo das cigarrinhas foi subdividido em três regiões: câmara de filtração, domínio cônico do intestino médio e domínio tubular do intestino médio. Em alguns casos, o domínio tubular foi subdividido em três regiões: o domínio tubular anterior, médio e posterior. Além dos tecidos digestivos, foram separados os túbulos de Malpighi e a carcaça (correspondente a todos os demais tecidos do corpo do animal) para a extração de RNA. Estes materiais foram condicionados em tubos “*ependorf*” devidamente identificados e colocados em gelo seco e estocados a -80 °C.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em 10 mL de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies) à temperatura ambiente e transferidas para tubos livres de RNase. Estes tubos foram submetidos a centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* formado foi descartado.

A este sobrenadante foram adicionados 250 µL de isopropanol e 250 µL de solução de precipitação (1,2 M de NaCl e 0,8 M de citrato de sódio em água DEPC 1%). Em seguida, as soluções foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e submetidos a centrifugação a 11.000 rpm por mais 10 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi descartado.

O passo seguinte foi adicionar 500 µL de etanol 75% a estes *pellets*. Estas soluções foram centrifugadas por cinco minutos a 11.000 rpm e os sobrenadantes foram descartados. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Os *pellets* resultantes foram secos em fluxo laminar por três minutos e, em seguida, diluídos em 100 µL de água DEPC 0,1%. Por fim, estas soluções foram incubadas por cinco minutos a 65 °C.

A quantificação deste material foi feita por um espectrofotômetro (uma unidade de absorbância = 40 µg de RNA) pela leitura da absorbância do material em um comprimento de onda de 260 nm. A verificação da pureza e integridade do material extraído foi feita pela razão entre os valores de absorbância obtidos no comprimento de onda de 260 nm e com o obtido em 280 nm.

2.2. Purificação de RNA

Para eliminar a presença de DNA genômico na amostra de RNA extraída dos tecidos de *B. xanthophis*, foi utilizada a enzima TurboTM DNase da empresa Ambion (Applied Biosystems), que digere tanto moléculas de DNA de fita simples, quanto de fita dupla com terminal 5' fosfato.

Foi adicionado 1 µL de TurboTM DNase para cada 10 µL de RNA em tampão apropriado para a ação da enzima. O conjunto da reação foi incubado a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, aquecido a 75 °C por 10 minutos. Por fim, foi adicionado à mistura EDTA em concentração final de 15 mM.

Para remover os fragmentos de DNA clivados no procedimento anterior, foi utilizado o kit RNA Clean Up da empresa Qiagen. Neste procedimento, o RNA se liga a uma coluna pela adição de etanol à mistura e isolando-o do restante da solução. Ao final, o RNA é eluído com água DEPC.

Para se isolar o mRNA do total extraído de *B. xanthophis*, foi utilizado o kit Dynabeads® mRNA. Neste procedimento, é realizada uma cromatografia de afinidade na qual resíduos de oligo (dT)25 se ligam covalentemente da superfície dos Dynabeads. Tais resíduos, por sua vez, se associam às caudas poliA da região 3' dos mRNAs de eucariotos, separando-os do restante de RNA.

2.3. Produção de cDNA

A produção de cDNA a partir do RNA total foi feita com o uso do kit SuperScriptTM (Invitrogen). Neste procedimento, uma transcriptase reversa produz a primeira fita de cDNA a partir do RNA na presença de *primers* aleatórios.

O protocolo se inicia com quantidades iguais de RNA para cada uma das amostras a ser processada, com um mínimo de 0,2 µg. Mistura-se aos RNAs 1 µL de

dNTPmix, 5 µL de hexâmetros aleatórios (utilizados como *primers*) e 10 µL de água DEPC. Estas misturas foram incubadas por cinco minutos a 65° C e, posteriormente, por um minuto em gelo.

Em seguida, foi preparada uma mistura de reação que consiste, para cada reação, de 2 µL de RT Buffer 10X, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL DTT 0,1 M e 1 µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Posteriormente, 9 µL desta mistura de reação foram adicionados aos volumes contendo RNAs e *primers* e as soluções resultantes foram incubadas por dois minutos a 25° C. O próximo passo foi a adição de 1 µL da enzima SuperScript™, uma transcriptase reversa, seguida de incubação por 10 minutos a 25° C. Passada esta etapa, o procedimento tem sequência por nova incubação a 42° C por 50 minutos e, em seguida, por 15 minutos à 70° C. Por fim, as soluções foram submetidas ao gelo e 1 µL de RNase H foi adicionada à cada preparação, para, então, serem incubadas novamente por 20 minutos a 37° C.

2.4. RT-PCR semi-quantitativo

O cDNA obtido dos diferentes tecidos discriminados no item 3.2.2.1. foi utilizado como fita molde para a amplificação das sequências por PCR com *primers* específicos de cada sequência.

A reação de PCR foram montadas da seguinte maneira:

1 µL	cDNA (RT) (amostra)
0,2 µL	<i>primer</i> 1 (100 µM)
0,2 µL	<i>primer</i> 2 (100 µM)
0,25 µL	Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
5 µL	Buffer 10 X
1 µL	dNTP (10 mM)
2 µL	MgCl ₂ (50 mM)
40,35 µL	H ₂ O milliQ

As reações de RT-PCR foram realizadas em ciclos programados em um termociclador conforme especificado abaixo:

30 segundos a 94° C (desnaturação das fitas molde)

30 segundos a 55° C (anelamento dos *primers*)

60 segundos a 72° C (alongamento das fitas filhas)

Amostras de 5 µL foram retiradas após 25 ciclos e 30 ciclos e, em seguida, aplicadas em gel de agarose 0,1% (m/v) em tampão TAE 1X para eletroforese. Cada uma das soluções contendo DNA foram misturadas a um tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30% em água) na proporção de 1:10. Após a eletroforese, o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) para visualização das amostras de DNA.

3. Bioinformática

3.1. Newbler

O Newbler é um programa de montagem de genomas ou transcriptomas desenvolvido especificamente para processar os dados gerados pelo pirosequenciador 454-GS series (Roche) e utiliza como dado de entrada o arquivo binário gerado pelo sequenciador 454, no qual se encontram todas as informações referentes ao pirosequenciamento. Os arquivos de extensão *.sff* obtido, referentes às amostras de cDNA de *B. xanthophis*, foram submetidos à montagem por meio da plataforma gsAssembler do programa Newbler 2.3, fornecido pela Roche 454. O montador se utiliza de sobreposições para a formação de *contigs*, realizando uma comparação direta entre os *flowgrams* (equivalentes aos eletroforetogramas do procedimento Sanger) através do módulo *Overlapper*. O módulo *Unitigger* agrupa as leituras de sequências que possuem sobreposições consistentes em *unitigs*. Cada *unitig* pode ser obtido devido a presença de regiões de repetição no genoma ou por não haver sequência para continuar a extensão. Por fim, o módulo *Multialigner* faz o processo de otimização dos *unitigs* em *contigs*, no qual qualquer problema detectado nas etapas anteriores é corrigido e os *contigs* são estendidos.

Os parâmetros adotados para a realização das análises foram aqueles determinados como padrões pelo software, com valor de sobreposição mínimo de 40 bases e identidade de sobreposição de 90%. Foram realizados vários testes variando estes parâmetros, mas nenhuma modificação significativa no número total de *contigs* gerados foi observada.

3.2. dCAS

Com o intuito de atender as necessidades e facilitar as atividades de pesquisadores, foi desenvolvido um pacote de software chamado de *Desktop System Annotation cDNA* (dCAS), que é usado para executar a limpeza, clustering de montagem e anotação de sequências em larga escala através de um computador desktop (Andersen et al., 2007; Arcà et al., 2007; Assumpção et al., 2008; Guo et al. 2009). O dCAS usa um conceito de fluxo de trabalho que integra diversas etapas de processamento e análise de sequências. Atualmente, há dois fluxos de trabalho disponíveis: Fluxo de Trabalho do Núcleo, concebido para processamento de uma única biblioteca de cDNA, e o Fluxo de Trabalho Biblioteca Compare, que analisa múltiplas bibliotecas de cDNA derivadas de uma mesma amostra biológica sob diferentes condições experimentais. Para uma única biblioteca de cDNA, o fluxo de trabalho retira sequências de vetores de clonagem que possam estar unidos à sequência de interesse através de uma pesquisa dentro do banco de dados UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Fragmentos de sequências são agrupadas usando BLAST (Altschul & Lipman, 1990) e montados em *contigs* utilizando Cap3 (Huang & Madan, 1999). Estes *contigs* são, então, anotados por comparação com bases de dados de sequências especificadas pelos usuários e peptídeos sinal são previstos usando o servidor SignalP (Emanuelsson et al., 2007). Finalmente, os dados analisados são reunidos e compilados em uma planilha com acesso a arquivo de dados gerados em cada etapa da análise.

Para várias bibliotecas, o fluxo de trabalho de comparar bibliotecas constrói *clusters* pela união de sequências complementares entre as diferentes bibliotecas comparadas e anota os *contigs* usando BLAST em vários bancos de dados e no SignalP. Os resultados são compilados em uma planilha que inclui análises estatísticas sobre a diferença de expressão gênica das sequências entre as bibliotecas de cDNA analisadas na comparação.

Grande parte das análises das sequências obtidas através do pirosequenciamento foi realizada pelo dCAS após prévia montagem com o Newbler.

3.3. Curagem das sequências

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos (obtidos por tradução) foram comparadas com outras sequências depositadas em bancos de dados digitais. Para isso, foi realizada uma consulta ao “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), onde foi utilizado o programa de alinhamento de sequências BLAST X. Deste modo, é possível verificar a anotação dos *contigs*, além de diversos outros parâmetros, como o tamanho da proteína traduzida e quadro de leitura da sequência. Após a confirmação de similaridade com a proteína pretendida, a sequência é traduzida usando-se o software Translate do ExPASy Tools (web.expasy.org/translate). Em alguns casos, a sequência apresenta dois quadros de leitura diferentes, evidenciado pela representação gráfica do BLAST X. Este tipo de erro é decorrente do tipo de sequenciamento realizado pelo 454, que apresenta dificuldades em se obter uma resposta linear quando várias bases do mesmo tipo estão lado a lado (Carvalho & Silva, 2010). Neste caso, utiliza-se a sequência de maior semelhança obtida pelo BLAST X como referência para se verificar qual a posição do aminoácido que apresentou o problema e executa-se a correção do quadro de leitura pela adição ou remoção de bases nitrogenadas.

Em alguns casos, podem ser observados *contigs* incompletos que correspondem a segmentos distintos de uma mesma proteína, sendo, portanto, complementares. Neste caso, as sequências são processadas de modo a permitir a junção de diferentes *contigs* em um único mais completo.

Estas sequências devidamente processadas são submetidas a um BLAST P, que as compara com uma proteína já caracterizada e depositada no banco de dados. Deste modo, verifica-se a presença de aminoácidos fundamentais para a função da proteína em questão. Neste caso, foram analisadas as assinaturas características de cada tipo de proteína reconhecidas pelo software NPS@PROSCAN (http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPS/npsa_server.html). Além disso, também foi verificado a presença de alças transmembranas nestas sequências pela utilização do software TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) e os motivos característicos das proteínas de interesse previstos pelo InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

RESULTADOS

ANÁLISES MORFOLÓGICAS

1. *Macugonalia leucomelas*

A espécie *M. leucomelas* é classificada como integrante da família Cicadellidae, superfamília Membracoidea, sendo da mesma família de *B. xanthophis*. Portanto, estes insetos exibem características morfológicas gerais e hábitos alimentares muito semelhantes.

Do ponto de vista anatômico, o sistema digestivo de *M. leucomelas* mostra muitas semelhanças com o observado na espécie *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016) (Figura 1). O intestino anterior de *M. leucomelas* é formado por uma estrutura tubular, o esôfago, que conecta a boca à câmara de filtração e não apresenta diferenciações anatômicas.

O intestino médio tem início no interior da câmara de filtração (CF) (Figura 1). Este órgão consiste na associação de segmentos do intestino médio anterior, do intestino médio posterior e das regiões proximais dos quatro túbulos de Malpighi. Ao sair da câmara, o intestino médio se expande, originando o domínio cônico do intestino médio (DC), cujo epitélio apresenta muitas dobras, resultando no aspecto enrugado desta estrutura (Figura 1). O intestino médio segue como um longo tubo delgado, o domínio tubular (DT). O DT segue livre pela hemocela e conecta o DC à CF. A transição do intestino médio para o posterior é denominada piloro e acontece no interior da CF. Esta região caracteriza-se pela comunicação entre os epitélios dos quatro túbulos de Malpighi com o do sistema digestivo. A partir do piloro, o intestino posterior segue para fora da CF em direção ao ânus, localizado na região posterior do animal. O intestino posterior é observado como um tubo delgado achatado e sua porção terminal, o reto, se mostra como uma estrutura expandida, às quais se associam as extremidades distais dos túbulos de Malpighi.

O intestino médio de *M. leucomelas* é responsável pelos principais eventos do processo digestivo, como os fenômenos de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Terra, 1988; 1990; Ribeiro et al., 1990). Assim, as análises ultraestruturais foram restritas à CF, DC e DT.

A CF é, provavelmente, a estrutura mais característica do sistema digestivo deste inseto. Os tipos celulares que compõem este órgão possuem algumas particularidades marcantes. Aparentemente, ocorre uma convergência do ponto de vista morfofuncional entre as células do intestino médio e dos túbulos de Malpighi presentes no interior da CF. Estas células possuem o citoplasma apical modificado em microvilosidades, citoplasma bastante reduzido, com poucas organelas, invaginações da membrana plasmática basal bem desenvolvidas e associadas a mitocôndrias (Figura 2). O padrão morfológico destas invaginações pode ser utilizado como caráter de distinção entre um tipo celular e outro. As células do intestino médio possuem invaginações tubulares da membrana plasmática basal (Figura 2A), enquanto que nas células dos túbulos de Malpighi elas formam estruturas lamelares (Figura 2B).

Após a CF, o sistema digestivo de *M. leucomelas* segue pelo DC e DT. As células destas regiões, denominadas enterócitos, praticamente não apresentam diferenças morfológicas entre si. Os enterócitos são células epiteliais tipicamente polarizadas, apresentando domínio apical distinto do basal (Junqueira & Carneiro, 2005) (Figura 3). A membrana plasmática apical destas células é modificada em microvilosidades que se projetam para o lúmen do intestino (Figura 3A). Um acúmulo de mitocôndrias é observado no citoplasma apical, próximas à base das microvilosidades. O retículo endoplasmático granular pode ser observado por todo o citoplasma, mas em quantidade moderada e discretas áreas de Golgi também são notadas próximas ao núcleo. Vesículas de secreção podem ser igualmente detectadas, embora pouco frequentes e exibindo conteúdo com aspecto e eletrondensidade variáveis. A membrana plasmática basal destes enterócitos formam invaginações que adentram o citoplasma basal e se associam a mitocôndrias, constituindo uma complexa rede de canais com diversas aberturas para a lâmina basal (Figura 3B).

No lúmen do intestino médio de *M. leucomelas*, observa-se a presença de um complexo luminal de membranas muito semelhante à descrita para a espécie *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Estas membranas, denominadas de membranas luminais em forma de chama (MLC), se associam às extremidades das microvilosidades e avançam pelo lúmen do intestino médio, delimitando regiões com maior eletrondensidade (Figuras 3A, 4). A presença de regiões mais eletrondensas entre as membranas do MLC sugere a ocorrência de espaços luminais de acesso restrito. Eventualmente, podem ser observadas constrições próximas ao ápice das

microvilosidades formando vesículas que, muitas vezes, permanecem ligadas às microvilosidades e entre si por membranas (Figura 4B).

2. *Dalbulus maidis*

A espécie *D. maidis* também é integrante da família Cicadellidae e, portanto, possui estreito parentesco filogenético com as espécies *B. xanthophis* e *M. leucomelas*. Apesar de compartilhar características morfológicas semelhantes (com exceção do seu tamanho reduzido), *D. maidis* difere das outras duas espécies por se alimentar de floema ao invés de xilema.

O sistema digestivo de *D. maidis* segue o mesmo padrão anatômico básico observado em *B. xanthophis* e *M. leucomelas* e que é característico dos insetos integrantes da infraordem Cicadomorpha (Figura 1). O tubo digestivo exibe um intestino anterior como um tubo simples sem modificações que desemboca em uma câmara de filtração, um intestino médio com um domínio cônico e um tubular, retornando à câmara. O intestino posterior se inicia à saída da câmara de filtração, juntamente com os quatro túbulos de Malpighi, seguindo em direção à região posterior do corpo do animal, terminando em uma pequena dilatação, o reto, antes de formar o ânus.

As semelhanças com *B. xanthophis* e *M. leucomelas* segue do ponto de vista ultraestrutural. As células da CF possuem a membrana plasmática apical modificada em microvilosidades e extensas invaginações da membrana plasmática basal associadas a mitocôndrias e com aberturas para a lâmina basal (Figura 5). Na luz dos túbulos de Malpighi podem ser observadas pequenas estruturas de formato geométrico denominadas de brocossomos (Raikitev, 1995; 1999), que correspondem a secreções produzidas por regiões especializadas dos túbulos de Malpighi de espécies da família Cicadellidae. Estruturas semelhantes foram encontradas em *M. leucomelas*, bem como em *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016).

A organização geral dos enterócitos do intestino médio de *D. maidis* mostra características muito semelhantes às observadas nas espécies *B. xanthophis* e *M. leucomelas*, sem diferenças relevantes.

Associado às microvilosidades dos enterócitos, nota-se a presença de um extenso e elaborado MLC (Figura 6), muito semelhante ao descrito em *M. leucomelas*

B. xanthophis (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Nesta região, podem ser observadas muitas vesículas originadas a partir da constrição das microvilosidades (Figura 7) e grande quantidade de membranas associadas, que delimitam regiões de maior eletrondensidade. Entretanto, no caso de *D. maidis*, as vesículas possuem menor diâmetro, são mais numerosas e a arquitetura geral das MLC é menos organizada em relação às descritas em *M. leucomelas* e *B. xanthophis*, de modo que o padrão em forma de chama torna-se menos evidente.

3. *Mahanarva fimbriolata*

A cigarrinha *M. fimbriolata* é uma espécie que se alimenta de xilema e pertence à superfamília Cercopoidea, família Cercopidae, sendo, portanto, mais distante do ponto de vista filogenético das espécies *M. leucomelas* e *D. maidis* (bem como de *B. xanthophis*).

Anatomicamente, o sistema digestivo de *M. fimbriolata* segue o padrão básico observado nas espécies anteriores, mas algumas diferenças devem ser apontadas (Figura 8). A CF é relativamente maior, exibindo uma forma mais alongada do que as observadas nas espécies da família Cicadellidae e se posiciona fora do eixo do DC. Além disso, a CF dos cercopídeos é, de modo geral, anatomicamente mais complexa do que as observadas nos cicadélídeos.

Do ponto de vista ultraestrutural, a CF, o DC e DT de *M. fimbriolata* compartilham de muitas semelhanças com as espécies descritas anteriormente, sem apresentar peculiaridades relevantes. No entanto, no lúmen do intestino médio pode ser observada uma MLC menos desenvolvida associada ao ápice das microvilosidades (Figura 9). De fato, não se observa uma grande abundância de membranas associadas ou a existência de regiões luminais de maior eletrondensidade limitadas pela MLC como descrito nas espécies *M. leucomelas* e *D. maidis*.

4. *Quesada gigas*

A cigarra *Q. gigas* é uma espécie que também se alimenta de xilema e integra a família Cicadidae, superfamília Cicadoidea. Este grupo compartilha um ancestral comum mais próximo com Cercopoidea.

À semelhança das demais espécies estudadas até o momento, o sistema digestivo de *Q. gigas* também possui uma organização anatômica geral que segue o padrão dos integrantes da família Cicadellidae. No entanto, seu sistema digestivo é mais semelhante ao descrito em *M. fimbriolata*, incluindo uma CF relativamente maior e mais complexa em comparação a das espécies da família Cicadellidae.

Do ponto de vista ultraestrutural, o intestino médio de *Q. gigas* também possui características muito similares às descritas anteriormente (Figuras 10, 11 e 12). As invaginações da membrana plasmática basal das células da CF são mais desenvolvidas do que as observadas nos enterócitos. No citoplasma dos enterócitos é, ainda, possível notar a presença de retículo endoplasmático granular desenvolvido e várias áreas de Golgi (Figura 11).

Um complexo luminal de membranas do tipo MLC pode ser observado no lúmen do intestino médio de *Q. gigas*, associado às microvilosidades (Figura 12). Neste caso, a MLC é mais elaborada do que em *M. fimbriolata*, com maior quantidade de membranas associadas que formam regiões de maior eletrondensidade. Entretanto, este complexo luminal de membranas aparenta ser menos desenvolvido do que o observado em espécies da família Cicadellidae.

5. *Diaphorina citri*

A espécie *D. citri* se alimenta de floema e é integrante da família Psyllidae, da subordem Sternorrhyncha. Este inseto apresenta uma relação filogenética próxima aos afídeos, estudados previamente por nossa equipe (Cristofolletti et al., 2003; Silva et al., 2004).

Sob o ponto de vista anatômico, o sistema digestivo de *D. citri* exibe algumas características que diferem das descritas nas espécies anteriores (Figura 13). Assim, verifica-se a ocorrência de uma CF relativamente simples, caracterizada pela ausência de túbulos de Malpighi. O intestino médio também possui dois domínios anatômicos, sendo que, no domínio tubular, nota-se a existência de quatro pequenos apêndices de fundo cego. Como nas demais espécies, o intestino posterior tem início no interior da CF e segue livre pela cavidade corporal em direção ao ânus, apresentando uma pequena dilatação em sua porção final, o reto.

Quanto à ultraestrutura, a CF de *D. citri* exibe algumas peculiaridades relevantes que merecem destaque (Figura 14). Assim, as células da CF possuem um citoplasma mais extenso e rico em retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi, organelas relacionadas à rota secretora. Além disso, é possível diferenciar morfológicamente a região anterior e posterior do intestino médio na CF, de modo que a primeira apresenta células com um citoplasma mais eletrondenso (Figura 14B) quando comparadas às da segunda (Figura 14C). É relevante salientar que na luz do intestino na CF, principalmente na região anterior, observa-se a presença de um complexo luminal de membranas do tipo MPMm. Este é um resultado surpreendente, uma vez que não há descrições na literatura da ocorrência de um complexo luminal de membranas na luz da CF.

O intestino médio de *D. citri*, do ponto de vista da ultraestrutura, apresenta características semelhantes às descritas até o momento. Os enterócitos possuem a membrana plasmática apical modificada em microvilosidades (Figura 15A) e invaginações da membrana plasmática basal com aberturas para a lâmina basal (Figura 15B), mitocôndrias acumuladas no citoplasma apical, próximas à base das microvilosidades, presença de retículo endoplasmático granular, áreas de Golgi e vesículas de secreção em quantidade moderada (Figura 15C). As microvilosidades destes insetos estão organizadas de forma mais compacta, como uma complexa rede de lamelas, que estão ligadas entre si por trabéculas. Associado ao ápice dessas lamelas, nota-se a presença de um complexo luminal de membranas do tipo MPMm que se projetam ao lúmen do intestino.

É interessante evidenciar no citoplasma dos enterócitos a presença de diversas vesículas associadas às áreas de Golgi (Figura 16A). Notam-se, também, vesículas aglomeradas em regiões do citoplasma que podem ou não estar envolvidas por membrana (Figuras 16B e 16C). Estes agrupamentos de vesículas envoltas por membranas, aqui chamadas de grânulos multivesiculares, também estão presentes no citoplasma apical, frequentemente associados à base das lamelas (Figura 16D). Além disso, é possível notar a ocorrência de vesículas de aspecto semelhante ao conteúdo dos grânulos multivesiculares (Figura 16E).

ANÁLISES MOLECULARES

1. Análise geral do pirosequenciamento e montagem dos *contigs*

O sequenciamento de RNA – transcriptoma do intestino médio de *Bucephalagonia xanthophis* – foi realizado a partir da extração de RNA desta região do sistema digestivo, que incluem a CF e os DC e DT. A partir destes transcritos, criou-se uma biblioteca de cDNA que foi utilizada no pirosequenciamento. Este procedimento resultou em um total de 249.695 *reads* (devidamente verificados por todos os filtros e controles de qualidade padrões do procedimento da Roche®). Estes *reads* são resultantes do sequenciamento de 134.999.967 bases e apresentam um tamanho médio de 540,7 pb, variando entre um valor máximo de 1.201 pb e mínimo de 64 pb.

2. Função das proteínas e banco de dados GO (*Gene Ontology*)

Os dados obtidos pelo pirosequenciamento foram submetidos ao programa Newbler, fornecido pela Roche® 454, que reuniu as sequências em 5.927 *contigs* em um arquivo com extensão *.fsa. Este arquivo foi analisado no programa dCAS, no qual foram realizados uma série de *BLAST* em bancos de dados públicos em uma tentativa de identificar as proteínas correspondentes aos *contigs* formados. A análise dos resultados obtidos pelo *BLAST X* realizado com as sequências de *B. xanthophis* mostraram que a espécie com a maior quantidade de melhores correspondências foi *Tribolium castaneum* (Coleoptera). No entanto, quando consideradas apenas as melhores correspondências (“*best hits*”) a espécie que se observa com maior frequência é o fungo unicelular *Vittoria corneae* (Microsporidia). Estes resultados são reflexo da quantidade de sequências disponíveis destas duas espécies depositadas nos bancos de dados, devido à abundância de informações desta natureza pela realização do sequenciamento do genoma e transcriptoma destes organismos (Mittleider et al., 2002; Tribolium Genome Sequence Consortium, 2008; Li et al., 2008). Estes dados estão reunidos em um banco de dados exclusivo desta espécie, o *Beetlebase* (<http://beetlebase.org>).

O banco de dados *Gene Ontology* (GO) é um dos mais utilizados para identificar as sequências. Ele classifica as proteínas em três grandes categorias: componente celular, que compreende as proteínas que são integrantes de uma estrutura maior de uma célula (como complexos moleculares ou organelas); função molecular, que reúne proteínas associadas à atividades que ocorrem ao nível molecular, como catálise ou ligação molecular; e processo biológico, que correspondem a proteínas que participam de séries de eventos moleculares bem definidos e necessários para o funcionamento das atividades dos organismos.

Os 5.927 *contigs* obtidos pelo transcriptoma da biblioteca de cDNA do intestino médio de *B. xanthophis* foram organizados nestas três grandes categorias do GO (Figura 17). Dentre as proteínas classificadas como componentes celulares (Figura 17A), boa parte delas participa da estrutura do núcleo, de elementos do citoplasma, são elementos de membranas e também dos ribossomos. Nesta categoria, podem ser observadas proteínas importantes que participam do processo de secreção celular e também as que formam subunidades estruturais de transportadores de membrana.

As sequências atribuídas à categoria de função molecular (Figura 17B) apresentam funções bastante variadas, das quais podemos destacar as atividades de ligação (a ATP, GTP, íons metálicos, nucleotídeos, DNA, RNA, proteínas) e enzimática (hidrolases, transferases, oxirredutases, peptidase e funções catalíticas). Neste grupo, podem-se destacar as enzimas α -glicosidases, catepsinas e aminopeptidases estudadas neste trabalho. Este perfil de sequências associadas à função molecular foi observado anteriormente em transcriptomas do intestino médio de insetos de outras espécies (Siegfried et al., 2005; Moreira, 2013).

As sequências associadas a processos biológicos (Figura 17C) apresentam uma distribuição bastante ampla entre os termos de GO, incluindo ações fundamentais para o a célula, como a manutenção da homeostase e o metabolismo basal, como transporte de solutos, ciclo de Krebs, fosforilação oxidativa, produção de energia, tradução, proteólise.

3. Sequências de interesse ao processo digestivo identificadas no intestino médio de *B. xanthophis*

As sequências de interesse obtidas pelo transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* podem ser observadas em detalhe na Tabela 1. Estas proteínas podem ser agrupadas em três grandes categorias: transportadores de membrana, enzimas digestivas e outras proteínas de relevância para o processo digestivo.

3.1. Transportadores

A absorção de água, açúcares, aminoácidos e íons é realizada por proteínas integrantes de membrana denominadas transportadores. Eles são classificados nas seguintes categorias: uniportes, que transportam um composto por vez; simportes, que transportam dois compostos simultaneamente e na mesma direção; antiportes, que realizam o transporte de dois compostos em direção oposta; e bombas de íons, que transportam íons por ação de ATPases (Kikuta et al., 2010).

Através da realização de *BLAST* em bancos de dados públicos com as sequências obtidas no pirossequenciamento, foi possível identificar alguns transportadores (Figura 18), dos quais podemos destacar os transportadores de aminoácidos, de açúcar, as V-ATPases, as aquaporinas, os transportadores de amônia/amônio, de fosfato inorgânico e antiportes (que incluem os transportadores de sódio, de sódio/H⁺ e de cloreto/H⁺).

a) Transportadores de aminoácidos

A análise do transcriptoma do tubo digestivo de *B. xanthophis* revelou a existência de 16 *contigs* que possuem similaridade com transportadores de aminoácidos. Estas sequências foram submetidas a um processo de curagem, resultando em nove sequências, que correspondem a diferentes categorias de transportadores de aminoácidos (Tabela 2A).

Dentre estes nove transportadores, os quatro com a maior quantidade de *reads* foram selecionados para a realização de RT-PCRs (H+aaT-1, H+aaT-2, Na0aaT-1 e

aaP-1), para averiguar os sítios de transcrição destes transportadores no tubo digestivo.

Os resultados obtidos sugerem que todos os quatro transportadores de aminoácidos mais expressos no sistema digestivo de *B. xanthophis* são específicos do tubo digestivo (Figura 19A) e, portanto, não são observados nos túbulos de Malpighi (TM) e na carcaça (CC). No entanto, os transportadores HaaT-2 e Na0aaT-1 apresentam um perfil de expressão mais generalista do que os demais, de modo que podem ser encontrados ao longo de todo o intestino médio. Já o transportador HaaT-1 é específico da câmara de filtração (CF) e domínio tubular posterior (DTP) e a permease aaP-1 são expressos no domínio cônico (DC) e no DTP.

b) Transportadores de açúcar

A partir dos dados obtidos do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*, foram encontrados 27 *contigs* referentes a transportadores de açúcares. Após realizada a curagem destas sequências, este número foi reduzido a apenas sete (Tabela 2B).

Com o auxílio de programas de verificação de motivos característicos, todos os transportadores de açúcares foram identificados como GLUT. Estas sequências apresentam cerca de 12 alças transmembranas, além de assinaturas características de GLUTs previstas pelo site NPS@PROSCAN e não foi previsto qualquer peptídeo sinal reconhecido pelo algoritmo do software SignalP.

Os transportadores de açúcar mais expressos são os GLUT-1, 4 e 2. Estes três transportadores tiveram seus sítios de transcrição identificados no tubo digestivo pela realização de um RT-PCR, o que permite um melhor entendimento sobre a localização destes transportadores e o seu papel fisiológico (Figura 19B).

Os três transportadores de açúcar analisados apresentam expressão específica no sistema digestivo de *B. xanthophis*. GLUT-2 e GLUT-4 são encontrados por todo o intestino médio, enquanto que GLUT-1 tem um perfil de expressão mais específico, sendo observado apenas nas regiões do domínio tubular médio (DTM) e DTP.

c) V-ATPase

Os dados obtidos do transcriptoma do sistema digestivo de *B. xanthophis* evidenciaram a presença de 21 *contigs* que se referem a subunidades de V-ATPases. Após curagem, foram obtidas 18 sequências (Tabela 3).

As V-ATPases são formadas pelos complexos V0 e V1. O complexo V0 é responsável pelo transporte de prótons e consiste em seis ou mais subunidades do tipo c, formando uma estrutura em anel. O complexo V1 é formado por uma peça globular, composta por subunidades A e B, um eixo central e estruturas periféricas (Beyenbach & Wieczorek, 2005). Assim, para a determinação dos sítios de transcrição das V-ATPases no tubo digestivo de *B. xanthophis*, foram selecionadas as principais subunidades: V0-c e V1-A (V-ATPaseV0c-1, V-ATPaseV0c-2, V-ATPaseV0c-3, V-ATPaseV1A-1, V-ATPaseV1A-2).

Os resultados obtidos mostram que a única sequência que é transcrita exclusivamente no tubo digestivo é a V-ATPaseV0c-2, podendo ser observado na CF, DC, DTM e DTP (Figura 19C). As demais sequências são transcritas no tubo digestivo e nos TM. No caso de V-ATPaseV0c-1, pode-se observar a expressão também na CC.

Apesar de ter sido encontrada apenas uma sequência referente a V-ATPase exclusiva do sistema digestivo de *B. xanthophis*, ela ocorre por praticamente todo o intestino médio. Além disso, a quantidade de *reads* desta sequência é superior à todas as outras V-ATPases encontradas no transcriptoma, indicando que a V-ATPaseV0c-2 seja intensamente expressa pelo tubo digestivo.

d) Aquaporinas

A partir do transcriptoma do sistema digestivo de *B. xanthophis*, foram identificados 10 *contigs* referentes a aquaporinas. Depois de submetidas à curagem, foram obtidas quatro sequências (Tabela 4A).

As duas aquaporinas com a maior quantidade de *reads* (MIP-1 e MIP-2) foram utilizadas para a realização de RT-PCR, com o objetivo de se verificar os sítios de transcrição destas proteínas no animal (Figura 20A). As duas sequências analisadas não são exclusivas aos tecidos do intestino médio, apresentando um perfil de

expressão bastante geral, que incluem as diferentes regiões do intestino médio (com exceção da região anterior do domínio tubular – DTA), TM e CC.

e) Transportador de amônia/amônio

Foi encontrado apenas um *contig* referente a um transportador de amônia/amônio no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* (Tabela 4B). Os sítios de expressão deste transportador foram verificados realizando reações de RT-PCR (Figura 20B).

Este transportador apresenta um perfil de expressão exclusivo do sistema digestivo, sendo observado em praticamente todas as regiões do intestino médio, apesar da fraca amplificação observada no DTA.

f) Transportador de fosfato inorgânico e sódio

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de 24 *contigs* correspondentes a simportadores de fosfato inorgânico e sódio (PiNa). Após o processo de curagem, foram obtidas 11 sequências referentes a estes transportadores (Tabela 5).

Dentre estas 11 sequências, foram selecionadas a PiNa-1, PiNa-7 e PiNa-8 para a realização de reações de RT-PCR e identificação dos sítios de expressão (Figura 20C), pois tratam-se das sequências que apresentam a maior quantidade de *reads*. Destas sequências, a PiNa-1 não é exclusiva do sistema digestivo, sendo expressa também nos TM. Por outro lado, as sequências PiNa-7 e PiNa-8 são encontradas apenas em algumas regiões do intestino médio. Ambas podem ser observadas nos DC e DTM e a PiNa-8 também é expressa na CF.

g) Transportador de sódio/H⁺

A partir do transcriptoma de *B. xanthophis*, foram identificados três *contigs* referentes ao transportador de sódio/H⁺ (Tabela 6A). Após a curagem destas sequências, a quantidade de sequências foi mantida e a que apresenta a maior quantidade de *reads* foi submetida a reações de RT-PCR para a análise do seu perfil de expressão (Figura 20D).

Analisando o perfil de expressão deste transportador, podemos notar que o antiporte de sódio/H⁺ é encontrado especificamente na CF do intestino de *B. xanthophis*.

h) Transportador de cloreto/H⁺

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de apenas um *contig* correspondente a um transportador de cloreto/H⁺ (Tabela 6B). Os sítios de expressão deste antiporte foram detectados pela realização de um RT-PCR (Figura 20E).

O transportador de cloreto/H⁺ é expresso por todo o intestino médio e não é observado nos TM ou demais tecidos do corpo, sendo, portanto, uma proteína transportadora exclusiva do sistema digestivo.

3.2. Enzimas digestivas

A hidrólise das moléculas orgânicas presentes no alimento ingerido pelo animal é realizada por enzimas digestivas e caracteriza as fases inicial e intermediária do processo digestivo. O resultado final é a liberação de pequenos monômeros ou dímeros orgânicos que podem ser absorvidos pelos enterócitos.

A identificação das principais enzimas digestivas detectadas no pirosequenciamento foi possível através da realização de *BLAST* em bancos de dados públicos. As enzimas mais relevantes para este estudo podem ser observadas na Figura 21.

a) α -glicosidases

A partir do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*, foi possível identificar cinco *contigs* correspondentes à enzima α -glicosidase. Depois de submetidas ao processo de curagem, foram obtidas quatro sequências (Tabela 7A). Destas quatro sequências, aquela que apresenta maior quantidade de *reads* foi selecionada para a identificação dos sítios de expressão no intestino médio através de experimentos de RT-PCR (Figura 22A).

A proteína α -glicosidase é expressa ao longo de todo o intestino médio de *B. xanthophis*, com exceção do DTA. Por se tratar de uma enzima digestiva, espera-se que sua expressão seja exclusiva do intestino médio. Deste modo, não se observa expressão desta proteína nos TM e CC.

b) Catepsinas

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de 15 *contigs* correspondentes a catepsinas. Após serem submentidas a um processo de curagem, foram obtidas 11 sequências (Tabela 7B). As sequências CatD-1, CatL-1 e CatB-2 foram selecionadas para a realização de procedimentos de RT-PCR e identificação dos sítios de expressão (Figura 22B).

As proteínas CatD-1 e CatB-2 são expressas exclusivamente no sistema digestivo e, portanto, não são observadas nos TM ou CC. Enquanto a CatD-1 é observada em quase todo o intestino médio, com exceção da DTA, a CatB-2 é expressa apenas nos DC e DT. Já a enzima CatL-1 apresenta um perfil de expressão muito semelhante a de CatD-1, mas também pode ser encontrada nos tecidos da carcaça de *B. xanthophis*.

c) Aminopeptidases

A partir do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*, foi possível identificar 16 *contigs* correspondentes à enzima aminopeptidase. Após processo de curagem, o número de sequências foi mantido (Tabela 8). Dentre elas, as escolhidas para a identificação dos sítios de expressão através de RT-PCR foram as Aminopep-1, Aminopep-4, Aminopep-5 e Aminopep-6 (Figura 22C).

Todas as sequências selecionadas, com exceção da Aminopep-5, apresentam um perfil de expressão bastante geral, sendo observados em tecidos do sistema digestivo, TM e CC. Os resultados obtidos para Aminopep-5 indicam que houve problemas com os *primers* projetados para o experimento.

d) Quimotripsinas

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de três *contigs* correspondentes a quimotripsinas. Após o processo de curagem, apenas uma sequência foi obtida (Tabela 9A) e seus sítios de expressão foram determinados por reações de RT-PCR (Figura 22D).

Esta enzima é expressa especificamente no DTP, com uma banda fraca indicando expressão também na CF. Portanto, trata-se de uma proteína com expressão bastante específica no intestino médio de *B. xanthophis*.

3.3. Outras proteínas

Além da hidrólise de macromoléculas orgânicas e do transporte de solutos através da membrana, o processo digestivo é complementado pela ação de outras proteínas e enzimas com funções diversas, como as proteínas ligantes de ácidos graxos e a anidrase carbônica. Estas proteínas foram detectadas no pirosequenciamento e submetidas a blast em bancos de dados públicos, sendo devidamente identificadas para estudo neste trabalho.

a) Proteínas ligantes de ácidos graxos

A partir do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*, foi possível identificar dois *contigs* referentes a proteínas ligantes de ácidos graxos. Após curagem, estas duas sequências foram mantidas (Tabela 9B) e ambas foram utilizadas em experimentos de RT-PCR para determinação dos seus sítios de expressão (Figura 23A).

As duas proteínas analisadas apresentam o mesmo perfil de expressão, sendo transcritas por todo o sistema digestivo, com exceção do DTA e demais tecidos corporais.

b) Anidrase carbônica

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de dois *contigs* correspondentes a anidrase carbônica. Depois de serem submetidas ao processo de curagem, foram obtidas duas sequências (Tabela 9C), das quais apenas a CarbAn-1 foi submetida a experimentos de RT-PCR (Figura 23B).

Esta enzima apresenta um perfil de expressão bastante específico, sendo observado apenas no sistema digestivo, exclusivamente na CF, apesar da fraca banda observada no domínio cônico.

DISCUSSÃO

ANÁLISE MORFOLÓGICA

A proposta principal da abordagem morfológica deste trabalho foi detalhar as informações sobre a distribuição e a organização do complexo luminal de membranas em espécies representativas da ordem Hemiptera. Para tanto, os estudos foram iniciados com insetos da subordem Auchenorrhyncha, tendo como base os resultados obtidos previamente com a espécie *Bucephalogonia xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Assim, foram analisadas quatro espécies (*Macugonalia leucomelas*, *Dalbulus maidis*, *Mahanarva fimbriolata* e *Quesada gigas*) integrantes de três das quatro superfamílias dentro de Auchenorrhyncha (Membracoidea, Cercopoidea e Cicadoidea). Além da subordem Auchenorrhyncha, este estudo também abrangeu a subordem Sternorrhyncha, pela estudo morfológico detalhada do sistema digestivo da espécie *Diaphorina citri*, família Psyllidae. Existem, na literatura, apenas dois trabalhos realizados sobre a morfofisiologia do sistema digestivo em insetos da subordem Sternorrhyncha, envolvendo as espécies *Acyrtosiphon pisum* (Cristofolletti et al., 2003) e *Myzus persicae* (Silva et al., 2004). Assim, os resultados obtidos com a espécie *D. citri* complementam os poucos dados existentes com relação à morfofisiologia da digestão em insetos desta subordem.

1. Anatomia do sistema digestivo

O sistema digestivo dos insetos pode apresentar grande diversidade anatômica e variados graus de complexidade (Waterhouse, 1957; Wigglesworth, 1972; Cruz-Landim, 1985; Terra, 1988; Ribeiro et al., 1990; Chapman, 1998). O intestino das espécies estudadas neste trabalho exibe uma estrutura anatomicamente complexa, com diferentes especializações adaptativas características de insetos sugadores de seiva. Entre elas, observa-se a presença de um esôfago simples, uma câmara de filtração (CF), um intestino médio com dois domínios bem definidos (o cônico – DC – e o tubular – DT) e, com exceção do psíldeo *D. citri*, os quatro túbulos de Malpighi, que apesar de serem órgãos do sistema excretor, possuem um papel fundamental no processo digestivo destes animais.

Nas espécies estudadas neste trabalho, o intestino anterior é formado por uma estrutura tubular, o esôfago, sem qualquer diferenciação anatômica, que conecta a

boca à CF. Em outros insetos, o intestino anterior pode apresentar modificações na forma de um papo e um proventrículo. O papo é descrito como um órgão de armazenamento (Chapman, 1998) e, segundo Wigglesworth (1972), é um sítio onde o processo digestivo pode ter início, pela ação de enzimas digestivas secretadas pelo intestino médio ou glândulas salivares. Em grande parte das espécies de insetos, o proventrículo forma uma válvula que controla a passagem do alimento do intestino anterior para o médio. Em alguns casos, este órgão pode apresentar dentículos de quitina voltadas para o lúmen do intestino, atuando na trituração do alimento (Terra, 1988). Estes dentículos ou espículas de quitina podem ser encontradas ao longo de todo o intestino anterior, como na barata *Periplaneta americana* (Dictyoptera) (De Lima, 2004) e no grilo *Gryllodes sigillatus* (Orthoptera) (Biagio, et al., 2009), ou apenas em algumas regiões, como na larva do besouro *Dermestes maculatus* (Coleoptera) (Caldeira et al., 2007).

A CF é um órgão típico de insetos sugadores da infraordem Cicadomorpha, composta por espécies sugadoras de fluidos vegetais (xilema, floema ou mesofilo) (Resh & Cardé, 2003). Este órgão apresenta graus diferentes de complexidade e, como discutido anteriormente, consiste na associação de segmentos do intestino médio anterior, do intestino médio posterior e das regiões proximais dos quatro túbulos de Malpighi. Nesta região, ocorre o transporte de água diretamente do início do intestino médio para o intestino posterior através dos túbulos de Malpighi, resultando numa maior concentração de nutrientes ao longo da porção média do intestino médio (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974). A seiva das plantas, tanto o xilema quanto o floema, é uma fonte nutricional bastante desbalanceada. O xilema é pobre em aminoácidos, contém monossacarídeos, ácidos orgânicos, íons potássio e outros minerais também em baixas concentrações, sendo, portanto, um alimento extremamente diluído. O floema é, também, pobre em aminoácidos, mas possui alta concentração de sacarose (Terra, 1988; Terra et al., 1996a; b). Insetos sugadores de xilema, como as espécies *M. leucomelas*, *M. fimbriolata* e *B. xanthophis*, e algumas que se alimentam de floema precisam concentrar os nutrientes orgânicos de modo a aumentar a eficiência de absorção destes componentes. Este fenômeno ocorre na CF destes animais, permitindo que o excesso de água passe diretamente do intestino médio anterior para o posterior, acumulando os nutrientes na região mediana (Gouranton, 1968; Cheung & Marshall, 1973a; b; Terra, 1988). A eficiência deste mecanismo é tão grande, que é capaz de

concentrar o xilema em até 10 vezes (Cheung & Marshall, 1973a; b) e o floema em 2,5 vezes (Lindsay & Marshall, 1980).

No caso dos hemípteros que se alimentam de floema, como a cigarrinha *D. maidis* e o psílídeo *D. citri*, a CF pode atuar de outro modo. O floema apresenta altas concentrações de sacarose, sendo hiperosmótico com relação à hemolinfa. De fato, a concentração de carboidratos pode chegar a 1,0 M, que corresponde a quatro ou cinco vezes a concentração da hemolinfa (Ashford et al., 2000; Fisher, 2000; Douglas, 2006). Neste contexto, a CF atuaria como um dos mecanismos de combate ao estresse osmótico imposto pelo floema, permitindo o transporte de água a partir da região posterior do intestino médio para a porção anterior, diluindo o conteúdo luminal do intestino (Rhodes et al., 1997; Douglas, 2003; Shakesby et al., 2009).

A organização e o nível de complexidade da CF são bastante diversos entre as espécies (Ponsen, 1979; 1990; 1991; Cicero et al., 2009). Em algumas delas, como no afídeo *A. pisum* (Douglas, 2003; Shakesby et al., 2009), esta estrutura pode ser constituída por um simples contato entre os tecidos, sem estar enclausurada por uma membrana (Cicero et al., 2009). Dentre os Auchenorrhyncha, espécies da infraordem Cicadomorpha apresentam a maior complexidade deste órgão, incluindo, em sua estrutura, as porções proximais dos túbulos de Malpighi (órgãos do sistema excretor) (Resh & Cardé, 2003). Os insetos da família Cercopidae (p. ex. *M. fimbriolata*) e Cicadidae (p. ex. *Q. gigas*) apresentam CF com maior complexidade quando comparadas às observadas em Cicadellidae (*B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *D. maidis*), de modo que a porção posterior do intestino médio se apresenta mais enrolada no interior da CF (Marshall & Cheung, 1974; Tsai & Perrier, 1996; Raikitov, 1999; Zhong et al., 2013). Já os Sternorrhyncha, como o psílídeo *D. citri* e o afídeo *A. pisum* (Cristofolletti et al., 2003), são exceções entre os insetos por não possuírem túbulos de Malpighi e, portanto, a CF destas espécies é constituída apenas por associação de tecidos do sistema digestivo. Os túbulos de Malpighi são órgãos do sistema excretor em insetos e são responsáveis pela eliminação de compostos nitrogenados e pela manutenção do equilíbrio iônico. A ausência de túbulos de Malpighi nos Sternorrhyncha acarreta numa série de adaptações metabólicas no sentido de melhorar o aproveitamento dos compostos nitrogenados e sua excreção (Lamb, 1959; Hussain et al., 1974; Whitehead et al., 1992; Sasaki & Ishikawa, 1993; Sasaki et al., 1993; Dixon, 1998).

Externamente à CF, o intestino médio segue pelo DC, que se caracteriza por uma região expandida do tubo digestivo que pode apresentar dobras no epitélio, resultando em um aspecto corrugado. O DT pode ser observado livre pela cavidade corporal e conecta o DT de volta à CF. No caso de *D. citri*, uma característica peculiar é a presença de quatro apêndices que se projetam a partir do DT. Estas estruturas não são descritas em outros grupos de hemípteros e Brittain (1923) afirma que estes órgãos correspondem aos túbulos de Malpighi, mas não oferece informações histológicas ou fisiológicas que deem suporte para esta hipótese.

A transição do intestino médio para o posterior ocorre em uma estrutura denominada de piloro, que forma uma válvula na qual os quatro túbulos de Malpighi se conectam. O intestino posterior segue externamente à CF como um tubo delgado com uma dilatação em sua porção final, o reto. Esta estrutura tem papel importante na reabsorção ativa de água, íons e outras substâncias dissolvidas (como alguns nutrientes) provenientes da urina primária excretada pelos túbulos de Malpighi (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1998; Nation, 2008). Diversos insetos possuem células especializadas em absorção no reto que se agrupam formando papilas, denominadas papilas retais, que atuam reabsorvendo a água que passa pelo reto, diminuindo as perdas hídricas por excreção pelo organismo. No entanto, segundo Chapman (1998), insetos que se alimentam de fluidos nos quais a água não é escassa, como no caso dos hemípteros da subordem Auchenorrhyncha, não possuem papilas retais.

2. Ultraestrutura do intestino médio

Do ponto de vista da ultraestrutura, os tipos celulares de uma mesma região das diferentes espécies estudadas neste trabalho apresentam características muito semelhantes.

Como discutido anteriormente, pode ser observada uma diferença na complexidade anatômica da CF entre os diferentes grupos da subordem Auchenorrhyncha. De modo geral, os integrantes da família Cicadellidae (*M. leucomelas*, *D. maidis* e *B. xanthophis*) apresentam uma CF relativamente menos complexa do que as observadas em Cercopidae (*M. fimbriolata*) e Cicadidae (*Q. gigas*). No entanto, esta diferença na complexidade não é observada no nível

ultraestrutural. As células da CF (tanto as células do intestino médio, como as dos túbulos de Malpighi) apresentam adaptações relacionadas ao transporte de água e íons através do epitélio (Ribeiro et al., 1990). A grande quantidade de microvilosidades e as extensas invaginações da membrana plasmática basal associada a mitocôndrias, aliadas ao citoplasma reduzido destas células, aumentam significativamente a capacidade absorptiva destes epitélios e sugerem que o transporte de água e íons é intenso entre o intestino médio e os túbulos de Malpighi (Ribeiro et al., 1990). Este mecanismo deve permitir a tomada de grandes volumes de água em excesso que passam pela CF, visando a concentração dos nutrientes na porção média do intestino médio, como já discutido anteriormente (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados para outras espécies da família Cicadellidae, como a *Cicadella viridis* (Hubert et al., 1989) e *Euscelidius variegatus* (Cheung & Purcell, 1993). Outros trabalhos com espécies de famílias diferentes relatam diferentes morfologias da câmara de filtração, mas as células desta estrutura apresentam sempre um aumento de superfície de membrana plasmática apical por microvilosidades e invaginações da membrana plasmática basal (Lindsay & Marshall, 1980; Le Cahérec et al., 1997). Associadas a essas membranas foram constatadas a presença de grandes quantidades de aquaporinas, como esperado, que são uma família de proteínas integrantes de membrana que atuam no transporte específico de moléculas de água, impedindo a passagem de prótons, íons ou solutos neutros (Hubert et al., 1989; Beuron et al., 1995; Le Cahérec et al., 1997).

A CF observada em *D. citri* apresenta características anatômicas e ultraestruturais que sugerem que se trata de uma estrutura menos especializada em seu papel no transporte de água e íons do que as observadas nas espécies da subordem Auchenorrhyncha, não apresentando, inclusive, túbulos de Malpighi em sua organização, como mencionado anteriormente. Sob o ponto de vista de sua ultraestrutura, estas células apresentam um citoplasma mais extenso do que as observadas nas espécies de Auchenorrhyncha, com grande quantidade de organelas relacionadas à secreção de proteínas, como o retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi. Estes dados sugerem que o papel da CF em Sternorrhyncha tenha, possivelmente, menor relevância no processo digestivo quando comparado com espécies de Cicadomorpha. Como mencionado anteriormente, em animais que se alimentam de floema, a CF teria a função de aliviar o estresse osmótico causado pelo

excesso de sacarose na seiva através do transporte de água a partir do intestino médio posterior para o médio anterior, diluindo, assim, o conteúdo luminal (Rhodes et al., 1997; Douglas, 2003; Shakesby et al., 2009).

Animais que se alimentam de floema apresentam adaptações de natureza comportamental e fisiológica que auxiliam na diminuição do estresse osmótico causado pelo floema no tubo digestivo. Estes insetos podem, ocasionalmente, se alimentar de xilema como resposta ao estresse osmótico causado pela sua dieta, diluindo o alimento (Pompon et al., 2011). Outra adaptação observada nestes animais consiste na presença de α -glicosidases associadas às MPMm no intestino médio. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose, que são imediatamente utilizadas na síntese de oligossacarídeos, resultando em uma diminuição da osmolaridade do conteúdo luminal. Este processo é denominado de transglicosilação (Rhodes et al., 1997; Cristofolletti et al., 2003; Douglas, 2003).

De um modo geral, as células do DC e DT apresentam poucas diferenças em sua organização ultraestrutural. A presença de microvilosidades nos enterócitos aumenta a área absorptiva do epitélio intestinal (Fawcett, 1981). Além disso, há um importante papel fisiológico na digestão final de proteínas e carboidratos, pois possuem enzimas digestivas associadas à sua membrana ou ao seu glicocálix (Ferreira et al., 1981; 1988; Silva et al., 1996). Além disso, os enterócitos exibem características que indicam que estas células estão comprometidas com o transporte de água e íons (Ribeiro et al., 1990), como a membrana plasmática apical modificada em microvilosidades e a basal apresentando extensas invaginações associadas a mitocôndrias. No entanto, este transporte não deve ser tão intenso como o que ocorre na CF, uma vez que os enterócitos de DC e DT possuem invaginações da membrana plasmática basal menos desenvolvidas. Em *D. citri*, diferentemente das demais espécies estudadas, as microvilosidades apicais dos enterócitos estão organizadas de maneira mais compacta na forma de um sistema de lamelas, associadas entre si por trabéculas, de modo semelhante ao descrito para o afídeo *A. pisum* (O'Loughlin & Chambers, 1972; Ponsen, 1987; 1991; Cristofolletti et al., 2003). Esta especialização das microvilosidades está relacionada à adaptação do sistema digestivo à uma dieta baseada em floema, como será discutido adiante.

Organelas da rota secretora, que incluem o retículo endoplasmático granular, áreas de Golgi e vesículas de secreção (Rothman & Orci, 1992), são comumente encontradas nos enterócitos das espécies estudadas neste trabalho. Diferentemente de vertebrados, nos quais se observa uma única área de Golgi, em insetos esta organela se distribui em pequenas áreas pelo citoplasma celular em arranjos denominados de dictiossomos (Mollenhauer & Moore, 1994). São comumente observados no citoplasma próximo ao núcleo, apresentando um número variável de cisternas associadas a elementos do retículo endoplasmático e a vesículas de secreção.

Como vimos, os enterócitos das regiões DC e DT apresentam características ultraestruturais muito similares entre si. No entanto, convém lembrar que estas regiões do intestino médio são anatômica e histologicamente distintas, com o DC exibindo um maior volume luminal do que o DT e muitas dobras no epitélio. Estas diferenças devem acarretar em um aumento de superfície epitelial e consequente aumento da eficiência absorptiva. As similaridades ultraestruturais observadas entre os enterócitos destas duas regiões são, provavelmente, consequência do tipo de alimento adotado por estes hemípteros. O fato destes insetos se alimentarem de uma fonte nutricional desbalanceada, composta, basicamente, por monômeros e dímeros orgânicos (Terra, 1988), faz com que praticamente nenhuma digestão seja necessária. Segundo Terra (1988), a adaptação dos Hemiptera a este tipo de alimentação resultou na perda da membrana peritrófica, estrutura responsável pela compartimentalização do processo digestivo, visto que apenas a digestão final é necessária nestes animais (Ferreira et al., 1981). Deste modo, não há a formação de um contra fluxo de água pela secreção no intestino médio posterior e absorção na região anterior e, portanto, não se espera que haja diferenças morfológicas entre essas regiões no que diz respeito às invaginações da membrana plasmática basal e às microvilosidades.

Todas as espécies da subordem Auchenorrhyncha analisadas neste trabalho apresentam um complexo luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos. No caso das espécies da subordem Auchenorrhyncha, este complexo se assemelha bastante com as membranas luminais em forma de chama (MLC) observadas na espécie *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Estas membranas são originadas a partir de vesículas que brotam das extremidades apicais das microvilosidades e se projetam ao lúmen do intestino, mantendo-se conectadas às microvilosidades por segmentos de membrana. Conforme avançam pelo lúmen, estas

vesículas colapsam e formam as MLC. Aparentemente, este complexo de membranas delimitam compartimentos luminais de acesso restrito ao conteúdo da luz do intestino, como indicam as diferenças observadas na eletrondensidade entre o lúmen e o interior destes compartimentos. Uma evidência desta compartimentalização foi obtida com o uso de um traçador luminal (nitrato de lantânio) que não penetra nesses compartimentos (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016).

Embora o mecanismo proposto para a origem do MLC pareça ser relativamente simples, sua complexidade fica mais aparente quando consideramos que a membrana biológica é composta por uma bicamada lipídica (ver esquema a seguir). Para que uma vesícula seja formada a partir de uma microvilosidade, deve haver uma constrição e a aproximação das membranas nesta região. Em seguida, as membranas devem se fundir para que a vesícula assim formada seja parcialmente liberada, mantendo sua ligação com a microvilosidade. De fato, há evidências de que durante a formação das MLC ocorre um fenômeno conhecido como hemifusão (Blumenthal et al., 2003; Jahn et al., 2003), no qual apenas uma das monocamadas, no caso a interna, se funde, enquanto que a outra permanece independente. Deste modo, uma nova unidade de membrana (bicamada lipídica), composta apenas pelas monocamadas externas das microvilosidades, deve ser formada, mantendo, assim, a vesícula conectada por um segmento de membrana. A hemifusão é, em geral, uma etapa intermediária à formação de qualquer tipo de vesícula, que precede a fusão das monocamadas externas e a consequente liberação de vesículas. Em seguida, estas vesículas se alongam à medida que avançam em direção ao lúmen e se colapsam.

As MLC das espécies *M. leucomelas* e *D. maidis* apresentam projeções e compartimentos luminais bem desenvolvidos, se assemelhando bastante às observadas em *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Já as observadas em *M. fimbriolata* e *Q. gigas* são consideravelmente menos desenvolvidas, com relativamente poucas membranas e compartimentos luminais reduzidos. Estes dados sugerem que as MLC apresentam variações em complexidade nos diferentes grupos dentro da infraordem Cicadomorpha. Tal variação pode ter relação com a complexidade anatômica da CF, discutida anteriormente. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que quanto maior a complexidade da CF (como nas espécies *M. fimbriolata* e *Q. gigas*), menos desenvolvida é a MLC. Por outro lado, quanto menos complexa a CF (como em *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *D. maidis*), mais desenvolvida é a MLC. Esta observação sugere que a evolução da CF e da MLC possa ter ocorrido simultaneamente ao longo da história evolutiva da infraordem Cicadomorpha, sendo selecionadas conjuntamente para um aumento global na eficiência do processo digestivo. Uma possível explicação para esta relação seria que, nas espécies que possuem uma CF mais complexa (*M. fimbriolata* e *Q. gigas*), os nutrientes seriam mais eficientemente concentrados na porção mediana do intestino médio, facilitando sua absorção. Deste modo, o papel das MLC no processo digestivo destes animais se tornaria menos relevante e este complexo luminal de membranas seria reduzido ao longo da evolução. Um cenário contrário pode ser proposto para as espécies *M. leucomelas* e *D. maidis*.

Por sua vez, o complexo luminal de membranas observado em *D. citri* é semelhante às membranas perimicrovilares modificadas descritas nos afídeos *Acyrtosiphon pisum* (Cristofolletti et al., 2003) e *Myzus persicae* (Silva et al., 2004). No entanto, algumas diferenças morfológicas podem ser destacadas em sua organização. Em *D. citri*, as MPMm são mais abundantes do que as descritas para as espécies *A. pisum* e *M. persicae*. Além disso, muitas vesículas estão presentes em sua organização. Estas pequenas vesículas e membranas podem ser observadas entre as lamelas e pelo citoplasma do enterócito, no interior de grânulos multivesiculares. Aparentemente, as áreas de Golgi, em conjunto com o retículo endoplasmático granular, são responsáveis pela produção destes grânulos. Assim, a origem celular das MPMm em *D. citri* parece seguir o modelo proposto por Cristofolletti et al. (2003). Vesículas produzidas por áreas de Golgi se agregam no citoplasma dos enterócitos e

são envolvidas por porções do retículo endoplasmático granular sem ribossomos, formando um grânulo multivesicular, em um fenômeno semelhante ao observado na formação de autofagossomos (Dunn, 1990a; b). Estes grânulos se fundem à base das lamelas e seus conteúdos seguem seu curso entre elas em direção ao lúmen, fixando-se às suas extremidades. Estas membranas exercem alguns papéis fisiológicos importantes, que incluem a concentração de aminoácidos pela sua ligação à MPMm de modo reversível, facilitando sua absorção; e o ancoramento de moléculas de α -glicosidase, deixando-as em maior contato com o alimento para a reação de transglicosilação e impedindo a sua excreção (Cristofolletti et al., 2003).

3. Panorama da digestão em Hemiptera

Com os dados morfológicos obtidos neste trabalho, um novo cenário se revela em relação a organização funcional do sistema digestivo dentre os Hemiptera, que parece ser muito mais diversificada do que se acreditava inicialmente. Recorda-se, mais uma vez, que os hemípteros não possuem uma membrana peritrófica no lúmen do intestino médio, como a maioria dos insetos, mas sim um complexo luminal de membranas lipoprotéicas. Além das MPM, considerada, inicialmente, como modelo presente em todos os membros da ordem, outros dois complexos luminais de membrana podem ser observados: as MPMm e as MLC. Aparentemente, a distribuição destes complexos está relacionada à filogenia do grupo, de modo que cada subordem apresenta uma organização de membranas característica. As MPM são encontradas em espécies da subordem Heteroptera (percevejos). Os insetos deste grupo possuem dietas variadas, com integrantes que se alimentam de tecidos vegetais ou animais, podendo ser predadores, hematófagos, sugadores de seiva, entre outros. As espécies que compõem a subordem Sternorrhyncha (afídeos e pulgões) são especializadas em se alimentar de floema das plantas e apresentam o complexo luminal de membranas do tipo MPMm. Por fim, a subordem Auchenorrhyncha é composta por animais que se alimentam de xilema, floema ou mesofilo e possuem membranas do tipo MLC.

Como se recorda, a ordem Hemiptera é integrante da superordem Paraneoptera, que também inclui as ordens Psocoptera, Phthiraptera e Thysanoptera. Análises de imagens disponíveis na literatura com espécies das subordens Psocoptera

e Phthiraptera sobre a morfofisiologia do sistema digestivo indicam que a membrana peritrófica também está ausente nestes grupos de insetos, sugerindo que tal estrutura tenha sido perdida no ancestral de toda superordem Paraneoptera (Gonçalves, 2002; Silva et al., 2004). No entanto, a falta de estudos mais detalhados sobre o sistema digestivo e hábitos alimentares, especialmente dos integrantes das ordens Psocoptera e Phthiraptera, dificultam a compreensão dos fenômenos evolutivos que levaram à perda da membrana peritrófica no ancestral dos Paraneoptera. Uma hipótese possível que explicaria a perda desta estrutura neste ancestral seria que o ancestral deste grupo tenha se adaptado a uma fonte alimentar baseada em fluidos orgânicos ou detritos, cuja composição apresenta moléculas orgânicas menos complexas e mais facilmente digeríveis. Deste modo, o processo digestivo neste ancestral poderia ser simplificado a ponto da compartimentalização do lúmen do intestino médio deixar de ser uma vantagem, resultando no desaparecimento da membrana peritrófica ao longo da evolução.

De acordo com a literatura, o complexo luminal de membranas provavelmente se originou em um ancestral das ordens Hemiptera e Thysanoptera, como uma adaptação relacionada a um hábito sugador de seiva das plantas, semelhante aos atuais integrantes da subordem Auchenorrhyncha, como podemos observar no esquema a seguir. Este complexo luminal de membranas presentes no ancestral eram, provavelmente, do tipo MPM e aumentavam a eficiência na absorção de moléculas orgânicas, principalmente aminoácidos, que são nutrientes escassos na seiva (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Transportadores de potássio presentes na MPM absorveriam ativamente estes íons para o interior dos enterócitos a partir do EPM, formando um gradiente de concentração entre o lúmen e o EPM. Este gradiente geraria a energia potencial utilizada para o transporte de aminoácidos através da MPM por cotransportadores de potássio e aminoácidos. Uma vez no EPM, estes nutrientes se difundiriam e seriam absorvidos por transportadores específicos presentes na membrana microvilar (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). As MPM podem ser observadas principalmente em representantes da subordem Heteroptera atuais, que, apesar de adotarem secundariamente uma dieta mais complexa e que exige digestão luminal de grandes moléculas orgânicas, mantiveram estas membranas, que compartimentalizam o processo digestivo de modo semelhante à membrana peritrófica (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012).

Os integrantes da subordem Sternorrhyncha possuem um complexo luminal de membranas organizadas em MPMm. Este complexo supostamente evoluiu a partir de um ancestral MPM, após a adaptação destes insetos à alimentação baseada em floema, que é rica em sacarose e hiperosmótica com relação à hemolinfa. Uma das características do modelo MPMm é a modificação das microvilosidades dos enterócitos em um sistema de lamelas que possuem trabéculas conectando-as entre si. Com o surgimento destas trabéculas ao longo da evolução e a consequente limitação do espaço entre as microvilosidades, as MPM ancestrais foram substituídas pela MPMm (Cristofolletti et al., 2003).

Os membros da subordem Auchenorrhyncha parecem apresentar dois tipos de organização do complexo luminal de membranas: as MPM e as MLC. Apesar de existir a descrição de uma espécie desta subordem apresentando membranas luminiais

semelhantes às MPM (Reger, 1974), as MLC foram observadas em insetos da infraordem Cicadomorpha da subordem Auchenorrhyncha, que, com exceção de algumas espécies, são animais especializados em se alimentar primariamente de xilema. As MLC provavelmente evoluíram a partir de uma organização do tipo MPM, como uma adaptação a um hábito alimentar baseado especificamente em xilema. No entanto, as pressões seletivas e fenômenos evolutivos envolvidos nesse processo não são conhecidos. Tal adaptação deve ter ocorrido paralelamente à evolução da câmara de filtração em Cicadomorpha, que auxiliaria a absorção de nutrientes essenciais pela eliminação do excesso de água presente no xilema.

Em um estudo realizado com uma espécie sugadora de xilema *Phylloscelis atra* (Fulgoridae), integrante da infraordem Fulgoromorpha, da subordem Auchenorrhyncha (Reger, 1974), foi descrito um complexo luminal do tipo MPM, semelhante à observada em integrantes da subordem Heteroptera. Este dado, somado aos resultados obtidos até o momento neste trabalho, dão suporte a uma hipótese para a classificação de Auchenorrhyncha (Muséum National D'Histoire Naturelle. Hem-bases). O complexo luminal de membranas do tipo MLC teria evoluído no ancestral da linhagem que originou Cicadomorpha, sendo, portanto, uma autapomorfia deste grupo (ver esquema acima).

Essa visão mais tradicional sobre a evolução da organização morfofuncional do processo digestivo em Hemiptera mostra-se, no entanto, pouco consistente quando confrontada com dados mais recentes. Nesta visão, o complexo luminal de membranas do tipo MPM teria surgido no ancestral das ordens Hemiptera e Thysanoptera, adaptado para um hábito sugador de seiva semelhante aos atuais Auchenorrhyncha. Entretanto, a descoberta da existência de um modelo de complexo luminal de membranas em integrantes desta subordem que difere significativamente da organização do ancestral de Hemiptera e Thysanoptera se mostra como um complicante ao suporte da visão tradicional (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Além disso, dados recentes obtidos pela nossa equipe apresentam fortes evidências da presença de um complexo luminal de membranas do tipo MLC em integrantes da ordem Thysanoptera (Leal et al., 2016). Deste modo, com base nestas informações, uma nova hipótese pode ser levantada sobre a origem e evolução do complexo luminal de membranas nas ordens Hemiptera e Thysanoptera. Assim, o ancestral hipotético das ordens Hemiptera e Thysanoptera seria um inseto adaptado ao hábito sugador de seiva, que poderia apresentar um complexo luminal de membranas com

organização semelhante às MLC. Os sugadores de xilema que integram a infraordem Cicadomorpha (da subordem Auchenorrhyncha) atuais, que apresentam hábitos alimentares semelhantes aos ancestrais, teriam mantido a mesma organização geral do MLC. As MPMm teriam sido selecionadas como variações da MLC no ancestral da subordem Sternorrhyncha como um mecanismo que proporcionaria vantagens evolutivas para um hábito alimentar baseado em floema. As MPM, por sua vez, teriam derivado a partir das MLC no ancestral compartilhado entre a subordem Heteroptera e a infraordem Fulgoromorpha (da subordem Auchenorrhyncha). As MPM foram, provavelmente, selecionadas ao longo da evolução como um mecanismo que promoveria a compartimentalização do processo digestivo no ancestral Heteroptera/Fulgoromorpha, adaptado secundariamente a uma alimentação nutricionalmente mais complexa que envolve digestão luminal de polímeros.

Esta nova hipótese sobre a evolução da organização do processo digestivo em Hemiptera e Thysanoptera é baseada nos resultados obtidos com diversas espécies de hemípteros e os respectivos tipos de complexo luminal de membranas. No entanto, cada tipo de complexo apresenta uma organização característica e parece ser originado por mecanismos celulares distintos. As MPM são formadas por dois eventos consecutivos de fusão de vesículas de membrana dupla, de modo que a membrana externa se funde com a membrana plasmática e a interna com a MPM (Silva et al., 1995). Estas vesículas são originadas a partir das cisternas trans-Golgi, envoltas por um rearranjo de cisternas adjacentes (Andries & Torpier, 1982; Werner et al., 1991; Silva et al., 1995). As MPM revestem as microvilosidades mantendo uma distância constante entre as membranas, formando um novo compartimento, o espaço perimicrovilar (Lane & Harrison, 1979; Terra, 1988; 1990; 2001; Silva et al., 1995; Terra & Ferreira, 2012). As MPMm, por sua vez, são produzidas por um mecanismo semelhante ao que ocorre na origem das MPM, pois são produto direto da rota intracelular de secreção, que envolvem o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e vesículas de secreção (Rothman & Orci, 1992). No entanto, não há a formação de vesículas de membrana dupla, neste caso. As membranas do complexo luminal MPMm encontram-se associadas às extremidades das microvilosidades e possuem aspecto enovelado, não formando compartimentos fechados (Cristofaletti et al., 2003). Diferentemente dos outros dois modelos, as MLC não são produto direto da rota de secretora e sim são originadas a partir da vesiculação das extremidades das microvilosidades. Conforme estas vesículas avançam pelo lúmen do intestino médio,

elas se alongam e se fundem, formando, como vimos, figuras semelhantes a chapas (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). O fato de os mecanismos celulares que levam à formação dos três tipos descritos de complexo luminal de membranas serem tão diversos dificultam a compreensão dos reais mecanismos evolutivos que levaram à diversificação destes complexos. Assim, para se ter uma visão mais precisa acerca dos fenômenos evolutivos que levaram à formação dos complexos luminais de membranas, torna-se necessária a obtenção de mais informações ainda não disponíveis na literatura.

Como visto ao longo deste trabalho, a evolução da organização morfofuncional do sistema digestivo em insetos da ordem Hemiptera e Thysanoptera é marcada pelo surgimento de um complexo luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos do intestino médio destes organismos. No entanto, a função geral deste complexo de membranas ou os fenômenos evolutivos que levaram ao seu surgimento continuam pouco compreendidos. Acredita-se que essas membranas possam aumentar a eficiência do processo digestivo por ampliar a área de contato do epitélio intestinal com o alimento, permitindo a fixação de proteínas de membrana ou outros componentes essenciais para a digestão. Além disso, estas membranas podem estar também relacionadas a uma função ainda mais importante, como a compartimentalização do processo digestivo. Em Auchenorrhyncha, as MLC formam compartimentos fechados, evidenciado por uma maior eletrondensidade destas regiões e pelo uso de traçadores luminais (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Em Heteroptera, as MPM delimitam o espaço perimicrovilar, que compartimentaliza o processo digestivo destes insetos. Nos Sternorrhyncha, as MPMm não delimitam um compartimento fechado, como nos outros dois modelos. Entretanto, estas membranas projetam-se ao lúmen e podem concentrar proteínas, nutrientes e outros solutos, formando microambientes com composição distinta do restante do conteúdo luminal (Cristofolletti et al., 2003). Deste modo, considerando as dimensões reduzidas destes animais, pode-se considerar que tais microambientes correspondam a compartimentos de acesso restrito no lúmen intestinal. Neste ponto, é interessante salientar que os insetos da ordem Phthiraptera, que incluem os piolhos, não apresentam qualquer tipo de membranas luminais associadas ao epitélio intestinal. Isso foi constatado em um estudo realizado em nosso laboratório com a espécie hematófaga *Haematopinus suis* (Phthiraptera: Anoplura) (Gonçalves, 2002).

Neste caso, o sangue ingerido pelo inseto forma coágulos no interior do lúmen intestinal que pode acarretar na formação de microambientes bioquimicamente distintos entre seu interior e a luz do intestino. Deste modo, a digestão do alimento ocorreria em etapas distintas, tendo início a partir da superfície do coágulo até as porções mais internas. Com relação aos integrantes da ordem Psocoptera, não há, praticamente, informações sobre a organização do sistema digestivo destes insetos. Em um único trabalho existente na literatura, com uma espécie da família Liposcelidae, não se observou qualquer tipo de membrana luminal ou indicação da existência de microambientes relacionados a uma possível compartimentalização da luz do intestino (Silva et al., 2003).

As informações disponíveis até o momento indicam que, embora a compartimentalização do processo digestivo nos insetos mediada pela membrana peritrófica tenha sido perdida ao longo da evolução dos Paraneoptera, mecanismos alternativos foram selecionados no sentido de promover algum nível de compartimentalização no intestino médio destes insetos.

ANÁLISE MOLECULAR

A vertente molecular deste trabalho teve como foco identificar os principais transportadores de membrana, enzimas digestivas e outras proteínas que atuam na digestão na espécie sugadora de xilema *B. xanthophis*, utilizada como modelo de estudo. Para isso, foi realizado um transcriptoma do intestino médio desta espécie, que serviu como base de dados para a busca destas proteínas. Além disso, os sítios de expressão destas proteínas selecionadas foram determinados, em uma tentativa de relacionar as diferentes regiões do sistema digestivo com as proteínas atuantes na digestão do alimento. Deste modo, foi possível incorporar os dados morfológicos previamente obtidos do tubo digestivo de *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016) com informações sobre sua fisiologia molecular, permitindo uma compreensão mais abrangente sobre a organização morfofuncional do sistema digestivo nesta espécie.

1. Transportadores de membrana

A realização do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de uma grande diversidade de transportadores atuantes nesta região do sistema digestivo. Entretanto, parte significativa destas proteínas estão relacionadas a funções gerais da célula e, portanto, podem não estar envolvidas diretamente aos eventos relacionados ao processo digestivo. Assim, para a elaboração dos modelos sobre a fisiologia da digestão em *B. xanthophis*, foram considerados apenas aqueles transportadores cuja expressão foi detectada exclusivamente no intestino médio e nos túbulos de Malpighi, pois os sistemas digestivo e excretor compartilham algumas proteínas transportadoras e até enzimas digestivas (Beyenbach, 2003; Boron & Boulpaep, 2005), uma vez que o sistema excretor está comprometido com a reabsorção seletiva e recuperação de nutrientes e íons de importância para o organismo que passaram pelo sistema digestivo.

1.1. Transporte de aminoácidos e outros compostos nitrogenados

Analisando as sequências de transportadores de aminoácidos identificadas no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* e os sítios de expressão das principais delas, pode-se concluir que a absorção de aminoácidos ocorre ao longo de todo o intestino médio desta espécie.

A absorção de aminoácidos no intestino médio de *B. xanthophis* se dá pelo cotransporte de H^+ e aminoácidos. O principal cotransportador presente no sistema digestivo de *B. xanthophis*, identificado como H+aaT-1 (328 *reads*), ocorre especificamente nas extremidades do intestino médio, sendo observado na câmara de filtração (CF) e na porção posterior do domínio tubular (DTP).

O cotransportador H+aaT-2 apresenta 157 *reads* é expresso em todas as regiões do intestino médio, incluindo a câmara de filtração (CF), o domínio cônico (DC), o domínio tubular anterior (DTA), médio (DTM) e posterior (DTP).

Os demais transportadores de aminoácidos analisados neste trabalho (Na0aaT-1 e aaP-1) estão localizados, provavelmente, no domínio basolateral da membrana plasmática dos enterócitos e são responsáveis por transportar os aminoácidos

presentes no meio intracelular para a hemolinfa, disponibilizando estes nutrientes para os demais tecidos do corpo do animal.

Os prótons necessários para a absorção de aminoácidos devem ser fornecidos por V-ATPases presentes no domínio apical dos enterócitos ao longo de todo o epitélio do intestino médio. A principal V-ATPase identificada no transcriptoma corresponde à sequência V-ATPaseV0c-2, que apresenta 4.084 *reads* e é expressa em todas as regiões do intestino médio. Estes complexos proteicos utilizam a energia da hidrólise do ATP para bombear prótons para o meio extracelular, formando um gradiente eletroquímico entre o lúmen intestinal e o meio intracelular, que é utilizado como potencial para o transporte ativo de aminoácidos para o interior do enterócito.

Este modelo para a absorção de aminoácidos difere consideravelmente do proposto para o ancestral sugador de seiva de Hemiptera e Thysanoptera, que depende da presença de MPM (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Como se recorda, os enterócitos deste ancestral absorveria ativamente íons potássio (o componente mais abundante na seiva) do EPM, formado entre a membrana plasmática dos enterócitos e as MPM, para o meio intracelular, gerando, deste modo, um gradiente eletroquímico entre o lúmen intestinal e o EPM. Este gradiente seria utilizado como potencial para o cotransporte de potássio e aminoácidos por transportadores presentes na MPM a partir da luz intestinal para o EPM. Uma vez neste compartimento, os aminoácidos se difundiriam por um espaço mais restrito e próximo à membrana das microvilosidades, onde seriam transportados para o interior dos enterócitos por transportadores específicos.

No entanto, os resultados obtidos neste trabalho apontam para um cotransporte de aminoácidos dependente de íons H^+ ao invés de íons potássio. Além disso, apesar da existência de um compartimento fechado criado pelas MLC, este modelo de absorção não requer a existência de tal compartimento. Adicionalmente, a análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* não evidenciou sequências associadas a transportadores de potássio de qualquer natureza.

Além dos aminoácidos, o intestino médio de *B. xanthophis* absorve compostos nitrogenados na forma de amônio. A análise do transcriptoma revelou a presença de uma sequência referente a um transportador de amônio, que é expressa ao longo de todo o intestino médio. No entanto, o xilema apresenta concentrações extremamente baixas de amônio (0,05-0,3 mM) e quantidade relativamente alta de nitrato (3-8 mM), importante nutriente nitrogenado utilizado pelas plantas, mas que não é metabolizado

por animais (Watson et al., 2001; Bahrum et al., 2002). Neste caso, o metabolismo do nitrato poderia ser realizado por bactérias simbiontes presentes no intestino médio, produzindo amônio e liberando-o para a absorção pelos transportadores presentes no epitélio intestinal. De fato, o estudo do sistema digestivo de *B. xanthophis* mostra a presença de simbiontes que podem desempenhar este papel no lúmen do intestino médio, entre as microvilosidades e as MLC (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016).

Os simbiontes são importantes fatores a serem considerados na nutrição de animais fitófagos. Insetos hemípteros que se alimentam de seiva são conhecidos por possuírem organismos simbiontes intracelulares obrigatórios, localizados em estruturas especializadas na cavidade corporal, chamadas de bacteriócitos (Buchner, 1965; Douglas, 1998; Moran et al., 2008; Urban & Cryan, 2012; Hansen & Moran, 2014). No caso de insetos que se alimentam de seiva das plantas, como a espécie *B. xanthophis*, os simbiontes sintetizam aminoácidos essenciais (que não são produzidos por animais e, portanto, são obtidos exclusivamente pela dieta) utilizando aminoácidos não essenciais e amônia produzidos pelo hospedeiro (Mittler, 1971; Slansky & Scriber, 1985; Douglas, 1988; Andersen et al., 1989; Douglas & Prosser, 1992; Sandström & Pettersson, 1994; Febvay et al., 1995; Shiguenobu et al., 2000; Sandström & Moran, 2001; Baumann, 2005; Hansen & Moran, 2011; Hansen & Moran, 2014). Além disso, os simbiontes também podem fornecer a seus hospedeiros outros nutrientes importantes, como riboflavinas, vitaminas do grupo B e carotenóides (Shiguenobu et al., 2000; Wu et al., 2006; Hansen & Moran, 2014).

O modelo proposto para a absorção de aminoácidos e amônio no intestino médio de *B. xanthophis* pode ser observado no esquema abaixo.

1.2. Transporte de açúcares

O transporte de açúcares através do epitélio intestinal é realizado por transportadores do tipo GLUT, que são responsáveis pelo transporte passivo de glicose através da membrana. Dentre os GLUTs estudados neste trabalho, dois deles, GLUT-2 e 4, são expressos por toda a extensão do intestino médio, incluindo a câmara de filtração. Entretanto, o transportador de açúcar mais expresso identificado no transcriptoma é o GLUT-1, que é encontrado apenas nas regiões média e posterior do domínio tubular do intestino médio.

Estes resultados indicam que um dos GLUTs de expressão geral (GLUT-2 e 4) está localizado na membrana plasmática apical e está comprometido com a absorção

de carboidratos, enquanto que o outro deve estar inserido no domínio basolateral da membrana plasmática e está relacionado ao transporte de carboidratos do epitélio intestinal para a hemolinfa.

O transportador GLUT-1, por outro lado, apresenta um padrão de expressão ao longo do intestino médio que sugere um papel mais específico no processo digestivo. Há a possibilidade deste transportador ser responsável pelo transporte de trealose através da membrana, ao invés da glicose. A trealose é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose e é importante por não apresentar o poder redutor apresentado pelas moléculas de glicose, sendo, portanto, menos tóxico em altas concentrações (Becker et al., 1996). A trealose pode ser observada em relativamente altas concentrações na hemolinfa dos insetos e é a principal forma circulante de carboidratos nestes organismos. Portanto, a glicose absorvida no epitélio intestinal deve ser convertida em trealose antes de ser transportada para a hemolinfa e disponibilizada para os demais tecidos do corpo. A identificação de enzimas relacionadas à síntese de trealose (Bx-contig_2251, 3241 e 3836, Tabela 1) no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* indica que a produção de trealose ocorre nos enterócitos. Por fim, o GLUT localizado na membrana plasmática basal dos enterócitos também devem ser transportadores de trealose, que permitem que estes dissacarídeos recém sintetizados possam ser transportados para a hemolinfa.

Também foi identificada no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* uma trealase (Bx-contig_1520, Tabela 1). Esta enzima é comumente encontrada no intestino médio de insetos, embora a trealose não seja componente regular da dieta destes animais (Zebe & McShan, 1959; Gilby et al., 1967). Acredita-se que a trealase presente no intestino dos insetos não esteja comprometida com a hidrólise de trealose proveniente da dieta, mas sim com a recuperação da trealose que se difunde para o lúmen intestinal a partir da hemolinfa (Wyatt, 1967). Neste caso, o dissacarídeo seria quebrado em moléculas de glicose e reabsorvidos pelos enterócitos.

O modelo proposto para o transporte de açúcares através do epitélio do intestino médio de *B. xanthophis* pode ser observado no esquema abaixo.

1.3. Transporte de água

O transporte de água através do epitélio em insetos é realizado primariamente por proteínas transportadoras chamadas de aquaporinas, que realizam o transporte passivo de moléculas de água a favor de um gradiente de concentração (Beyenbach, 2003; Kikawada et al., 2008; Kataoka et al., 2009 a; b; Shakesby et al., 2009; Drake et al., 2010; Harvey et al., 2010; Goto et al., 2011, Liu et al., 2011; Matthew et al., 2011; Phillip et al., 2011).

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* revelou a existência de quatro sequências referentes a aquaporinas, a partir das quais foram selecionadas as duas mais expressas para a determinação dos seus sítios de expressão (MIP-1 e 2). Os resultados obtidos indicam que as aquaporinas escolhidas não são

expressas exclusivamente no intestino médio da cigarrinha, podendo ser encontrada, também, nos túbulos de Malpighi e carcaça.

Estes dados são considerados uma surpresa pela nossa equipe de pesquisadores, pois esperava-se a presença de ao menos uma sequência de aquaporina específica do intestino médio, em particular, da câmara de filtração. Como discutido anteriormente, o sistema digestivo de *B. xanthophis*, assim como de outras espécies da infraordem Cicadomorpha, apresenta uma adaptação anatômica chamada de câmara de filtração (Cheung & Purcell, 1993; Tsai & Perrier, 1996; Wiesenborn, 2004). Este órgão é formado pela aposição das porções anterior e posterior do intestino médio e das regiões proximais dos túbulos de Malpighi. A CF é responsável pelo transporte do excesso de água da seiva diretamente para o intestino posterior, concentrando os nutrientes na porção mediana do intestino médio (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974). Estudos realizados com tecidos da CF de outras espécies de Cicadomorpha, especialmente com a cigarra *Cicadella viridis*, identificaram proteínas semelhantes a aquaporinas em frações de membranas isoladas deste órgão. Experimentos realizados com técnicas de imunocitoquímica indicam a existência de aquaporinas por toda a extensão da membrana plasmática das células que compõem este órgão, tanto nas microvilosidades apicais, quanto no domínio basolateral (Hubert et al., 1989; Beuron et al., 1994; Le Caherec et al., 1997). Além disso, esta aquaporina seria observada exclusivamente na CF e, portanto, não seria expressa em outras regiões do intestino.

O transporte de água através de aquaporinas ocorre de modo passivo, ou seja, sem gasto de energia e a favor de um gradiente de concentração. Geralmente, tal gradiente é estabelecido por diferenças nas concentrações de Na^+ e/ou H^+ (Beyenbach, 2003; Harvey et al., 2010). Neste caso, o antiporte de sódio/ H^+ (observado exclusivamente na CF) pode se mostrar como um dos responsáveis pela origem do gradiente de concentração que direcionará o fluxo de água através do epitélio. Este transportador realiza a troca entre uma molécula de sódio extracelular por um próton intracelular, sem gasto de ATP (Aharonovitz et al., 2000; Orłowski & Grinstein, 2004). Deste modo, além de contribuir para a formação do gradiente de concentração que favoreça o fluxo de água através do epitélio, o antiporte de sódio/ H^+ também fornece prótons para o gradiente eletroquímico que atua como potencial para a absorção de aminoácidos.

Outros transportadores podem estar relacionados ao transporte de água no intestino médio de *B. xanthophis*. Além das aquaporinas, os transportadores de açúcar também são responsáveis pelo transporte de água através da membrana (Bifano et al., 2010; Moreira, 2013). Estudos realizados com a espécie *D. peruvianus* mostram que uma grande quantidade de água é transportada juntamente com a passagem das moléculas de açúcar. No coleóptero *Tenebrio molitor*, os transportadores de açúcar localizados na região anterior do intestino médio possuem um papel fundamental na formação do contrafluxo de água no espaço ecto-peritrófico, sendo os principais responsáveis pela absorção da água secretada pelas células da região posterior do intestino médio (Moreira, 2013).

1.4. Outros transportadores

Além dos transportadores descritos discutidos anteriormente, foram identificados algumas outras proteínas transportadoras no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* e que podem estar relacionados em algum nível ao processo digestivo.

Diversas sequências relacionadas ao cotransporte de fosfato inorgânico e sódio foram identificadas no transcriptoma. Alguns dos transportadores analisados neste estudo (PiNa-7 e 8) são expressos exclusivamente no sistema digestivo, sendo observados ao longo de todo o intestino médio, com exceção da região anterior do domínio tubular. Uma das sequências identificadas também é expressa nos túbulos de Malpighi, além de ter sido detectada ao longo de todo o intestino médio.

Os cotransportadores de fosfato inorgânico e sódio presentes exclusivamente no intestino médio de *B. xanthophis* estão, provavelmente, relacionados com a absorção de fosfato presente no alimento. Já o transportador expresso nos túbulos de Malpighi pode estar relacionado à reabsorção de fosfato a partir das excretas. Estudos realizados sobre a composição nutricional do xilema demonstram a presença de fosfato e sódio em concentrações similares, que variam entre 2-5 mM e 2-3 mM, respectivamente (Watson et al., 2001; Bahrum et al., 2002).

Uma única sequência referente a um antiporte de cloreto/ H^+ foi encontrada no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*. Este transportador é exclusivo do intestino médio e pode ser observado em todas as suas regiões. Aparentemente, este

antiporte está relacionado à absorção de íons Cl^- a partir do lúmen e ao transporte de prótons para a luz, contribuindo, juntamente com as V-ATPases e os antiportes de sódio/ H^+ , com o estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons utilizado como potencial para a absorção de aminoácidos.

2. Enzimas digestivas

O sistema digestivo de *B. xanthophis* apresenta uma série de adaptações relacionadas ao hábito de se alimentar de xilema, fonte nutricional extremamente desbalanceada, composta por poucas macromoléculas orgânicas (Terra, 1988; Terra & Ferreira, 2012). Assim, grande parte das enzimas responsáveis pela digestão luminal do alimento foram perdidas ao longo da evolução destes insetos, embora alguma delas possam ser observadas adaptadas a funções distintas da original.

Uma das principais enzimas estudadas nas espécies de Hemiptera é a α -glicosidase, considerada como marcador bioquímico dos complexos luminiais de membrana dos tipos MPM e MPMm, observados em insetos integrantes das subordens Heteroptera e Sternorrhyncha, respectivamente. No entanto, sua presença em espécies de Auchenorrhyncha e sua relação com as MLC ainda não havia sido demonstrada.

Sequências referentes a α -glicosidases foram identificadas durante as análises do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis*. Esta enzima é expressa por todo o intestino médio, com exceção à região anterior do DT. Estes resultados sugerem uma possível correlação espacial entre a ocorrência de α -glicosidase e das MLC (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016). Além disso, a presença de peptídeo sinal e de três alças transmembranas indica que trata-se de uma proteína integrante de membrana e encaminhada, provavelmente, à rota secretora.

Como mencionado anteriormente, a presença das α -glicosidases como marcador bioquímico do complexo luminal de membranas em Hemiptera foi demonstrado em espécies da subordem Heteroptera e Sternorrhyncha (Silva et al., 1995; Cristofolletti et al., 2003). Nestes animais, as α -glicosidases possuem um papel importante no processo digestivo, como a digestão de carboidratos e a transglicosilação. No entanto, o xilema não apresenta substratos para a ação desta enzima e sua função no processo digestivo em *B. xanthophis* ainda não é conhecida.

Estudos realizados utilizando técnicas de imunocitoquímica evidenciaram que a α -glicosidase no afídeo *Acyrtosiphon pisum* está localizada nas MPMm. No entanto, em um trabalho desenvolvido sobre a caracterização molecular desta enzima mostrou que apesar de não possuir alças transmembranas, sua associação à membrana se dá pela região C-terminal hidrofóbica (Price et al., 2007b).

As proteinases digestivas observadas em integrantes da ordem Hemiptera são derivadas de hidrolases lisossômicas conhecidas como catepsinas (Terra & Ferreira, 2012). A presença de catepsinas no processo digestivo em hemípteros é comum em integrantes da subordem Heteroptera, que se adaptaram secundariamente a uma dieta mais variada e que exige digestão luminal do alimento (Terra et al., 1988; Defferrari et al., 2011; Balczun et al., 2012).

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de algumas proteinases, como catepsinas, aminopeptidases e quimotripsinas.

A catepsina B é expressa especificamente nos DC e DT do intestino médio e não é observada em outros tecidos do corpo, sugerindo que se trata de uma enzima digestiva luminal. Embora sua função no processo digestivo ainda não seja bem compreendida, sua localização no intestino sugere que esta proteinase deva estar relacionada à proteção do inseto contra o sistema de defesas das plantas.

As catepsinas D também são proteinases específicas do intestino médio e, portanto, não são observadas em tecidos não digestivos. Entretanto, seu padrão de expressão é mais geral, podendo ser observadas por todo o intestino médio, com exceção à região anterior do DT. Estas catepsinas D digestivas podem ser diferenciadas de suas contrapartes lisossômicas por não apresentarem em suas sequências uma região consenso chamada de alça de prolina, identificada como D_P_P_(G/A)P (Padilha et al., 2009). Quando alinhadas as sequências referentes às catepsinas D identificadas no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* com uma catepsina D de *Musca domestica*, pode-se concluir que a alça de prolina está ausente e, portanto, são todas proteinases luminais (ver alinhamento abaixo).

	D_P_P_GP
AspMD03	CLSGFMGIDIPPPNGPLWIL
BxCatD1	CMSAFIGSDT----MPFFIL
BxCatD2	CVVGLDPWSIN----WAIL
BxCatD3	CLSGFMGIDLKPLWIL
BxCatD4	CISSEMPAG-----LPYFIL

A participação da catepsina D no processo digestivo em Heteroptera, apesar de comum, é considerada minoritária quando comparada a outras catepsinas (Hoseman & Downe, 1983; Terra et al., 1988; Silva & Terra, 1994; Defferrari et al., 2011). Sua presença no lúmen do intestino médio de *B. xanthophis* é inesperada, considerando as características do xilema como fonte alimentar. O perfil mais generalista de expressão da catepsina D pelo intestino médio de *B. xanthophis* sugere, talvez, uma função mais geral no processo digestivo, como, por exemplo, a digestão de bactérias simbiontes que possam estar presentes no lúmen do intestino.

A catepsina L analisada neste trabalho apresenta um padrão de expressão ainda mais geral do que a catepsina D, podendo ser observada também na carcaça do animal. A presença desta proteinase em tecidos não digestivos indica que se trata de uma enzima lisossômica, ou seja, não digestiva. No entanto, a sequência referente a catepsina L obtida pelo transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* corresponde a cerca de 12% da proteína completa. Deste modo, os fragmentos produzidos nos experimentos de RT-PCR tornam-se pouco específicos e estes dados devem ser analisados com cautela.

A presença de catepsina L em insetos sugadores de seiva foi descrita no afídeo *A. pisum* (Cristofolletti et al., 2003). Esta enzima é encontrada ligada à MPMm e sua presença nestes animais está associada à sua capacidade de digerir proteínas presentes no floema de algumas plantas (Salvucci et al., 1998).

As aminopeptidases estudadas neste trabalho não são exclusivas do sistema digestivo de *B. xanthophis*, sendo observadas em todos os tecidos analisados. Estes resultados indicam que estas proteinases são enzimas lisossômicas e, portanto, não possuem função associada à digestão luminal de alimentos.

Aminopeptidases também foram descritas associadas às MPMm do afídeo *A. pisum* e correspondem ao principal sítio de ligação da lectina Concanavalina, presentes no floema das plantas (Cristofolletti et al., 2006). Esta associação limita o desenvolvimento dos afídeos, apesar de não influenciar negativamente a atividade da

aminopeptidase. No entanto, acredita-se que estas proteinases estejam localizadas próximas a transportadores de aminoácidos e a absorção destes nutrientes seja impedida pela ligação das lectinas às aminopeptidases (Cristofolletti et al., 2006).

A análise do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiu a identificação de três sequências referentes a quimotripsinas. As tripsinas e quimotripsinas são serina proteinases e apresentam muitas similaridades em sua sequência e estrutura terciária. Uma importante diferença consiste no tipo de aminoácido encontrado na posição 189 da sequência peptídica, que corresponde a uma asparagina no caso das tripsinas e a uma serina nas quimotripsinas (Ma et al., 2005). Após alinhamento das sequências obtidas com outras de referência (tripsina e quimotripsina de *Bos taurus*), foi constatado que apenas uma delas corresponde a uma quimotripsina (ver alinhamento abaixo).

*

P00760.3 trypsin [Bos	182	NMFCAGYLEGGKDS	CQGDSGGPVVCSG	208
Q7M3E1.2 Chymotrypsin	199	TMVCAG-GDGVIS	ACNGDSGGPLNCQA	230
BX_2943 chymotrypsin	240	TQLCTS-GDDGKST	CNGDSGGPLVQVD	269
BX_291trypsin-Asp189	197	RLACAY-NQGKTT	LCTGDWGDALVWKN	229

A quimotripsina analisada é expressa exclusivamente no DT posterior do intestino médio de *B. xanthophis*, com uma pequena expressão na CF. As quimotripsinas são enzimas digestivas que podem ser observadas em todos os insetos, excetuando os integrantes da ordem Hemiptera (Colebatch et al., 2002). Assim, sua presença no intestino médio de *B. xanthophis* se mostra bastante interessante, embora seu papel no processo digestivo ainda não é bem compreendido.

3. Outras proteínas

Entre as proteínas selecionadas para estudo encontradas no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* destacam-se as proteínas ligantes a ácidos graxos (FABPs). Estas proteínas podem ser encontradas no meio intracelular e sua função está relacionada ao transporte de lipídios pelo organismo (Chmurzynska, 2006; Furuhashi & Hotamisligil, 2008). As FABPs analisadas neste trabalho não são exclusivas do sistema digestivo, sendo também observadas nos túbulos de Malpighi e na carcaça. Estas proteínas são encontradas em tecidos relacionados ao metabolismo de lipídios, como, por exemplo, no tecido adiposo (Zimmerman & Veerkamp, 2002;

Haunerland & Spener, 2004; Furuhashi & Hotamisligil, 2008). Deste modo, estas FABPs estão, possivelmente, relacionadas à mobilização de ácidos graxos para a produção de energia nos enterócitos. Contudo, considerando que o intestino médio de *B. xanthophis* apresenta, em seu lúmen, um complexo luminal de membranas associado aos enterócitos, o MLC, a demanda por ácidos graxos nestas células deve ser relativamente alta. Assim, é possível que uma análise mais detalhada do transcriptoma possa revelar a presença de FABPs específicas do intestino médio, relacionadas ao transporte de ácidos graxos para a produção de lipídios de membrana que originarão os MLC.

Outra enzima analisada neste trabalho foi a anidrase carbônica, que está relacionada a uma grande variedade de processos fisiológicos, como, por exemplo, a respiração e o transporte de íons (Henry, 1996). A anidrase carbônica identificada no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* é expressa apenas na CF e DC do intestino médio. De um modo geral, a anidrase carbônica tem função na regulação do pH do lúmen do sistema digestivo. No entanto, o padrão de expressão da anidrase carbônica no intestino médio de *B. xanthophis* sugere que esta enzima esteja associada ao transporte de água que ocorre na câmara de filtração.

4. Considerações gerais sobre a fisiologia molecular da digestão

Os resultados obtidos com a análise do transcriptoma do intestino médio da cigarrinha *B. xanthophis* permitiu, como visto ao longo deste trabalho, a identificação de uma grande quantidade de transportadores de membrana, enzimas digestivas e outras proteínas relacionadas ao processo digestivo nesta espécie. Além disso, foi possível verificar os sítios de expressão das principais proteínas selecionadas ao longo do intestino médio, de modo a estabelecer uma relação funcional entre as diferentes regiões do sistema digestivo e as proteínas presentes em cada uma delas. Neste particular, é importante salientar que muitas das diferenças funcionais encontradas entre as diversas regiões do intestino médio não se refletem na morfologia ultraestrutural. De fato, não são observadas diferenças significativas na ultraestrutura dos enterócitos ao longo do intestino médio, como constatado em *B. xanthophis* (Utiyama, 2011; Utiyama et al., 2016) e nas demais espécies estudadas neste trabalho.

Os resultados moleculares obtidos neste estudo permitem uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem no processo digestivo da espécie *B. xanthophis*, como a absorção de aminoácidos, açúcares e água, além de outros nutrientes presentes na seiva. Neste aspecto, é importante pontuar a ocorrência de um cotransporte de aminoácidos com prótons ao longo do intestino médio, ao contrário da ideia inicialmente proposta da existência de cotransportadores de aminoácidos com potássio. Além disso, fica evidente a presença de α -glicosidase no intestino médio de *B. xanthophis* e evidências contundentes de sua associação às MLC, presentes, principalmente, nos DC e DT do intestino médio. Deste modo, a α -glicosidase se mostra como potencial marcador molecular das MLC, como já descrito na literatura para as MPM e MPMm. Por outro lado, a presença de enzimas digestivas associadas à digestão luminal de proteínas em *B. xanthophis* é surpreendente, considerando a fonte alimentar pobre em macromoléculas adotada por esta espécie. Neste aspecto, faz-se necessário estudos complementares para se averiguar a real função destas enzimas o processo digestivo destes hemípteros sugadores de xilema.

Há de se destacar que os dados moleculares obtidos neste trabalho indicam que a CF tenha funções mais abrangentes no processo digestivo do que se supunha inicialmente. Este órgão é conhecido na literatura por sua capacidade em transportar água diretamente da região anterior para a posterior do intestino médio, concentrando os nutrientes na região mediana. Entretanto, a detecção de enzimas relacionadas à digestão de proteínas e de transportadores de aminoácidos e açúcares na câmara de filtração indicam que esta estrutura tenha alguma participação no processo digestivo além do transporte de água e concentração de nutrientes, fato este desconhecido até o momento.

CONCLUSÕES

1. As espécies *Macugonalia leucomelas*, *Dalbulus maidis*, *Mahanarva fimbriolata* e *Quesada gigas*, integrantes da infraordem Cicadomorpha, subordem Auchenorrhyncha estudadas neste trabalho, apresentam um complexo luminal de membranas do tipo membranas luminais em forma de chama (MLC) associado às microvilosidades dos enterócitos. Estas membranas luminais exibem diferentes níveis de complexidade entre as espécies analisadas, que podem estar relacionadas com o grau de elaboração anatômica da câmara de filtração. Por outro lado, o psílídeo *Diaphorina citri*, da subordem Sternorrhyncha, apresenta um complexo luminal de membranas do tipo membranas perimicrovilares modificadas (MPMm), semelhante ao descrito para outras espécies desta subordem. Assim, é possível concluir que insetos da ordem Hemiptera apresentam, ao menos, três tipos de organização do complexo luminal de membranas: as membranas perimicrovilares (MPM), as MPMm e as MLC. As MPM são descritas em integrantes da subordem Heteroptera, que incluem insetos com dieta bastante variada, composta por macromoléculas. Este complexo de membranas também foi observado em uma espécie sugadora de xilema da subordem Auchenorrhyncha, infraordem Fulgoromorpha. Por outro lado, em espécies sugadoras de seiva (xilema ou floema) da infraordem Cicadomorpha, também da subordem Auchenorrhyncha, foi identificado um complexo luminal de membranas do tipo MLC. Por fim, os sugadores de floema da subordem Sternorrhyncha exibem as membranas luminais do tipo MPMm. Deste modo, as diferentes organizações do complexo luminal de membranas entre os Hemiptera parecem depender principalmente das relações filogenéticas entre os grupos dessa ordem, embora o hábito alimentar ao qual estes insetos estão adaptados sejam, também, um fator a ser considerado.

2. A análise dos dados obtidos pelo transcriptoma do intestino médio de *Bucephalogonia xanthophis* possibilitou a identificação de uma grande variedade de proteínas associadas ao processo digestivo, das quais se destacam os transportadores de membrana, enzimas digestivas e outras proteínas relacionadas à digestão.

a) A enzima α -glicosidase, importante marcador bioquímico dos complexos luminais de membrana do tipo MPM e MPMm, está presente no intestino médio de *B. xanthophis*. Esta enzima é intensamente expressa no sistema digestivo, ocorrendo nas mesmas regiões onde as MLC estão presentes. Além disso, há fortes evidências de

que a α -glicosidase seja uma proteína integrante de membrana das MLC, como indicam os dados obtidos pela análise de sua sequência de aminoácidos.

b) Os resultados obtidos pelo estudo do transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* permitiram a identificação de diversos transportadores de aminoácidos, açúcares, água, amônio e íons. Além disso, foi possível detectar a presença de proteinases não-lisossômicas expressas exclusivamente no intestino médio, sugerindo a participação destas enzimas no processo digestivo de *B. xanthophis*. Este fato é surpreendente, uma vez que o xilema é uma fonte nutricional extremamente pobre em proteínas. Assim, a real função destas proteinases no processo digestivo de *B. xanthophis* fica por ser esclarecida.

c) A determinação dos sítios de expressão dos transportadores de membrana identificados no transcriptoma do intestino médio de *B. xanthophis* indicam que a absorção de nutrientes orgânicos ocorre ao longo de toda a sua extensão. Apesar da pouca diferenciação morfológica ultraestrutural exibida pelos enterócitos, diferentes transportadores são expressos em regiões distintas do intestino médio. Neste em particular, destaca-se o modelo proposto para a absorção de aminoácidos em *B. xanthophis*. Diferentemente do sistema descrito na literatura, os aminoácidos parecem ser absorvidos por um cotransporte com prótons, ao invés de um cotransporte com potássio, através de transportadores presentes na membrana plasmática apical. Neste caso, foram identificados dois cotransportadores distintos, sendo um deles expresso ao longo de todo o intestino médio e outro apenas em algumas regiões específicas. Além disso, a presença de proteinases e transportadores de nutrientes orgânicos torna evidente que o papel da câmara de filtração no processo digestivo de *B. xanthophis* é mais abrangente e vai além do transporte de água e concentração de nutrientes.

RESUMO