

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

NATHÁLIA RAMALHO MOREIRA

Fisiologia molecular intestinal de *Tenebrio molitor*

**Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
23/09/13

NATHÁLIA RAMALHO MOREIRA

Fisiologia molecular intestinal de *Tenebrio molitor*

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

Orientador: Prof. Dr. Walter R. Terra

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moreira, Nathália Ramalho

M838f Fisiologia molecular intestinal de *Tenebrio molitor* / Nathália
Ramalho Moreira. -- São Paulo, 2013.
300p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Terra, Walter Ribeiro

1. Bioquímica : Insetos 2. Bioquímica : Coleoptera 3. Enzima :
Inseto : Bioquímica animal I. T. II. Terra, Walter Ribeiro,
orientador.

595.70192 CDD

Nathália Ramalho Moreira

Fisiologia molecular intestinal de *Tenebrio molitor*

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

Aprovado em : _____

Banca examinadora:

Prof Dr: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico...

À minha família no sentido amplo da palavra, que sempre me incentivou para a realização deste trabalho, e à Deus

AGRADECIMENTO(S)

Ao meu orientador e mentor Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, pela orientação, paciência, conselhos e competente orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

A Profa Dra. Clélia Ferreira pelas valiosas discussões e sugestões em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos de laboratório pela convivência agradável e pela troca de experiências de bancada, Érica Moreira, Dr. Fábio Tamaki, Dra. Thaís Bifano, Dr. Fabiane Cançado, Dr. Ivan Bragatto, Dr Walciane da Silva, Ticiane Damasceno, Katia Rebola e André Pimentel.

À técnica e amiga Christiane Cardoso pela importante ajuda no laboratório principalmente nas análises de bioinformática.

Aos técnicos: Gilliard de Faria, Ivanilde Marcelino, Dra. Layla Martins, Luci Navarro e Luiza Nakabayashi que sempre me auxiliaram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Alberto de Freitas Ribeiro e ao técnico Waldir Caldeira pela colaboração em experimentos de microscopia eletrônica.

Aos professores do Departamento de Bioquímica do IQ-USP por disponibilizarem os equipamentos de seus laboratórios.

Àos amigos do instituto de química, Dra. Daniela Gonzales, Daniela Cunha, Alexsandra Scalfó, Gabriela Mol e em especial à amiga Ana Laura Borges pela convivência durante meus dias de USP e São Paulo e pelas boas discussões e amizade.

A Helena Torbitoni Pazianoto pela ajuda, apoio, dedicação e companheirismo.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e carinho apesar da distância.

Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapesp, pelo suporte financeiro.

Epígrafe:

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.”

Charles Darwin

RESUMO

Moreira, N. R. **Fisiologia Molecular Intestinal de *Tenebrio molitor***. 2013. 300p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foi realizado o pirossequenciamento de duas bibliotecas de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* e as sequências foram submetidas à montagem através do programa Newbler.

Visando sanar alguns questionamentos a respeito de muitos tipos de transportadores que pudessem estar envolvidos com funções presumíveis em tamponamento luminal, absorção de nutrientes, envolvimento em mecanismos de secreção de enzimas como a α -manosidases e secreção e absorção de água, foram analisadas sequências de interesse que pudessem esclarecer os fenômenos fisiológicos em questão.

O pirossequenciamento revelou 19 sequências de **α -manosidases**. Após alinhamentos múltiplos, desconfiou-se que o contig 12 era a continuação da sequência original da α -manosidase. Utilizando-se de iniciadores apropriados, a suspeita foi confirmada e uma sequência completa foi obtida e denominada de TmMan1.

Através de cladogramas gerados com as sequências de todos os contigs obtidos, assim como de sequências representativas das famílias 38 e 47 das glicosídeos hidrolases, mostrou que todas as nossas sequências, exceto o contig 6 e 7, pertencem à família 38.

Todas as sequências com mais de 100 reads (exceto o contig 9) tiveram a sua expressão tecidual avaliada por RT-PCR. Os resultados mostraram que só são expressos no intestino ou intestino e túbulo de Malpighi, implicando na possibilidade de

serem digestivas. Dessas sequências, as únicas com peptídeo sinal são a TmMan1 (contig 12) e o contig 14 e, portanto, devem corresponder às atividades Man1 e Man2. Levando em conta o número de reads, TmMan1 deveria corresponder a Man2 e o contig 14 à Man1. É possível, embora necessite de confirmação, que os contigs 8 e 15 sejam de expressão lisossômica.

Um peptídeo sintetizado que correspondia a sequencia única da TmMan1 foi usado para gerar anticorpos, que reconheceram a Man2, mas não a Man1, confirmando a identificação de TmMan1 com a Man2. Esse anticorpo foi também utilizado para imunolocalizar a TmMan1 nas células intestinais de *T. molitor*. Os resultados mostraram que a TmMan1 é secretada de forma apócrina pela região anterior de intestino de *T. molitor*.

Esse trabalho é o primeiro que mostra a ocorrência de α -manosídeses com especificidade similar àquelas lisossômicas, mas que são secretadas apócrinamente para fora da célula, devendo agir no lúmen intestinal, removendo resíduos de manoses de oligossacarídeos manosilados.

Foram identificados 10 tipos diferentes de transportadores e na elaboração dos modelos fisiológicos só foram levados em conta aqueles expressos exclusivamente no intestino médio ou no intestino médio e túbulos de Malpighi.

A **V-ATPase** em *T.molitor* parece ser uma bomba usada para energizar muitos dos transportes ao longo do intestino médio como, por exemplo, o de oligopeptídeos. Já as **bombas de Na⁺ e K⁺** são responsáveis pelo equilíbrio de cargas e, portanto estão presentes na maioria dos tipos celulares.

Duas sequências de **cotransportadores de oligopeptídeos/H⁺** foram encontradas no pirosequenciamento e sua expressão é maior na região posterior, uma

vez que ali é a última possibilidade de absorção dos oligopeptídeos que ainda estiverem no lúmen, remanescentes da digestão final de proteínas.

Foi demonstrado que *T.Molitor* absorve **aminoácidos** e **açúcares** ao longo de todo o intestino médio, pois estes tipos de transportadores possuem uma expressão uniforme ao longo do intestino médio.

Já a expressão dos **transportadores de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$** em *T.molitor*, encontra-se confinada às regiões onde o pH do intestino médio do inseto é mais ácida. Também há uma expressão de **transportadores de cloreto** que se manifesta mais intensamente na região anterior. Podemos visualizar que a distribuição dos contigs dos **transportadores de bicarbonato** encontra-se mais expressiva na região posterior do intestino médio. Os resultados sugerem que a acidificação na região anterior do intestino de *T.molitor* pode resultar da secreção de NH_4^+ acompanhado do íon cloreto e a alcalinização na região posterior do lançamento no lúmen de bicarbonato. A importância dos canais de cloreto é que o mesmo balanceia as cargas e desta forma pode ser útil juntamente com o transporte de NH_4^+ , que gera uma carga no lado onde é transportado. Há absorção de água (junto com glicose) ao longo de todo o intestino médio, enquanto que a secreção de água ocorreria apenas nos dois terços finais do intestino médio com o auxílio de **aquaporinas** complementado por transportadores de íons, teria como consequência a absorção líquida de água na região anterior e uma secreção líquida no final do intestino médio. Isso esclarece qual a base molecular para a ocorrência do contrafluxo intestinal evidenciado por experimentos fisiológicos.

Palavras-chave: Transportadores, fisiologia molecular, α -manosidases, α -glicosidases, pirosequenciamento

ABSTRACT

Moreira, N.R **Midgut molecular physiology of *Tenebrio molitor***. 2013.300p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pyrosequencing was performed with two cDNA libraries in the midgut of *Tenebrio molitor* and the sequences were subjected to assembly with the Newbler program.

In order to tackle questions concerning proteins which may be involved in midgut buffering, nutrient absorption, in the secretion of enzymes such as α -mannosidases, and water absorption and secretion, sequences of interest were analyzed in order to clarify those physiological phenomena.

The pyrosequencing revealed 19 sequences of α - mannosidases. After multiple alignments, it was suspected that the contig 12 was the continuation of the original sequence of the α -mannosidase. Using appropriate primers, the hypothesis was confirmed and a complete sequence was obtained and named TmMan.

Through cladograms generated from the sequences of the contigs obtained, as well as of sequences representing families 38 and 47 of glycoside hydrolases, it was showed that all sequences except the contig 6 and 7 belong to family 38.

All sequences with over 100 reads (except contig 9) had their tissue expression assessed by RT-PCR. The results showed that they are expressed only in the midgut or midgut and Malpighian tubules, implying the possibility of having a digestive function. Among these sequences, the only ones with a signal peptide are TmMan1 (contig 12) and contig 14 and therefore they should correspond to the activities Man1 and Man2.

Taking into account the number of reads, TmMan1 should correspond to Man2 and contig 14 to Man1. It is possible, though it requires confirmation, that the contigs 8 and 15 are lysosomal.

A peptide corresponding to the unique sequence TmMan1 was synthesized and used to generate antibodies that recognized Man2, but not Man1, confirming the identification of TmMan1 with Man2. This antibody was also used to immunolocalize TmMan1 in the midgut cells of *T. molitor*. The results showed that TmMan1 is secreted in an apocrine way by the anterior region of *T. molitor* midgut.

This is the first study that shows the occurrence of α -mannosidases with similar specificity to those lysosomal, but that are secreted in an apocrine way, acting in the midgut lumen, removing mannoses from mannosylated oligosaccharides.

We identified 10 different types of carriers and in the development of physiological models it was only taken into account those expressed exclusively in the midgut or midgut and Malpighian tubules.

The V-ATPase in *T. molitor* appears to be a pump used for powering many transports along the midgut, as of oligopeptides. The Na^+ and K^+ pumps are responsible for charge load balancing and therefore are present in most cell types.

Two sequences of oligopeptide / H^+ cotransporters were found in the transcriptome and their expression is higher in the posterior region. This agrees with the fact that there is the last possibility of oligopeptides remaining in the lumen to be absorbed.

It is highly probable that *T. molitor* absorbs amino acids and sugars throughout the midgut, once these types of carriers have a uniform expression throughout the midgut.

The expression of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ transporters in *T.molitor* is confined to the regions where the pH of the insect midgut is more acidic. There is also chloride transporter expression there. The expression of bicarbonate transporters is more significant in the posterior midgut. The results suggest that acidification in the anterior *T.molitor* midgut may result from the secretion of NH_4^+ and chloride ions together, whereas the alkalization in the posterior midgut results from bicarbonate release.

There is water absorption (along with glucose) throughout the midgut, while the water secretion occurs only in the final two-thirds of the midgut with the aid of aquaporins, complemented by ion transporters. It would result in the net absorption and net secretion of water in the anterior and posterior midgut, respectively. This clarifies the molecular basis of the midgut countercurrent fluxes evidenced by physiological experiments.

Keywords: Transporters, molecular physiology, α -mannosidases, α -glucosidase, Pyrosequencing

Sumário

1. Introdução_-----	17
1.1. Considerações gerais-----	17
1.2. O surgimento da transcriptômica-----	20
1.3. Sequenciadores de nova geração (new generation sequencing- NGS)-----	20
1.4. Pirosequenciamento de DNA-----	22
1.5. RNA-Seq – histórico e aplicações-----	26
1.6. Seqüenciamento aleatório de etiquetas de sequências expressas (ESTs)-----	27
1.7. Fisiologia molecular intestinal da larva de <i>T.molitor</i> -----	29
1.7.1. Estrutura e compartimentalização do tubo digestivo-----	29
1.7.2. Membrana peritrófica-----	31
1.7.3. Quitina-----	32
1.7.4. Peritrofinas-----	33
1.8. Transporte através da membrana celular-----	38
1.9. Família dos transportadores de soluto (SLC)-----	40
1.10. Transportadores-----	41
1.10.1. Transportadores de aminoácidos-----	41
1.10.2- Transportadores de bicarbonato-----	42
1.10.3. Transportadores de açúcar-----	44
1.10.4- Canais de cloreto-----	46
1.10.5. Canais de potássio-----	47
1.10.6- Cotransportador de K ⁺ /Cl ⁻ -----	50
1.10.7. V-ATPase-----	52
1.10.8. Transportador de amônia-----	54
1.10.9- Aquaporinas-----	56
1.10.10. Simportador de H ⁺ /oligopeptídeos-----	58
1.10.11. Na ⁺ /K ⁺ ATPase-----	60
1.11. α-manosidases e α-glicosidases-----	61
1.12. Método de detecção óptico por ressonância de Plasmons de superfície (SPR) histórico e princípio-----	65
2. Objetivos-----	68
3. Materiais e métodos-----	69

3.1. Manutenção e cultivo da colônia de <i>Tenebrio molitor</i> -----	69
3.2. Preparação da membrana peritrófica de <i>Tenebrio molitor</i> -----	69
3.3. Centrifugação diferencial de homogeneizado de tecidos do intestino médio (fracionamento celular)-----	70
3.4. Determinação da concentração de proteínas-----	71
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteínas (SDS-PAGE)-----	71
3.6. Produção de anticorpos policlonais-----	71
3.7. Western Blot-----	73
3.8. Dissecção dos tecidos, extração de RNA total de <i>Tenebrio molitor</i> ----- -----	74
3.9. Tratamento do RNA total com DNase para produção de cDNA para pirosequenciamento-----	75
3.10. Purificação do RNA total após tratamento com Turbo™ DNase---	75
3.11. Quantificação de RNA total e mRNA por Ribogreen -----	75
3.12. Purificação de mRNA-----	76
3.13. Análise da qualidade do RNA total e mRNA-----	76
3.14. Síntese de cDNA-----	76
3.15. RT-PCR semi-quantitativo-----	77
3.16. Programas de bioinformática-----	78
3.16.1. BLAST -----	78
3.16.2. ClustalW-----	78
3.16.3. Newbler -----	78
3.16.4. dCAS-----	79
3.16.5. Curagem das sequências-----	81
3.17. Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular-----	82
3.18. Imunoensaios-----	82
3.18.1. Plaqueamento e indução das bibliotecas de cDNA -----	82
3.18.2. Imunoensaio nas membranas de nitrocelulose-----	83
3.18.3. Coleta dos clones positivos-----	83
3.18.4. Excisão do plasmídeo p-Bluescript -----	84
3.19. Seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA (transcriptoma do intestino médio de <i>T.molitor</i> -----	86

3.19.1. Excisão <i>in vivo</i> do plasmídeo Bluescript-----	86
3.20. PCR-----	87
3.21. Eletroforese em gel de agarose para separação de DNA-----	88
3.22. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas-----	88
3.22.1. Expressão do das proteínas recombinantes CBD2 e CBD3 em Escherichia coli -----	88
3.22.2. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes CBD2 e CBD3-----	89
3.22.3. Purificação das proteínas recombinantes solúveis CBD2 e CBD3-----	89
3.22.4. Purificação das proteínas do precipitado de CBD2 e CBD3----- -----	90
3.22.5. Quantificação das proteínas recombinantes e métodos para Produção de anticorpos policlonais -----	91
3.23. Ensaio de interação dos CBDs com quitina -----	92
3.24. Determinação das atividades enzimáticas sobre os substratos 2 α - manobiose, 3 α -manobiose, 6 α -manobiose-----	93
3.25. Microscopia eletrônica-----	95
4. Resultados e discussão-----	96
4.1- Análises gerais das qualidades dos RNAs utilizados para o Pirossequenciamento de cDNA do intestino médio de <i>Tenebrio molitor</i> --	96
4.1.1. RNA total e ribossomal-----	96
4.1.2. mRNA de <i>T.molitor</i> -----	97
4.1.3. Análises gerais do pirossequenciamento 454 e montagem dos contigs-----	99
4.1.4. Gene Ontology (GO) e funções das proteínas-----	101
4.1.5. Identificação dos transcritos mais abundantes no intestino médio de <i>T.molitor</i> -----	105
4.2. Processamento, análise, categorização e caracterização do transcriptoma do intestino médio de <i>Tenebrio molitor</i> -----	107
4.3. Considerações gerais sobre a técnica de imunoscreening e os resultados obtidos-----	118
4.3.1. Proteínas presentes nas preparações de membrana peritrófica de <i>Tenebrio molitor</i> -----	121

4.3.2. Identificação de proteínas presentes na fração P1 do fracionamento celular isotônico do epitélio anterior e médio de <i>Tenebrio molitor</i> -----	131
4.3.3. Identificação de proteínas presentes na fração P3 do fracionamento celular isotônico do epitélio anterior e médio de <i>Tenebrio molitor</i> -----	154
4.3.4. Resultados da união das sequências obtidas no sequenciamento ao acaso e do imunoscreening da biblioteca com os anticorpos anti-MP, anti-fração P1 e anti-fração P3 -----	157
4.4. Transcritos codificantes de proteínas importantes identificadas no intestino médio de <i>T. molitor</i> -----	158
4.4.1. Transportadores-----	158
4.4.1.1. Transportadores de açúcar-----	159
4.4.1.2. Transportadores de aminoácidos-----	166
4.4.1.3. Transportadores de bicarbonato-----	172
4.4.1.4. Canais de cloreto-----	175
4.4.1.5. Canais de Potássio-----	179
4.4.1.6. Cotransportador de K ⁺ /Cl ⁻ -----	182
4.4.1.7. V-ATPase-----	185
4.4.1.8. Transportador de amônia-----	187
4.4.1.9. Aquaporinas-----	190
4.4.1.10. Simportador de H ⁺ /oligopeptídeos-----	193
4.4.1.11. Na ⁺ /K ⁺ ATPase-----	195
4.5. Enzimas digestivas-----	197
4.5.1. α-Manosidase-----	197
4.5.1.1. Caracterização, origem e função das α-manosidases digestivas de <i>Tenebrio molitor</i> .-----	197
4.5.1.2. Estudo da especificidade por substrato das α-manosidase de <i>Tenebrio molitor</i> -----	210
4.5.1.3. Teste da eficiência do anticorpo produzido contra α-manosidase e Imunocitocalização-----	215
4.5.2. α-Glicosidases-----	220
4.5.3. Peritrofinas-----	228

4.5.3.1. Identificação, seqüenciamento e análise dos cDNAs que codificam peritrofinas do intestino médio de <i>Tenebrio molitor</i> ----	228
4.5.3.2. Análise da sequência da peritCBD2CBD3 de <i>Tenebrio molitor</i> -----	231
4.5.3.3. Clonagem, expressão e purificação de alguns CBDs da itrofina majoritária de <i>Tenebrio molitor</i> -----	233
4.5.3.4. Purificação e produção de anticorpo utilizando os corpos de inclusão das bactérias contendo CBD2 e CBD3-----	244
4.5.3.5. Espectros de fluorescência do CBD2 e CBD3-----	247
4.5.3.6. Ensaio de interação entre quitina coloidal e domínios ligante de quitina (CBD) -----	249
4.5.3.7. Medida da interação de peritrofinas com quitosana utilizando a técnica de Ressonância plasmônica de superfície----	251
5. Discussão geral-----	257
5.1. α -manosidase-----	257
5.2. Fisiologia molecular intestinal-----	258
5.2.1 Considerações gerais -----	258
5.2.1 Transporte facilitativo e ativo de íons-----	259
5.2.3 Transporte de nutrientes-----	262
5.2.4 Tamponamento do pH luminal -----	265
5.2.5 Bases moleculares dos contrafluxos intestinais-----	269
5.2.6 Comentários finais-----	273
6. Referências bibliográficas-----	274

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

Os insetos são organismos muito bem sucedidos, que se adaptaram aos mais variados nichos ecológicos durante a sua longa história evolutiva. Isso resultou em uma irradiação de diversidade muito grande, no que diz respeito a aspectos morfológicos e fisiológicos, nesse grupo de animais.

Alguns insetos produzem substâncias úteis ao homem, como o mel, a cera e a seda. Outros são detritívoros e alguns são polinizadores de plantas. Muitos insetos são considerados daninhos porque transmitem doenças (mosquitos, moscas), danificam construções (térmitas) ou destroem colheitas (gafanhotos, gorgulhos) e muitos entomologistas econômicos e agrônômicos se preocupam com várias formas de lutar contra eles, por vezes usando inseticidas, mas cada vez mais, investigando métodos de biocontrole. *Tenebrio molitor*, o qual é o inseto objeto de estudo deste projeto é um das pragas de grãos estocados e que pode gerar enormes prejuízos para os produtores.

O número de espécies de insetos existentes é estimado em 1 milhão (Barnes e Rupert, 1996), representando cerca de 70% das espécies vivas de animais conhecidas. Entre essas, 90.000 são consideradas pragas para populações humanas (Gallo *et al.*, 1988). Na agricultura, além de sugar a seiva e ingerir fragmentos de folhas, disseminam doenças que podem aniquilar uma lavoura inteira. No Brasil, os prejuízos na produção agrícola vão de 7 a 79% dependendo da cultura considerada (Pfadt, 1978; Gallo *et al.*, 1988 e CNA, 2013), pois o clima do país da condições para insetos-praga causarem danos consideráveis e prejudicarem boa parte da colheita. Segundo CNA, a produção agrícola do país, na safra 2013/2014, poderá ser afetada devido à forte incidência de três pragas de difícil controle. São os casos da lagarta *Helicoverpa armigera*, da “mosca branca” e da “ferrugem asiática” que atacam e afetam a produtividade de culturas como as da soja, algodão, feijão e milho, em diferentes regiões produtoras do país. Esse é o diagnóstico preliminar da Comissão Nacional de Cereais, Fibras e Oleaginosas, da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA).

Os inseticidas químicos selecionam indivíduos que tem mutações naturais em enzimas que desintoxicam produtos químicos, como os herbívoros (Coleoptera e principalmente Lepidoptera), que se adaptaram para resistir ao grande arsenal químico

de defesa das plantas. Os verdadeiros afetados são os insetívoros, ou seja, os insetos que se alimentam de outros insetos, pois estes não têm a mesma defesa química. Dessa forma além de eliminar os inimigos naturais, selecionamos artificialmente, de forma global, pragas cada vez mais resistentes a agentes químicos (Burg e Mayer., 1999).

Cada vez mais o uso indiscriminado de praguicidas faz surgir ainda a médio e longo prazo, efeitos de poluição ambiental e, pelo uso de dosagens e de alvos inadequados, resistência de artrópodes a esses produtos com o consequente desequilíbrio biológico.

Pelo exposto acima fica claro o quanto o desenvolvimento de outras formas de controle de insetos é necessária.

Os estudos da função intestinal foram particularmente estimulados após a conscientização de que o tubo digestivo é uma enorme interface relativamente pouco protegida entre o inseto e o meio ambiente. Assim uma compreensão da função intestinal foi considerada essencial para o desenvolvimento de métodos de controle que agem através do intestino, tais como o uso de plantas transgênicas para controlar insetos fitófagos.

O desenvolvimento do setor passa pela ampliação do conhecimento dos eventos moleculares subjacentes aos fenômenos fisiológicos intestinais, o que requer conhecimento das enzimas digestivas em detalhe estrutural, assim como de proteínas associadas a outras funções intestinais tais como: transportadores, receptores, bombas, proteínas relacionadas aos mecanismos de secreção, e ainda de proteínas de compõem a membrana peritrófica dos insetos. Estamos atrás de detalhes da estrutura e função destas proteínas.

Quando consideramos a biodiversidade global representada dentro de banco de dados de sequências (como por exemplo, o NCBI), muitas seqüências são atribuídas a espécies modelos de insetos como a *Drosophila melanogaster* ou espécies de interesse econômico ou relacionado a problemas com a saúde pública como é o caso do *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae*, pois são insetos vetores de doenças (figura 1). Isso naturalmente coloca limitações quanto ao alcance de análises

comparativas que podem ser realizadas usando as sequências de DNA ou de proteínas de insetos disponíveis.

A

▼ Top Organisms [Tree]

Drosophila melanogaster (125906)
Anopheles gambiae (46227)
Drosophila simulans (43539)
Culex quinquefasciatus (38522)
Drosophila pseudoobscura (37998)
All other taxa (1431891)
Drosophila melanogaster (125906)
Anopheles gambiae (46227)
Drosophila simulans (43539)
Culex quinquefasciatus (38522)
Drosophila pseudoobscura (37998)
Aedes aegypti (36674)
Drosophila yakuba (34592)
Drosophila pseudoobscura pseudoobscura (34158)
Drosophila persimilis (34156)
Drosophila sechellia (33594)
Drosophila ananassae (31639)
Drosophila willistoni (31393)
Drosophila mojavensis (30626)
Drosophila erecta (30613)
Drosophila grimshawi (30183)
Drosophila virilis (30040)
Anopheles gambiae str. PEST (28693)
Tribolium castaneum (27380)
Pediculus humanus (22322)
Pediculus humanus corporis (21790)
All other taxa (996538)

Less...

B



Figura 1: Na letra A temos a lista de espécies de insetos representados no banco de dados de ESTs em Julho de 2013 e entre parênteses o número de ESTs correspondentes. Na letra B temos a árvore filogenética correspondente das espécies da letra A.

O aprofundamento e a introdução da amostragem de novos conjuntos de táxons pode nos oferecer uma visão melhor dos processos funcionais e evolutivos fundamentais para a vida dos insetos (Rudd., 2003).

O desenvolvimento da linha de pesquisa em que este projeto se enquadra busca identificar sítios específicos intestinais afetem os insetos. Para isso tem havido um

grande esforço na ampliação dos conhecimentos envolvendo as enzimas digestivas (a sua distribuição espacial e os seus mecanismos de secreção), assim como de aspectos da biologia celular das células intestinais e da fisiologia molecular intestinal dos insetos.

1.2. O surgimento da transcriptômica

Os projetos genoma estão revolucionando a maneira como a biologia e a medicina serão exploradas nesse século (Collins *et al.*, 1998). Com o seqüenciamento total do genoma humano e de outras espécies e a disponibilidade das bibliotecas de cDNA, abriu-se a possibilidade de uma nova estratégia para a genética, que está sendo chamada de genômica funcional, a interpretação da função das seqüências de DNA numa escala genômica. A caracterização em larga escala de transcritos (RNAs) e suas proteínas resultantes está bem dentro da análise funcional do genoma. É bastante razoável pensarmos que o seqüenciamento e a análise dos níveis de expressão de todos os genes de um organismo devem ser tomados como alta prioridade. Por analogia com o termo genoma, que representa o conjunto completo dos genes (DNA) de um organismo, criou-se o termo transcriptoma, que representa o conjunto completo dos transcritos (RNAs). Recursos metodológicos para enfrentar esses desafios estão sendo padronizados com sucesso. Dentro da análise dos transcriptomas, o primeiro recurso disponível foram as bibliotecas de DNAs complementares (cDNA), ou seja, um conjunto de clones (de fagos ou plasmídeos) que abrigam cópias, se possível, de todos os RNAs mensageiros de uma linhagem celular ou órgão na forma de cDNA (http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio06/6_e.pdf>. Acesso em 01 de dezembro de 2011).

1.3. Sequenciadores de nova geração (new generation sequencing- NGS)

Desde a publicação do *draft* do genoma humano (Venter *et al.*, 2001), a capacidade de geração de dados genômicos tem crescido intensivamente, guiados principalmente pelo desenvolvimento de novas tecnologias de seqüenciamento de DNA, os chamados “sequenciadores de nova geração”. Existem atualmente diversas tecnologias disponíveis no mercado, voltadas para o sequenciamento de DNA em larga

escala. Estas tecnologias diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados, à precisão de bases, à tecnologia de operação, ao tamanho de fragmento gerado por leitura e ao custo operacional; sendo que a escolha da tecnologia deve basear-se principalmente no suprimento dos dados necessários para a abordagem experimental (Maclean et al., 2009) (Tabela 1).

A empresa Roche foi a primeira a lançar no mercado, em 2005, uma tecnologia de seqüenciamento de DNA em larga escala (o equipamento 454 GS20), baseada na tecnologia de piroseqüenciamento. No início de 2007, foi a vez de a empresa *Illumina* disponibilizar a sua primeira plataforma (Solexa GA). E, posteriormente, as plataformas SOLiD e Heliscope foram apresentadas pelas empresas *Applied Biosystems* e *Helicos*, respectivamente. Desde então, todas estas empresas voltaram suas pesquisas no aprimoramento de suas tecnologias, levando a um processo contínuo de atualização de plataformas capazes de gerar um volume de dados cada vez maior, com maior precisão de bases e/ou tamanho de *reads* maiores. Dentre estas tecnologias, a Heliscope, juntamente com a tecnologia ainda em desenvolvimento pela empresa *Pacific biosciences*, destacam-se por serem as únicas capazes de seqüenciar moléculas únicas de DNA- "*Single molecule sequencer*". Tais tecnologias mostram-se como promissoras, uma vez que possibilitam o seqüenciamento de moléculas de DNA, sem a necessidade de um processamento de pré-amplificação, o qual é comum às outras tecnologias citadas acima, e por vezes criticadas por alguns autores devido ao favorecimento de *amplicons*.

Tabela 1 - Resumo das características dos seqüenciadores de nova geração

	Sanger	454	Solid	Illumina
Química do Sequenciamento	Terminadores de cadeia marcados com fluoróforos	Pirosequenciamento	Sequenciamento por ligação	Sequenciamento por síntese com base em polimerase
Abordagem de amplificação	Clonagem in vivo	PCR em emulsão	PCR em emulsão	Amplificação em ponte
Tamanho das leituras	~650 pb	~200-500 pb	~25-35 pb	35-100 pb
Número de leituras por corrida	384	200.000-400.000	200 milhões sequencias de pares	8X 10.000.000
Números de dados gerados por corrida	290 kb	~300 Mb	> 15Gb	~7 Gb
Tempo por corrida	1 h	5 hrs	10 dias	3-7 dias
Sequências de Pares	sim	sim	sim	sim
Custo por corrida	£ 192	£ 3500	£ 7000	£ 6000
Custo por bases	£ 1500	£ 87,50	£ 0.90	£ 1.70
Acurácia do sequenciamento	>99,9	99,5	99,94	98,5

Fonte: Thomas D. Otto, Patogen Genomics.

1.4. Pirosequenciamento de DNA

O princípio da tecnologia de pirosequenciamento de DNA foi introduzido por Hyman (1988). Entretanto, foi somente em 2005 que Margulies e colaboradores, trabalhando junto ao 454 *Life Science corp.* desenvolveram o primeiro seqüenciador de segunda geração disponível no mercado, empregando esta bioquímica de processamento. Para mostrar a eficiência do equipamento produzido, os autores seqüenciaram e montaram o genoma completo da bactéria *Mycoplasma genitalium* (508.069 bases), com 96% de cobertura e 99,96% de precisão de bases, em um único processamento de 4 horas.

Este primeiro equipamento disponibilizado pela 454 *life sciences corp* foi o *Genome Sequencer 20 System*, capaz de produzir 200.000 reads, com tamanho médio variando entre 100 - 120 bases, em apenas 4,5 h de processamento. Posteriormente,

esta plataforma foi atualizada para GS FLX, a qual é capaz de produzir até 400.000 reads por processamento, com tamanho médio entre 350-450 bases, em um processamento de 10 horas. Tais avanços tem se mostrado contínuos, não somente por parte da 454 *Life science corp.* como por parte de tecnologias e empresas concorrentes (i.e. SOLiD, Solexa), as quais, de maneira geral, competem no mercado baseando-se na relação tamanho de fragmento/precisão de bases, os quais são específicos de cada tecnologia.

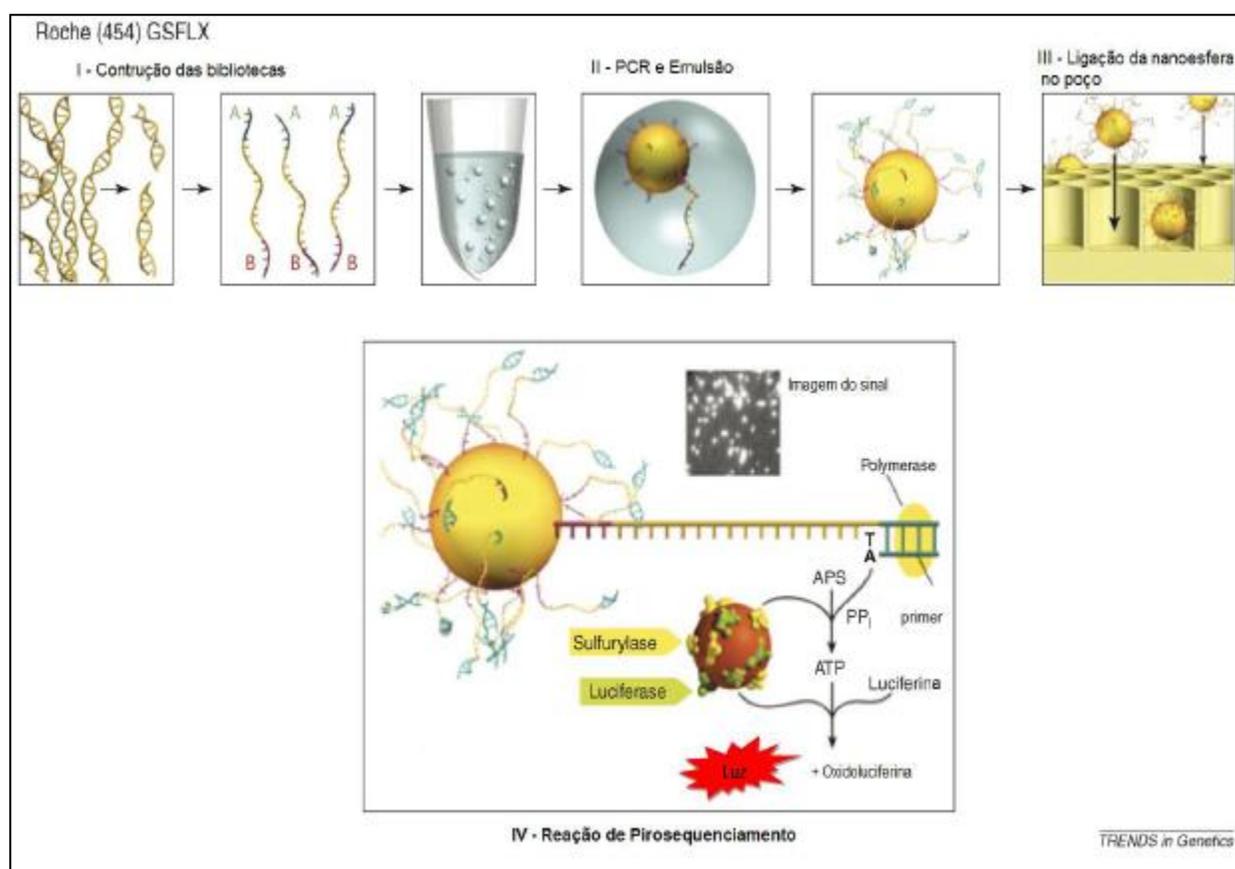


FIGURA 2. Pirosequenciamento. Fonte: Mardis, Trends in Genetics, v. 24, n.3, 2007.

I Construção das bibliotecas – Genoma é fragmentado por nebulização, não existe a necessidade de selecionar colônias. O DNA simples fita é criado com adaptadores A e B que são usados como primers para ligação nas nanoesferas. A seleção dos fragmentos A/B é feita através de purificação por streptavidina-biotina

II PCR em Emulsão – O DNA simples fita é capturado pelas nanoesferas. A emulsão contendo os reagentes de PCR formam microreatores para a clonagem do fragmento.

III Ligação da nanoesfera no poço – Cada poço recebe uma nanoesfera com os fragmentos de DNA simples fita clonados. O diâmetro de cada poço possui 44 μm contendo 200.000 leituras em paralelo.

IV Reação de Pirosequenciamento – Anelamento da polimerase no primer, incorporação dos dNTPs e liberação do PP_i que é convertido a ATP pela sulfurylase. O ATP fornece energia a luciferase oxidar a luciferina em oxiluciferina gerando luz. Por fim a apirase hidrolisa os dNTPs excedentes limpando o poço para um nova incorporação.

Adicionalmente ao seqüenciamento de genomas, mais recentemente a 454 lançou um protocolo específico para o seqüenciamento de cDNA, partindo de amostras de mRNA. Esta metodologia, comumente chamada de RNA-Seq, tem possibilitado a obtenção de um amplo perfil de expressão gênica em isolados bacterianos (i.e. transcriptômica) e também da expressão gênica em diferentes tecidos de um mesmo organismo.

A leitura da sequência nesse sistema de pirosequenciamento é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz (figura 2) capturado por uma câmara CCD (*charge-coupled device*) acoplada ao sistema.

O sistema requer que o DNA seja mecanicamente fragmentado em seqüências de 300 – 800pb, transformado em fragmentos abruptos fosforilados e ligado a adaptadores de seqüência específica (Figura 2). A biblioteca de DNA da amostra é ligada a adaptadores A e B nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos, respectivamente, os quais são utilizados nas etapas posteriores de isolamento dos fragmentos (A-B) e amplificação e nas reações de seqüenciamento. O adaptador B possui biotina ligada à extremidade 5', o que permite o isolamento dos fragmentos ligados ao adaptador A na extremidade 3' e adaptador B na extremidade 5' na amostra. Somente os fragmentos AB são eluídos na reação de purificação e são especificamente ligados às microesferas que carregam várias cópias da seqüência complementar exata ao adaptador B de um único fragmento (Margulies, et al., 2005). O outro adaptador é utilizado no anelamento do *primer* que inicia a reação de seqüenciamento. As microesferas ligadas aos fragmentos únicos de fita simples são então emulsionadas em uma mistura de água e óleo com reagentes de PCR para amplificação clonal do fragmento fita simples em cerca de 1 milhão de cópias. Na PCR em emulsão, o óleo em solução aquosa forma micelas, nas quais as microesferas são capturadas. Cada micela funcionará como um microrreator, produzindo muitas cópias idênticas de um mesmo fragmento isoladamente em um microsuporte (Dressman et al., 2003).

Após a PCR de emulsão, as microesferas ligadas aos fragmentos de fita simples são depositadas em poços distintos em uma placa de sílica, onde os reagentes para o sequenciamento são distribuídos. As reações de sequenciamento ocorrem em cada poço, para um único tipo de fragmento ligado à microesfera, não havendo, portanto, competição por reagentes com outros fragmentos da biblioteca. A placa de sequenciamento é dividida em 1,6 milhões de poços com diâmetro suficiente para alojar uma única microesfera (Figura 2).

A placa de sequenciamento é inserida junto ao sistema óptico de leitura no equipamento. Os reagentes e as soluções de sequenciamento são então distribuídos por toda a placa a cada ciclo para obtenção do sequenciamento paralelo dos 1,6 milhões de poços. O sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal um reflexo do número de nucleotídeos desse tipo específico que foram sucessivamente incorporados na molécula. Como o nucleotídeo que é adicionado a cada ciclo é conhecido, o sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação de sequência (Ronaghi, 2001).

Os fragmentos sequenciados nessa plataforma passam por sistemas de análise de qualidade em que sequências distintas oriundas do sequenciamento de uma única microesfera são eliminadas, bem como as leituras em que a sequência inicial TCGA (quatro primeiros nucleotídeos dos adaptadores) não aparece. O Kit utilizado para fazer os experimentos com os insetos do nosso estudo geram leituras de cerca de 400pb e no último lançamento da Roche leituras maiores que 800pb são conseguidas. Esse aprimoramento das leituras advém de otimizações nas reações químicas do pirosequenciamento, as quais reduzem o ruído de fundo e aumentam o número de leituras por corrida, e do novo desenho do suporte de seqüenciamento (*PicoTiterPlate*), o qual agregou duas mudanças principais: o uso de uma estrutura metálica, permitindo leituras mais acuradas, e esferas ainda menores, aumentando, tanto o tamanho das leituras, quanto o número de leituras por corrida (ROCHE, 2008).

Uma limitação importante da plataforma 454 é a baixa eficiência na determinação de homopolímeros. Como a intensidade do sinal de fluorescência relaciona-se ao

número de vezes que um determinado nucleotídeo é repetido mais de três vezes torna-se imprecisa.

1.5. RNA-Seq – histórico e aplicações

O “transcriptoma” pode ser definido como sendo o conjunto completo de transcritos em uma célula, e suas quantidades, em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica (Wang et al., 2009), incluindo, portanto RNA codificante (mRNA) e não codificante (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório, e outros tipos de RNAs). Assim sendo, desde o início da biologia molecular, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição nas células (Seshasayee et al., 2006), uma vez que a alteração nos níveis de expressão está diretamente relacionada à modificações na fisiologia, metabolismo e conseqüentemente ao processo de adaptação celular (Van Vliet, 2010).

Até recentemente, a aplicação de técnicas moleculares baseadas em microarranjos de DNA eram as mais eficientes ferramentas para a determinação de um amplo padrão de expressão gênica a nível celular (Hinton et al., 2004). Entretanto, algumas limitações no uso desta tecnologia têm surgido (Bloom et al., 2009), como por exemplo, a especificidade do arranjo para cada isolado, a saturação do fundo (*background*) e a qualidade e densidade variáveis dos *spots*; fatores os quais têm dificultado a análise comparativa entre experimentos e, geralmente, levados a necessidade de métodos normalizadores complexos (Hinton et al., 2004). Devido a isto, a aplicação de seqüenciamento de cDNA surgiu como uma alternativa eficiente para solucionar estes problemas, bem como para suprir dados transcriptômicos independentemente da necessidade de uma seqüência genômica de referência previamente descrita.

O seqüenciamento de cDNA inicialmente era feito por técnicas como Sanger ou bibliotecas de ESTs, mas esta abordagem possui um rendimento relativamente baixo, com custo elevado, dispendioso e geralmente não são quantitativos. Desta forma, foi somente após o surgimento de protocolos específicos aplicados para a síntese e

sequenciamento de cDNA em larga escala, que a tecnologia RNA-Seq tornou-se possível, levando à obtenção de uma alta resolução em perfis transcriptômicos.

Os recentes avanços das tecnologias de seqüenciamento de DNA têm possibilitado uma revolução nos mais diversos contextos das ciências biológicas, em especial àqueles aplicados à transcriptômica. Desta forma, as plataformas atuais de seqüenciamento em larga escala vêm sendo empregadas na área de fisiologia intestinal de insetos com o objetivo de compreender melhor a ampla diversidade dos tipos de ordens de insetos e especializações dos tubos digestórios destes, visando encontrar características principais nas expressões gênicas e componentes chaves, do intestino médio de insetos, responsáveis por fenômenos intrigantes, mas com sua base molecular ainda desconhecida. Também pretendemos encontrar moléculas responsáveis por fenômenos fisiológicos como transporte de nutrientes, secreção de enzimas digestivas, receptores e bombas.

Com o auxílio das novas plataformas de seqüenciamento podemos também realizar um *northern* digital, pois estes são métodos quantitativos além de qualitativo e desta forma, podemos identificar regiões de expressão de mRNAs específicos.

1.6. Seqüenciamento aleatório de etiquetas de sequências expressas (ESTs)

Além da técnica moderna de pirosequenciamento, ao longo dessa tese foram utilizadas outras técnicas como o sequenciamento aleatório de etiquetas de sequência expressas.

A geração rápida de sequências de leitura simples a partir das porções 3' e 5' de mRNAs suficientemente expressos (popularmente conhecidos como ESTs, isto é, etiquetas de sequências expressas) (Adams et al. 1991; Okubo et al. 1992; Wilcox et al. 1991) resultou na descoberta de muitos genes, antes mesmo da conclusão do projeto genoma e do esforço para o sequenciamento de outros organismos (Adams et al. 1992; Matsubara e Okubo 1993; Venter 1993).

ESTs são tipicamente não editados, processados automaticamente e seqüências de leitura únicas produzidas a partir de cDNA (pequenas moléculas de DNA transcritas reversamente a partir da população de mRNA.). Bibliotecas de cDNA são

rotineiramente preparadas e contêm dezenas de milhares de clones, exemplificando uma variedade de tipos de tecidos específicos que representam a expressão do gene durante estágios de desenvolvimento específicos e frente a desafios bióticos e abióticos. O baixo preço do sequenciamento de EST e sua automação freqüentemente fazem do sequenciamento do EST a mais atrativa rota para a amostragem ampla de um transcriptoma (Rudd., 2003).

Dessa forma, a utilização de dados de EST tem aumentado consideravelmente para que se possa explorar o máximo de informação desta fonte de dados e isso se tornou possível devido ao estabelecimento das bases de dados centralizada (Boguski et al., 1993).

ESTs foram por muito tempo o maior número componente dos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos obtidas a partir de genomas, em termos do número de seqüências e da contagem total de bases. ESTs fornecem uma fonte de seqüência bruta (sem muito tratamento), que podem ser bastante exploradas para a descoberta de genes, anotações de genoma e genômica comparativa.

O conceito de usar cDNAs como uma rota para acelerar a descoberta de genes foi pela primeira vez demonstrado no começo dos nos 80. Mark Adams foi o primeiro a usar o termo EST em relação à descoberta de genes e no projeto genoma humano em 1991 (Adams et al., 1991).

Quando consideramos a biodiversidade global representada dentro das bibliotecas de EST, muitas seqüências são atribuídas a espécies modelos de insetos como a *Drosophila melanogaster* ou espécies de interesse econômico ou relacionado a problemas com a saúde pública como é o caso do *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, pois são insetos vetores de doenças. Isso naturalmente coloca limitações quanto ao alcance de análises comparativas que podem ser realizadas usando as seqüências de EST de insetos disponíveis.

A necessidade de uma amostragem mais uniforme dentre os insetos tem sido discutida e há muitos genomas ideais para se fazer um sequenciamento genômico completo. Com as complicações de se fazer um sequenciamento genômico completo, o aprofundamento e a introdução da amostragem de novos conjuntos de táxons pode nos

oferecer uma visão melhor dos processos funcionais e evolutivos fundamentais para a vida dos insetos (Rudd., 2003).

1.7. Fisiologia molecular intestinal da larva de *T.molitor*

1.7.1. Estrutura e compartimentação do tubo digestivo

O intestino dos insetos é dividido em três regiões: anterior, médio e posterior (ver esquema na figura 3, para maiores detalhes ver Chapman, 1985). O intestino anterior começa na boca e inclui a cavidade bucal (no qual as glândulas salivares liberam sua secreção), a faringe, o esôfago e o papo. O papo é um órgão de estoque e, em alguns insetos, também serve como um sítio para a digestão. O intestino anterior é coberto por cutícula e, em alguns casos, pode ser reduzido a um pequeno tubo. O proventrículo pode ser um órgão triturador em alguns insetos, mas na maioria das espécies costuma desempenhar apenas o papel de válvula para entrada do alimento no intestino médio.

O intestino posterior, como o anterior, também é coberto por uma cutícula. Ele inclui o íleo e o reto, que são estruturas envolvidas na absorção de água, e termina no ânus. Em alguns insetos essa estrutura é reduzida a um tubo fino, em outros ele pode ser modificado em câmaras de fermentação ou rúmen. Nessas duas ocorre a presença de microorganismos que podem ajudar na digestão da celulose.

O intestino médio representa a porção mais importante do intestino na digestão do alimento pelos insetos. Ele consiste de um tubo simples que pode apresentar extensões em forma de sacos com fundo cego, presente normalmente no início do intestino médio, denominado de cecos gástricos. Na maioria dos insetos, no interior do intestino ocorre uma estrutura membranosa em forma de tubo que envolve o alimento e de constituição quitino-protéica. Essa estrutura é denominada de membrana peritrófica (falaremos desta estrutura em separado). O intestino médio termina no piloro que é um esfíncter que separa o intestino médio do posterior. É nessa região que desembocam os tubos de Malpighi, estrutura responsável pela excreção nesses animais.



Figura 3: Diagrama Geral do tubo digestivo de insetos (de acordo com Chapman, 1985; Terra e ferreira, 1994).

A digestão nos insetos ocorre no intestino médio (ventrículo) de forma compartimentada. A digestão inicial dos polímeros (amido, proteína, etc...) ocorre no interior da membrana peritrófica (estrutura anatômica quitino-proteica que reveste o alimento no interior do ventrículo). Os oligômeros resultantes difundem-se para o espaço luminal exterior a membrana peritrófica onde são atacados por outras enzimas (carboxipeptidases, aminopeptidases) e, finalmente, na digestão final os dímeros resultantes são hidrolisados por enzimas imobilizadas na superfície do epitélio do intestino médio. Essa imobilização ocorre devido ao fato das enzimas serem integrantes de membrana em alguns insetos ou por estarem firmemente associados ao glicocálix celular em outros. Ocorre uma circulação endo-ectoperitrófica (isto é entre os espaços interiores e exteriores à membrana peritrófica) de enzimas de digestão inicial, o que leva a uma grande economia dessas enzimas, pois impede a sua excreção junto com o alimento não digerido. Essa circulação ocorre graças à secreção de água na região posterior do intestino médio (ventrículo) e sua absorção na região anterior. Dependendo

do grupo filogenético, ocorrem variações nesse esquema (Terra, 1990; Terra & Ferreira, 1994, 2005).

As larvas do besouro da farinha *T. molitor* representam o tipo mais basal dos insetos holometabólicos (metamorfose completa). Eles apresentam um ventrículo anterior ácido, onde ocorre principalmente digestão de carboidratos, e um ventrículo posterior básico responsável pela maior parte da digestão protéica. Como nos demais insetos ocorre um contra fluxo de fluido intestinal (Terra et al., 1985).

1.7.2. Membrana peritrófica

O intestino médio de insetos frequentemente contém uma membrana acelular semipermeável, a membrana peritrófica (MP) (ou matriz peritrófica), a qual separa o conteúdo do lúmen do intestino médio das células epiteliais que delimitam o intestino médio. Esta é a única região do inseto em contato com o meio externo não recoberta por cutícula (Tellam *et al.*, 1999). A MP envolve o bolo alimentar e é formada de proteínas (peritrofinas) e quitina tendo diversas funções como a de compartimentação do tubo digestivo, proteção do epitélio e ligação de toxinas (Terra, 2001; Hegedus, et al., 2009). Dentre as diversas proteínas, as peritrofinas desempenham um importante papel para a formação e manutenção da estrutura da membrana peritrófica.

Muitos insetos secretam a membrana peritrófica (Peters., 1992); entretanto, a MP é geralmente ausente em Hemiptera, Thysanoptera e adulto de Lepidoptera, e a MP é formada em outras espécies somente quando eles se alimentam (ex: fêmeas de mosquitos depois de se alimentarem de sangue) (Lehane., 1997).

Dois tipos de membrana peritrófica tem sido definidos baseado no sítio de síntese (Wigglesworth, 1930; Peters, 1992). MP do tipo 1 é sintetizada por todas as células epiteliais do intestino médio e forma uma bolsa ao redor do alimento. Tipicamente este tipo de MP é produzido em resposta direta a ingestão de alimento, mas pode ser constitutivamente produzida (Baines, 1978; Ramos *et al.*, 1994; Lehane, 1997). A MP do tipo 2 é constitutivamente produzida por um pequeno órgão altamente especializada, a cárdia, localizada na região anterior do intestino médio.

As funções dessa MP foram revistas por Terra (2001), Terra & Ferreira (2005) e testadas empiricamente por Bolognesi et al., 2001. A MP compartimenta os processos

digestivos macromoleculares, protegendo o epitélio contra efeitos deletérios de enzimas digestivas endógenas, enquanto permite a passagem de pequenos nutrientes para o espaço ectoperitrófico onde a digestão final ocorre (Terra *et al.*, 1996). A MP também funciona como um andaime para a imobilização de enzimas digestivas como as proteases, peptidases e glicosidases (Ferreira *et al.*, 1994; Wijffels *et al.*, 2001) e é a primeira linha de defesa contra substâncias tóxicas ingeridas pelo inseto e contra a invasão de patógenos (Lehane, 1997; Terra *et al.*, 1996).

1.7.3. Quitina

Quitina, o homopolímero de β -(1,4)-*N*-acetil-*D*-glicosamina (GlcNAc), é o principal componente do exoesqueleto de insetos e outros artrópodes. Quitina não é somente constituinte da cutícula de insetos (Kramer & Muthukrishnan, 1997), mas também é componente principal da membrana peritrófica, a qual é secretada pelas células endodérmicas epiteliais do intestino médio.(Arakane *et al.*, 2008),

Técnicas usadas para determinar o conteúdo de quitina não são eficientes para diferenciar entre quitina e os polissacarídeos em glicoproteínas (Adang e Spence.,1992; Peters, 1992). Tellam & Eisemann (2000) concluíram que a membrana peritrófica da larva de *L. cuprina* contém não mais que 5,3% de quitina e o baixo conteúdo de quitina foi responsável pela inabilidade da quitinase e inibidores da síntese de quitina em romper a membrana peritrófica, mas a quitina pode ser o grande componente da MP em outros insetos.

Quitina é sintetizada pela quitina sintase (QS) através da adição seqüencial de unidades de GlcNAc e parece estar presente em maiores quantidades nas membranas peritróficas do tipo 1. Esse tipo de membrana é completamente desagregado por calcoflúor (Wang & Granados, 2000).

Edwards & Jacobs-Lorena (2000) incubaram membranas peritróficas de larvas e adultos de mosquitos com quitinase. Esses autores mostraram que nas larvas, que têm membrana peritrófica do tipo 2 (pouca quitina), ela permanece intacta, enquanto que nos adultos, que têm membrana peritrófica do tipo 1 (muita quitina), há rompimento dessa estrutura.

Os trabalhos comentados acima indicam que em membranas peritróficas do tipo 2 a quitina está presente em pequenas quantidades, ou o modo como ela interage com as peritrofinas é tal que impede a ação das substâncias testadas, ao contrário do observado nas membranas peritróficas do tipo 1.

1.7.4. Peritrofinas

Análises de etiquetas de sequências expressas (ESTs) de tecidos epiteliais do intestino médio (Shi *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2007; Venâncio *et al.*, 2009), e análises de proteômica da membrana peritrófica (MP) (Campbell *et al.*, 2008; Toprak *et al.*, 2008) e componentes do lúmen do intestino médio (Paunchet *et al.*, 2008) tem identificado muitas das principais proteínas da MP.

Estimamos que o número de proteínas da MP variam muito, desde poucas até muitas dúzias (Adang & Spence, 1982., Moskalyk *et al.*, 1996). Estágios do desenvolvimento, dieta e às vezes dentro do mesmo grupo de animais, temos número de peritrofinas diferentes, mas o principal determinante é o procedimento de extração realizado.

Tellam *et al.* (1999) propôs 4 classes de proteínas da MP baseado na facilidade com a qual elas conseguem ser removidas da MP.

Proteínas da classe 1 são removidas da MP por tampões fisiológicos e representam proteínas associadas fracamente, como enzimas digestivas e/ou comida remanescente. As proteínas da classe 2 são extraídas com detergentes leves como dodecil sulfato de sódio (SDS), que rompem interações iônicas fracas, entretanto as proteínas da classe 3 são liberadas somente com desnaturantes fortes como a uréia. A classe 4 das proteínas não pode ser removida por qualquer meio e são covalentemente ligadas a outras proteínas ou a quitina.

Estas proteínas também podem ser divididas em não estruturais e estruturais (peritrofinas). Proteínas não estruturais incluem enzimas digestivas (ex: lipases, serino-proteases, exopeptidases, endopeptidases), enzimas que modificam quitina (quitina desacetilase) e outras enzimas (ex: fosfatase alcalina) (Terra *et al.*, 1979; Campbell *et al.*, 2008; Toprak *et al.*, 2008).

Peritrofinas contêm pelo menos um domínio ligante de quitina (CBD) e podem também ter domínio de mucina (MD). MDs contêm uma ou mais regiões que são ricas em resíduos de serina e treonina e exibem um alto potencial de O-glicosilação (Devine & McKenzie, 1992).

Os carboidratos associados com MD podem contabilizar 50-90% da proteína em peso (Wang & Granados, 1997b; Perez-Vilar & Hill, 1999). Resíduos de prolina existem entre os resíduos de serina e treonina, o que leva a cadeia de aminoácidos condensar numa estrutura enrolada com a porção dos carboidratos projetando-se para o exterior (Van den Steen *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2004).

Pesquisas anteriores presumem que os tipos de proteínas associadas com o tegumento e a MP devem ser similares porque ambos contêm quitina. Um motivo comum chamado de Rebers e Riddiford está presente em mais de 70% de todas as proteínas cuticulares. Este domínio forma uma estrutura de folha beta com cadeias laterais hidrofóbicas orientadas para que possam participar de interações com a quitina. Conjugação oxidativa de catecóis levam a proteína a fazer ligações cruzadas e a esclerotização da cutícula (Suderman *et al.*, 2006).

As peritrofinas, proteínas integrantes da MP e que são liberadas somente sob a ação de fortes desnaturantes, são feitas de vários domínios. O domínio principal (domínio peritrofina-A, pfam 01607, CBM_14)(CDART database) (Geer *et al.*, 2002; <WWW.ncbi.nlm.nih.gov> visitado em dezembro de 2009) é um domínio rico em cisteína com propriedades ligantes de quitina, possuindo a seqüência consenso: CX₁₃₋₂₀CX₅₋₆CX₉₋₁₉CX₁₀₋₁₄CX₄₋₁₄C (onde X é qualquer aminoácido, exceto Cys) que inclui vários aminoácidos aromáticos. Acredita-se que estes resíduos aromáticos estão envolvidos na ligação a açúcares. Os domínios peritrofina-A têm sido encontrados não somente nas proteínas peritrofinas, mas também em mucinas de insetos (Wang e Granados, 1997), no C-terminal de muitas quitinases, em algumas serina proteases relacionadas à imunidade (Gorman *et al.*, 2000), em ovário e proteínas da traquéia de *Drosophila* (Barry *et al.*, 1999) e em proteínas do baculovírus. Entretanto, inspeções manuais destas seqüências feitas por Venâncio *et al.*(2009) mostrou que proteínas da traquéia não tem CBDs verdadeiros, portanto peritrofinas são proteínas específicas da membrana peritrófica.

Outro tipo de domínio que ocorre nas peritrofinas é o domínio rico em Pro/Ser/Thr que são fortemente glicosilados e similares às mucinas. As peritrofinas podem ser formadas por um simples CBD ou por arranjos alternativos de CBDs e espaços, os quais podem apresentar comprimentos variáveis e possuem resíduos altamente glicosilados (domínios semelhantes a mucinas) (Wang e Granados, 1997 a; Shen e Jacobs-Lorena, 1998; Tellam et al., 1999, 2003).

De acordo com esta definição, a mucina intestinal de inseto descrita por Wang e Granados (1997 a,b), que apresenta um grande domínio semelhante a mucina é uma proteína semelhante a peritrofina. Apesar disso, muitos autores ainda separam as mucinas intestinais de insetos das peritrofinas, devido a sua grande extensão em espaçadores ricos em Pro/Ser/Thr (veja exemplo em Si et al., 2001).

O motivo Rebers e Riddiford (R&R consenso; PDGDYNY+YETSNGIADQETGD+KSQGETRDG++AVDVV+GSYSYVDPDGTTRTVTYTADDENGFQPVG AHL P; PFAM 00379; Rebers e Riddiford, 1988; Anderson, 2010; Karouzou *et al.*, 2007; Willis, 2010), o qual é desprovido de cisteína, não é encontrado entre as peritrofinas. Entre as peritrofinas encontramos domínios com 6, 8 e 10 resíduos de cisteína e estes são chamados de domínios peritrofina A, B, C respectivamente. Estes domínios estão envolvidos nas interações com a quitina (Tellam *et al.*, 1999). As folhas- β formadas dentro dos domínios de ligação a quitina (CDB) das peritrofinas estão ligadas por pontes dissulfeto entre as cisteínas para criar um bolso de ligação em que resíduos hidrofóbicos conservados interagem com a quitina (Figura 4). A especificidade do CDB pode influenciar na estrutura da MP, assim como proteínas ligantes de quitina podem interagir apenas com conformações específicas da quitina (Hegedus *et al.*, 2008).

O domínio peritrofina-A é encontrado em várias proteínas extraídas da MP de insetos. Este motivo pertence a família CBM14 de domínios ligantes de carboidratos (pfam 01607; Elvin *et al.*, 1996) também conhecido como domínio ligante de quitina tipo 2 (ChtBD2 = SMART 00494).

Apesar da grande maioria das proteínas com ChtBD2 encontradas até o momento estarem localizadas na MP, estudos recentes (Barry *et al.*, 1999; Behr e Hoch, 2005) encontraram estas proteínas com ChtBD2 na cutícula de *Drosophila*

melanogaster e também no intestino posterior e túbulos de Malpighi de *Ctenocephalides felis* (Gaines *et al.*, 2003).

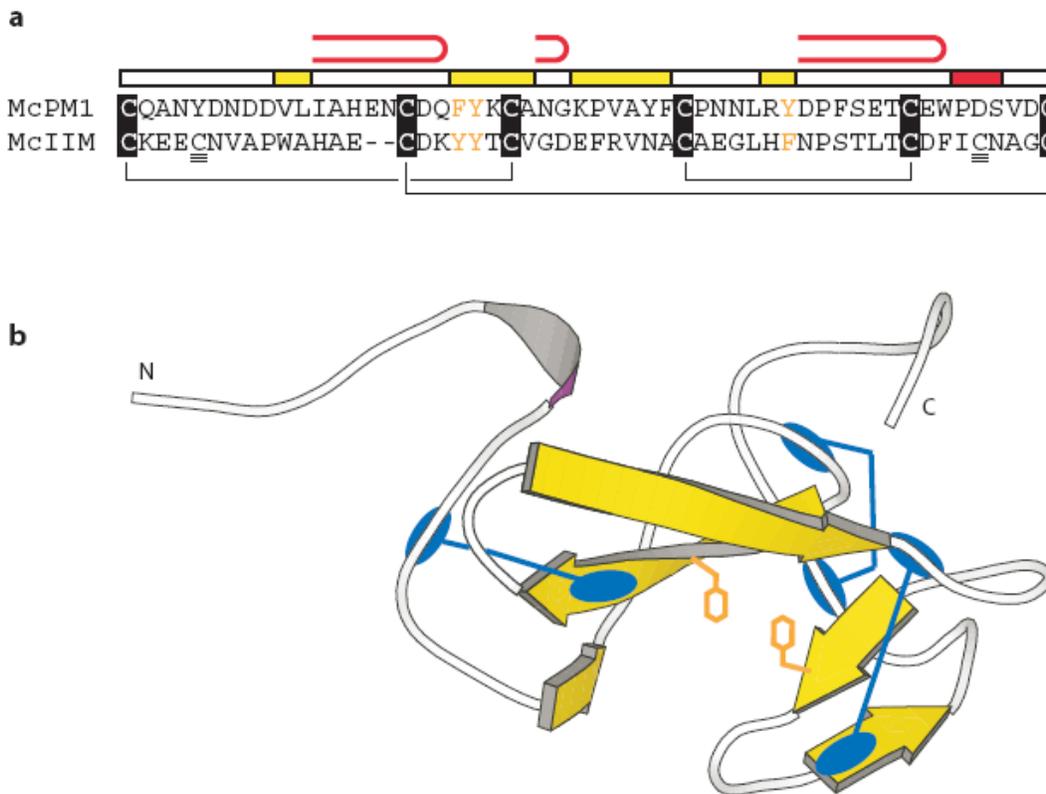


Figura 4- Estrutura do domínio ligante de quitina peritrofina-A (CBD) (Hegedus, *et al.*, 2009). (a) Comparação entre as estruturas primária e secundária do CBD da peritrofina de *Mamestra configurata*, McPM1, e a mucina intestinal de invertebrado, MclIM. Resíduos de cisteína conservados (caixa preta) que formam as pontes dissulfeto (linhas pretas) e resíduos aromáticos envolvidos na interação com quitina (laranja) são indicados. Resíduos de cisteína adicional (sublinhado triplamente) no terminal carboxi do CBD de MclIM que podem formar pontes dissulfeto intra ou intermolecular. A estrutura secundária predita incluindo alças (linhas brancas), folhas- β (barras amarelas) e α -hélice (barra vermelha) está mostrada acima. (b) Estrutura terciária de Tachycitin, uma proteína antimicrobiana de caranguejo, *Tachypleus tridentatus*, que contém um CBD similar ao de uma peritrofina. Resíduos de cisteína conservados são bolas ovais azuis e as pontes dissulfetos entre estes resíduos são linhas azuis e resíduos aromáticos de interação com a quitina são destacados em laranja.

As peritrofinas exibem uma grande variação em número de CBDs e conseqüentemente de massa molecular. O número de CBDs em uma peritrofina pode variar desde um até 19 (revisão de Tellam *et al.*, 1999; Dinglasan *et al.*, 2009; Venancio *et al.*, 2008; Hegedus *et al.*, 2009).

Uma nova nomenclatura para as proteínas que contêm CBDs surgiu em 2010 (Jasrapuria *et al.*, 2010). Esta classificação foi construída após um trabalho de bioinformática, no qual, todos os genes de *Tribolium castaneum* (um inseto da ordem

Coleoptera), que codificavam proteínas contendo um ou mais ChtBD2, foram encontrados.

Estas proteínas foram divididas em 3 grupos: o primeiro grupo são as proteínas que eram muito similares as peritrofinas descritas de *L. Cuprina* e *T ni* e que tinham o consenso de espaçamento entre as cisteínas adjacentes de Tellam *et al*, 1999 (CX₁₁₋₁₇CX₅CX₉₋₁₄CX₁₂CX₆₋₇C). Estas proteínas foram denominadas de peritrofinas. O número de ChtBD2 nesta família de proteínas variou de 1 até 14 e o tamanho dos CBDs individualmente variou de 52 a 56 aminoácidos, contando da primeira cisteína até a sexta. Normalmente quando existe mais de um CBDs na mesma proteína, estes são altamente similares entre si.

O segundo grupo de proteínas encontradas são agrupadas em uma família denominada “Proteínas cuticulares análogas a peritrofina-3” (CPAP3), devido a sua aparente falta de função na organização da membrana peritrófica, a sua localização na cutícula e a presença de 3 ChtBD2. Esta família possui o tamanho dos CBDs entre 54 e 56 aminoácidos e os espaçamentos entre as cisteínas segue o consenso CX₁₃₋₂₄CX₅CX₉₋₁₀CX₁₂₋₁₆CX₇₋₈C.

A terceira família de *T. castaneum* inclui membros com um ChtBD2 (CPAP1) e possuem os espaçamentos entre as cisteínas conservadas CX₁₄₋₁₆CX₅CX₉₋₁₃CX₁₂CX₇₋₈C.

Esta nova classificação de Jasrapuria *et al* (2010) servirá como base para o agrupamento das peritrofinas encontradas durante o primeiro ano de trabalho com as varreduras da biblioteca de cDNA com os anticorpos anti-MP e anti-P1. Este agrupamento das peritrofinas levará em conta principalmente os espaçamentos entre as cisteínas conservadas dos CBDs.

Uma hipótese do surgimento das peritrofinas é de que as mucinas ancestrais (as quais recobrem o epitélio do intestino médio dos insetos ancestrais assim como dos animais atuais dando uma certa viscosidade) tenham adquirido domínios capazes de ligar quitina, formando uma rede, originando a membrana peritrófica (Terra, 2001).

Estas proteínas são a importância central para a manutenção da estrutura e da função biológica de proteção dos insetos. A perturbação das funções das peritrofinas ou

da manutenção da estrutura da MP por meios químicos ou imunológicos pode levar a um novo mecanismo de controle de insetos.

O processo de secreção de peritrofina não é conhecido em Coleoptera e nem está claro porque foram encontrados ao varrer uma biblioteca intestinal de cDNA de expressão com anticorpos gerados contra membranas microvilares purificadas. Essa descoberta sugere uma associação forte das peritrofinas com essa membrana e isso pode influenciar o modo de formação da membrana peritrófica nesses insetos. Ambos os aspectos merecem ser investigados.

1.8. Transporte através da membrana celular

O transporte através da membrana celular, ocorre por um de dois processos básicos: difusão (transporte passivo) ou transporte ativo. Transporte ativo é o movimento através da membrana contra um gradiente de concentração, em combinação com uma proteína carreadora que transfere energia para a substância transportada. Já a difusão ocorre sem gasto de energia. A difusão facilitada é uma modalidade de difusão em que não ocorre gasto de energia, o transporte ocorre a favor do gradiente de concentração (do meio mais concentrado para o meio menos concentrado), em que as substâncias atravessam a membrana com a assistência de uma proteína transportadora específica localizada na superfície da membrana - a permease.

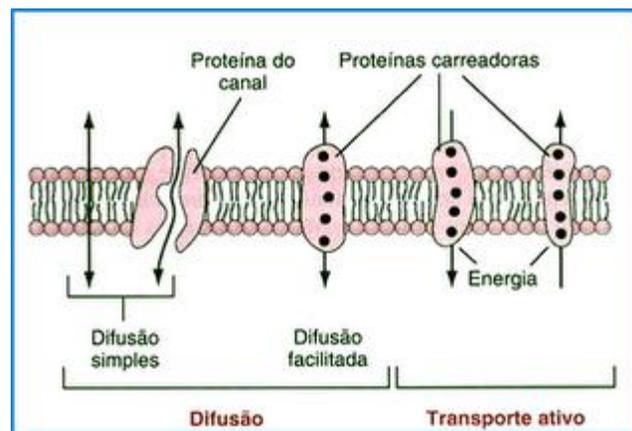


Figura 5: Vias de transporte através da membrana celular e os mecanismos básicos do mesmo.

As proteínas de transporte membranar são proteínas transmembrânicas, e permitem o transporte de inúmeras moléculas essenciais para a sobrevivência da célula (água, glicose, íons, aminoácidos e etc), e ainda a excreção de produtos do metabolismo celular que já não serão necessários. Há casos em que uma mesma substância pode atravessar a membrana quer por difusão quer através de uma proteína de transporte. Nesses casos a presença destas proteínas acelera o transporte, de forma a satisfazer as necessidades da célula. Será importante salientar que estas proteínas não se encontram exclusivamente na membrana citoplasmática, mas também na membrana de inúmeras organelas celulares como é o exemplo da mitocôndria.

Gases como: oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono e também alcoóis possuem uma lipossolubilidade elevada e desta maneira conseguem difundir através da bicamada lipídica, assim como soluções aquosas.

Substâncias polares e/ou carregadas podem também atravessar as membranas celulares com a ajuda dos chamados canais protéicos. Estes canais podem ter uma permeabilidade seletiva para o transporte de um ou mais íons ou moléculas específicas. As aquaporinas são canais de água com uma difusão extremamente elevada quando comparado a outros tipos de canais como: canais de cloreto, sódio e também de potássio. Estes canais possuem tamanhos da ordem de nanômetros e podem ser controlados por voltagem ou por regulação química.

Estes transportadores exercem suas funções para manter o equilíbrio e o bom funcionamento do sistema fisiológico. Os líquidos extracelulares e intracelulares são bem diferentes quando se fala em substâncias mais abundantes em cada um deles. O líquido extracelular contém grande quantidade de íons cloreto, sódio e bicarbonato, além dos nutrientes para as células, tais como oxigênio, glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Contêm, igualmente, dióxido de carbono que está sendo transportado para excreção. O líquido intracelular difere, significativamente, do líquido extracelular, porque contém grande quantidade de íons potássio, magnésio e fosfato, em lugar dos íons sódio e cloreto, encontrados no líquido extracelular. Abaixo será exposto uma breve explicação sobre cada um dos tipos de transportadores estudados.

1.9. Família dos transportadores de soluto (SLC)

Solute Carrier family (SLC) ou família dos transportadores de soluto são proteínas transportadoras de membrana que incluem mais de 300 membros, organizados em 51 famílias. (Hediger, 2004). A maioria dos membros do grupo de SLC estão localizados na membrana da célula. O gene SLC teve sua nomenclatura inicialmente proposta pelo Comitê de Nomenclatura HUGO Gene (HGNC) que é a base para os nomes oficiais HGNC dos genes que codificam esses transportadores. A classificação mais geral chamada de: “transportador transmembranar” pode ser encontrada na base de dados TCDB (www.tcdb.com.br).

Solutos que são transportados pelos vários membros do grupo SLC são extraordinariamente diversos e incluem tanto moléculas orgânicas carregadas e sem carga quanto íons inorgânicos e moléculas do gás amônia.

Os SLCs contêm uma série de alfa-hélices transmembranares hidrofóbicas ligadas umas as outras por segmentos hidrofílicos intra e extracelular. Dependendo do SLC, estes transportadores podem ser funcionais na forma de monômeros ou como oligômeros do tipo homo-ou hetero.

Por convenção de nomenclatura do sistema, os membros dentro de uma família SLC têm entre 20-25% de similaridade de sequência entre si. Em contraste, a similaridade entre as famílias SLC é muito baixa ou inexistente. Assim, os critérios para a inclusão de uma família no grupo SLC não é parentesco evolutivo, mas parentesco funcional (uma proteína integral de membrana que transporta um determinado soluto).

Abaixo segue alguns exemplos de proteínas de transporte do grupo dos SLCs:

- Transportadores facilitadores (solutos fluem a favor de seus gradientes eletroquímicos)

- Transportadores ativos secundários (solutos fluem contra o seu gradiente eletroquímico através do acoplamento com um segundo soluto, que flui a favor do seu gradiente, de tal forma que a variação de energia livre global é ainda favorável)

A série SLC não inclui membros de uma família de proteínas de transporte que tenham sido anteriormente classificados por outros sistemas de nomenclatura geralmente aceitos, incluindo:

- Transportadores ativos como ABC (ATP Binding Cassete), Transportadores por acoplamento de transporte para um evento liberando energia, como a hidrólise de ATP, canais iônicos e aquaporinas (canais de água).

A maioria dos membros do grupo de SLC está localizada na membrana plasmática da célula, mas alguns membros estão localizados na mitocôndria ou em outras organelas intracelulares. Os mais notáveis membros do grupo estão na família SLC 25.

Os nomes dos membros individuais SLC tem o seguinte formato: SLC_nX_m, em que SLC é o nome da raiz (Carrier soluto), n = um número inteiro que representa uma família (por exemplo, 1-47) e X = uma única letra (A, B, C, e etc) indicando uma subfamília. O m = um inteiro que representa um membro da família individual (isoforma). Por exemplo, SLC1A1 é a isoforma A primeira subfamília de SLC família 1.

1.10. Transportadores

1.10.1. Transportadores de aminoácidos

Dentre os tipos de transportadores que citaremos o primeiro deles é o que realiza o transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, regulando o fluxo destes nutrientes iônicos entre o líquido extracelular e intracelular. Alguns aminoácidos específicos possuem funções diferenciadas, pois atuam como neurotransmissores, moduladores sinápticos, e/ou precursores (Christensen., 1982). No início de 1960, após o trabalho pioneiro do grupo de Christensen foram identificados diferentes sistemas de transporte de substratos, como por exemplo os aminoácidos em células de mamíferos (principalmente eritrócitos, hepatócitos, e fibroblastos) (Christensen., 1990). Também foram reveladas propriedades gerais de transporte de aminoácidos em mamíferos como: estereoespecificidade (transporte é mais rápido em L-estereoisómeros) e especificidade do substrato. Com estes estudos iniciais, os principais critérios funcionais usados para definir os transportadores de aminoácidos têm sido: 1) o tipo de aminoácido (ácido, zwitteriônicos, ou básico, bem como outras características da cadeia

lateral), a proteína se move através da membrana, de acordo com a especificidade de substrato e propriedades cinéticas, e 2) As propriedades termodinâmicas do transporte (se o transportador é equilibrativo ou conduz o substrato orgânico contra corrente).

De acordo com as famílias SLC, os aminoácidos podem ser transportados por alguns tipos de transportadores que serão descritos a seguir:

1- High-affinity glutamate and neutral amino acid transporter

Esta família compreende os transportadores classificados nas famílias SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6 e SLC1A7.

2- Heavy subunits of heterodimeric amino acid transporters

Estes transportadores estão compreendidos nas famílias SLC3A1 e SLC3A2.

3- Cationic amino acid transporters

Estes transportadores estão reunidos nas famílias: SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3 e SLC7A4

4- Glycoprotein-associated/light or catalytic subunits of heterodimeric amino acid transporters

Estão compreendidos nas famílias: SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13 e SLC7A14).

5- Proton-coupled amino acid transporter

As famílias que compreendem estes transportadores são: SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3, SLC36A4)

6- System A & N, sodium-coupled neutral amino acid transporter

As famílias são: SLC38A1, SLC38A2, SLC38A3, SLC38A4, SLC38A5, SLC38A6, SLC38A7, SLC38A8, SLC38A9, SLC38A10, SLC38A11)

Temos 20 diferentes tipos de aminoácidos e os mesmos se distribuem de acordo com o seu radical e o seu destino. Desta forma o intuito de estudar os transportadores de aminoácidos seria para mapear os diferentes tipos existentes e se os mesmos tem distribuições diferenciadas ao longo do intestino médio do inseto.

1.10.2- Transportadores de bicarbonato

O bicarbonato é um íon alcalino e um componente vital para a manutenção do pH do sistema de tamponamento do corpo humano (mantendo a homeostase ácido-

base). O CO_2 é um intermediário da reação de formação do ácido carbônico (H_2CO_3^-) e, portanto, 70-75% de todo o CO_2 do corpo pode ser convertido em bicarbonato (HCO_3^-)

Este tipo de tampão é um dos principais na manutenção do pH em células animais e proporciona resistência à rápida alteração de pH tanto na faixa ácida quanto na básica. Isto é especialmente importante para proteger os tecidos do sistema nervoso central, onde as mudanças de pH muito fora da faixa normal em qualquer direção pode ser desastrosa. O transporte deste íon bicarbonato também desempenha um papel vital no equilíbrio ácido-base em movimentos do estômago, pâncreas, intestino, rim e órgãos reprodutores.

Estudos funcionais sugeriram diferentes modos de transporte de HCO_3^- . Alguns deles são: proteínas trocadoras aniônicas, as quais trocam HCO_3^- por Cl^- de um modo reversível (Kopito., 1990); Proteínas co-transportadoras de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ medeiam o movimento acoplado destes íons através das membranas plasmáticas, muitas vezes de forma eletrogênica (Boron et al, 1997).

A análise das sequências das duas famílias de transportadores de HCO_3^- que foram clonados até à data (os permutadores de ânions e os cotransportadores de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$) revelam que eles são homólogos. Isto não é totalmente inesperado, uma vez que ambos os transportes de HCO_3^- são inibidos por uma classe de agentes farmacológicos chamados dissulfônicos estilbenos (Burnhan et al, 1997). Eles partilham cerca de 25-30% de identidade de sequência, o qual é distribuído ao longo de todo o seu comprimento de sequência, e topologias de membrana semelhantes, sugerindo que eles têm ~ 10 alças transmembranas (TM).

Proteínas cotransportadoras de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ estão envolvidas na absorção e secreção celular de HCO_3^- , e também com a regulação do pH intracelular, que medeiam o movimento acoplado de Na^+ e HCO_3^- através das membranas do plasma na maioria dos tipos de células até agora investigados. Um único HCO_3^- pode ser transportado juntamente com um a três Na^+ , sendo desta maneira, frequentemente eletrogênico. No rim, o cotransportador eletrogênico de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ é o principal transportador de HCO_3^- do túbulo renal proximal, e é responsável pela reabsorção de mais de 85% da carga filtrada de HCO_3^- (Boron., et al, 1997). Até recentemente, a natureza molecular destes cotransportadores de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ tinha permanecido desconhecido, devido a tentativas

mal sucedidas para cloná-las com base na homologia presumível dos trocadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Uma segunda estratégia de clonagem de expressão foi utilizada com sucesso para identificar o cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ do rim da salamandra, um órgão previamente descrito por possuir esta atividade (Romero., et al 1997). Pelo menos, 3 cotransportadores de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ de mamífero já foram clonados, com semelhantes comprimentos de sequência primária e possíveis topologias de membrana. Um dos encontrados é uma isoforma específica de rim (Burnham., et al 1997), que é quase idêntica (com exceção de uma região variável N-terminal) a uma isoforma de cotransportador mais amplamente distribuída localizada no tecido pancreático (Abuladze., et al 1998).

Este transportador de bicarbonato será estudado pela sua provável ligação com o fenômeno do tamponamento luminal no intestino médio de *Tenebrio molitor*, uma vez que este inseto possui diferenças de pH de até duas unidades ao longo do seu tubo digestivo.

1.10.3. Transportadores de açúcar

A absorção de glicose em todo o intestino de mamíferos é realizada através de 2 componentes: o cotransportador ou simportador Na^+ /glicose (SGLT1), e o transportador facilitativo ou uniportador (GLUT2). O simportador é estritamente dependente da presença de Na^+ , é inibido por flordizina e é encontrado na membrana apical de enterócitos. Em contraste, o uniportador é inibido por floretina e citocalasina B e está localizado na membrana basal de enterócitos (Hediger *et al.*, 1987; Takata, 1996; Kellett, 2001 e Giordana *et al.*, 2003)

SGLT e GLUT são transportadores que pertencem a famílias de genes transportadores de solutos (SLC). A família SGLT (transportador de glicose sódio-dependente, nome do gene é SLC5A) inclui 11 genes humanos expressos em tecidos do epitélio até o sistema nervoso central. O membro mais conhecido desta família é o SGLT1 (SLC5A1), expresso em intestino, que transporta a glicose ou galactose com Na^+ e água (Wright, 2001; Wright e Turk, 2004;. Scheepers et al, 2004). A família GLUT (nome do gene é SLC2A) é composta de 14 genes humanos que podem ser divididos em três subfamílias de acordo com a similaridade de sequência. A classe GLUT 1 inclui

os melhores transportadores conhecidos: GLUT1 é preferencialmente expresso em eritrócitos e GLUT2, constitutivamente expresso na membrana basolateral do intestino (Scheepers et al., 2004; Kellett et al, 2008). Após uma refeição, seguida de alta concentração de glicose no sangue, o GLUT2, localizado em endossomos na base da borda em escova, é inserido transitoriamente na membrana apical do enterócito (Kellett et al., 2008).

A absorção de glicose pelo intestino médio do inseto tem sido estudada por mais de 50 anos (Treherne, 1957, 1958; Crailsheim, 1988; Turunen e Crailsheim, 1996) e o consenso é que a glicose é absorvida por difusão simples. Mais recentemente, contudo, o envolvimento dos facilitadores do transporte de glicose (GLUTs) foi descrito na epiderme (Giordana et al, 2003) e no intestino médio de insetos (Pascual et al, 2006; Caccia et al, 2007; Bifano et al, 2010). GLUT também foi objeto de estudos moleculares (Escher e Rasmuson-Lestander, 1999; Chen et al, 2006.; Price et al., 2007). Os dados mostraram que GLUT do intestino médio de insetos é semelhante ao GLUT classe 1, embora outros GLUTs podem ocorrer em tecidos diferentes do intestino médio (Chen et al., 2006). Caccia et al. (2007) funcionalmente demonstraram a presença de SGLT1 e GLUT2 no intestino médio do parasitóide *Aphidius ervi* (Hymenoptera). No entanto, os cDNAs correspondentes não foram clonados. Mais recentemente, foi demonstrado, por meio da identificação de sequências, determinação de seus sítios de transcrição no tubo digestivo (por RT-PCR) a localização destes transportadores de açúcar em células de intestino médio de *Dysdercus peruvianus* (Bifano et al, 2010).

Os transportadores de açúcar possuem algumas assinaturas características reconhecidas pelo software NPS@PROSCAN (http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html). Além desta assinatura também foi verificado nas sequências dos prováveis transportadores de açúcar, o número de alças transmembrana pelo software TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) e os motivos característicos dos transportadores facilitativos de glicose preditos pelo interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Estes transportadores possuem entre 10 e 14 alças transmembrana e na região N-terminal possuem um sítio de ligação para cátions (Wright, 2001).

1.10.4- Canais de cloreto

Canais de ânions são poros proteicos na membrana, que permitem a difusão passiva de íons negativamente carregados ao longo de seu gradiente eletroquímico. Embora estes canais possam transportar outros ânions, por exemplo, NO_3^- e I^- melhor do que Cl^- , eles são frequentemente chamados de canais de cloreto porque este é o ânion mais abundante nos organismos (Li et al., 2006).

Os canais de cloreto pertencem a uma superfamília de canais iônicos pouco compreendidos, consistindo em cerca de 13 membros, os quais podem executar as suas funções na membrana plasmática ou nas membranas de organelas intracelulares e esta localização pode ser base para a classificação do canal.

Estes canais podem ser dependentes de voltagem ou dependentes da ligação de moléculas de sinalização (como nas membranas pós-sinápticas). As funções deste canal estão relacionadas com o transporte de carga criando uma corrente elétrica através do canal, e também com o transporte de matéria (www.tcdb.com.br).

A corrente que flui pelos canais de cloreto intracelulares tenta garantir o equilíbrio entre o transporte geral de H^+ , que acidifica os vários compartimentos intracelulares. Por outro lado, o fluxo de massa de cloreto é importante para a regulação do volume celular, bem como para o transporte transepitelial. Ao contrário de Ca^{2+} , Cl^- não parece desempenhar um papel como mensageiro intracelular.

Esta família de canais de íons contém 10 ou 12 hélices transmembranas que formam um poro único, podendo ter alguns membros como homodímeros. Em termos de estrutura primária, estes canais de cloreto não estão relacionados com canais de cátions conhecidos ou outros tipos de canais de ânions. (Li et al, 2006).

A secreção de cloreto é o principal determinante da hidratação da mucosa do trato gastrointestinal, e o transporte de cloreto é também crucial na regulação da secreção de fluidos por órgãos que drenam para o intestino. Além disso, há consequências patológicas se a secreção de cloreto ou é reduzida ou aumentada, como na fibrose cística e diarreia secretora, respectivamente. Com a clonagem molecular de muitas das proteínas e fatores de regulação que compõem o mecanismo

de secreção de cloreto, tem havido avanços significativos na compreensão do presente processo, ao nível celular.

A correlação de um gene clonado com uma função de canal de íons é muitas vezes problemática, devido à presença de canais endógenos no sistema de expressão. Até agora, sabemos que três famílias de genes de canais de Cl^- são bem estabelecidas. Nos mamíferos, a família de genes CLC tem nove membros que podem funcionar na membrana plasmática ou em compartimentos intracelulares. Presume-se que a grande maioria das proteínas CLC possuem entre 10 e 12 domínios transmembrana, mas este modelo tem agora sido revisto, porque Dutzler et al., 2013 *in press*, relatou a estrutura de cristal tridimensional de canais de cloreto CLC de bactérias.

Canais desempenham um papel crucial no controle de composição iônica do citoplasma e do volume de células. Esta função é realizada numa interação estreita com vários transportadores de íons, incluindo bombas, cotransportadores, e outros canais iônicos. Por exemplo, o pH do citoplasma das células é estritamente regulado. Em quase todas as células, o pH é mais alcalino do que o esperado no equilíbrio eletroquímico. Isto é principalmente provocado por trocadores de Na^+/H^+ e trocadores $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{H}^+\text{Cl}^-$ que ainda precisam de um canal de cloreto para a reciclagem deste. Além disso, algumas células usam ATPases de prótons que podem precisar de canais de Cl^- para manter a eletroneutralidade, semelhante aos mecanismos utilizados na acidificação de certos compartimentos intracelulares. Por outro lado, as células podem ser carregadas com ácido como, por exemplo, com os trocadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

Este tipo de canal será estudado devido a sua importância relacionada ao equilíbrio de cargas, uma vez que o mesmo pode estar empregado em vários tipos de transporte, principalmente nos trocadores por bicarbonato. Estes canais podem estar envolvidos neste tipo de transporte e também nos processos de reciclagem do cloreto.

1.10.5. Canais de potássio

Os canais tendem a ser específicos para um determinado íon, apesar de íons com carga e tamanho idêntico também possam, até um determinado limite, atravessar o canal. Através de estudos estruturais de cristalografia de raios-X de um canal de potássio, assumindo que esta estrutura permanece intacta na membrana plasmática

correspondente, é possível supor que quando uma diferença de potencial é introduzida na membrana, o campo eletromagnético associado induz uma alteração conformacional no canal de potássio. Esta mudança de conformação distorce a forma dos canais proteicos de maneira suficientemente forte, permitindo que a cavidade ou canal se abra para admitir o influxo ou efluxo de íons através da membrana. Esta movimentação iônica gera depois uma corrente elétrica suficiente para despolarizar a membrana (Sakura et al., 1995., Thomas et al., 2002).

Os canais de sódio dependentes de voltagem e os canais de cálcio dependentes de voltagem são formados por um único polipeptídeo com quatro domínios homólogos. Cada domínio contém 6 alfa-hélices que atravessam a membrana. Uma destas hélices, S4, é a hélice sensível à voltagem. Possui muitas cargas positivas de tal maneira que cargas positivas fora da célula repelem a hélice, induzindo uma alteração conformacional que induz o fluxo de íons pelo canal. Os canais de potássio funcionam de modo similar, com a exceção de serem compostos por quatro polipeptídeos, cada um com um domínio.

Os domínios proteicos sensíveis à voltagem destes canais (o "sensor de voltagem") contém geralmente uma região composta por hélices S3b e S4, que parecem ter uma sequência conservada, que ocorre numa variedade de células e espécies.

Cada canal é constituído por 4 subunidades. Cada subunidade tem seis regiões com aminoácidos hidrofóbicos que se pensa serem responsáveis pelo canal transmembranar. Estas regiões hidrofóbicas encontram-se ligadas por sequências de aminoácidos de características hidrofílicas, que estão expostos nos espaços intracelular e extracelular. Cada subunidade contém também um terminal amino- ou carboxilo citoplasmático.

A região S4 encontra-se carregada eletricamente em cada subunidade, contendo um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos. Esta região S4 é provavelmente a responsável pela sensibilidade do canal à voltagem. A via permeável é formada em parte pela região que faz a ligação entre as sequências transmembranares S5 e S6 à qual se dá o nome de região porosa ou H5 (na figura 6 representada pela letra P). Tudo isto está demonstrado na figura 6.

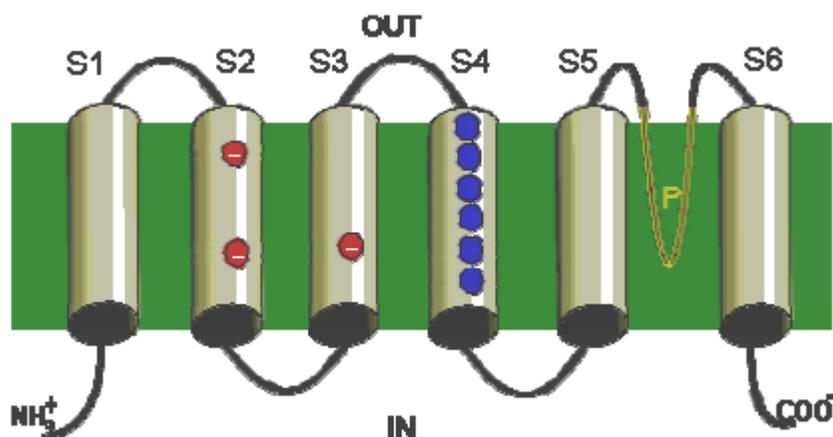


Figura 6: Estrutura molecular dos canais de potássio. Adaptado de <http://www.icb.ufmg.br/~lbcd/grupod/potassio.html>

A alcalemia, desequilíbrio ácido-base causado pelo excesso de base, promove a entrada de potássio para o meio intracelular em troca da liberação de íons H^+ para minimizar a elevação do pH. Geralmente, para o aumento de 0,1 unidade no pH extracelular, a concentração de potássio plasmática cai até 0,4 mEq/L. Efeito semelhante ocorre após a administração de bicarbonato de sódio para correção da acidose.

A insulina endógena ou exógena também promove a entrada de potássio para o meio intracelular aumentando a atividade da bomba de Na^+K^+ -ATPase.

A diminuição do pH extracelular pode ser resultado da saída de K^+ das células de forma a manter a eletroneutralidade diante da entrada do excesso de íons H^+ nas células. Deve-se observar que, nestas situações, os valores encontrados de K^+ serão sempre maiores do que deveriam ser, portanto, a correção da acidemia poderá levar à hipocalemia.

A deficiência de insulina e hiperglicemia gera a elevação da osmolaridade plasmática promovendo a saída de água e potássio das células (a perda de água aumenta a concentração intracelular de K^+ e cria um gradiente favorável para a saída

passiva de K^+ das células, além de arrastá-lo pelos canais de água da membrana celular).

A hemolinfa de diferentes tipos de insetos varia enormemente em sua composição iônica. Além disso, as composições dos insetos divergem bastante das composições dos sangues de animais vertebrados e também de outros invertebrados (Macallum, 1910). Taxas muito baixas de K/Na não são encontradas em todos os insetos e na época achava-se que esta relação estava envolvida com o tipo de alimentação do inseto. Foi alterada a dieta de *Tenebrio molitor* e nenhuma diferença foi observada (Boné, 1944). Após este resultado verificou-se que as concentrações iônicas são uma característica das espécies mantidas por um mecanismo de regulação mineral.

Devido aos dados expostos acima podemos dizer que os canais de potássio devem participar atividade da fisiologia do intestino médio de muitos insetos e como não temos muitas informações a respeito deste tipo de transportador em *Tenebrio molitor* devemos perseguir o nosso objetivo em descrever os fenômenos fisiológicos digestivos procurando mapear os sítios de expressão dos canais de potássio e também os locais de ação dos mesmos.

1.10.6- Cotransportador de K^+/Cl^-

Um outro tipo de transportador mencionado ao longo deste trabalho é o cotransportador de cátion e cloreto. Este tipo de transportador faz parte de uma família de proteínas dos transportadores de soluto (SLC). Esta família inclui os produtos dos genes humanos: SLC12A1, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6, SLC12A7, SLC12A8 e SLC12A9 (www.tcdb.org).

O co-transportador de $Na-K-Cl$ (NKCC, SLC12A2) é uma proteína que auxilia no transporte ativo de sódio, potássio e cloreto através da membrana (Haas, 1994). Há duas variedades, ou isoformas desta proteína de transporte de membrana chamadas NKCC1 e NKCC2. NKCC1 é amplamente distribuída por todo o corpo e tem importantes funções em órgãos que secretam líquidos. Já NKCC2 é encontrada especificamente no rim, onde serve para extrair o sódio, potássio e cloreto da urina, de modo que eles possam ser reabsorvidos para o sangue.

Os NKCC mantêm eletroneutralidade movendo dois solutos com carga positiva (sódio e potássio), juntamente com duas partes de um soluto carregado negativamente (cloreto). Assim, a estequiometria das proteínas NKCC é 1Na: 1K: 2Cl.

A energia necessária para mover os solutos através da membrana celular é fornecida pelo gradiente eletroquímico de sódio. O gradiente eletroquímico do sódio é estabelecido pela ATPase de Na-K, que é uma enzima dependente de ATP. Uma vez que a utilização do gradiente de sódio é utilizada pelas proteínas NKCC, a sua atividade é indiretamente dependente de ATP, por esta razão, proteínas NKCC são conhecidas por realizar o transporte ativo secundário.

Três isoformas do K-Cl cotransportador têm sido descritos, denominado KCC1 (SLC12A4), KCC2 (SLC12A5), e KCC3 (SLC12A6), contendo 1085, 1116 e 1150 aminoácidos, respectivamente. Eles tem 12 alças transmembranas (TM) com um domínio hidrofóbico central, juntamente com terminações hidrofílicas no N e no C terminal. Uma comparação das suas sequências com as de outras proteínas de membrana transportadoras de íons revela que são parte de uma superfamília nova de cotransportadores de cloreto juntamente com cátions, que inclui os cotransportadores de Na-Cl e de Na-K-2Cl. KCC1 e KCC3 são amplamente expressos em tecidos humanos, ao passo que KCC2 é expresso apenas em neurônios cerebrais, fazendo com que seja provável que esta isoforma seja responsável pela manutenção de baixa concentração de Cl⁻ em neurônios (Payne., et al, 1996; Rivera., et al, 1999; Race., et al, 1999).

KCC1 é amplamente expresso em tecidos humanos e, quando expressos de forma heteróloga, possui as características funcionais na hemácia bem estudado K-Cl cotransportador, incluindo a estimulação tanto pelo inchaço quanto por N-etilmaleimida.

A sua localização basolateral dá ao NKCC1 a capacidade de transporte de sódio, potássio e cloreto a partir do sangue para dentro da célula. Outros transportadores auxiliam no movimento dos solutos para fora da célula através da sua superfície apical. O resultado final é que os solutos a partir do sangue, particularmente cloreto, são secretados no lúmen das células, aumentando a concentração luminal de solutos e fazendo a água ser secretada por osmose. Este tipo de transportador pode estar envolvido com a secreção (anterior) ou absorção (posterior) de água nas duas regiões

do intestino médio de *Tenebrio molitor* onde ocorre este fenômeno. As aquaporinas são as grandes responsáveis pela passagem de água através das membranas, mas muitos outros transportadores estão também auxiliando nesta parte da fisiologia do inseto.

1.10.7. V-ATPase

O intestino médio possui células especializadas e transportadores específicos para tamponar os conteúdos luminiais nas diferentes regiões (anterior, média e posterior), além de funcionar na absorção de fluido.

V-ATPases têm sido responsabilizadas pelo processo de translocação de prótons em vários epitélios (Davies *et al.*, 1996; Debreuil, 2004) e isto incentivou uma investigação do fenômeno de tamponamento relacionado a este tipo de transportador. Para isso, foram selecionados os contigs do intestino médio de *T. molitor* similares a V-ATPases para verificarmos a expressão destes transportadores nas diversas regiões do inseto em estudo. Este estudo foi utilizado para ampliar o conhecimento acerca dos diferentes pHs ao longo do intestino médio de *T. molitor*, definindo os transportadores responsáveis pela secreção de prótons.

As H⁺-ATPases (ou V-ATPases) vacuolares tem como função a acidificação de compartimentos celulares em células eucarióticas, podendo ser encontradas nos mais diversos compartimentos, como endossomos, lisossomos, vesículas sinápticas. A acidificação de compartimentos celulares desempenha importante papel em processos celulares, incluindo endocitose mediada por receptor, direcionamento intracelular de enzimas lisossômicas recém-sintetizadas, processamento e degradação de macromoléculas e acoplamento do transporte de pequenas moléculas. As V-ATPases foram também descritas na membrana citoplasmática atuando na acidificação renal, reabsorção óssea, manutenção do pH citoplasmático e transporte de K⁺ no intestino médio de insetos (Stevens & Forgac, 1997).

As V-ATPases tem importante função no tráfego de membranas, atuando na acidificação de endossomos e, com isso, há dissociação de ligantes dos processos de endocitose mediada por receptor liberando assim vesículas com seus receptores livres que são encaminhadas novamente para a membrana plasmática. O mesmo processo ocorre na liberação de enzimas lisossomais de receptores de manose-6-fosfato,

permitindo a recuperação desses receptores para o *trans*-Golgi network (Creek & Sly, 1984). É importante ressaltar que nos processos citados, a atuação de V-ATPase na liberação de íons H^+ é acompanhada pela atuação de um canal de cloreto necessário à dissipação do potencial de membrana gerado pela translocação de prótons. Mais uma vez vemos a importância de estudarmos os canais de cloreto e também os cotransportadores nos quais o cloreto participa.

As V-ATPases presentes na membrana plasmática de células especializadas podem desempenhar diversas funções. Por exemplo, o transporte de prótons nos ductos coletores presentes no rim de mamíferos se dá através das V-ATPases. Há também o controle do pH citossólico pela ação das V-ATPases, que são expostas ao meio externo por exocitose, quando o pH citossólico é baixo, e internalizadas na situação de elevação do pH citossólico (Gluck *et al.*, 1982). Os osteoclastos promovem a reabsorção da matriz óssea devido a valores ácidos do pH gerado pelas V-ATPases, que além de solubilizar a matriz também ativam enzimas degradativas (Blair *et al.*, 1989).

Em epitélios de insetos (que inclui o intestino médio) as V-ATPases desempenham o papel de gerar um potencial de membrana utilizado por um antiportador H^+/K^+ que resulta no transporte do íon K^+ para o lúmen (Harvey *et al.*, 1983, Wieczorek *et al.*, 2009).

Na ausência de canais de ânions em membranas ricas em V-ATPase a acidificação é bastante reduzida. Nessas condições a bomba de prótons gera uma grande voltagem em uma pequena variação de pH, permitindo assim o funcionamento de sistemas de transporte ativo como antiportador $nH^+/cátion$ ou simportador $nH^+/oligopeptídeo$ (Beyenbach & Wieczorek, 2006). A ação das V-ATPases na recuperação de neurotransmissores, por exemplo, se dá devido à formação do potencial de membrana e do gradiente de pH. Lisossomos de mamíferos e vacúolos centrais de plantas contêm hidrolases ácidas que necessitam de baixo pH gerado pelas V-ATPases para sua ativação (Stevens & Forgac, 1997).

As V-ATPases são formadas por um complexo de subunidades que formam o domínio periférico V1 responsável pela hidrólise do ATP e o domínio associado à membrana V_o responsável pela translocação do próton (Stevens & Forgac, 1997).

Subunidades da V1 são representadas por letras maiúsculas e subunidades de Vo por letras minúsculas segundo convenção. O complexo V1 consiste em: um domínio globular em anel formado por três subunidades A e B alternadas; centro rotacional alongado formado por cópias únicas das subunidades D e F; e por uma região periférica alongada formada pelas subunidades C, E, G e H. O complexo transportador de próton Vo consiste em seis ou mais subunidades c, formando uma estrutura em anel. O modelo funcional mais amplamente aceito diz que as V-ATPases apresentam uma região estática e outra móvel. A região móvel (ou rotor) é composta pelas subunidades D, F e o anel de subunidades c. As demais subunidades compõem a região estática (Beyenbach & Wiczorek, 2006).

Nos eucariotos multicelulares diferentes isoformas das subunidades de V-ATPase apresentam expressão específica para tipos celulares ou tecidos específicos. Em mamíferos, por exemplo, foram identificadas diferentes isoformas em rim, ouvido interno, cérebro, osteoclastos, células alveolares e o acrossomo (Beyenbach & Wiczorek, 2006). Foi demonstrada a expressão tecido-específica de isoformas das subunidades da V-ATPase em mamíferos (Murata *et al.*, 2002, Nishi *et al.*, 2003). Em insetos as V-ATPases são encontradas na membrana apical de quase todos os tecidos epiteliais (como glândulas salivares, intestino médio e túbulos de Malpighi), garantindo o transporte ativo secundário pelo epitélio (Wiczorek *et al.*, 2009). Em *Drosophila* a V-ATPase é codificada por 33 genes (que inclui as subunidades e as proteínas acessórias). Estudo em *Drosophila* demonstrou haver apenas uma holoenzima de membrana plasmática, que consiste em uma única isoenzima composta por subunidades de genes bem definidos (Allan *et al.*, 2005).

1.10.8. Transportador de amônia

As proteínas Rh (Rhesus) foram reconhecidas em mamíferos como membros da superfamília Amt/Mep (transportador de amônia/metilamônio permease) graças à homologia da estrutura primária das proteínas Rh com Amt/Mep de bactérias, Archaea, fungos e plantas (Marini *et al.*, 1997). Em humanos, a família das proteínas Rh é composta por cinco membros, três deles associados aos eritrócitos (RhCE, RhD e RhAG) e dois membros (RhBG e RhCG) que foram caracterizados com

expressão em diversos tecidos, incluindo o rim. RhBG e RhCG facilitam o movimento de amônia pela membrana de maneira rápida, de baixo custo energético e bidirecional (Zidi-Yahioui *et al.*, 2005).

Em insetos o transportador de amônia foi caracterizado em *Aedes albopictus* sendo verificada sua expressão em diferentes tecidos. Os maiores níveis de expressão, em animais não alimentados, estão na cabeça e nos túbulos de Malpighi. Já em fêmeas alimentadas com sangue, há um aumento nos níveis de RNAm do transportador no corpo gorduroso, intestino médio e túbulos de Malpighi. A proposta para o papel fisiológico de transportador de amônia no intestino médio de *Aedes albopictus* seria a eliminação do resultado da desaminação oxidativa dos aminoácidos provenientes da alimentação (Wu *et al.* 2010).

A porção posterior do intestino médio de *Tenebrio molitor* possui pH alcalino, em torno de 8 (Terra *et al.*, 1985). Para se chegar a este pH é necessário que o lúmen do intestino médio sofra um processo de alcalinização nesta porção posterior. Esta alcalinização pode ser atribuída à participação do íon bicarbonato ou então devido à presença de amônia. Na região posterior, amônia poderia difundir-se para o lúmen, tornando-se protonada e eliminando do conteúdo os íons H^+ que se encontravam livres, elevando desta maneira o pH luminal. O íon amônio poderia ser trocado por Na^+ por uma Na^+/K^+ -ATPase microvilar hipotética. Dentro das células, o íon amônio formaria amônia que se difunde para o lúmen, enquanto o próton vai para a hemolinfa, neutralizando o bicarbonato originado a partir do intestino médio. Deve-se notar que processos de alcalinização podem ser diferentes do proposto, principalmente para atingir pHs mais elevados, como os observados em larvas de mosquitos (Boudko *et al.*, 2001).

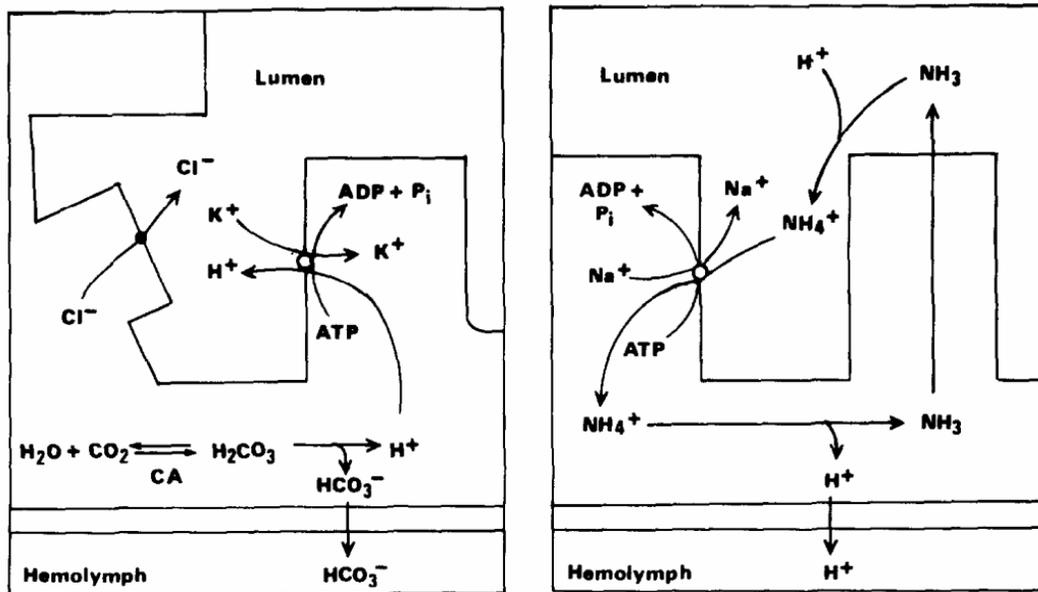


Figura 7. Esquema da movimentação dos íons supostamente responsáveis pela manutenção do pH no conteúdo do intestino médio. Retirado de Terra e Regel (1995).

Este tipo de transportador teve uma atenção especial ao longo das nossas análises e seria um possível alvo para mapearmos as moléculas responsáveis pela manutenção do pH do lúmen intestinal e também pelas alterações de pH ao longo do intestino médio de *T. molitor*. Este tipo de transportador provavelmente está engajado dentro de um contexto da fisiologia do *Tenebrio molitor* onde vários tipos de transportadores estão exercendo a sua função conjuntamente para o bom funcionamento do todo em estudo.

1.10.9- Aquaporinas

A homeostase da água contra o stress da dessecação, que é um dos os maiores obstáculos para a sobrevivência de animais e plantas em terra, é conseguida através do controle da composição e da pressão osmótica de fluidos do corpo, em resposta à ausência ou à abundância de água em alimentos e no ambiente. A água é um componente chave indispensável, pois ela suporta todos os processos bioquímicos dentro das células e nos espaços extracelulares e mantém tanto a estrutura de macromoléculas quanto de membranas de organelas. A descoberta de canais de água, ou aquaporinas (AQPs), tem fornecido informações significativas a nível molecular

relacionadas a fisiologia da regulação do balanço hídrico e também a respeito de distúrbios relacionados com as aquaporinas (Agre, 2006; Verkman, 2005, 2009). A direção do fluxo de água é unicamente dependente do gradiente de concentração osmótica através da membrana plasmática e estes gradientes são principalmente estabelecidos pela força motriz de sódio e / ou a força motriz protônica (Harvey et al, 2010;. Beyenbach e Wieczorek, 2006). Nos epitélios de animais estão presentes as AQPs, para permitir que moléculas de água atravessem passivamente a membrana plasmática em conjunto com outros fluidos. Em epitélios onde ocorre o transporte de fluidos, tais como nos túbulos de Malpighi (MTs) de insetos, o equilíbrio entre sal e água é mantido usando as aquaporinas e a depuração de resíduos é feita na hemolinfa.

Estudos sobre a fisiologia molecular de AQPs em insetos foram recentemente acelerados (Kikawada et al, 2008;. Kataoka et al, 2009a, b.; Shakesby et al, 2009;. Drake et al, 2010;. Goto et al, 2011;. Liu et al, 2011;. Mathew et al, 2011;. Philip et al, 2011). Como resultado, aquaporinas são agora reconhecidas como atores-chave no transporte epitelial em insetos. AQPs podem ser amplamente divididas entre aquelas que são específicas de água (aquaporinas ortodoxas) e aqueles que, adicionalmente, transportam um número limitado de solutos não-polares (por exemplo, glicerol e ureia), denominada aquagliceroporinas. Todas as AQPs de insetos que têm sido relatados anteriormente são aparentemente água específica. No entanto, anteriormente identificou-se duas aquagliceroporinas através de experimentos que demonstraram o transporte de água juntamente com glicerol e uréia a partir de bicho da seda, *Bombyx mori* (Kataoka et al., 2009a), e a partir da mariposa oriental, *Grapholita molesta* (Kataoka et al., 2009b).

Kataoka et al. (2009a, b) caracterizou um tipo específico de AQP e encontrou sua expressão predominante no intestino grosso; com base nesses estudos, AQP é provavelmente necessário para facilitar transporte de água através das membranas epiteliais do intestino posterior. A movimentação de moléculas de água e de solutos é essencial para a homeostase de fluido interno. Estudos fisiológicos em *Manduca sexta* têm sugerido que a água é reabsorvida no intestino posterior e reciclada através da hemolinfa do conteúdo do intestino médio e que este processo depende da qualidade dos alimentos e para a necessidade de água para a parte interna do corpo (Reynolds et

al, 1985; Reynolds e Bellward, 1989). Embora o transporte de água e sal esteja intimamente ligado, a importância das AQPs no movimento de água e na homeostase osmótica, associada em epitélios de insetos não recebeu muita atenção quando comparado com as bombas e transportadores de solutos.

Este tipo de transportador também foi estudado pelo nosso grupo afim de que possamos ter maiores informações a respeito deste tipo de transportador em insetos da ordem Coleoptera usando como ferramenta o inseto modelo *T.molitor*. Isto tornou-se interessante uma vez que este inseto possui regiões diferentes de absorção e secreção de água ao longo do intestino médio, o que provavelmente deve ter alguma ligação com transportadores específicos destas regiões.

1.10.10. Simportador de H⁺/oligopeptídeos

Os simportadores de H⁺/oligopeptídeos pertencem à família SLC15 dos transportadores de soluto. Esta família pode ser dividida em duas subfamílias com base nas diferenças estruturais e funcionais: SLC15A1 (PEPT1) e PepT2 (SLC15A2) de transporte de di e tripeptídeos, mas não os ácidos aminados, enquanto que SLC15A3 (PHT2) e SLC15A4 (PHT1) transportam L-histidina e alguns di e tripeptídeos (Daniel, H and Kottra, G. 2004). Estes transportadores são proteínas transmembranas (TM) com 12 hélices com terminais intracelulares e um loop extracelular prolongado no TM 9/10. A estrutura cristalina da PepTSo (um homólogo de procariontes e de PEPT1 de *PepT2 oneidensis Shewanella*) confirma muitas das características estruturais previstas no PEPT1 PepT2 de mamífero (Newstead et al., 2011).

PHT1 é possivelmente intracelular (Romano, et al., 2010), enquanto a proteína PHT2 está localizada em lisossomas de células transfectadas (Botka, et al., 2000; Herrera-Ruiz Knipp, 2003; Sakata, et al., 2001).

Estudos realizados em vários laboratórios mostraram que a absorção de oligopeptídeos intactos através da borda em escova da membrana de células do rim é mediada por dois sistemas de transporte distintos. Uma é caracterizada como alta afinidade/baixa capacidade e o outro como o de baixa afinidade/elevada capacidade de transporte de oligopeptídeos. Segundo resultados dos estudos de Hannelore et al

(1991), os sistemas de transporte diferem em suas respostas a alterações no gradiente transmembranar de prótons e o potencial de membrana gerado por este gradiente.

Um grande número de oligopeptídeos podem servir como substratos para os transportadores de peptídeos. Por exemplo, formando-se dipeptídeos, com base nos 20 resíduos de aminoácidos de proteínas existentes, podemos ter a formação de 400 dipeptídeos diferentes. Estes variam consideravelmente nas suas características físico-químicas, isto é, tamanho molecular, carga elétrica, e hidrofobicidade. Embora a relação entre alguns aspectos da estrutura química dos dipeptídeos e seu transporte no intestino tenha sido estudada anteriormente, os resultados desses estudos nem sempre concordaram. Por exemplo, estudos de Adibi e Soleimanpour (1974), demonstraram que o alongamento da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos, quer no amino ou no carboxi terminal, aumenta a afinidade de dipeptídeos ao transportador peptídico. Por outro lado, mais recentemente, Burston e Matthews (1990), concluíram que a afinidade aparente para transporte não está relacionado com as propriedades lipofílicas das cadeias laterais dos dipeptídeos.

A existência do transportador de oligopeptídeo de alta afinidade/baixa capacidade no intestino ainda não foi demonstrada (Burston e Matthews, 1990).

O transportador presente no intestino é o do tipo SLC15A1 e possui estequiometria do tipo 2 H⁺: 1 peptídeo zwitterionico (in). Os 3 genes *Slc15a1*(Hs), *Slc15a1*(Mm), *Slc15a1*(Rn) podem produzir este tipo de transportador

O H⁺ para este tipo de transportador serve como uma força eletrogênica através de um gradiente eletroquímico ao invés da utilização do gradiente de Na⁺ conforme mostrado na figura abaixo.

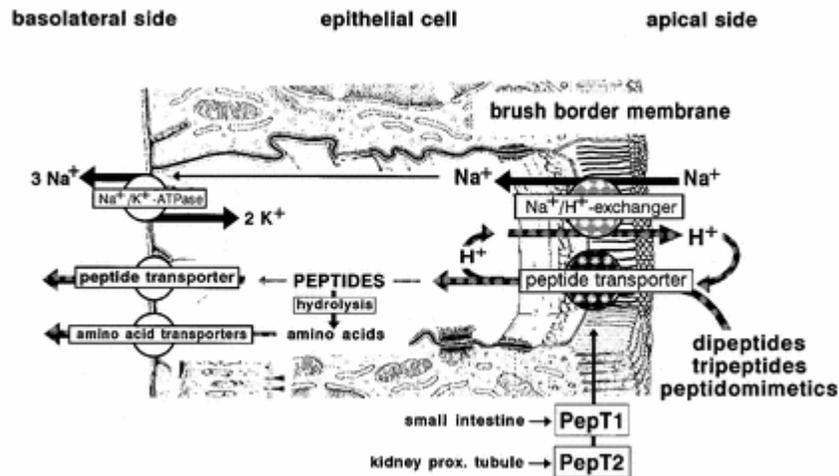


Figura 8: Transporte de peptídeos e peptidomiméticos a nível celular. Este é um dos modelos utilizados para explicar a dependência do pH para a captação intestinal de peptídeos (Bolger et al., 1998).

Através destes transportadores é que realizamos o transporte de peptídeos através da membrana, participando então da absorção de nutrientes no intestino médio e também ele ajuda a compor o quadro dos transportadores que podem alterar ou manter os valores de pH nas diferentes regiões dos insetos e outros organismos (Bolger et al., 1998).

1.10.11. Na^+/K^+ ATPase

Esta bomba é um transportador que se localiza na membrana plasmática de quase todas as células dos organismos vivos.

Para manter o potencial elétrico da célula, esta precisa de uma baixa concentração de íons de sódio e de uma elevada concentração de íons potássio, dentro da célula. Fora das células ocorre o inverso e isto existe devido à difusão destes componentes através de canais iônicos existentes na membrana celular.

Para manter as concentrações ideais dos dois íons, a bomba de sódio bombeia sódio para fora da célula e potássio para dentro dela. Nota-se que este transporte é realizado contra os gradientes de concentração destes dois íons, o que ocorre graças à energia liberada com a clivagem de ATP (transporte ativo). Este bombeamento não é equitativo: para cada três íons sódio bombeados para o líquido extracelular, apenas dois íons potássio são bombeados para o líquido intracelular.

Como a membrana celular é muito menos permeável ao sódio que ao potássio, desenvolve-se um potencial elétrico (positivo, como ponto de referência o interior celular) na célula.

O gradiente de concentração e elétrico estabelecido pela bomba de sódio suporta não só o potencial elétrico de repouso da célula mas também os potenciais de ação em células nervosas e musculares. A exportação de sódio da célula proporciona a força motriz para que certos transportadores façam o importe de glicose, aminoácidos e outros nutrientes importantes para a célula. A translocação de sódio de um lado do epitélio para o outro cria um gradiente osmótico que suporta a absorção de água e evita que as células inchem até estourar.

O mecanismo que constitui a bomba de sódio é formado por uma proteína carreadora. Tal proteína é, na verdade, constituída por um complexo de duas proteínas, a maior chamada de subunidade alfa, com peso molecular de cerca de 100.000, e a menor chamada de subunidade beta, com peso molecular aproximado em 55.000.

Esta é uma importante bomba que cuida da homeostase celular e também da geração de energia para os transportes ativos que ocorrem nas células. Por esta e outras funções esta bomba foi monitorada ao longo dos estudos com o transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

1.11. α -manosidases e α -glicosidases

Alfa-D-manosidases são enzimas chave envolvidas em processamento de glucanas manosiladas e complexos contendo oligossacarídeos de manose N-ligados em células eucarióticas. Estas enzimas são agrupadas em 4 famílias de glicosídeo hidrolases (GH) de acordo com a classificação de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZY) (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel *et al*, 2009), nomeadamente GH38, GH47, GH76 e GH92. Para as últimas duas famílias, as quais incluem enzimas que hidrolisam α -(1,6) manana e α -(1,2), α -(1,3), e α -(1,6) manosil oligossacarídeos, respectivamente, um número limitado de artigos tem sido publicados (Ponzano *et al*, 2010). Ao contrário destas famílias pouco estudadas, as famílias GH38 e GH47 tem sido extensivamente estudadas e informações interessantes tem sido descobertas sobre a função, dobramentos em geral, mecanismos de catálise e especificidade de inibidores.

GH47, ou enzimas da classe I, as quais tem o dobramento $(\alpha/\alpha)_7$, são tipicamente inibidas por 1-deoximanojirimicina e possuem uma comportamento de hidrólise inversora, ou seja, a configuração do carbono anomérico do produto é invertida em relação ao substrato, e são específicas para ligações α -(1,2). Esta família inclui enzimas bacterianas e eucarióticas. Em janeiro de 2011, através do site <http://www.cazy.org/>, o número de ORFs correspondentes a esta família totalizava 243 ORFs, sendo 4 de Bacteria e 239 de Eukarya. Elas estão envolvidas em vias secretoras iniciais do retículo endoplasmático e Golgi, onde elas agem na maturação de N-glicanas e no controle de qualidade pela produção de manoses superiores $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (para revisar veja [Lederkremer, 2009; Mast et al, 2006]).

Enzimas pertencentes à família GH38, também chamadas de manosidases da classe II, possuem uma estrutura multidomínio, consistindo em um domínio N-terminal α/β , um feixe de 3 hélices, e um domínio C-terminal todo em folhas- β . Eles são tipicamente inibidos por swainsonina e possuem um mecanismo de reação retentora (Dorling, *et al.*, 1980; Numao, *et al.*, 2000). As enzimas desta família possuem aproximadamente 1000 resíduos de tamanho e tem sido encontradas nos domínios Archaea (27 ORFs em janeiro de 2011), Bacteria (389 ORFs) e Eukarya (135 ORFs) (<http://www.cazy.org/>).

A α -manosidase de Golgi mais estudada até hoje é uma de *Drosophila melanogaster* (dGMII), a qual teve sua especificidade de subsítio, e bases moleculares de catálise reveladas além de sua estrutura 3D (Van den Elsen, *et al.*, 2001; Numao *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2008).

A família G38 de Golgi também inclui outras alfa-manosidases como a III, por exemplo, as quais são específicas para ligações manosídicas α -1-3 e α -1-6.

As α -D-manosidases lisossomais são otimamente ativas em pHs ácidos e hidrolisam todas as ligações α -manosídicas entre manoses originárias do catabolismo de glicoproteínas para produzir $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_{(1-2)}$.

As α -manosidases de insetos melhor conhecidas são da classe II e ocorrem no complexo de Golgi, onde estão envolvidas na maturação de cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas (Gonzalez and Jordan, 2000; Kawart *et al.*, 2001). A maioria delas é solúvel, embora ocorram também ligadas às membranas microvilares, possuem um pH

ótimo entre 4,5 e 5,0, Km para p-nitrofenil α -manosídeos de 0,5 – 1,8 mM e massa molecular de 100-200 kDa (Terra and Ferreira, 1994). As α -manosídeses solúveis, pelo menos em *Rhodnius prolixus* (Terra et al., 1988) e *Dysdercus peruvianus* (Silva and Terra, 1994), são secretadas para o lúmen intestinal.

Até a dissertação de Nathália Ramalho Moreira (2008), onde foi purificada uma α -manosídesa de intestino médio de *Tenebrio molitor*, nenhuma α -manosídesa digestiva havia sido purificada completamente para assegurar uma classificação adequada. Nesta dissertação foi observado a presença de dois picos de atividade nomeados de Man 1 e Man 2, sugerindo a existência de duas α -manosídeses solúveis, que se diferem quanto a hidrofobicidade. O pH ótimo da α -manosídesa é de 5,6, seu pI é de 3,38 e sua massa molecular é de 123 kDa (com duas subunidades). Foi encontrado Km para o substrato p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo de 0,84 mM para Man 1 e 0,62 para Man 2. Também foram feitos ensaios de inibição com dois inibidores que sabidamente inibem carboidrases, um é o deoximanojirimicina e o outro é a swainsonina. O fato desta enzima ser inibida apenas por Swainsonina em concentrações razoáveis, permite a sua classificação como tipo II. Isso sugere que ela é derivada da forma lisossômica, embora apresente pH ótimo alterado.

Enzimas semelhantes a α -manosídesa digestiva de *T.Molitor* foram encontradas no besouro *Rhynchophorus palmarum* (Bedikou et al., 2009a; 2009b). Estas enzimas foram purificadas e caracterizadas cineticamente com o intuito de aplicações biotecnológicas, mas ainda continuamos sem dados que relacionam dados cinéticos com sequências e mecanismos de secreção.

Desta forma, α -manosídeses também são enzimas digestivas, as quais atacam inicialmente glicosilações de proteínas para que depois outras enzimas possam chegar até seus substratos. Ela pode ser classificada então como uma enzima de digestão inicial, mas é necessário um estudo destas enzimas, principalmente um estudo mais molecular para se assegurar uma localização e função mais precisa.

Até o momento ainda não temos dados que faça conexões entre dados cinéticos e sequências obtidas de insetos, o que será um dos focos deste trabalho.

α -Glucosidases (EC 3.2.1.20) catalisam a hidrólise de ligações α -1,4-glicosídicas de resíduos de monossacarídeos pelo terminal não redutor de aril (ou alquil)-glicosídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos. As α -glucosidases são classificadas em função de sua similaridade de sequência em quatro famílias: as famílias 4, 13, 31 e 97 (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993). As α -glucosidases de insetos ocorrem como formas solúveis no lúmen intestinal como observado em Coleoptera (Ferreira e Terra, 1989), e Hymenoptera (Schumaker et al, 1993) ou aprisionadas no glicocálix da célula intestinal como em Lepidopera (Santos e Terra, 1986). Elas também podem ser ligadas a membranas microvilares (Terra na Ferreira, 1994; 2005), a membranas perimicrovilares (Silva and Terra, 1995) ou ainda a membranas perimicrovilares modificadas de células intestinais de afídeos (Cristofolletti et al., 2003). As duas últimas α -glucosidases ligadas a membranas, assim como a enzima solúvel de intestino de abelhas (Nishimoto et al., 2001), foram purificadas até a homogeneidade eletroforética. A α -glucosidase de *Acyrtosiphon pisum* é ativa em reação de transglicosilação (Cristofolletti et al., 2003) o que, associado à rápida absorção de frutose (Ashford et al., 2000), favorece a diminuição da osmolaridade da seiva ingerida rica em sacarose.

A compartimentação das α -glucosidases no intestino médio depende da posição filogenética dos insetos, de acordo com o fato estabelecido de que toda digestão padrão se correlaciona bem com a filogenia (Terra, 1988; 1990).

Existem sequências de α -glucosidases conhecidas para díptera e *A.pisum* (Price et al., 2006), mas isso ainda é pouco quando comparado a quantidade de insetos conhecidos. Portanto há carência de estudos de estrutura-função para essas enzimas.

Uma vez que foram encontradas algumas enzimas na varredura da biblioteca com anticorpos anti-membrana microvilar, estamos interessados em saber como ocorre a secreção de enzimas juntamente com o fenômeno da secreção apócrina. Daremos uma atenção especial para estas duas enzimas digestivas: as α -manosidases e as α -glicosidases.

Ainda não existe uma classificação adequada dentro do CAZY para as α -manosidases digestivas, as quais provavelmente são derivadas das lisossomais, porém com seu pH ótimo alterado. A falta de informação na literatura aliada ao grande interesse do nosso laboratório em elucidar e estudar características enzimáticas,

moleculares e fisiológicas dos insetos, gera um interesse especial na α -manosidase de *Tenebrio molitor*. Alguns estudos sobre esta enzima já foram feitos, no entanto alguns experimentos ainda serão necessários para ajudar a criar uma nova classe, a classe das glicosídeo hidrolases digestivas.

1.12. Método de detecção óptico por ressonância de Plasmons de superfície (SPR) – histórico e princípio

Otto (1968), Kretschmann & Raether (1968), precursores nos estudos de SPR, observaram que quando um feixe de luz monocromática é incidido sobre uma superfície metálica em configuração de reflexão total atenuada, nota-se a diminuição da reflexão da luz. Esse fenômeno foi então associado à excitação de plasmons na superfície metálica (figura 9).

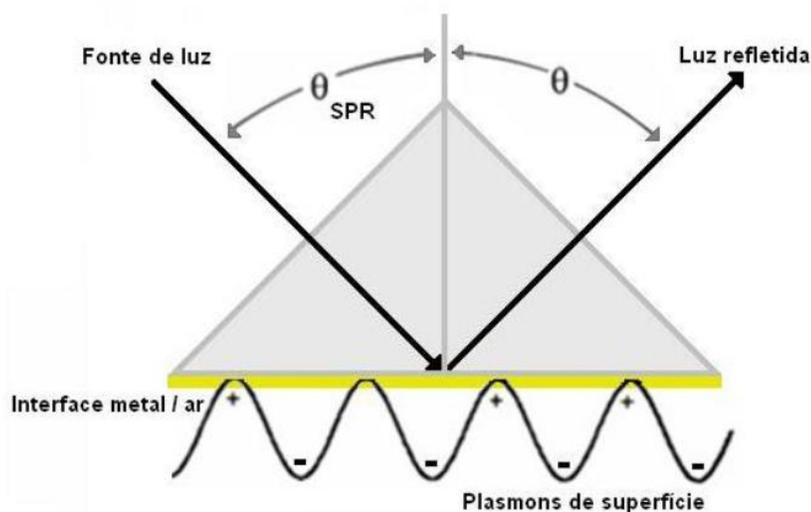


Figura 9: Geração de plasmons de superfície utilizando a configuração de Kretschmann, com reflexão total atenuada. O filme metálico, de ouro ou de prata, é evaporado diretamente no prisma de vidro ou quartzo, e os plasmons são excitados do outro lado desse filme. θ é o ângulo onde se observa o efeito ou ângulo de SPR.

No intuito de explicar o fenômeno de excitação de plasmons de superfície, é necessário definir termos como reflexão total e ângulo de SPR crítico. Ilustremos uma situação em que uma fonte de luz monocromática (lasers ou LEDs) e polarizada (seu componente vetor-elétrico é paralelo ao plano de incidência) atinge uma interface do

tipo ar-água. Quando isso ocorre, parte da luz é refletida e parte é refratada. O aumento do ângulo de incidência acarreta aumento no ângulo de refração, que ao alcançar 90° indica uma refração tangente a interface. Os ângulos acima deste ângulo de refração tangencial são denominados ângulos de reflexão total (Kretschmann et al., 1968).

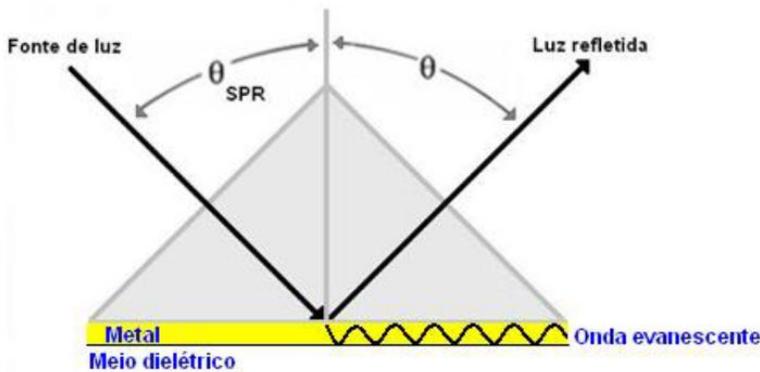


Figura 10: Onda evanescente gerada pela interação de feixes luminosos com os elétrons livres do ouro. Filme metálico de 50 nm de espessura evaporado diretamente no prisma. O meio ar-água pode ser considerado um dielétrico.

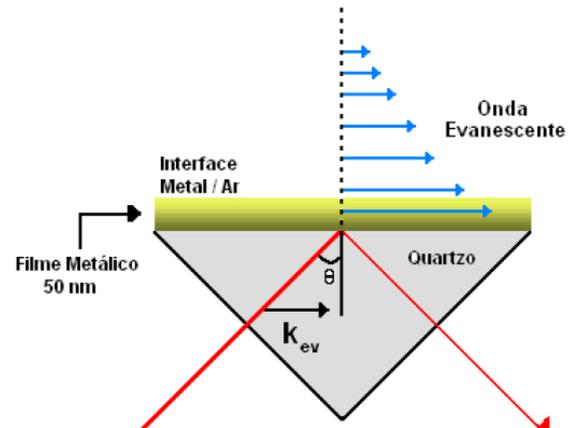


Figura 11: Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica (ld).

Em certos ângulos de incidência, os elétrons livres do metal (ouro) oscilam e absorvem energia luminosa, gerando ondas evanescentes que se propagam paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico (figura 10). Portanto, ocorrerá a excitação de plasmons de superfície, se um metal for colocado na interface com um meio dielétrico e se a fonte luminosa for monocromática e polarizada. A ressonância de plasmons de superfície será detectada pela diminuição na intensidade da luz refletida. O ângulo que ocorre essa interação é chamado de ângulo de SPR (Kretschmann et al, 1968).

O princípio da técnica de SPR é baseado no fato que as propriedades ópticas da interface afetam o ângulo de SPR (Θ_{SPR}). Quando o feixe luminoso alcança a interface entre os meios indicados na figura 11, ocorre à formação de uma oscilação de densidade de carga superficial, que é associada com uma onda eletromagnética, cujo vetor do campo é máximo na superfície e decai exponencialmente com a distância (campo evanescente), podendo assim afetar e “sentir” as regiões próximas à interface

(Homola, J. 2006). A intensidade da onda evanescente decai exponencialmente com a distância da superfície de ouro (figura 11), sendo que a sua extensão de decaimento (l_d) varia conforme o sistema que está sendo analisado. O cálculo do decaimento, obtido em nm, é dado pela equação 1 (Jung et al., 1998), onde λ é o comprimento de onda da luz incidente pelo equipamento, (n_{eff}) é o valor de índice de refração obtido após associação/dissociação de um composto, em relação a linha base e (ϵ) é a constante dielétrica do ouro (23,124) (Kikanskis et al., 1999) ou de outro metal utilizado. O SPRi possui um λ de 635 nm resultando em valores de l_d ordem de 260 nm.

$$l_d = \left(\frac{\lambda}{2\pi} \right) / \left[\frac{-n_{eff}^4}{(n_{eff}^2 + \epsilon_{metal})} \right]^{1/2} \quad (1)$$

A posição do ângulo em que ocorre o máximo de ressonância depende do índice de refração do meio que está em contato com o metal, e varia proporcionalmente com a concentração de moléculas na região de propagação da onda evanescente (figura 11). Portanto, SPR pode ser uma ferramenta útil para detectar a associação e a dissociação de biomoléculas em tempo real e sem a necessidade de um sistema de revelação, funcionando como uma balança óptica. Essa ausência de um sistema de revelação no estudo de interação entre biomoléculas é uma vantagem da técnica de SPR sobre outras de imunoenaios tais como ELISA e Western Blott. Se o índice de refração imediatamente acima da superfície do metal sofre alguma alteração, pela adsorção de qualquer molécula, uma mudança no ângulo de SPR é observada através do monitoramento deste ângulo, em que se pode quantificar a adsorção de moléculas em função do tempo (Homola et al., 2006).

2. Objetivos

Os objetivos do projeto, a serem perseguidos com as larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), distribuem-se em algumas vertentes principais:

- (A) Busca de seqüências correspondentes a proteínas com funções presumíveis em tamponamento luminal, absorção de nutrientes, fluxos intestinais e envolvidas nos mecanismos de secreção de enzimas como as α -manosidases e α - glicosidases.
- (B) Realizar análises por RT-PCR das sequências de interesse encontradas para verificar a presença ou a ausência destas moléculas nas várias regiões do intestino e corpo do inseto, com o intuito de detectar proteínas diferencialmente expressas no intestino da larva de *Tenebrio molitor*.
- (C) Geração de domínios ligantes de quitina de proteínas da membrana peritrófica de forma recombinante e analisar “in vitro” as interações desses domínios com a quitina.
- (D) Identificação dos sítios de expressão dos mRNAs correspondentes às proteínas de interesse descritas em (A) para propor mecanismos moleculares para fenômenos fisiológicos intestinais, como tamponamento luminal, fluxos intestinais e absorção de nutrientes.

3. Materiais e métodos

3.1. Manutenção e cultivo da colônia de *Tenebrio molitor*

Culturas estoque de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), foram mantidas em farelo de trigo a temperatura de 24-26 °C, a uma umidade relativa de 70-75 %. Larvas desenvolvidas (cada uma pesando cerca de 0,12 g) de ambos os sexos foram usadas nas preparações.

3.2. Preparação da membrana peritrófica de *Tenebrio molitor*

A membrana peritrófica e seu conteúdo foram homogeneizados em água bidestilada com o auxílio de um homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado obtido foi centrifugado (25.000x g; 30 min; 4°C), o sobrenadante resultante foi usado como fonte de proteínas solúveis do conteúdo luminal. O sedimento foi usado como fonte de membrana peritrófica. Além da membrana peritrófica, esse sedimento contém também a fração insolúvel do alimento ingerido pelo animal. Para obter apenas a fração de membrana peritrófica, a camada gelatinosa translúcida, que representa a menor parte do sedimento total e se posiciona na camada superior, foi retirada com o auxílio de uma espátula. Durante esse procedimento tentou-se retirar o mínimo da fração granulosa do sedimento (que é a maior parte de sedimento e deve representar a fração insolúvel do alimento ingerido pelo animal).

Essa fração gelatinosa foi então homogeneizada com o auxílio do homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem em uma solução de 60% de glicerol. Esse homogeneizado foi centrifugado (10.000x g; 15 min; 4 °C) e o sobrenadante retirado. O sedimento resultante é a fração granulosa contaminante que foi pega junto com a fração gelatinosa durante a coleta com a espátula. O sobrenadante foi então diluído de forma que a concentração final de glicerol fosse de 10% e novamente centrifugado (25.000x g; 30 min; 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento correspondente à fração gelatinosa inicial foi ressuspensionado em água bidestilada e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento novamente ressuspensionado em água bidestilada. Esse material foi usado como fonte de membrana peritrófica. Todos os passos foram realizados sob refrigeração.

3.3. Centrifugação diferencial de homogeneizado de tecidos do intestino médio (fracionamento celular)

O epitélio das porções anterior e média do intestino médio foram dissecados e no mesmo dia homogeneizados em um homogeneizador Potter-Elvehjem (15 movimentos) em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,0 contendo KCl 328 mM e EDTA 5 mM.

O pH do tampão foi ajustado à temperatura ambiente. O homogeneizado foi feito com 3 mg de proteína/mL, depois foi filtrado através de uma membrana de nylon com poro de 45 μ m e o volume recuperado foi ajustado para conter 2 mg de proteína/mL e foi centrifugado a 4 °C.

As seguintes frações foram coletadas: sedimento 1 (P1) resultante da centrifugação a 600 g por 10 min; sedimento 2 (P2) obtido a 3.300 g por 10 min; sedimento 3 (P3) obtido da centrifugação a 25.000 g por 10 min.

Após a centrifugação diferencial, os sedimentos foram coletados e homogeneizados no tampão previamente utilizado e em seguida foram submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento (sendo um dos congelamentos “overnight”) e posteriormente foram centrifugados a 10.000 g por 60 min.

O P1 sofreu os ciclos de congelamento e descongelamento, mas não foi centrifugado porque todo o material foi utilizado para a imunização do coelho. O P1 é a fração onde se encontra grandes vesículas que se desprendem das microvilosidades, ápices celulares e é bem abundante em mitocôndrias (Ferreira *et al.*, 1990).

A outra fração utilizada para imunização foi o sobrenadante do P3 após os ciclos de congelamento e descongelamento e a centrifugação final. Esta fração é rica em microvilosidades celulares e outras estruturas além de ser rica em conteúdo de vesículas (Ferreira *et al.*, 1990).

3.4. Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas presentes na amostra foi feita usando o método descrito por Smith et al., (1985) e modificado por Morton & Evans (1992). Foi utilizado curva padrão de albumina de ovo.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteínas (SDS-PAGE)

As amostras de proteínas foram diluídas com tampão de amostra (Tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 5% (m/v), 2- α -mercaptoetanol 1,3 mM, EDTA 1,0 mM, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)). Antes da aplicação, as amostras foram fervidas junto com o tampão acima descrito por 5 minutos. Foi usado o gel de corrida na concentração de 12% de poliacrilamida e o gel de empilhamento de 4% com SDS 1%, preparado segundo Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 200V a temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente, estivesse na borda inferior da placa. A coloração dos géis foi feita com Coomassie Blue R-250 0,1% (p/v) preparado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). A quantidade de proteína, contida nas diversas bandas separadas de cada amostra, pode ser quantificada usando uma curva padrão de uma quantidade crescente de albumina de ovo aplicada no mesmo gel. O marcador de massa molecular utilizado continha as seguintes proteínas: fosforilase B (116.000); soro albumina bovina (BSA) (80.000); ovoalbumina (52.500); anidrase carbônica (34.900); SBTI (29.900); lisozima (21.800).

3.6. Produção de anticorpos policlonais

A produção de anticorpo foi feita como descrito por Jordão et al., (1996). Antes da aplicação do material para a produção do anticorpo, foram retirados 5 mL de sangue do coelho, com o intuito de se obter o soro pré-imune.

A quantidade de proteína de cada preparação a ser usada na imunização foi determinada após cada uma ser submetida à eletroforese em SDS-PAGE. Após a eletroforese o gel foi corado por Coomassie Blue e as bandas minoritárias quantificadas comparando a sua intensidade com a intensidade das bandas de quantidades

crescentes de albumina de ovo, que também foram submetidas à eletroforese. O cálculo da quantidade de proteína total necessária em cada aplicação foi feito de forma que fossem inoculadas no mínimo 15 µg das proteínas menos abundantes, para que todas as proteínas pudessem ter quantidade suficiente para gerar anticorpos no coelho.

A quantidade de proteína total na amostra necessária em cada aplicação foi diluída para o volume final de 1 mL e então misturada com o adjuvante completo de Freund (Sigma) (na proporção de 1:1). Uma segunda aplicação foi realizada 30 dias após a primeira, aplicando os mesmos valores em massa de proteína, mas agora com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Após 15 dias da segunda imunização, o sangue do coelho foi retirado para se obter o soro imune. Para se obter o anticorpo semi-purificado foi utilizada a técnica descrita por Jordão et al., (1996), o sangue imune das respectivas preparações foram deixados por 1 h a 37°C e em seguida a 4°C por 19 h. O mesmo procedimento foi realizado com o sangue pré-imune. Os respectivos materiais foram então centrifugados (600 g rpm, 15 min a 4°C) e ao sobrenadante (soro) foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada preparada em tampão fosfato de sódio 200 mM pH 6,5 na proporção de 1:1 (v/v). Após permanecer por 18 h a temperatura ambiente, a suspensão obtida foi centrifugada (600 g, 15 min a 4°C). O sedimento foi então ressuspensionado em uma solução 50% saturada de sulfato de amônio pH 6,5 e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Esse passo foi então repetido por mais uma vez e o sedimento final obtido foi ressuspensionado em NaCl 125 mM. As respectivas preparações foram então dialisadas por 20 horas contra 1000 volumes de NaCl 125 mM com uma troca da salina. Os dialisados foram aliquotados e mantidos a -20°C até o uso.

3.7. Western Blot

As diversas preparações foram submetidas a SDS-PAGE 12 %. Após a separação eletroforética, o gel foi submetido ao método de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose descrito por Towbin *et al.*, (1979). Inicialmente o gel foi equilibrado por 15 min em tampão Tris 25 mM pH, glicina 192 mM e contendo metanol 20%, pH 8,3. Em seguida, foi realizada a transferência eletroforética das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose de poro de 0,45 µm, também

previamente equilibrada por 15 min no mesmo tampão. Foi utilizado o sistema de transferência de proteínas semi-seco (Bio Rad), na presença do tampão acima nas condições indicadas pelo manual do aparelho (15V; 5,5 mA/cm² de gel; 30 min). A eficácia de transferência das proteínas foi monitorada por marcadores de peso molecular pré-corados Low-Range (Bio-Rad, usados 5 µL) aplicados na eletroforese. Os padrões usados foram: fosforilase B (116.000); Soro albumina bovina (BSA) (80.000); ovoalbumina (52.500); anidrase carbônica (34.900); SBTI (29.900); lisozima (21.800).

Antes de serem imunoenunciadas, as membranas de nitrocelulose foram deixadas imersas em uma solução 5 % (p/v) de leite em pó desnatado dissolvido em TBS (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo NaCl 0,15 M) por uma 1h a temperatura ambiente (ou 18h a 4 °C). Esse procedimento é útil para bloquear os sítios da membrana de nitrocelulose que não contêm proteína transferida do gel, evitando assim ligações inespecíficas nos passos que se seguem. As membranas de nitrocelulose foram então lavadas 4 vezes por 5 min cada com TBS contendo Tween-20 0,05% (v/v) (TBS-T), incubadas por 2h com o anticorpo na diluição apropriada em TBS-T (todos os anticorpos foram usados na diluição de 200x). As membranas de nitrocelulose foram então lavadas com TBS-T 4 vezes por 5 min cada, incubadas por mais 2h com uma solução de anti-igG de coelho acoplada a peroxidase diluída 1:1000 em TBS-T. A seguir, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 4 vezes por 5 min com TBS e então reveladas. Para isso as membranas foram incubadas com uma solução feita com 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvidas em 4 mL de metanol, à qual foram adicionados 20 mL de TBS aquecido a 37 °C e 15µL de H₂O₂, até que bandas escuras pudessem ser visualizadas (até 15 min). Após serem extensivamente lavadas com água destilada as membranas de nitrocelulose foram deixadas para secar entre duas folhas de papel de filtro em local arejado.

Para determinar a diluição de anticorpo imune a ser usada foi feito uma Western blot (dados não mostrados) onde as diversas preparações foram submetidas a SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose (50 µg de proteína total) e testadas com diversas diluições do anticorpo imune gerado pelas respectivas

preparações (100, 200, 500 e 1000x). A diluição escolhida foi aquela onde ainda era observada uma boa marcação na maior diluição do anticorpo imune.

3.8. Dissecção dos tecidos, extração de RNA total de *Tenebrio molitor*

Para os experimentos de extração de RNA total, as larvas de *Tenebrio molitor* foram imobilizadas no gelo e submetidas ao procedimento de dissecção em lupa higienizada com álcool 70°GL. Nesse caso, as pinças e lâminas utilizadas foram fornadas a 150°C por pelo menos 4 horas. Foi utilizada água Milli-Q contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) autoclavada (Ausbel *et al.*, 1995) para auxiliar na dissecção dos insetos, ao invés de solução de NaCl 342 mM gelada. Os tecidos dissecados de *Tenebrio molitor* para extração de RNA para o pirosequenciamento foram: o epitélio do intestino médio inteiro para a primeira rodada do 454 e a metade anterior do intestino médio para a segunda rodada na máquina. Para os experimentos de RT-PCR os tecidos dissecados de *Tenebrio molitor* foram: carcaça, corpo gorduroso, túbulo de Malpighi e epitélio do intestino médio dividido em três regiões: anterior, média e posterior. Todos esses materiais foram lavados com água DEPC e então colocados em tubos “*ependorf*” devidamente identificados no gelo seco. Esses materiais foram estocados a -80°C até serem submetidos à extração de RNA com Trizol[®].

O RNA total foi extraído dos tecidos alvos, previamente dissecados e armazenados a -80°C, usando 1 mL de Trizol[®] (*Invitrogen Life Technologies*) e os tecidos foram completamente ressuspensos com o auxílio de uma seringa de 3 mL. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 volumes de CHCl₃, seguindo-se agitação por inversão e incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 16.000 xg por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi retirada e transferida para outro microtubo. A essa fase foi adicionado meio volume de isopropanol/solução de precipitação [NaCl 1,2M, citrato de sódio 0,8 M em água contendo DEPC 0,01% (v/v)], seguindo-se incubação por 10 minutos. O microtubo foi centrifugado a 16.000 xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nestas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente em fluxo laminar por 3 minutos.

O precipitado de RNA total foi ressuspenso em 100 μ L de água DEPC 0,01% (v/v) e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. A concentração final do RNA total foi estimada pela medida da absorbância em 260 nm. Os contaminantes do RNA como proteínas e fenóis foram monitorados por leituras das razões 260 nm/280 nm e 260nm/230nm respectivamente. $Abs_{260} = 1$ equivale a 40 μ g de RNA/mL. Este RNA foi mantido a - 80°C até que ele fosse utilizado.

3.9. Tratamento do RNA total com DNase para produção de cDNA para pirosequenciamento

Foi utilizada a TurboTM DNase da empresa Ambion (Applied Biosystems) para digerir todo e qualquer DNA genômico presente na amostra de RNA total extraída do epitélio do tubo digestivo de *T. molitor*. Esta enzima digere tanto DNA fita simples quanto fita dupla com terminal 5' fosfato.

Foi adicionado 1 μ L de TurboTM DNase (2U) para cada 10 μ g de RNA em uma reação de 50 μ L, juntamente com o tampão da enzima. O conjunto de reação foi inubado a 37°C por 30 min segundo o manual do kit da enzima. Estas condições podem remover cerca de 2 μ g de DNA genômico. Após 30 min, o tubo foi aquecido a 75°C por 10 min e EDTA foi adicionado no tubo numa concentração final de 15 mM.

3.10. Purificação do RNA total após tratamento com TurboTM DNase

Para a purificação do RNA total após tratamento com a enzima DNase, foi utilizado o kit RNA Clean up da empresa Qiagen. Este kit foi utilizado para remover qualquer DNA que tenha sido clivado durante o tratamento com a DNase no passo anterior. Resumidamente, este kit possui uma coluna, na qual o RNA total se liga com o auxílio do ambiente criado ao se adicionar etanol. Esta ligação do RNA na membrana do RNeasy é seletiva e os contaminantes são eliminados. Ao final o RNA é eluído com água livre de RNase.

3.11. Quantificação de RNA total e mRNA por Ribogreen

Para quantificação dos RNAs foi utilizado o kit Quant-iTTM RiboGreen® da empresa Invitrogen. Este reagente é um corante fluorescente ultrasensível que cora

ácidos nucleicos e é utilizado para quantificar em solução o RNA. Esta técnica é menos afetada por contaminantes do que as que quantificam ácidos nucleicos por leitura a 260 nm.

RNA ribossomal é utilizado na construção de uma curva padrão da ordem de ng de RNAs.

Este kit não é capaz de quantificar quantidades menores que 1ng/mL RNA. A excitação máxima do corante ligado ao RNA é em 500 nm e a emissão máxima é em 525 nm.

3.12. Purificação de mRNA

Para a purificação do mRNA foi utilizado o kit de purificação Dynabeads® mRNA. Esta purificação baseia-se na separação do mRNA do RNA total. O princípio da separação é uma cromatografia de afinidade na qual resíduos de oligo (dT)₂₅ são ligados covalentemente na superfície das Dynabeads. Estes resíduos se ligam a cauda de poliA na região 3' dos mRNAs de eucariotos separando este mRNA dos outros RNAs presentes.

Um mg de beads (200 µL) pode isolar mais que 2 µg de mRNA, dependendo da amostra e o máximo de RNA total que pode ser utilizado por reação são 75 µg.

3.13. Análise da qualidade do RNA total e mRNA

Esta análise da qualidade do RNA (se está intacto ou possui degradações) é feita utilizando o kit da Agilent chamado RNA 6000 juntamente com o equipamento Bioanalyzer 2100 da Agilent.

Com este aparato também conseguimos verificar o tamanho dos RNAs encontrados na amostra e sua integridade.

3.14. Síntese de cDNA

A preparação da biblioteca de cDNA consiste de 9 passos principais mostrados na figura 12 abaixo:

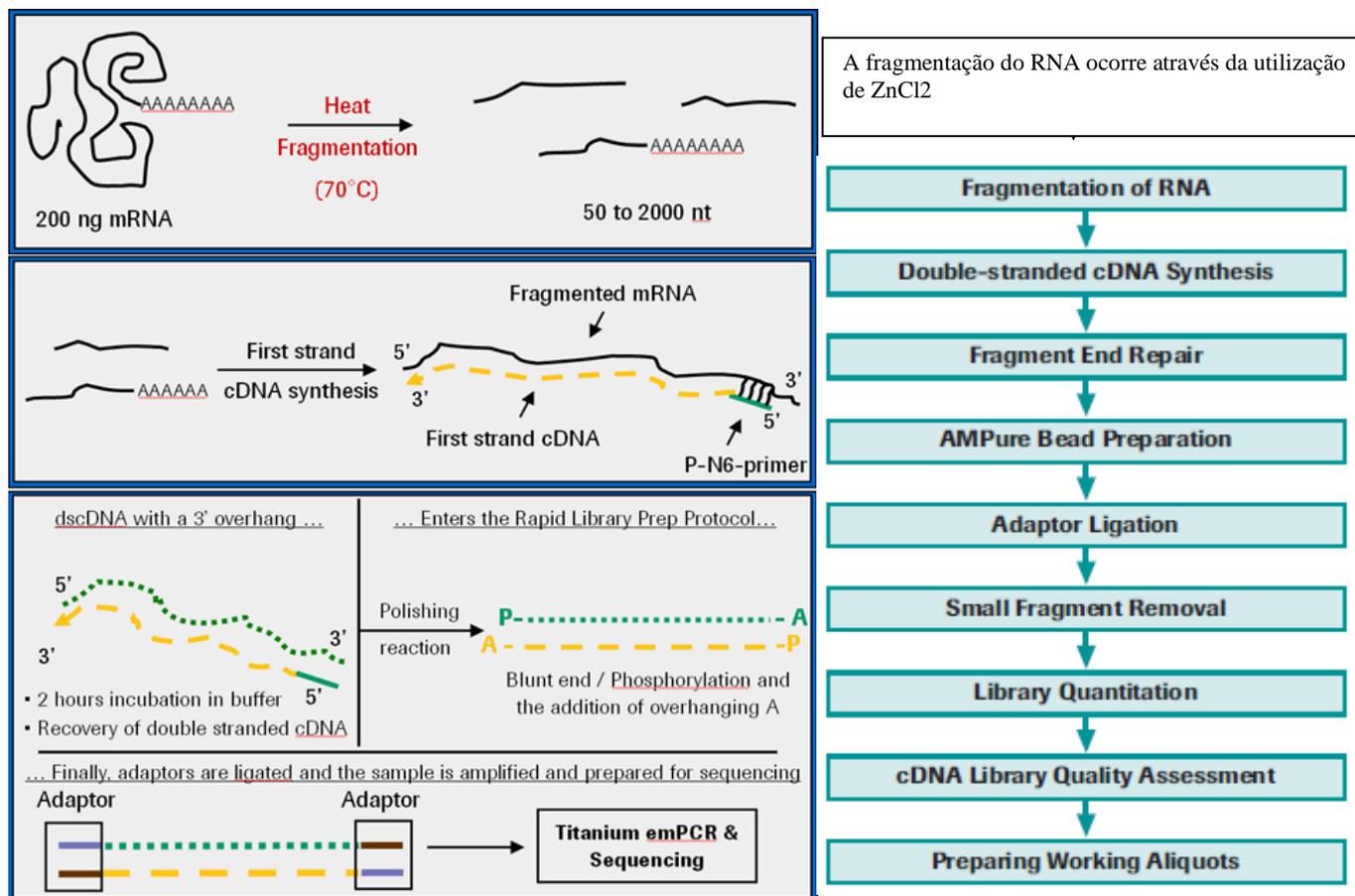


Figura 12: Passos da preparação da biblioteca de cDNA. Clotilde Tailing, 2011. Nature methods p V-VII.

3.15. RT-PCR semi-quantitativo

Após a extração de RNA total dos diferentes tecidos descritos no item 3.8, estes foram utilizados para produção de cDNA das regiões correspondentes, utilizando a transcriptase reversa fornecida pelo kit da *SuperScript First Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen)*. O cDNA resultante foi usado como molde para amplificação das sequências por PCR com iniciadores específicos para cada sequência, tendo-se como controle constitutivo a actina do mesmo inseto.

A reação de PCR foi realizada usando a Taq DNA polimerase (Invitrogen) em meio tamponado contendo 1,5 mM de MgCl₂. As condições de PCR foram as mesmas para todas as amostras, variando apenas o número de ciclos para amplificação das diferentes sequências. O número de ciclos foi escolhido após várias tentativas, assim que a amplificação estava em fase log, resultando em bandas claras e visíveis.

O tamanho dos produtos do RT-PCR deve ser compatível com os tamanhos esperados, assim eliminando a contaminação por DNA genômico na preparação.

3.16. Programas de bioinformática

3.16.1. BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) considera regiões de similaridade entre as sequências locais. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com sequências de uma base de dados e calcula a significância estatística dos alinhamentos. O programa BLAST pode ser usado para inferir relações evolutivas e funcionais entre as sequências, assim como para ajudar a identificar os membros de famílias protéicas (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Este programa também nos deu suporte para confirmar a similaridade das sequências obtidas através do pirosequenciamento.

3.16.2. ClustalW

Programa usado para o alinhamento múltiplo de sequências de DNA ou proteínas (HIGGINS *et al.*, 1988). Pode ser utilizado na identificação de regiões conservadas das sequências e para inferências filogenéticas.

3.16.3. Newbler

Programa para montagem de genomas ou transcriptomas, desenvolvido especificamente para processar os dados gerados pelo pirosequenciador 454-GS-series (ROCHE). O programa pode ser utilizado tanto através da linha de comando quanto via interface, utilizando Java GUI. Tem como dado de entrada o arquivo binário gerado pelo sequenciador 454, onde se encontram todas as informações referentes ao pirosequenciamento. Os arquivos *.sff obtidos referentes as amostras de cDNA de *Tenebrio molitor* foram submetidas à montagem por meio da plataforma gsAssembler (montagem de novo) do programa Newbler 2.3, fornecido pela Roche 454. O programa também permite o uso de sequências de outros procedimentos de seqüenciamento, desde que estejam no formato FASTA. O montador se utiliza de sobreposições para a formação de contigs, utilizando a 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 à 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, onde qualquer deficiência identificada nas outras etapas é corrigida e os contigs são estendidos.

Foi considerado um valor de sobreposição mínimo e identidade de sobreposição de 40 bases e 90%, respectivamente. Foram realizados testes modificando tais parâmetros, entretanto, nenhuma modificação significativa no número total de contigs gerados foi obtida. Assim sendo, o default do programa foi utilizado para se prosseguir com as análises.

3.16.4. dCAS

Para atender as necessidades e facilitar as atividades de pesquisadores, foi desenvolvido um pacote de software: Desktop System Annotation cDNA (dCAS), que é usado para executar em larga escala, limpeza, clustering de montagem, e anotação de seqüências através de um computador desktop. dCAS é um software de anotação, que foi desenvolvido pelo Dr. José M. C. Ribeiro e colaboradores (Yongjian Guo et al., 2009) no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, utilizando o Visual Basic e foi amplamente utilizada por muitos laboratórios ao redor do mundo (Andersen et al. 2007; Arca et al, 2007;. Assumpção et al, 2008). dCAS usa um conceito de fluxo de trabalho para integrar várias etapas de processamento e análise das seqüências. Há dois fluxos de trabalho atualmente disponíveis em dCAS: fluxo de trabalho do Núcleo, projetado para processamento de uma única biblioteca de cDNA, e a Biblioteca Compare fluxo de trabalho, para a análise de múltiplas bibliotecas de cDNA derivado da mesma amostra biológica sob diferentes condições experimentais. Para uma única biblioteca de cDNA, o fluxo de trabalho primeiro retira seqüências de vetores de clonagem que possam estar unidos à seqüência de interesse. Isto é conseguido através da pesquisa dentro do banco de dados UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Fragmentos de seqüências são então agrupadas usando Blast (Altschul et al. 1990) e montados em contigs usando Cap3 (Huang et al. , 1999). Contigs são então anotados por comparação com bases de dados de seqüências especificadas pelos usuários e

peptídeos sinal são previstos usando SignalP servidor (Emanuelsson et al., 2007). Finalmente, os dados analisados são reunidos e compilados em um planilha de Excel com hyperlinks referindo-se a arquivos de dados gerados em cada etapa de análise.

Para várias bibliotecas, o workflow de comparar bibliotecas constrói os clusters unindo sequências complementares entre as várias bibliotecas comparadas e anota os contigs usando blast em vários bancos de dados e no SignalP. Os resultados são então compilados em um relatório em Excel que agora também possui análises estatísticas sobre a diferença de expressão gênica das sequências entre as bibliotecas de cDNA analisadas na comparação.

A grande maioria das análises das sequências obtidas através do pirosequenciamento (454) foi realizada através deste programa dCAS, após prévia montagem com o Newbler, inclusive a comparação entre as duas bibliotecas de cDNA que sequenciamos. A interface do programa dCAS é mostrada na figura 13 abaixo.

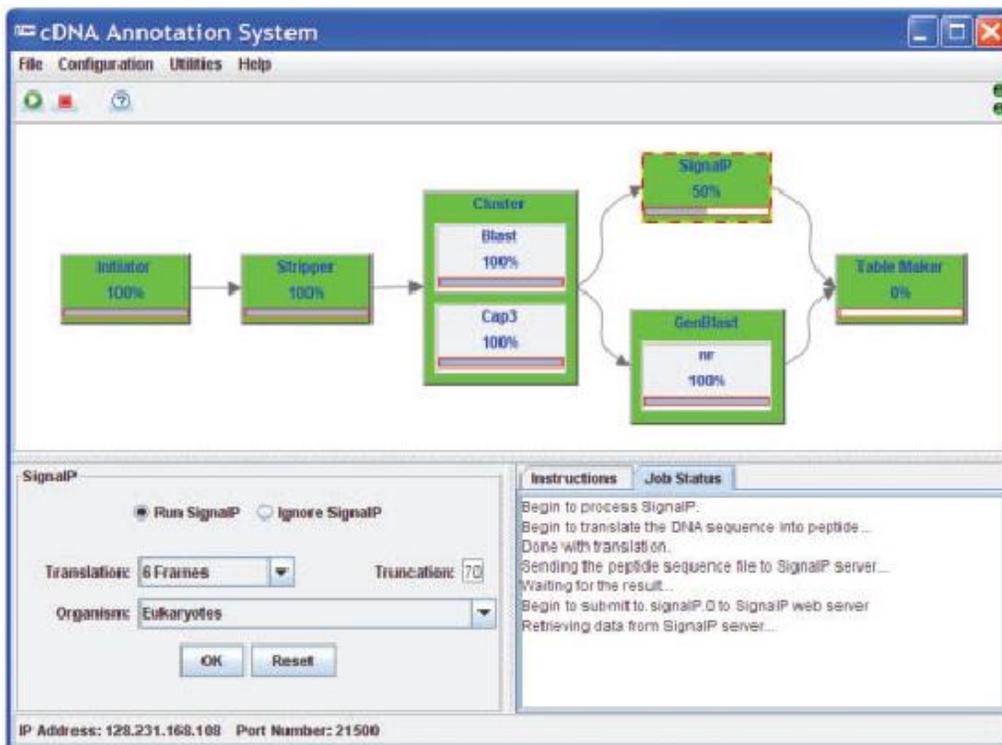


Figura 13. DCAS interface..

3.16.5. Curagem das sequências

Todos os contigs selecionados foram submetidos à Blast X, o que permitiu verificar se a anotação da sequência estava correta e se a sequência estava completa ou não dentre outros parâmetros sempre resumidos através das tabelas ao longo do texto. Quando se confirma a similaridade com a proteína almejada a sequência foi traduzida (no quadro de leitura correspondente da sequência de maior similaridade encontrada no banco de dados NR) usando a ferramenta de Translate do ExPasy Tools (web.expasy.org/translate). Algumas vezes se observa que a sequência aparece em dois quadros de leitura diferentes, o que causa uma interrupção na apresentação gráfica dada pelo Blast X. Isso ocorre devido ao tipo de seqüenciamento realizado pelo 454, onde é difícil conseguir uma resposta linear quando várias bases do mesmo tipo estão lado a lado (Carvalho & Silva, 2010). Nesse caso, usando a sequência mais semelhante àquela que apresenta problema, verifica-se qual é o aminoácido no qual houve o problema e utilizando uma tabela com os códons para os diversos aminoácidos, verifica-se qual a base que pode ser removida ou adicionada para que a sequência fique em um único quadro de leitura. Após este tratamento das sequências, alguns contigs se juntam e o número de contigs normalmente torna-se menor que o inicial.

Uma vez tendo a sequência da suposta proteína em um único quadro de leitura é feita a comparação com uma proteína já caracterizada através de Blast P, para verificar se a suposta proteína contém os aminoácidos importantes para sua função. Nesse caso analisamos 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=/NPSA/npsa_server.html). Além das assinaturas e tipos de domínios também foi verificado nas sequências o número de alças transmembrana pelo software TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) e os motivos característicos das proteínas de interesse preditos pelo interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

3.17. Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular

Os meios de cultura para o crescimento de células e os tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular foram preparados como descritos por Sambrook *et al.* (1989).

3.18. Imunoensaios

3.18.1. Plaqueamento e indução das bibliotecas de cDNA

Células XL1-blue MRF' foram crescidas em LB-líquido contendo maltose 0,2% (p/v) e $MgSO_4$ 10 mM durante cerca de 16 h, a 30 °C e sob agitação a 250 rpm. Em seguida foram sedimentadas por centrifugação (2.000x g; 10 min; temperatura ambiente) e então ressuspensas em $MgSO_4$ 10 mM para uma $A_{600} = 0,5$. Uma alíquota de 2 mL desta suspensão de células foi incubada com alíquotas da biblioteca de cDNA de intestino médio de *Tenebrio molitor*, que foi preparada como descrito por Ferreira *et al.* (2007). As alíquotas continham $1,5 \times 10^{10}$ pfu mL⁻¹ (título da biblioteca) e a incubação foi feita por 15 min a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 mL de NZY-agarose a 55 °C à mistura de incubação e essa derramada sobre uma placa NZY-ágar de 240 x 240mm. As placas de NZY-ágar permaneciam por um período de cerca de 6 h a 37 °C para o aparecimento dos primeiros sinais de placas de lise. A escolha da quantidade de fagos a serem plaqueados foi feita de forma a possibilitar uma densidade na placa de cultura que permitia a obtenção de clones isolados na varredura.

Após o aparecimento dos primeiros sinais de placas de lise, iniciava-se o procedimento de indução do promotor da α -Galactosidase com IPTG. Para isso eram usadas membranas de nitrocelulose (Bio Agency) previamente esterilizadas, através da exposição por 15 min à luz UV de cada face das membranas. Essas eram então embebidas em IPTG 10 mM estéril e deixadas secar no fluxo laminar. As membranas contendo IPTG eram então colocadas cuidadosamente sobre o meio de cultura evitando a formação de bolhas. Em seguida, as placas eram colocadas novamente para incubar a 37 °C, desta vez, por um período de 4 horas.

Durante o processo de indução, as proteínas de fusão (α -Galactosidase + polipeptídeo codificado pelo cDNA do inserto) induzidas em cada placa de lise ficavam aderidas às membranas de nitrocelulose. Após o término da indução, as placas eram deixadas pelo menos 2 h a 4 °C para evitar que pedaços de agarose ficassem aderidos às membranas de nitrocelulose quando essas fossem retiradas da placa. Marcas eram feitas nas membranas e nas placas de NZY-ágar usando agulhas, com o intuito de orientar o posicionamento da membrana na placa. Esse procedimento é importante para permitir a localização dos clones de interesse. Após serem retiradas dos meios de cultura, as membranas de nitrocelulose eram então submetidas aos imunoenaios.

3.18.2. Imunoensaio nas membranas de nitrocelulose

O imunoensaio nas membranas contendo as proteínas de fusão foi feito como descrito no item 3.7.

Durante o procedimento de revelação, os sinais positivos que fossem aparecendo eram marcados com lápis de ponta fina de forma a evitar que o sinal fosse perdido após o término da revelação.

As diluições dos anticorpos usadas para os imunoenaios foram de 200 vezes para todos os anticorpos utilizados.

3.18.3. Coleta dos clones positivos

Após o imunoensaio, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com água destilada e usadas para fazer uma réplica com o auxílio de uma transparência. Essa réplica tinha marcada os clones positivos e foi usada para localizar na placa de cultura quais as placas de lise que tinham as proteínas que reagiam positivamente com o anticorpo e que, conseqüentemente continham os fagos apresentando os cDNAs de interesse. As placas de lise eram então recolhidas do meio de cultura com o auxílio de um palito estéril. Pedacinhos do meio de cultura contendo apenas placas de lise isoladas eram então retirados e transferidos para um dos poços de uma placa de 96 poços contendo 100 μ L de tampão SM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 8mM Mg₂ SO₄; 0,0025 % p/v de gelatina). Nesse tampão, os fagos λ Zap II se mantêm estáveis por cerca de 6 meses. Depois de incubados por 2 h à temperatura ambiente ou 16 h a 4 °C,

a suspensão de fagos já podia ser usada para experimentos posteriores. Após o preenchimento com clones positivos de uma placa de 96 poços (sendo um clone selecionado por poço), era feito o procedimento de excisão de plasmídeos a partir desses fagos.

3.18.4. Excisão do plasmídeo p-Bluescript

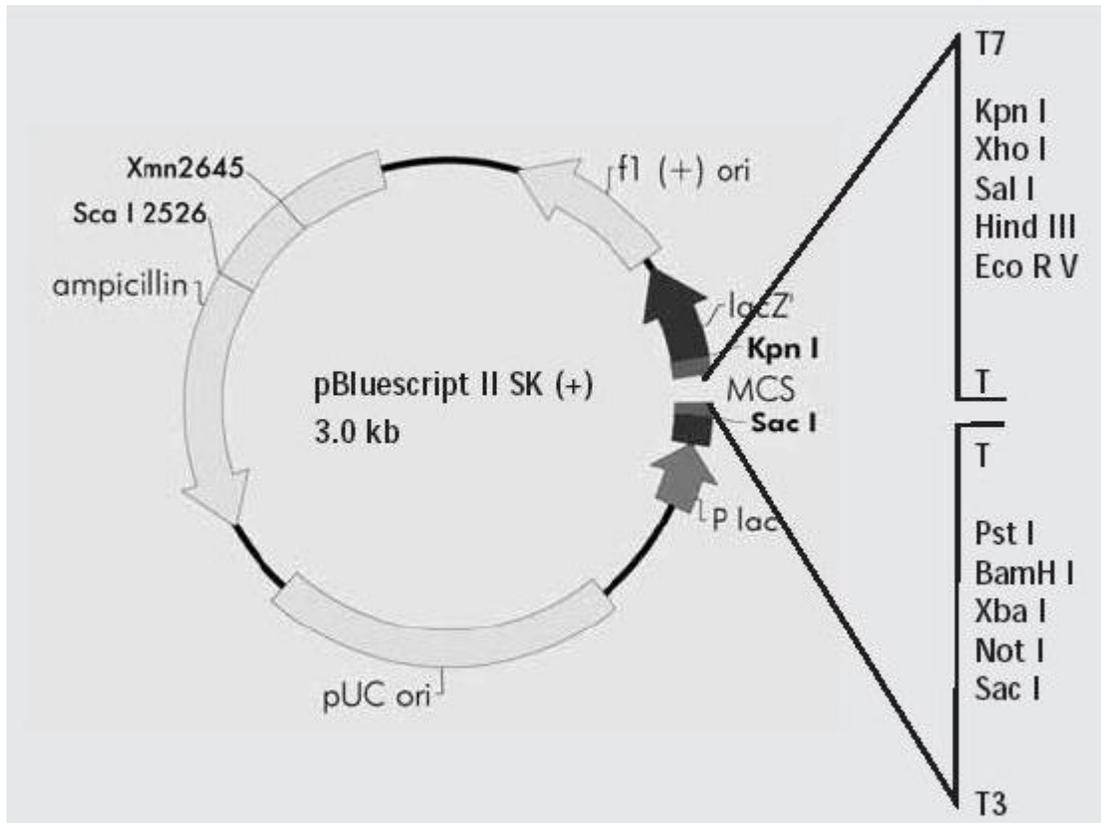


Figura 14: Mapa esquemático do plasmídeo pBluescript. Os cDNAs encontram-se clonados no gene da α -galactosidase (LacZ). Esse gene se encontra sobre o controle do promotor lac que é induzido na presença de IPTG. cDNAs que estão em fase de leitura com o gene da α -galactosidase são expressos como proteínas quiméricas na presença de IPTG.

Inicialmente foi feita a preparação do estoque de células XL1-blue MRF' e SOLR no dia a ser feita a excisão. Essas células foram crescidas em LB-líquido contendo maltose 0,2 % (p/v) e $MgSO_4$ 10 mM durante cerca de 16 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação (2.000x g; 10 min; temperatura ambiente) e ressuspensas em $MgSO_4$ 10 mM para uma $A_{600} = 1,0$.

O protocolo de excisão foi feito em placas de 96 poços estéreis que tem a capacidade para 300 μ L de solução em cada poço. A cada poço foram adicionados

13,3 μL de células XL1-blue MRF' que foram co-infectadas com 10 μL da amostra de fago λ Zap II isolado, obtido da varredura da biblioteca de cDNA, e 0,06 μL de fago "helper ExAssist". Essa mistura era então incubada a 37 °C por 16 h.

Em células XL1-blue MRF' coinfectadas por esses dois fagos, proteínas codificadas pelo fago "helper" reconhecem especificamente regiões do DNA do fago λ Zap II e promovem a excisão e circularização de uma fita simples de DNA, dando origem ao plasmídeo p-Bluescript (ver figura 14), plasmídeo esse que contém o cDNA de interesse. Esse plasmídeo é então encapsulado pelas proteínas do fago "helper" e eliminado pelas células XL1-blue MRF'.

Para purificar os fagos, a cultura obtida após a incubação por 16 h foi incubada a 65 °C por 15 min, período esse suficiente para matar as células XL1-blue MRF' presentes no meio. A cultura era então centrifugada (2.000x g, 10 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante, contendo os fagos carregando o plasmídeo p-Bluescript e fagos λ Zap II, recuperados.

Para finalizar, as células SOLR foram transformadas com 50 μL da preparação de fagos obtida no passo anterior. Após 15 min de incubação a 37 °C essas células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C.

As colônias isoladas obtidas no meio LB-ágar contendo ampicilina foram crescidas em meio LB-líquido contendo o mesmo antibiótico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas culturas foram feitas em placas de cultura de 96 poços de 300 μL de volume com fundo em "U", com tampa e estéreis. Essas culturas foram usadas como fonte de DNA para a realização do PCR.

3.19. Seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA (transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*)

3.19.1. Excisão *in vivo* do plasmídeo Bluescript

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

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

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

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

contendo como material genético o plasmídeo pBluescript, são selecionadas positivamente em meios contendo carbenicilina e XGal.

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

Posteriormente, com auxílio de um carimbo de replicação parte das bactérias que cresceram no meio líquido foram transferidas para uma placa de PCR para realização do PCR de colônia (PCR no qual se utiliza a própria colônia bacteriana, mas introduz-se no método um passo de aquecimento a 96 °C para lisar a bactéria e, desta forma o plasmídeo é liberado para ser utilizado como molde para a reação da polimerase) e ao restante foi acrescentado glicerol 30% e então armazenadas a -80 °C.

3.20. PCR

As reações de PCR tanto para os imunoenaios como para o transcriptoma foram realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01% (p/v), Triton X-100 0,1% (p/v), MgCl₂ 1,5mM e dNTPs 0,2 mM. Foram adicionados 2 pmol de iniciadores juntamente com 5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O volume final da reação de PCR foi de 25 µL. O DNA molde foi aquele das bactérias obtidas da transformação das células SOLR com os plasmídeos p-Bluescript e que foram selecionados em meio LB-ampicilina.

Para a realização do PCR das sequências do sequenciamento ao acaso e também dos clones positivos dos imunoenaios, foram usados os iniciadores T3 (5' AATAACCCTCACTAAAGGGA 3') e T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'). Esses iniciadores pareiam nos braços do plasmídeo p-Bluescript nas vizinhanças do sítio múltiplo de clonagem, permitindo amplificar os cDNAs que estão clonados nesse plasmídeo.

As reações foram montadas em placas de 96 poços em forma cônica com capacidade para 300 µL. Para transferência das bactérias das placas de PCR foi usado um repicador de microplacas Boeckel (Pennsylvania, USA) de 96 pinos, que transfere cerca de 0,2 µL de cultura para a mistura de PCR.

O PCR foi feito com 1 ciclo inicial onde a mistura de reação permanecia por 10 min a 95 °C para promover a lise das bactérias e liberação do DNA molde. Em seguida, eram realizados 30 ciclos de incubação seqüenciais de: 30s a 94 °C para a desnaturação do DNA, 45s a 50 °C para pareamento dos iniciadores e 1,5 min a 72 °C para alongamento da fita complementar de DNA. Para finalizar, era feito um ciclo final de incubação por 10 min a 72 °C, para o alongamento de todas as fitas de DNA incompletas geradas.

Para a análise dos fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose.

3.21. Eletroforese em gel de agarose para separação de DNA

O gel foi preparado para uma concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) preparado em água milli-Q® (Millipore) e autoclavado. Foi adicionado às amostras, 0,3 volumes de tampão de amostra contendo bromofenol (Sambrook *et al.*, 1989). Esse último serviu como marcador para monitorar a movimentação e determinar o encerramento da eletroforese. A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 100 V por um período de aproximadamente 25 min. Ao final da eletroforese, o gel foi incubado por 5 min em solução de brometo de etídio (aproximadamente 2×10^{-4} %) e o DNA visualizado em um transluminador de UV (312 nm).

3.22. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas

3.22.1. Expressão do das proteínas recombinantes CBD2 e CBD3 em *Escherichia coli*

Foram realizados testes de expressão de ambas as construções em pAE (CBD2 e CBD3) em *E. coli* BL21(DE3) e em *E. coli* Origami(DE3).

Os clones de interesse foram inoculados em 10 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina (pAE da resistência a carbenicilina) e crescidos a 37°C, sob agitação contínua de 160 rpm, durante 18 h. Em seguida, essa cultura foi diluída para uma $A_{600nm} = 0,1-0,15$ em 50 mL de meio LB contendo antibiótico na mesma concentração anterior, prosseguindo-se a incubação em diferentes temperaturas (20,

25 e 37°C). Quando a cultura atingiu uma $A_{600nm} = 0,4-0,8$, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), submetida à centrifugação a 16.000 x g, por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100 μ L de tampão de amostra para eletroforese 1X (ver item 4.3.4). O isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi então adicionado a essa cultura para concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 20 horas de incubação a 20, 25 e 37°C e processadas da mesma forma, exceto que o sedimento de bactérias foi suspenso em 200 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras de cultura não induzida e induzida foram armazenadas a -20°C até a sua utilização. O perfil de indução da proteína recombinante foi analisado por separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli *et al.* (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue R. O restante da cultura foi submetido à centrifugação a 3.000 xg por, 30 minutos, a 4°C e armazenado a -80°C, por no máximo uma semana.

3.22.2. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes CBD2 e CBD3

Para os testes de solubilidade, o sedimento, proveniente das culturas bacterianas induzidas com IPTG 1mM em diferentes temperaturas (20, 25 e 37°C) (armazenados a -80°C; ver item 3.3.1), foi suspenso em 1mL de tampão de lise [Tris-HCl 10 mM pH 7, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, PMSF 1mM e glicerol 10% (v/v)] e submetido a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, *out put* 3 (Branson Sonifier 450) com intervalos em gelo de 1 minuto entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10.000 xg, por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento suspenso em 1 mL do mesmo tampão de lise, sendo ambos analisados em seguida por SDS-PAGE 12% e coloração com Coomassie Blue.

3.22.3. Purificação das proteínas recombinantes solúveis CBD2 e CBD3

CBD2 e CBD3 recombinante foram semi purificadas por meio de cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de Ni²⁺-agarose (Qiagen) em condições de ligeira estringência. Nas proteínas recombinantes existe um peptídeo de fusão que contém 6 resíduos de histidina adjacentes, o que gera uma afinidade pelo níquel ligando a

proteína recombinante a resina. Inicialmente o sobrenadante (1 mL), proveniente do lisado bacteriano induzido a 20°C (ver item 3.3.2), foi misturado com 200 µL de resina de níquel, previamente equilibrada com 2,5 mL de tampão de lise [Tris-HCl 10 mM pH 7, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM e glicerol 10% (v/v)]. Essa suspensão foi incubada a 4°C, por 60 minutos, em homogeneizador (Heavy dutyrotator, Cole Parmer) sob baixa velocidade. Foram realizadas cinco lavagens com 750 µL de tampão de lise por centrifugação a 16.000 xg, por 1 minuto. A proteína foi eluída da resina com 150 µL de tampão de lise acrescido de 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM de imidazol (competidor pela ligação da proteína a resina), seguindo-se incubação por 15 minutos em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

Posteriormente, foi feita uma eletroforese em condições desnaturantes para observar os padrões da purificação. Foi aplicado 5 µL de cada eluição juntamente com 5 µL de tampão de amostra.

Estas proteínas purificadas foram usadas posteriormente para ensaios de interação com quitina coloidal.

3.22.4. Purificação das proteínas do precipitado de CBD2 e CBD3

As duas proteínas recombinantes CBD2 e CBD3, foram produzidas de acordo com o item 3.22.1 os testes de solubilidade foram realizados de acordo com o item 3.22.2 e assim podemos verificar que uma grande quantidade das proteínas recombinantes estavam concentradas na fração insolúvel da preparação. Para a produção dos anticorpos anti-CBD2 e anti-CBD3 foram purificadas as proteínas recombinantes da fração insolúvel através de métodos desnaturantes baseados no manual da coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA).

Após a produção das proteínas, os pellets foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise. Este volume foi diluído aproximadamente 10X em tampão B (Tampão com pH 8,0 contendo: 100 mM NaH₂PO₄, Tris-HCL 10mM, 8M de uréia). Este material foi agitado na câmara fria por cerca de 3 h.

A coluna de afinidade foi pré-equilibrada com 5 volumes de coluna com o mesmo tampão B usado para diluir o sedimento ressuspensado.

As amostras de CBD2 e CBD3 foram aplicadas separadamente. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão B pH8,0 e as frações recolhidas. As proteínas que se ligaram na coluna foram eluídas passando 5 volumes de coluna de tampão C pH 6,3 (contendo: 100 mM NaH₂PO₄, Tris-HCL 10mM, 8M de uréia). As frações foram recolhidas e depois as proteínas ligadas mais fortemente foram eluídas com tampão D pH 5,9 (contendo: 100 mM NaH₂PO₄, Tris-HCL 10mM, 8M de uréia).

Um SDS-PAGE desnaturante foi feito para verificar em quais frações as proteínas foram eluídas. Estas frações ainda não tinham a proteína de interesse totalmente purificada.

O reunido das frações contendo o CBD2 e o contendo as frações com CBD3 foram submetidas a filtração em gel (separação por tamanho) para retirar uréia. Para isso, foi empregada uma coluna chamada Hitrap Dessalting da seguinte maneira: as amostras foram aplicadas aos poucos em volumes de 1,3 a 1,5 mL e eluído com 2 mL de tampão Tris-HCl 10 mM. O que passava pela coluna neste momento foi coletado.

Uma segunda cromatografia na coluna de afinidade foi realizada, só que desta vez, ao invés da eluição ser feita com gradiente de pH, foi feita por competição da ligação a coluna utilizando imidazol de 25 mM até 300 mM.

Foi utilizada novamente a coluna Hitrap dessalting, porque se verificava ainda a presença de uréia (agente desnaturante).

3.22.5. Quantificação das proteínas recombinantes e métodos para Produção de anticorpos policlonais

Foi feito um SDS-PAGE desnaturante com várias concentrações conhecidas de ovoalbumina (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 µg), para que as bandas correspondentes aos CBDs semi-purificados pudessem ser quantificados, tanto pelo método de Bradford, quanto pela quantificação em gel.

Na imunização dos coelhos machos foram utilizadas 3 aplicações sendo a primeira aplicação de 500µg de CBD2 e CBD3 e as outras duas de 300µg. Antes da imunização, um volume de 5mL de sangue foi retirado do coelho para a obtenção do soro pré-imune. Para a primeira imunização, 10 alíquotas de 50µg de proteína recombinante purificada foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. O gel foi

corado de acordo com protocolo já descrito (Yan *et al.*, 2000) e as 10 bandas foram cortadas do gel. Em seguida, o gel foi descorado com uma solução 1:1 de ferricianeto de potássio 30mmol/L e tiosulfato de sódio 100mmol/L. Após a coloração ser removida, o gel foi lavado com água Milli-Q e homogeneizado em água Milli-Q com um homogenizador do tipo Potter-Elvehjem. A amostra acima, com um volume final de 800 μ L, foi misturada a 800 μ L de adjuvante de Freund completo (Sigma) e injetada no coelho. Uma nova imunização foi repetida trinta dias após a primeira nas mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após dez dias, o sangue do coelho foi coletado para a obtenção do soro imune. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez, para que o título do anticorpo não caísse até o recolhimento do sangue. O anticorpo foi semipurificado de acordo com procedimento já estabelecido (Jordão *et al.*, 1996). O sangue coletado (pré-imune e imune) foi incubado por 1 hora a 37°C, seguindo-se incubação a 4°C por uma noite. Esse material foi submetido à centrifugação a 3.000xg por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante (soro) foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8 numa proporção 1:1. Essa etapa foi seguida de incubação por uma noite a temperatura ambiente e centrifugação 5.000xg por 15 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi suspenso em solução 50% saturada de sulfato de amônio pH 6,8 e submetido à centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi suspenso em 2mL de NaCl 0,1M e submetido à diálise por 20 horas contra 1.000 volumes de 0,1M de NaCl a 4°C com uma troca. Por fim, o material obtido foi distribuído em microtubos e mantido a -80°C.

3.23. Ensaios de interação dos CBDs com quitina

A quitina coloidal foi preparada pelo método de Shimahara e Takiguchi (1988).

Os ensaios de interação com quitina foram realizados usando quitina coloidal como matriz de afinidade segundo Arakane *et al* (2003). Preparações de quitinases brutas de *Serratia marcescens* (Sigma, C7809) e *Streptomyces griseus* (Sigma, C6137) foram usados como controle positivo da interação com a quitina. Os experimentos foram feitos utilizando 29 μ U da quitinase de *S. griseus* e 44 μ U da quitinase de *S. marcescens*. As enzimas foram incubadas com 0,5 mg de quitina coloidal em 100 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0. A mistura foi incubada a 4°C sob agitação por

1h e então centrifugada por 5 min a 14.000 g. As atividades das quitinases solúvel (sobrenadante) e ligadas a quitina coloidal (precipitado) foram medidas utilizando o substrato MUC 3 (4-metilumbeliferil β -N, N', N''- triacetilquitotriose).

Os ensaios de interação dos CBDs com a quitina coloidal foi realizado da seguinte maneira, 0,5 mg de quitina coloidal foi incubado com 1 μ g dos CBDs recombinantes purificados em 100 μ L de tampão fosfato de sódio, pH 8,0. A mistura foi incubada a 4°C sob agitação por 1h e então centrifugada por 5 min a 14000 g, assim como feito com o controle positivo. O primeiro sobrenadante foi coletado como a fração contendo as proteínas não ligadas. O precipitado foi ressuspendido em 100 μ L do mesmo tampão (fosfato de sódio 50mM pH 8,0) usado no passo anterior, e centrifugado. O segundo sobrenadante foi chamado de fração 1. O sedimento foi novamente ressuspendido em 100 μ L tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0 contendo 1M de NaCl, seguido de outra lavagem com 100 μ L de ácido acético 0,1 M. Ambos os sobrenadantes foram coletados como frações de lavagem II e III. Finalmente, o sedimento foi ressuspendido em 100 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE e fervido por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado como a fração de proteína ligada. Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE, seguida da coloração de proteínas pelo método Coomassie Brilliant Blue R-250. Durante o experimento a proteína BSA (soro albumina bovina) foi utilizada como controle negativo de ligação a quitina, ou seja, que não se liga a quitina.

3.24. Determinação das atividades enzimáticas sobre os substratos 2 α -manobiose, 3 α -manobiose, 6 α -manobiose

Man1 e Man2 são as α -manosidases purificadas através de métodos cromatográficos (troca iônica, filtração em gel e interação hidrofóbica) de acordo com os procedimentos descritos na dissertação de mestrado de Nathália Ramalho Moreira depositada no banco de dissertações da USP (Moreira, N.R 2006).

A atividade enzimática de Man1 e Man2 foram testadas sobre os substratos : 2 α -manobiose, 3 α -manobiose, 6 α -manobiose. Estes substratos são compostos por duas manoses ligadas. A diferença entre eles é a maneira como estas duas manoses estão conectadas, ou seja, o tipo de ligação existente (α 1-2, α 1-3 e α 1-6). Estes substratos possuem uma extremidade redutora livre e assim podem ter leitura de absorbância com

o reagente de DNS (ácido dinitrosalicílico), mesmo sem a presença da enzima que o hidrolisa. Este reativo de DNS se reduz mudando de cor quando as extremidades redutoras livres se oxidam por ocasião da fervura. A redução do 3-5 dinitrosalicilato resulta em um derivado monoaminado de cor avermelhada e a leitura de absorbância é feita em 550 nm.

As concentrações dos substratos utilizadas durante os experimentos variaram de 0,75 mM até 10 mM.

O volume final de reação é 50 μ l, incubados em banho-maria termostatzado em 30°C por um período maior ou igual a 24 horas, dependendo do substrato. Para interromper a reação enzimática, 200 μ l de DNS foi adicionado e os tubos levados a fervura durante 5 min. Os tubos de ensaio foram lidos em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. Neste comprimento de onda podemos verificar o aumento da quantidade de açúcar redutor no meio de reação e desta forma quantificar a atividade enzimática de Man1 e Man2.

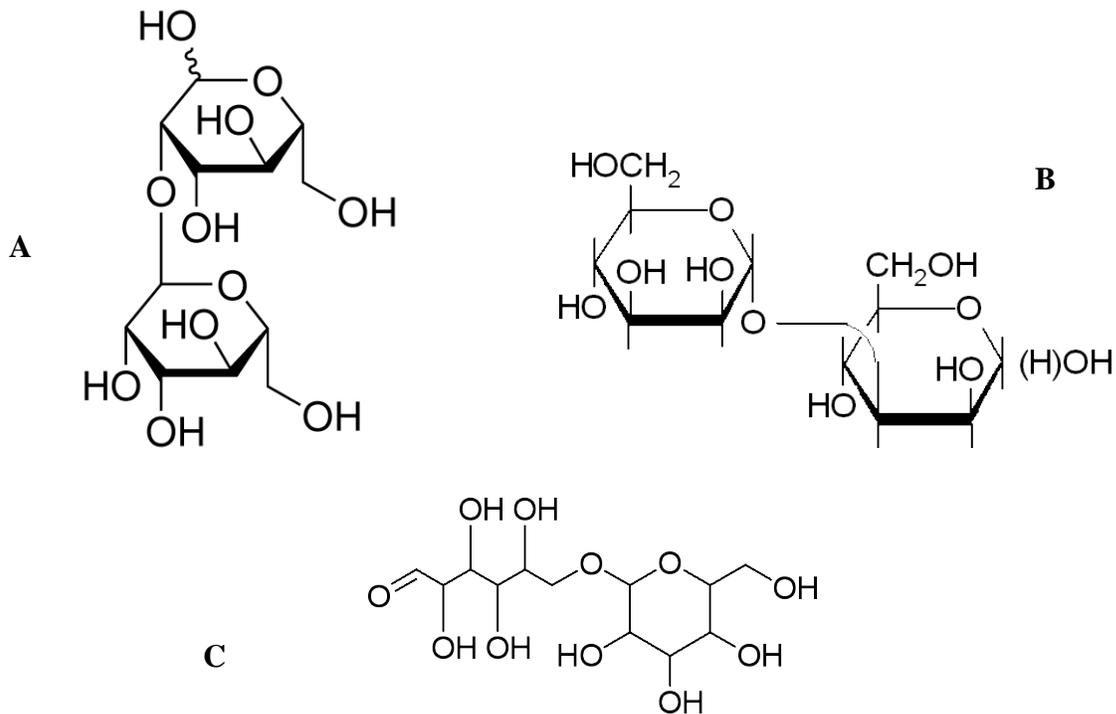


Figura 15: Estruturas dos 3 substratos utilizados durante os experimento enzimáticos com Man 1 e Man 2. (A) 2 α -manobiose, (B) 3 α -manobiose, e (C) 6 α -manobiose

3.25. Microscopia eletrônica

As análises de microscopias eletrônicas foram feitas no Instituto de Biociências da USP-SP em colaboração com o Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro.

Para a realização das imunomarcações, as larvas de *Tenebrio molitor* foram dissecadas e o intestino médio foi dividido em três partes: anterior, médio e posterior. O epitélio ventricular foi separado do conteúdo luminal, e apenas os tecidos epiteliais foram fixados (paraformaldeído 4% (m/v), glutaraldeído 5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4) e embebidos na resina acrílica L. R. White (Agar Aids, USA) por 24 horas a 50°C. Secções finas de tecidos foram obtidas em ultramicrótomo e transferidas para telas de níquel. A cada um dos cortes foi aplicada uma gota de TBS (tris 0,1M, NaCl 0,3M, NaN₃ 0,1% (m/v)) contendo albumina sérica bovina 1% (TBS-BSA). Após 30 minutos foi adicionado o anticorpo desejado, nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200 em TBS-BSA e incubado por 90 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o corte foi lavado com TBS-BSA e incubado com o anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado a partículas de 10 nm de ouro coloidal. Esse último foi diluído na proporção de 1:15 em tampão TBS-BSA. Como controle foi utilizado o soro pré-imune.

Os cortes foram finalmente lavados com água milli-Q e corados com acetato de urânio e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e visualizados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

4. Resultados e discussão

Os resultados mostrados nesta seção serão divididos em tópicos para facilitar o seu entendimento. Iniciaremos as análises falando sobre o pirosequenciamento, seguido do transcriptoma realizado através de sequenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* (biblioteca de expressão). Por último, falaremos sobre as técnicas de “imunoscreening”. Estas três técnicas serviram para a obtenção de sequências que correspondem a proteínas que são agentes dos fenômenos fisiológicos que ocorrem no intestino médio de *Tenebrio molitor* e que são objetos de estudos dessa tese.

4.1. Análises gerais das qualidades dos RNAs utilizados para o Pirosequenciamento de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*

4.1.1. RNA total e ribossomal

A integridade do RNA extraído é comumente avaliada por eletroforese em gel e posterior análise das bandas correspondentes ao RNA ribossomal. Usando o RNA intestinal total de *T.molitor* como amostra podemos verificar que o perfil de rRNA de insetos difere significativamente do padrão de referência existente para outros organismos, os quais apresentam no mínimo duas bandas de tamanhos diferentes presentes na eletroforese em gel. Em procariotos temos as bandas correspondentes aos tamanhos dos rRNAs de 16S e 23S e em eucariotos temos as bandas correspondentes aos tamanhos do rRNAs 18S e 28S.

Em insetos sabe-se que existem os rRNAs 18S e 28S, mas desde 2009 descobriu-se que em insetos existe um “hidden break” (quebra escondida) endógena (Winnebeck, et al. 2009). Após a desnaturação do RNA total de insetos, ligações de hidrogênios escondidas na estrutura destes RNAs são rompidas, liberando dois fragmentos de RNA de tamanhos similares que migram juntos, correspondentes ao tamanho do rRNA de 18S. Desta forma, observamos apenas uma banda de rRNA em insetos.

Utilizamos o aparelho da Agilent 2100 Bioanalyser, o qual é um dos últimos sistemas de eletroforese capilar de microfluidos que se tornou o padrão preferencial para análise de qualidade de RNAs da atualidade. A separação é baseada em uma

matriz de gel não desnaturante, no entanto, as amostras são em geral desnaturadas por calor antes da separação (Krupp, 2005).

A extração de RNA total das amostras de cada região do epitélio do intestino médio de *T.molitor* gerou perfis os quais mostram uma boa eficiência no processo de extração e obtenção de RNAs de alta qualidade. A razão A_{260}/A_{280} foi de 1,8 e a razão A_{260}/A_{230} foi de 1,7 na extração do RNA total.

O perfil de rRNA de *Tenebrio molitor* é mostrado na figura 16 e podemos observar a integridade do RNA e pouca degradação dos RNAs. Verificamos a presença de uma banda correspondente ao RNA de 18S e também as duas moléculas que formavam o rRNA de 28S que migram junto ao rRNA de 18S. A concentração de RNA medida pelo aparelho da Agilent foi de 58,32 pg/ μ L.

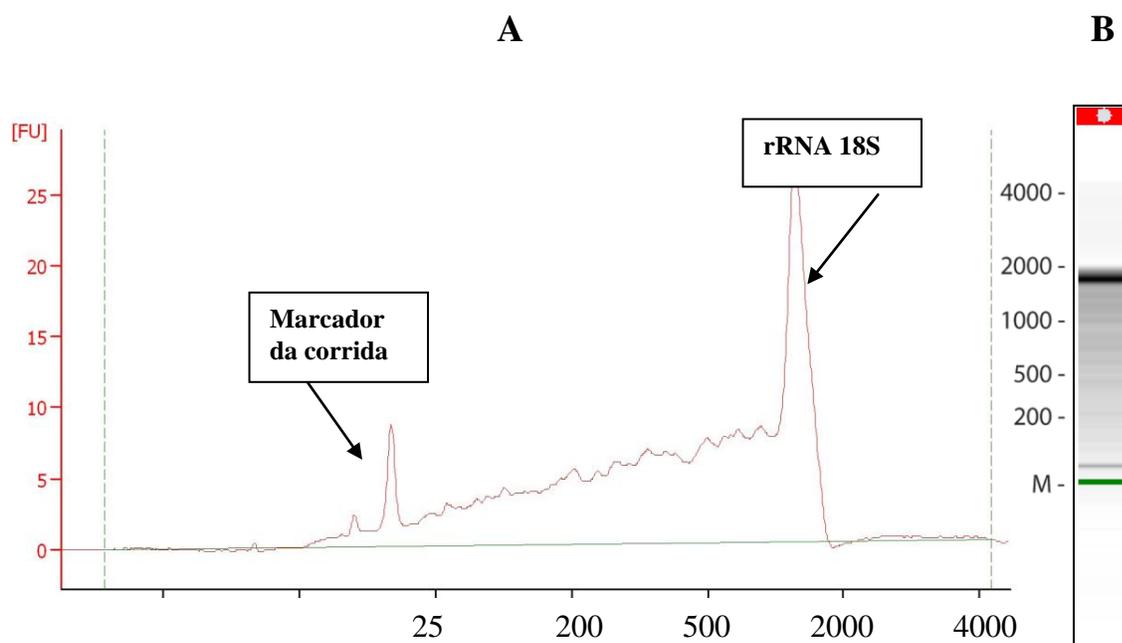


Figura 16: Perfil eletroforético (A) e gel virtual do RNA intestinal total de *T. molitor*.

4.1.2. mRNA de *T.molitor*

O processo de purificação de mRNA partiu da concentração total de RNA extraído de cada amostra. A porcentagem de mRNA dentre o total de RNAs das células corresponde de 1 a 5% da concentração (Sorek e Cossart, 2010). Como precisamos de cerca de 200 ng de mRNA (em um volume de no máximo 20 μ L), para dar início a

preparação da biblioteca de cDNA, começamos com uma massa de RNA total de cerca de 50 µg, pois se a preparação render cerca de 1% de mRNA ainda teríamos material para preparar a biblioteca de cDNA.

Após a purificação dos mRNAs, este foi submetido a análise pelo aparelho da Agilent 2100 Bioanalyser, para que sua integridade fosse acompanhada. Na figura 17, temos o perfil eletroforético da amostra de mRNA purificada do RNA total de *T. molitor*. Na letra A desta figura, temos uma distribuição de RNAs bem ampla, os quais correspondem aos vários tipos de tamanhos de mRNAs existentes nas células de todos os organismos. Também podemos observar um pico de rRNA contaminante desta preparação de mRNA. Este contaminante corresponde a cerca de 2,2% (cálculo pela área total do pico) do total de RNAs na amostra (medido pelo aparelho) e na literatura encontramos ser aceitável uma contaminação de até 8% de rRNA.

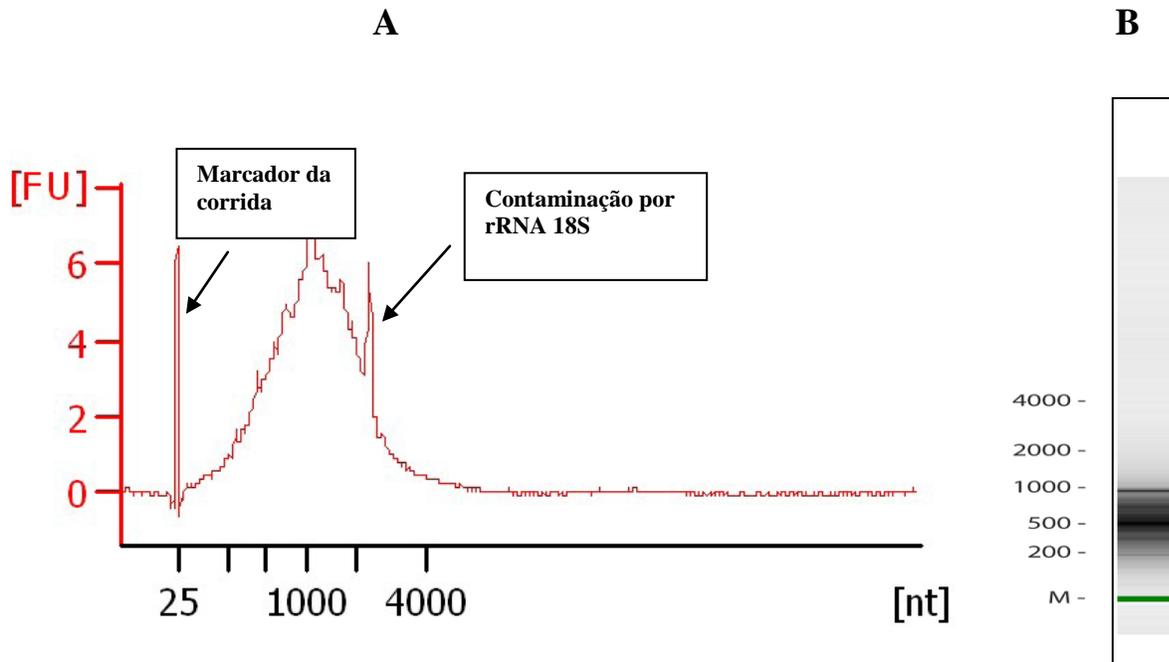


Figura 17: Perfil eletroforético (A) e gel virtual (B) do mRNA de *T. molitor*.

Após estas análises feitas para garantir uma boa qualidade das amostras de RNA, podemos dar início ao processo do pirosequenciamento de RNA (RNA-Seq) e as análises dos dados gerados por esta técnica.

4.1.3. Análises gerais do pirosequenciamento 454 e montagem dos contigs

O serviço de seqüenciamento de RNA foi realizado por mim juntamente com a técnica do Centro Nacional de Tecnologia em Genômicas (CATG), criado em julho de 2008, no Instituto de Química-USP. A metodologia de seqüenciamento de RNA por meio do sistema GS FLX Titanium foi criada no fim de 2009 e revista no começo de 2010. Assim sendo, este trabalho é um dos primeiros no Brasil com a utilização desta tecnologia, aplicada com o objetivo de obter um amplo perfil transcriptômico do epitélio do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

O presente projeto foi delineado para o seqüenciamento de RNA- transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor*, partindo de dois tipos de fontes de RNA distintas; a primeira amostra partiu da extração de RNA total de todo o epitélio do intestino médio de *Tenebrio molitor*, já a segunda rodada utilizou como fonte inicial de RNA total apenas a metade anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*, utilizando $\frac{1}{4}$ de placa para cada um dos tipos de amostras, totalizando meia placa de seqüências (era esperado aproximadamente 500.000 reads no total). O restante da placa foi utilizado com amostras não referentes ao presente trabalho.

O objetivo das duas amostragens diferentes era a obtenção de transcriptomas diferenciais entre a região anterior e a posterior (região inteira menos a anterior). Ver detalhes abaixo.

A biblioteca de cDNA do RNA extraído do epitélio do intestino médio de *T.molitor* foi normalizada com transcritos desde 0,6 a 6 kb de tamanho. O pirosequenciamento das duas bibliotecas de cDNA descritas acima, e melhor explicadas em materiais e métodos, resultou em um total de 487.472 reads, as quais passaram por todos os filtros da máquina da Roche e todos os controles de qualidade internos (como por exemplo a eliminação de fragmentos curtos, eliminação de spots com mais de uma seqüência, amplificação do primer controle interno, dentre outros.). Estes reads, como já foi descrito, correspondem a metade de uma placa de seqüenciamento e desta forma podemos dizer que o número de reads obtidos (487.472) está de acordo com o número de reads esperados (500.000), confirmando o sucesso da utilização da máquina.

Estes 487.472 reads totalizam 181.778.822 bases seqüenciadas com tamanho médio de 373 pb. O maior read obtido possui 668 pb e o menor foi de 40 pb. A mediana dos tamanhos dos reads foi de 410 pb.

Os arquivos *.sff referentes aos resultados do pirosequenciamento das amostras de RNA foram submetidos a montagem através do programa Newbler como descrito no item 3.16.3. Este programa foi fornecido pela Roche 454 e transforma arquivos de imagem em arquivos que possam ser reunidos em contigs com extensão *.fsa. Os dados com extensão *.fsa podem ser analisados através de outros programas.

Podemos resumir os dados acima na tabela 2 e na figura 18 abaixo.

Tabela 2: Resumo dos dados do pirosequenciamento do material do intestino médio de *T.molitor*

	Anterior	Total	soma Anterior e total
Número total de reads	256.651	230.821	487.472
tamanho médio dos reads	371pb	375 pb	373
Número total de bases sequenciadas	95.217.569	86.561.253	181.778.822
mediana tamanho reads	409 pb	410 pb	409,5
Maior read	675 pb	662 pb	668,5
número total de contigs pelo newbler	5557	11039	5808

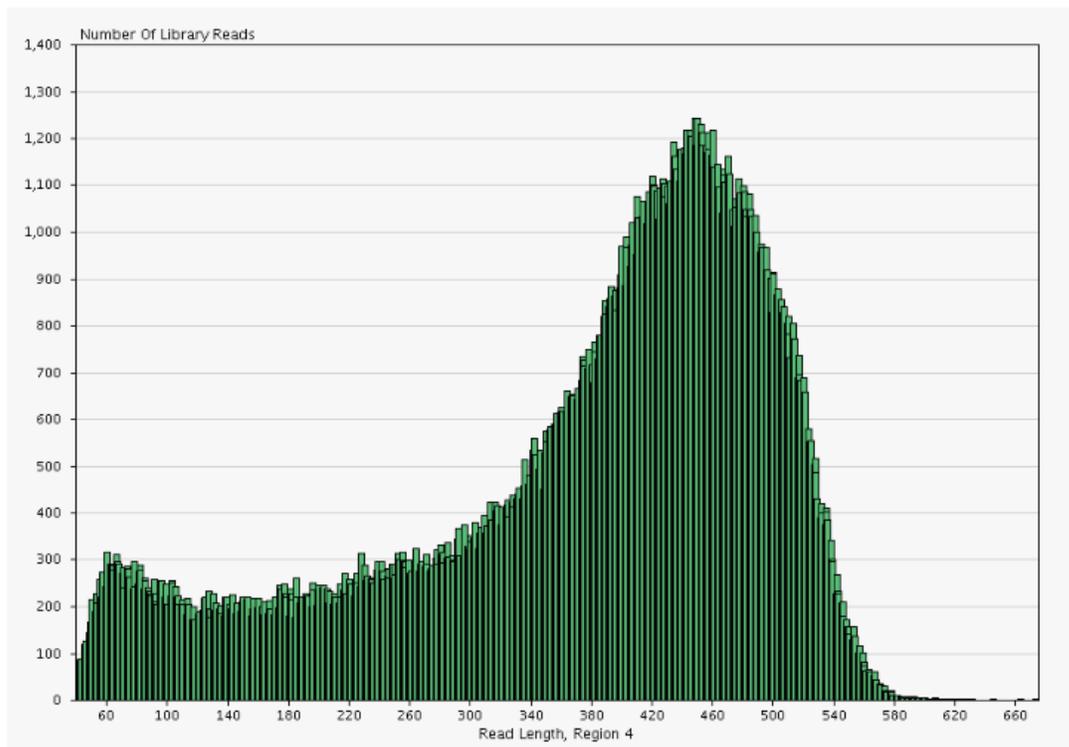


Figura 18: Distribuição do tamanho dos reads obtidos no pirosequenciamento da biblioteca de cDNA do intestino médio de *T.molitor*.Corresponde aos dados do intestino médio inteiro.

Para as análises gerais do transcriptoma foram reunidas todas as sequências obtidas tanto na primeira rodada de seqüenciamento (biblioteca de cDNA formada com o RNA extraído de todo o tubo digestório de *T.molitor*) como na segunda rodada do pirosequenciamento (biblioteca de cDNA construída com o RNA extraído apenas da região anterior do tubo digestório de *T.molitor*).

Esta segunda rodada do pirosequenciamento foi feita para termos uma melhor cobertura do transcriptoma e também para podermos fazer um northern digital, ou seja, para que pudéssemos calcular a expressão relativa de sequências entre a região anterior e posterior do tubo digestório do inseto. Isto foi feito baseado no número de reads que formam os contigs, pois estes reads podem ter vindo somente do seqüenciamento total, ou só do seqüenciamento anterior ou de ambos. Este cálculo da expressão relativa define e quantifica a região onde determinada proteína é expressa. Se esta proteína for muito mais expressa em alguma das regiões isto pode ser um indicativo de que esta proteína pode participar de algum fenômeno fisiológico específico daquela região, como é o caso do fenômeno da secreção apócrina, que somente ocorre na região anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

4.1.4. Gene Ontology (GO) e funções das proteínas

Após a utilização do programa Newbler fornecido pela Roche 454, as sequências do pirosequenciamento já se encontravam reunidas em contigs e com extensão *.fsa e estes contigs foram analisados através do programa dCAS como descrito no item 3.10.4. Este programa nos permite fazer blast em vários bancos de dados públicos tentando identificar os contigs formados. Análises de BlastX das proteínas de *Tenebrio molitor* sugerem que os “best hits” mais abundantes foram com *Tribolium castaneum* (Coleoptera). Este Coleoptera possui muitas sequências depositadas nos bancos de dados devido ao seqüenciamento do seu genoma e também do seu transcriptoma e com todos estes dados foi formado inclusive um banco de dados só com as sequências deste inseto, o Beetlebase (<http://beetlebase.org/>).

Um dos bancos utilizados para classificar os contigs encontrados foi o do Gene Ontology (GO), o qual classifica as sequências de acordo com 3 categorias: componente celular, onde encontramos definições das proteínas relacionadas as partes

de uma célula ou ao seu ambiente extracelular; função molecular, as atividades elementares de um produto gênico ao nível molecular, tais como ligação ou catálise e processos biológicos, operações ou séries de eventos moleculares com começo e fim definidos, pertinentes ao funcionamento das unidades de vida integrado: células, tecidos, órgãos e organismos.

A figura 19 foi construída com a classificação mais geral do gene ontology e podemos verificar que a grande maioria das sequências pertencem a duas grandes funções: proteínas de ligação e proteínas com atividade catalítica. As outras categorias informadas no gráfico (atividade motora, atividade regulatória, transdução de sinal, atividade estrutural e transportadora) foram as mais abundantes dentre as outras encontradas. Este padrão de distribuição nestas categorias citadas acima (ligação e catalítica) estão de acordo com a função exercida pelo tipo de tecido em estudo, o intestino médio de *Tenebrio molitor* e também foi verificada no transcriptoma do intestino médio do inseto *Nilaparvata lugens* (Hemiptera) (Peng et al, 2011).

A grande maioria das proteínas encontradas devem estar de certa forma envolvidas com os processos digestivos do inseto.

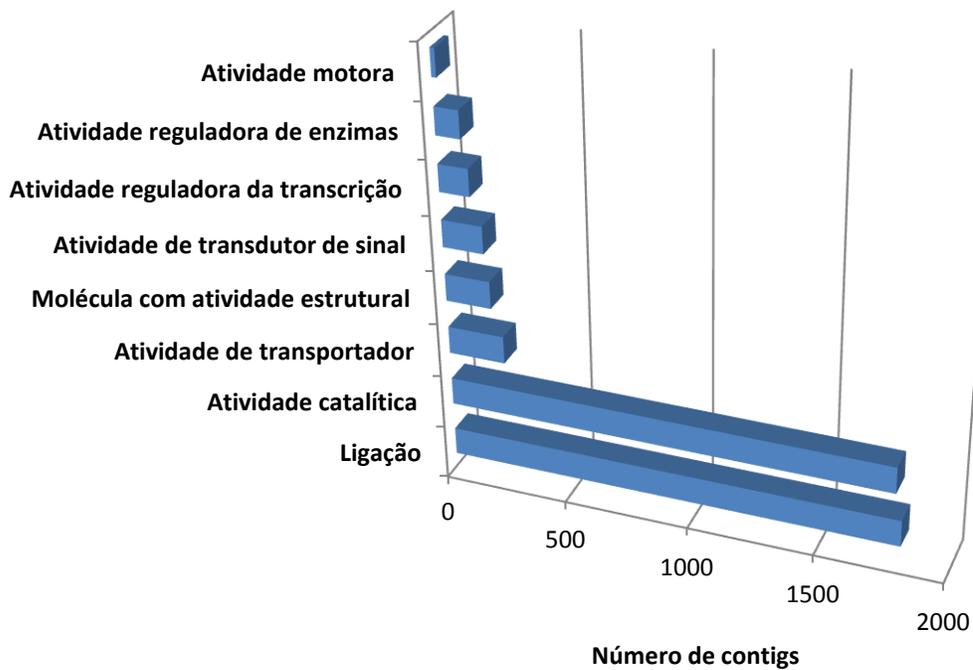


Figura 19: Gráfico geral da classificação do Gene Ontology.

A figura 20 mostra uma visão mais detalhada dos tipos de proteínas com funções de ligação. As funções de ligação mais encontradas foram as proteínas que se ligam a ácidos nucleicos e ao citoesqueleto, seguidas de outros 4 tipos de ligação bem menos abundantes como ligação a íons, a receptores e a lipídeos.

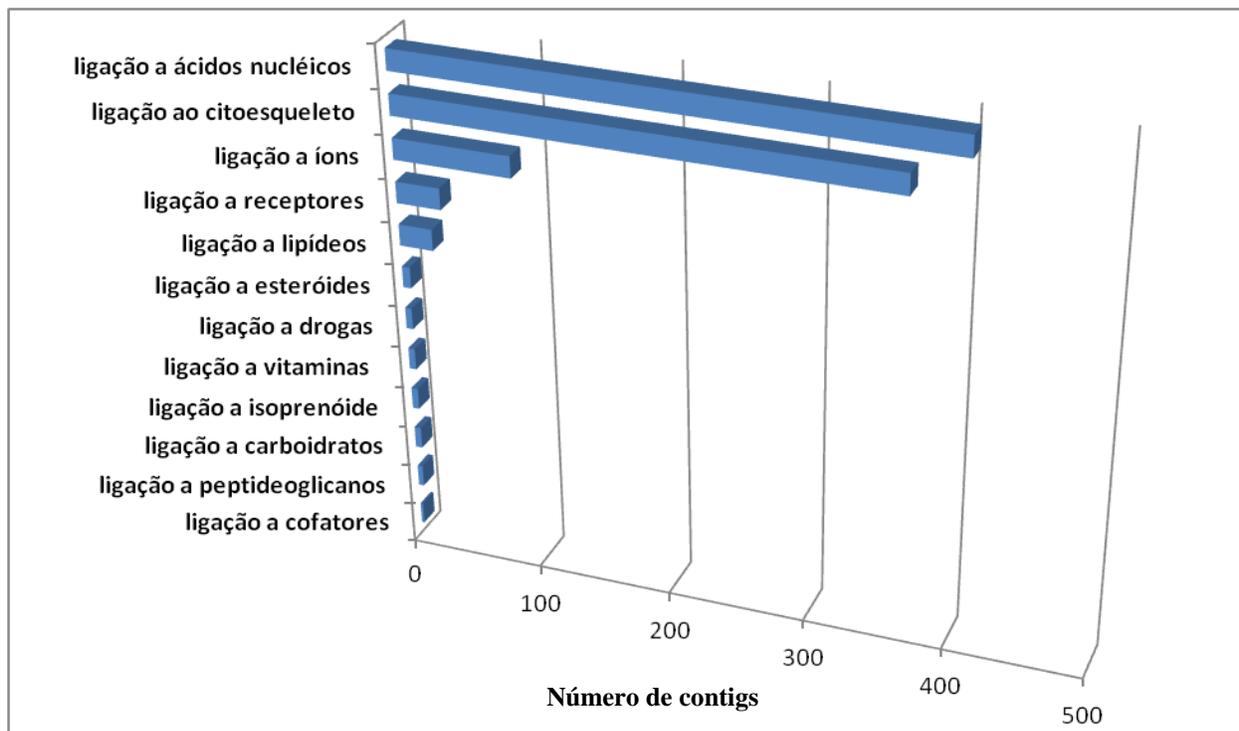


Figura 20: Gráfico da classificação do Gene Ontology das proteínas envolvidas com ligação.

Na figura 21 podemos visualizar quais são os tipos de atividade mais encontrados dentre as proteínas com funções catalíticas. No transcriptoma do intestino médio de *T. Molitor*, a atividade catalítica mais abundante é a das hidrolases, o que vai de acordo com o tipo de tecido estudado, cuja função principal está relacionada com a digestão. A atividade de hidrolase vem seguida das atividades de transferase, oxidorreductase e ligase.

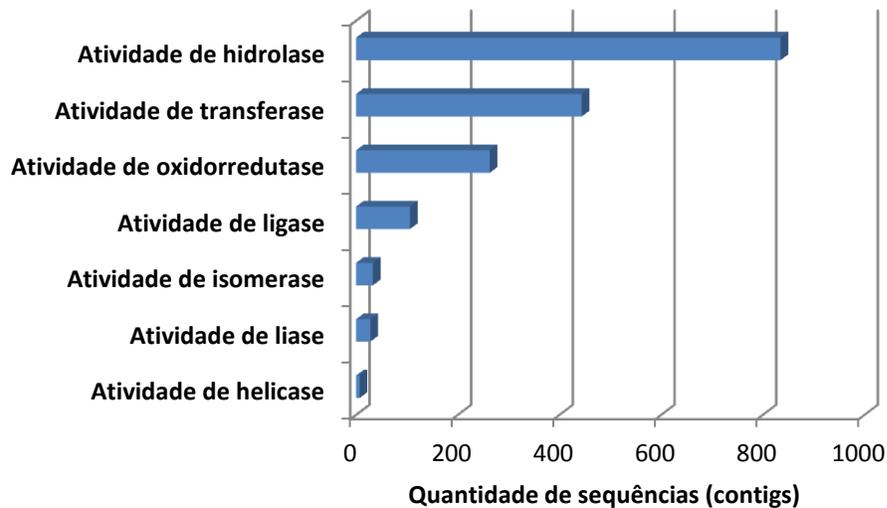


Figura 21: Gráfico da classificação do Gene Ontology das atividades catalíticas.

Juntamente com as análises gerais das sequências encontradas também temos que destacar dentre as atividades de hidrolases os tipos de enzimas digestivas encontradas e as suas abundâncias. Isto pode ser visualizado na figura 22. Dentre as enzimas encontradas podemos destacar enzimas que estão no objetivo de estudo deste projeto e que foram mais bem estudadas ao longo destes 3 anos de trabalho. As enzimas que estão no objetivo deste projeto são: α -manosidase (foram encontrados 18 contigs correspondentes a esta enzima), α -glicosidase (temos 12 contigs correspondentes a este tipo de enzima) e dipeptidases (foram encontrados 8 sequências desta enzima).

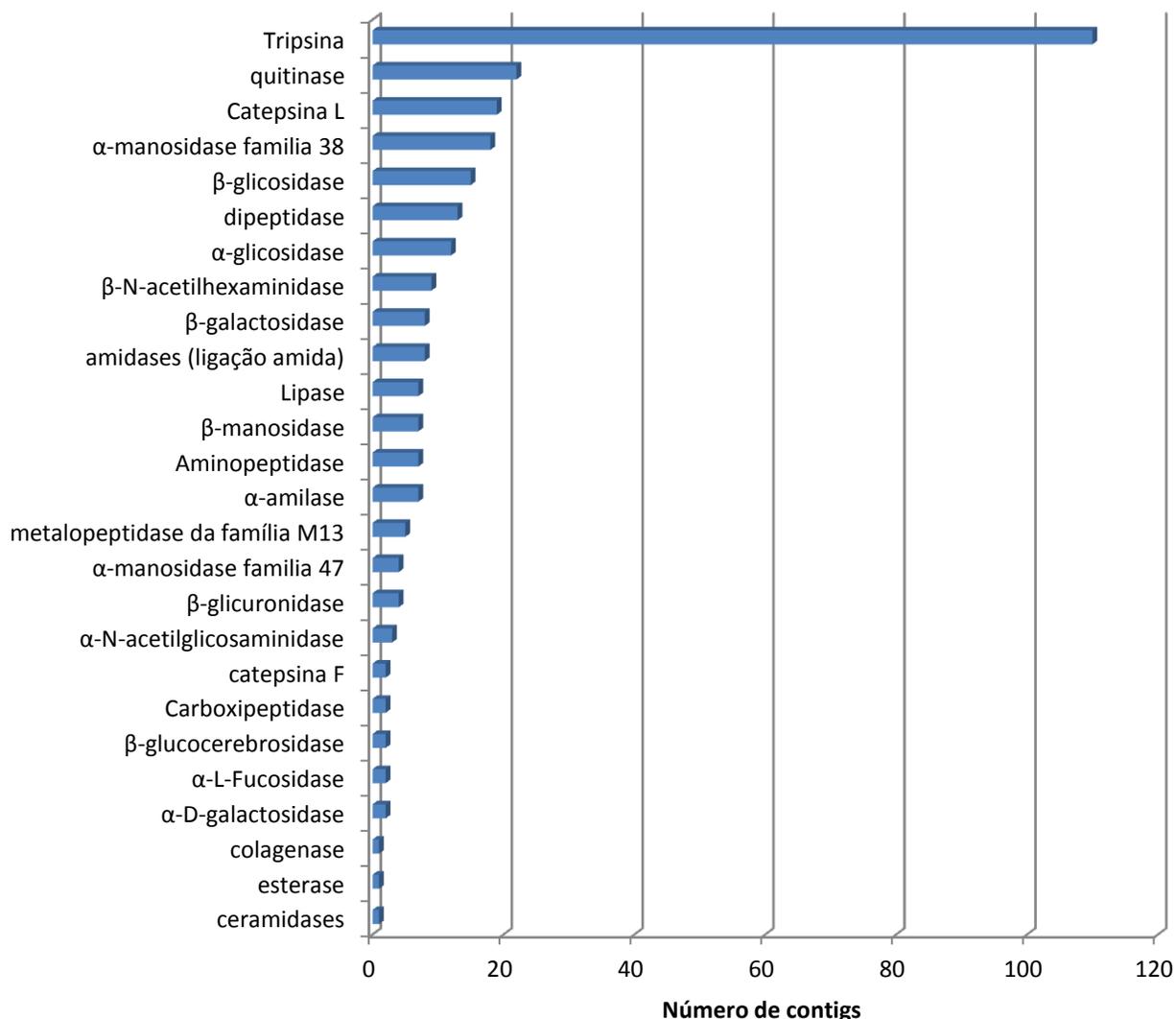


Figura 22: Contigs referentes a enzimas digestivas obtidos do transcriptoma do intestino de *T. molitor*. Anotação baseada nos Blasts nos diferentes bancos de dados utilizados pelo dCAS e reunidos nas categorias do Gene Ontology.

4.1.5. Identificação dos transcritos mais abundantes no intestino médio de *T. molitor*

Níveis de expressão de um transcrito podem ser quantificados usando a sua abundância na biblioteca. Foram selecionados os 24 contigs que tiveram maior número de reads e eles se encontram na tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Resumo dos 24 contigs com maior número de reads, caracterizando os mais abundantes no intestino médio de *T.molitor*.

Nº do contig	Nº de acesso	Nº de reads	Anotação no NR	Espécie
114	NP 511052.1	2956	Actina 5C	<i>Drosophila melanogaster</i>
60	AAP 92419.1	12381	Alérgeno (PMAP)	<i>Tenebrio molitor</i>
43	AAP 92419.1	9148	Alérgeno (PMAP)	<i>Tenebrio molitor</i>
39	AAP 92419.1	1915	Alérgeno (PMAP)	<i>Tenebrio molitor</i>
50	XP 972277.1	15726	Alfa esterase like proteína E3	<i>Tribolium castaneum</i>
4289	pdb/1TMQA	5684	Alfa-amilase	<i>Tenebrio molitor</i>
4278	pdb/1TMQA	1707	Alfa-amilase	<i>Tenebrio molitor</i>
4291	pdb/1TMQA	2430	Alfa-amilase	<i>Tenebrio molitor</i>
362	XP 001814972.1	3188	Ankirina	<i>Tribolium castaneum</i>
224	XP 975660.2	2632	Beta hexosaminidase b	<i>Tribolium castaneum</i>
26	XP 971632.1	13023	Cassete de ligação do ATP	<i>Tribolium castaneum</i>
1734	ABC 88768.1	1048	Catepsina L	<i>Tenebrio molitor</i>
146	ABC 88769.1	4743	Catepsina L	<i>Tenebrio molitor</i>
121	NP 258414.1	5917	Citocromo C oxidase	<i>Tribolium castaneum</i>
3281	AAP 92418.1	1668	Precursor de quitinase	<i>Tenebrio molitor</i>
728	XP 976015.1	2235	Proteína hipotética	<i>Tribolium castaneum</i>
34	EFA 11647.1	28408	Proteína hipotética	<i>Tribolium castaneum</i>
48	EFA 10021.1	85455	Proteína hipotética	<i>Tribolium castaneum</i>
153	ABC 88745.1	3344	Quimotripsina	<i>Tenebrio molitor</i>
51	ABC 88746.1	2547	Quimotripsina	<i>Tenebrio molitor</i>
16	Q25802.1	6627	RNA polimerase subunidade beta	<i>Plasmodium falciparum</i>
81	ABC 88747.1	1535	Serina protease	<i>Tenebrio molitor</i>
4044	BAC 82595.1	1517	Transcriptase reversa (transposons)	<i>Anopheles gambiae</i>
134	ABC 88728.1	1575	Tripsina	<i>Tenebrio molitor</i>

O contig mais abundante é o de número 48 seguido do número 34, os quais foram representados por 85455 e 28408 reads respectivamente. Estas duas sequências tiveram similaridade com proteínas hipotéticas de *Tribolium castaneum*, mas nenhum domínio conhecido foi identificado nestas duas proteínas.

De acordo com a tabela 3, os resultados encontrados sugerem que transcritos codificantes para enzimas digestivas (alfa-amilase, quimotripsina, tripsina, serina proteases, catepsina L, beta-hexosaminidase, quitinase e esterase), proteínas

estruturais (actina 5C e PMAP), proteína mitocondrial (citocromo C oxidase) e outras três proteínas (RNA polimerase, transcriptase reversa e cassette de ligação a ATP) foram abundantes no intestino médio de *T. molitor*.

Estes resultados encontrados, dentre as proteínas mais abundantes do transcriptoma, condiz novamente com o tecido estudado, uma vez que se trata de um tecido com função digestiva nada mais normal que encontrarmos enzimas digestivas bastante expressas e também proteínas mitocondriais, uma vez que se precisa de energia (gerada pelas mitocôndrias) para realizar os processos de transporte ativo associados aos mecanismos de absorção. Proteínas estruturais estão presentes devido à necessidade da manutenção da arquitetura das células digestivas no tecido estudado.

4.2. Processamento, análise, categorização e caracterização do transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor* .

O outro método utilizado foi o sequenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA de expressão de *Tenebrio molitor*. Este foi utilizado por ser uma maneira para obtermos sequências relacionadas com funções do intestino médio de *Tenebrio molitor*, mesmo que em menor escala do que as obtidas através do pirosequenciamento, mas com a finalidade de completar os dados obtidos pelo mesmo. Esta escolha foi feita também porque já dispúnhamos do recurso da biblioteca de expressão no nosso laboratório.

Nós seqüenciamos ao acaso 1632 clones de uma biblioteca de cDNA normalizada preparada a partir do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor*. Esses clones geraram ESTs que foram analisados com os programas Phred, Phrap e Consed Linux (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et. al.*, 1998), produzindo 105 contíguos e 754 singletos. As sequências são nomeadas por contíguo (se formado por 2 ou mais ESTs) ou por singletes (formada por um único EST). O seqüenciamento não prosseguiu além do ponto referido pela estabilização da razão de novidade desde a 13^a placa (1248 clones) (figura 23). A taxa de novidade corresponde à razão entre o número de bases novas o número total de bases seqüenciadas. Podemos verificar um esgotamento da taxa de novidade demonstrando assim que os clones por nós seqüenciados já haviam atingido a maioria de cópias diferentes de cDNA mais expresso no intestino médio da larva de *Tenebrio molitor*. Apesar disso o número de contíguos continuava crescendo, o

que indicava que pequenas adições de bases novas reuniam ESTs existentes em novos contíguos.

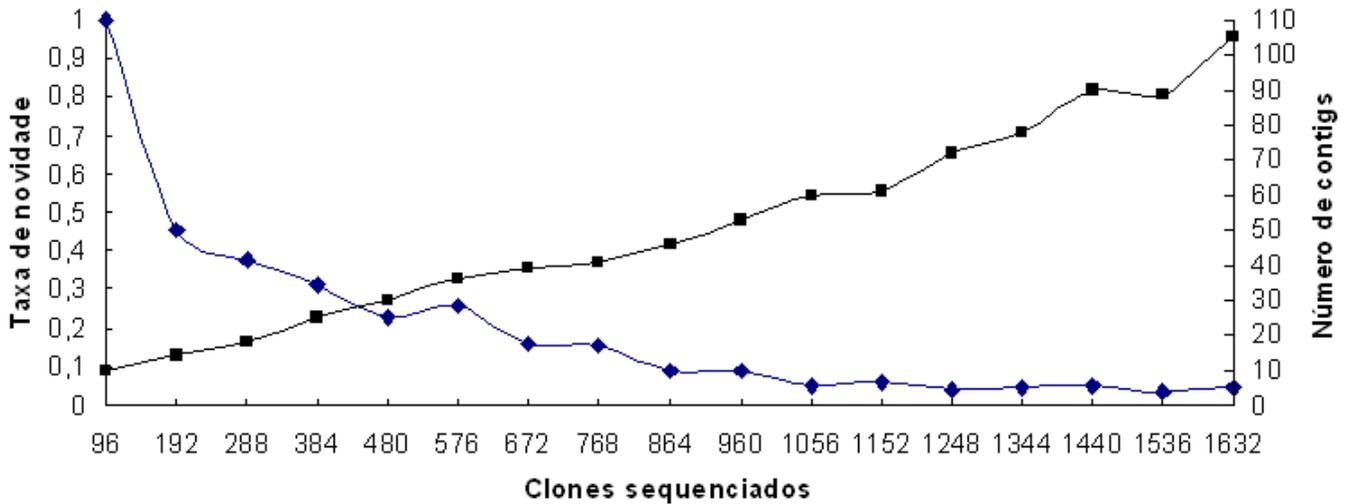


Figura 23: Mudanças na taxa de novidade e no número de contíguos acompanham o sequenciamento ao acaso da biblioteca do intestino médio de *Tenebrio molitor*. ■ = número de contíguos; ♦ = taxa de novidade.

O Blastx foi configurado para mostrar os 10 primeiros hits de cada sequência. A maioria dos hits são sequências de insetos, sendo, *Tribolium castaneum* a espécie com mais hits no blast, 18,71% do total de hits. O tamanho médio das sequências pode ser visualizado na figura 24 e é de aproximadamente 950 nucleotídeos.

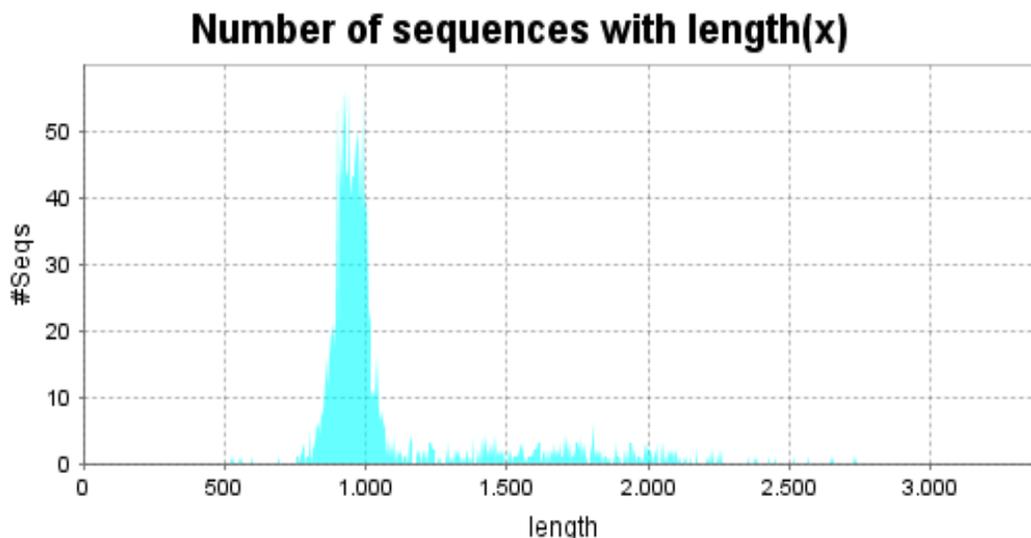


Figura 24: Distribuição das seqüências de acordo com o tamanho. Resultado obtido do programa de análises Blast2GO.

A fim de gerar uma visão mais ampla do estado metabólico do tecido, os ESTs gerados foram categorizados segundo critérios do Gene Ontology consortium (GO). A classificação por GO se divide em 3 categorias: função molecular, processo biológico e componente celular.

Dos 105 contíguos obtidos durante o transcriptoma da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*, 46 não obtiveram correspondência às seqüências existentes no banco de dados utilizado; nove não possuíam termos do GO que as incluíssem; e 50 possuíram equivalência tanto no banco de dados utilizado para o BLASTx quanto nos de GO. A análise destes 50 segundo as três categorias básicas de GO permitiu o agrupamento de 39 em 16 termos de processo celular; de 40 em 37 termos de função molecular, algumas proteínas, por terem mais de uma função, foram associadas a mais de um termo, resultando em um total de 21 repetições; e de 20 em 12 termos de componente celular.

Dentre os 754 singletos, 508 não obtiveram correspondência às seqüências existentes no banco de dados utilizado; 53 não possuíam termos do GO que as incluíssem; quatro tiveram correspondência com proteínas de função desconhecida; e 189 possuíram equivalência tanto no banco de dados utilizado para o BLASTx quanto

nos de GO. A análise destes 189 segundo as três categorias básicas de GO permitiu o agrupamento de 102 em 52 termos de processo celular; de 123 em 88 termos de função molecular, havendo um total de 77 repetições; e de 39 em 21 termos de componente celular.

Os termos do Gene Ontology foram atribuídos a 239 sequências e a distribuição nas três categorias: processo biológico, função molecular e componente celular estão ilustrados nas figuras de 25, 26 e 27, respectivamente.

biological_process Level 4

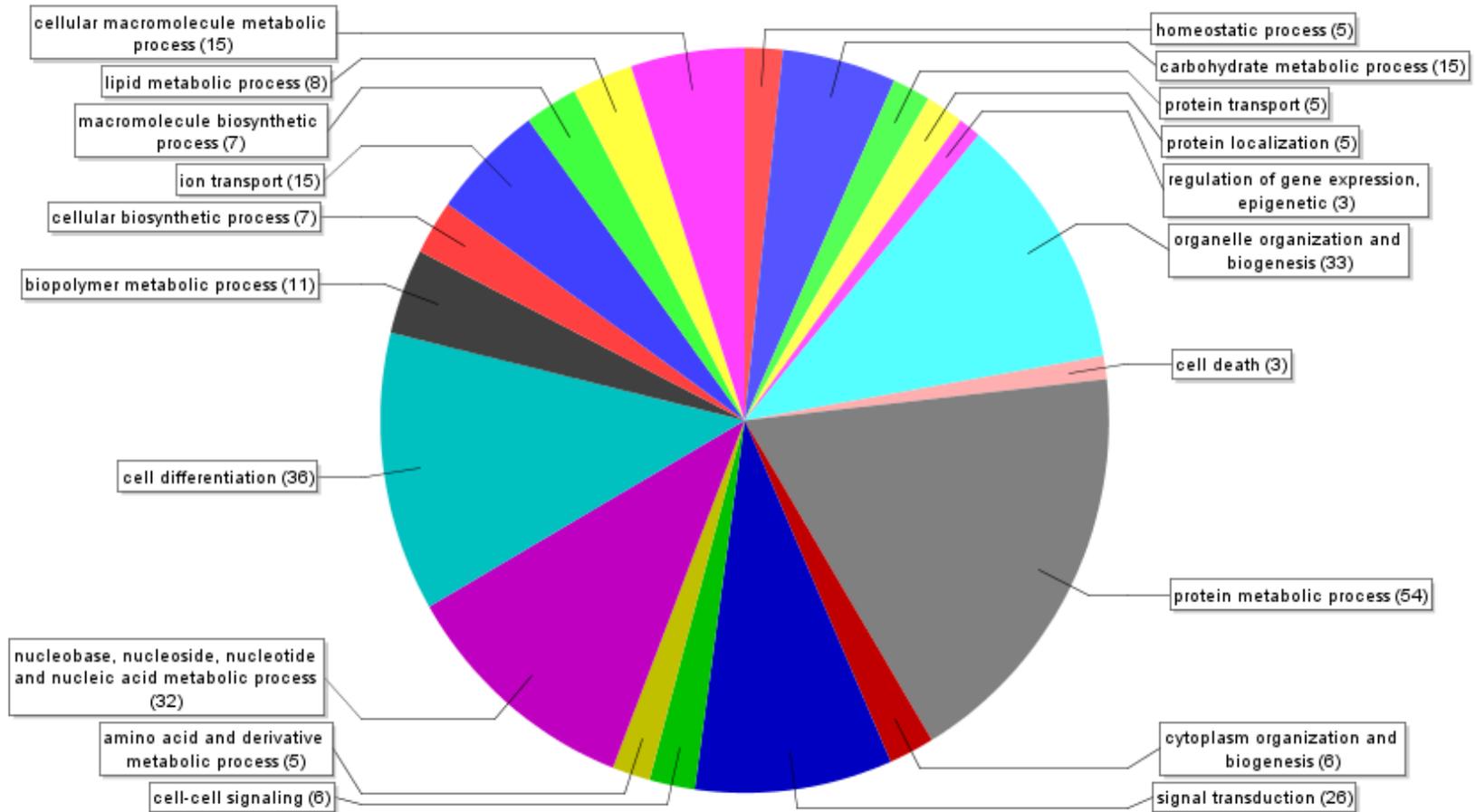


Figura 25: Distribuição das seqüências na categoria de GO processo biológico. Os números entre parênteses indicam a quantidade de seqüências que se encaixaram neste GO. O corte de cada categoria de GO é o menor que gera um gráfico claro. Resultado obtido pelo programa Blast2GO para o transcriptoma aleatório da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*.

Sequence distribution: cellular_component(Filtered by #Seqs: cutoff=2.0)

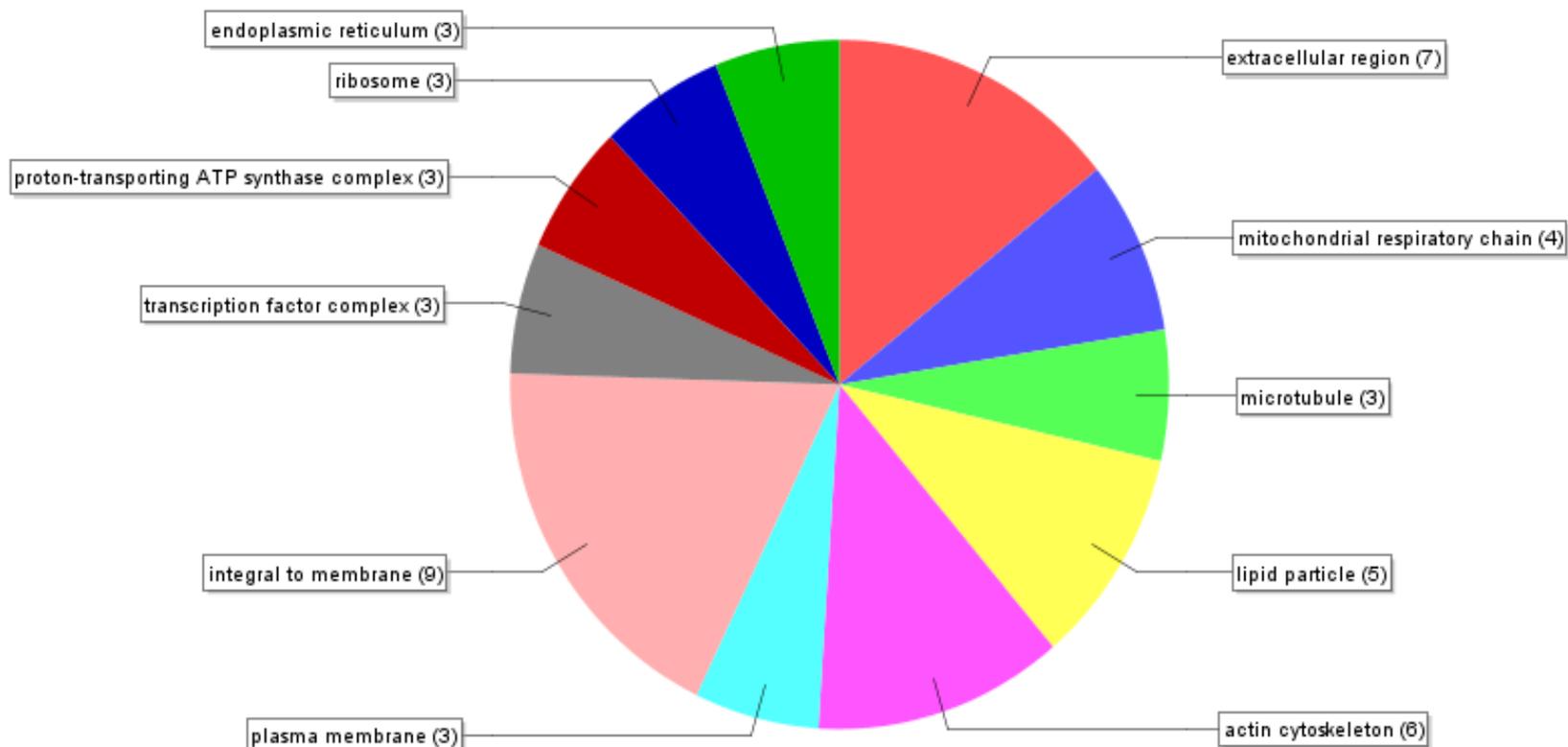


Figura 26: Distribuição das seqüências na categoria de GO componente celular. Os números entre parênteses indicam a quantidade de seqüências que se encaixaram neste GO. O corte de cada categoria de GO é o menor que gera um gráfico claro. Resultado obtido no programa Blast2GO para o transcriptoma aleatório da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*.

Sequence distribution: molecular_function(Filtered by #Seqs: cutoff=4.0)

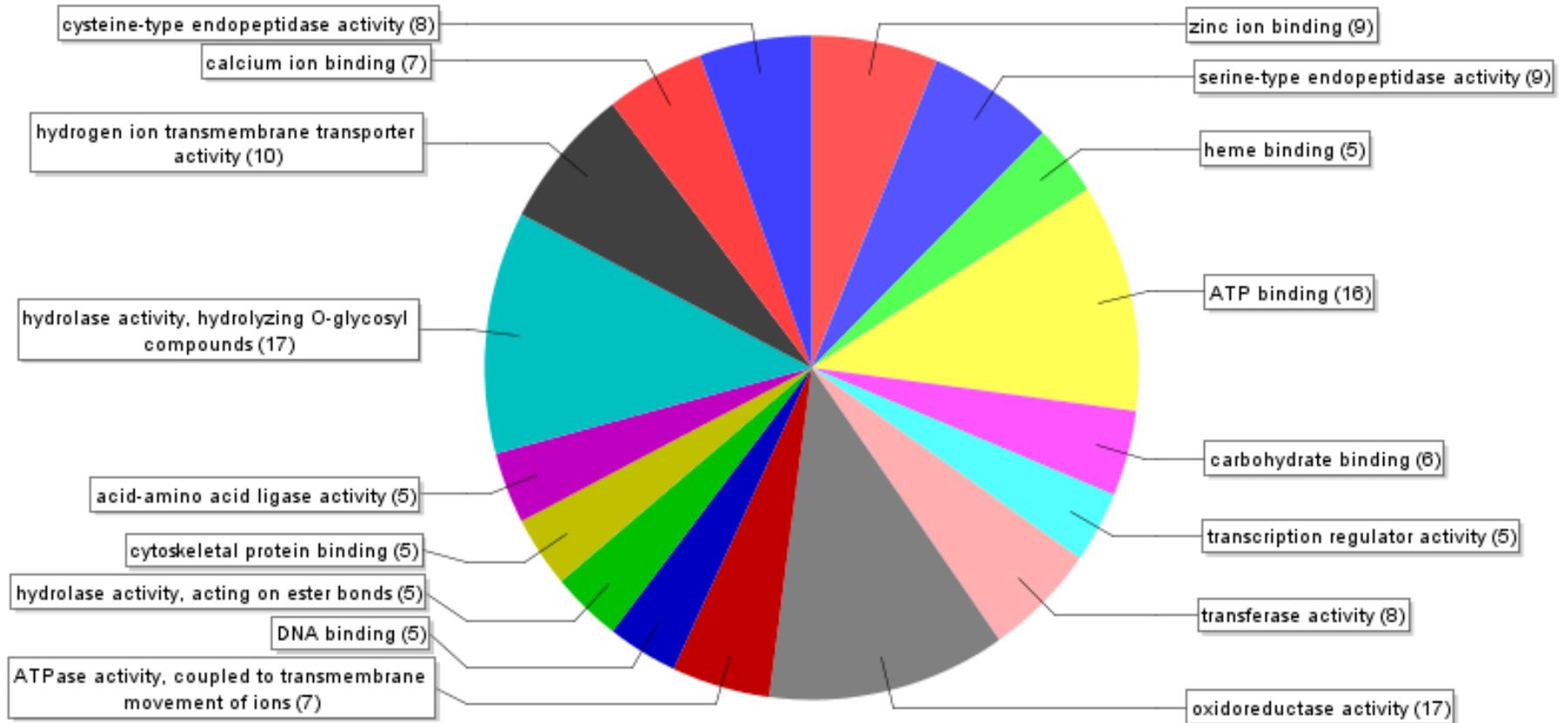


Figura 27: Distribuição das sequências na categoria de GO função molecular. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências que se encaixaram neste GO. O corte de cada categoria de GO é o menor que gera um gráfico claro. Resultado obtido no programa Blast2GO para o transcriptoma aleatório da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*.

Na figura 25 verificamos uma distribuição no termo de GO componente celular. É uma distribuição bem ampla entre os termos de GO que incluem proteínas relacionadas com a manutenção da homeostase e metabolismo basal tais como os termos: processo metabólico de proteínas, diferenciação celular, organização de organelas e biogênese e processo metabólico de nucleotídeos. Daremos destaque para os termos relacionados a transporte de proteínas e íons que também foram encontrados seguido de metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos.

Na categorização componente celular, a qual é menos instrutiva e é ilustrada na figura 26, grande parte das sequências eram classificadas como proteínas integrantes de membrana, proteínas relacionadas à cadeia respiratória, proteínas envolvidas ou integrantes dos microtúbulos e do citoesqueleto. Estes dados também são interessantes uma vez que estamos à procura de desvendar o fenômeno da secreção apócrina e este deve ocorrer com a participação de muitas proteínas relacionadas à estrutura celular tais como proteínas do citoesqueleto, actina dentre outras proteínas. Temos também que dar atenção para aquelas proteínas cujo seqüenciamento ficou bom, mas não teve hits no blast. Esta proteína pode nunca ter sido caracterizada e pode ser uma das que estamos atrás e que coordena a soldura de todo o topo celular.

A figura 27 ilustra a distribuição das sequências na categoria função molecular, indicando maior similaridade com proteínas relacionadas à atividade enzimática de hidrolase, atividade de oxidoredutase, ligação a ATP seguido de proteínas com atividade de transportador de enzimas e de proteínas com atividade de endopeptidases do tipo serina e cisteína, além de proteínas de ligação a citoesqueleto e carboidratos.

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

As sequências de interesse obtidas através deste seqüenciamento ao acaso foram selecionadas e estão resumidas na tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Sumário dos contíguos e singletes selecionados dentre os encontrados e demonstrados na tabela 1 (referente ao transcriptoma aleatório da biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*).

Nome	N de ESTs	Identificação	Descrição	Organismo	Tamanho	eValue	Similaridade
Peritrofinas							
1	1	ref XP_967419.2	Chitin binding protein, peritrophin-A	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1021	5,67E-25	69,40%
Contíguo115	4	ref XP_973688.2	Chitin binding protein, peritrophin-A	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1287	1,11E-42	42,40%
Contíguo128	6	ref NP_001161920.1	Chitin binding protein, peritrophin-A	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1035	1,79E-58	58,30%
2	1	ref XP_967419.2	Chitin binding protein, peritrophin-A	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	2523	0	58,30%
Contíguo9	1	gb ABW06596.1	intestinal mucin	<u><i>Spodoptera exigua</i></u>	1008	4,83E-45	53,00%
Contíguo30	1	ref NP_001161926.1	intestinal mucin	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1004	2,00E-46	55,80%
Contíguo70	2	ref XP_967419.2	mucin-like protein	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1165	4,22E-14	59,50%
Alérgenos (PMAP)							
Contíguo17	1	gb AAP92419.1	cockroach allergen-like protein	<u><i>Tenebrio molitor</i></u>	943	1,11E-78	69,50%
Contíguo121	4	gb AAP92419.1	cockroach allergen-like protein	<u><i>Tenebrio molitor</i></u>	1340	1,11E-85	57,10%
Contíguo101	3	gb AAP92419.1	major allergen bla g	<u><i>Tenebrio molitor</i></u>	1303	0	59,60%
Contíguo142	10	gb AAP92419.1	major allergen bla g	<u><i>Tenebrio molitor</i></u>	2072	0	58,20%
3	1	ref XP_969146.1	bla g 5 allergen	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	907	3,72E-18	57,90%
4	1	ref XP_974575.1	mpa2 allergen	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	922	1,82E-40	53,80%
5	1	ref XP_973929.1	mpa3 allergen	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1051	9,68E-68	58,60%

Citoesqueleto

Contíguo135	7	ref NP_511052.1	actin 5C	<u><i>Drosophila melanogaster</i></u>	1564	0	99,90%
Contíguo38	1	ref XP_967611.1	dynactin 2	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	975	5,27E-49	57,20%
Contíguo54	2	ref NP_001164283.1	fimbrin plastin	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	964	4,62E-82	84,50%
6	1	ref XP_967318.1	moesin ezrin radixin	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	952	1,53E-29	81,30%
7	1	ref XP_975060.2	myosin vi	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	936	5,04E-59	61,50%
8	1	ref XP_975060.2	myosin vi	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	992	1,06E-28	83,90%
9	1	ref XP_001602842.1	vanin-like protein 1	<u><i>Nanosia vitripennis</i></u>	952	1,62E-47	45,30%
Contíguo112	3	ref XP_001120116.1	vanin-like protein 1	<u><i>Apis mellifera</i></u>	819	1,31E-47	61,60%
10	1	ref XP_970159.1	vinculin	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	933	8,00E-68	72,10%

Transportadores e Bombas

Contíguo28	1	ref XP_975072.1	chloride channel protein	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	973	1,06E-49	83,20%
11	1	ref XP_975895.1	ctl transporter	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	992	4,45E-27	47,90%
Contíguo31	1	ref XP_969762.1	fatty acid binding proteina	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1014	8,64E-34	57,90%
Contíguo96	2	ref XP_967844.1	h(+)-transporting atpase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1025	3,92E-42	74,30%
12	1	ref XP_001809969.1	na-k-cl cotransporter	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	895	6,17E-46	73,40%
Contíguo99	2	ref XP_968449.1	sodium solute symporter	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	576	1,91E-22	65,00%
13	1	ref XP_971406.1	sugar transporter	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1050	3,38E-28	54,90%
14	1	ref XP_971406.1	sugar transporter	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1067	3,08E-24	73,33%
15	1	gb ABO61291.1	vacuolar atpase subunit c	<u><i>Lutzomyia longioalpis</i></u>	929	3,46E-41	80,70%
16	1	gb AAI15215.1	vacuolar h+atpase b2	<u><i>Danio rerio</i></u>	928	6,30E-18	55,70%
Contíguo106	3	ref XP_967959.1	vacuolar h	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1717	3,58E-74	94,60%

Manosidases

17	1	ref XP_968354.1	lysosomal alpha-mannosidase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	992	7,45E-91	69,70%
18	1	ref XP_968225.1	lysosomal alpha-mannosidase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1016	1,48E-50	54,10%
19	1	ref XP_001810123.1	lysosomal alpha-mannosidase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	976	9,29E-46	67,60%
20	1	ref XP_001810123.1	lysosomal alpha-mannosidase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	867	8,40E-53	69,40%
Contíguo127	5	ref XP_968517.2	lysosomal alpha-mannosidase	<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	1161	2,67E-85	71,50%

Todos os dados e sequências obtidas através de análises do cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* (sequenciamento ao acaso e pirosequenciamento) foram reunidas utilizando softwares de bioinformática como o dCAS e novas análises foram realizadas obtendo sequências mais completas, mais curadas e confiáveis.

4.3. Considerações gerais sobre a técnica de imunoscreening e os resultados obtidos

Após realizado o pirosequenciamento e todas as análises do transcriptoma da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*, realizamos o imunoscreening desta mesma biblioteca. Esta varredura foi realizada com anticorpos produzidos contra frações específicas do intestino da larva de *Tenebrio molitor*. Estas frações específicas foram escolhidas por serem ricas em materiais que poderiam acrescentar detalhes na nossa análise sobre a fisiologia molecular deste inseto. Para isso foram produzidos os anticorpos anti-membrana peritrófica, anti fração P1 e anti Fração P3, sendo estas duas últimas partes da centrifugação diferencial descrita no item 3.6 e no item 3.3. A membrana peritrófica purificada tem seu valor por ser rica em peritrofinas e pode conter parte pelo menos do maquinário responsável pela formação e manutenção desta membrana quitino-protéica tão importante para o inseto. A fração P1 é rica em grandes vesículas que se desprendem das microvilosidades, ápices celulares e é bem abundante em mitocôndrias (Ferreira et al., 1990). Esta fração é interessante nas análises relacionadas ao fenômeno da secreção apócrina que ocorre na região anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*. A fração P3 é rica em microvilosidades celulares e outras estruturas além de ser rica em conteúdo de vesículas (Ferreira et al., 1990). Essa fração é adequada para a busca de proteínas secretadas. Estas frações foram preparadas como descrito no item 3.3.

Para realizar o imunoscreening foi feita uma padronização no método e desta forma no início o uso de culturas contendo uma densidade de placas de lise relativamente alta nas varreduras facilitou em muito a obtenção de um grande número de clones. Contudo, essa varredura dificulta a identificação e o isolamento dos clones reconhecidos pelo anticorpo. Essa dificuldade pode levar a obtenção de clones com contaminação por outros clones ou até mesmo pegarmos um clone que não correspondia ao clone marcado pelo anticorpo. Dessa forma, é esperada a obtenção de

certo número de clones que não foram reconhecidos pelo anticorpo, mas sim buscados aleatoriamente na biblioteca de cDNA.

Nesse procedimento preferimos lançar mão da qualidade da purificação dos clones reconhecidos pelos anticorpos para conseguir um número grande de clones de uma forma mais rápida. Para isso foi feita apenas uma varredura usando uma densidade intermediária de placas de lise no meio de cultura. Essa densidade era a mais alta possível em que ainda era observado um número razoável de placas de lise isoladas (cerca de 15 placas de lise por cm^2 de placa de cultura). O número de clones varridos por esta técnica é cerca de 15 vezes menor do que seria obtido por uma varredura em alta densidade, mas era suficiente para obter um número razoável de clones em apenas um passo.

O passo seguinte constitui na identificação dos cDNAs contidos em cada clone obtido na varredura com anticorpos. Tomamos o cuidado inicial de forma a minimizar ao máximo a possibilidade de considerar um clone pego ao acaso como codificando uma proteína que não era esperado estar naquele local, sendo dessa forma um contaminante. Para isso, levamos em consideração uma das propriedades da biblioteca de cDNA utilizada. Essa propriedade é que os clones que são reconhecidos pelo anticorpo usado na varredura tem que estar na mesma fase de leitura que o gene da β -galactosidase presente no plasmídeo pBluescript. Ou seja, esses cDNAs devem estar com a sua porção 5' da fita codificante ligada à porção 5' da fita codificante do gene da β -galactosidase desse plasmídeo. Uma vez que queremos considerar apenas os clones que foram reconhecidos pelos anticorpos usados, resolvemos sequenciar apenas a porção do inserto que estaria adjacente a porção 5' do gene da β -galactosidase.

Como a presença de mais de um inserto é comum nos clones presentes nessas bibliotecas, preferimos evitar o sequenciamento a partir da porção 3' do gene da β -galactosidase. Isso devido ao fato de que, para muitos clones, essa seqüência poderia representar um cDNA que não era o que estava codificando o produto reconhecido pelo anticorpo.

Essa estratégia de sequenciamento levou a obtenção de um maior número de seqüências codificando a região N-terminal das proteínas de interesse, que de regra estão incompletas na região que codifica a região C-terminal do produto (extremidade

3'). O problema aqui é que não temos de primeira mão a seqüência completa, o que dificulta certas análises a respeito da função e localização dessas proteínas, mas estes resultados foram reunidos aos outros obtidos através das outras duas técnicas de geração de dados através da obtenção de seqüências mostradas anteriormente. Contudo, as informações geradas por estes imunoscreeing foram suficientes para chegarmos ao objetivo principal que seria a identificação de proteínas associadas à membrana peritrófica e as frações celulares P1 e P3 de *T.molitor*.

Foram obtidos nessas varreduras cerca de 600 clones que reagem positivamente para o anticorpo contra proteínas da membrana peritrófica , também 600 clones para a fração celular P1 e 400 clones para P3.

A figura 28 ilustra uma amostra da diversidade de cDNAs obtidos por essa varredura. Nessa estão mostrados os produtos de PCR obtidos da amplificação do inserto presente no plasmídeo pBluescript, já inserido em bactérias, de alguns clones obtidos da varredura da biblioteca de *Tenebrio molitor*.

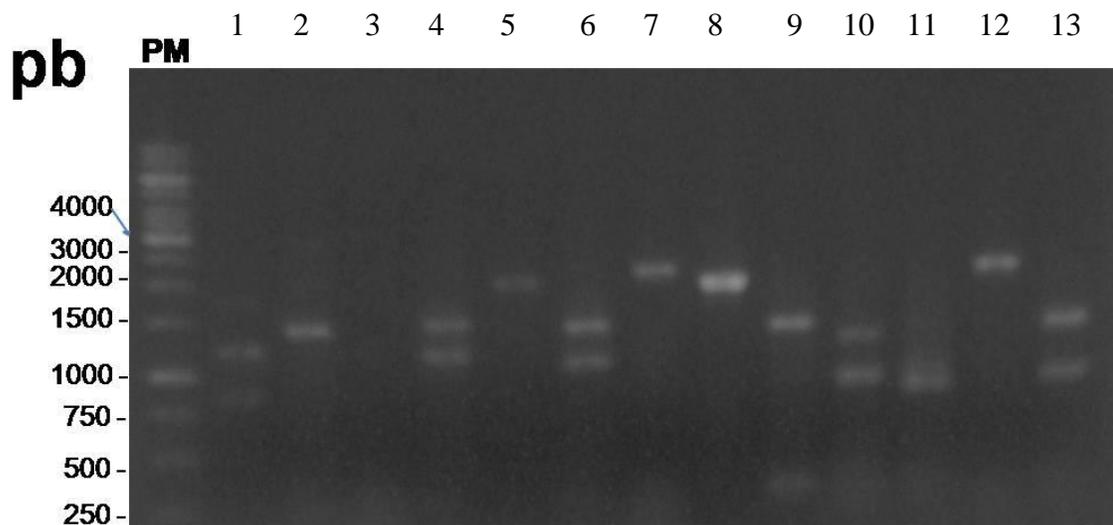


Figura 28: Produto do PCR do cDNA presente nos clones obtidos a partir da varredura da biblioteca de cDNA com anti-soro produzido contra P1. (PM) padrões de massa molecular. As raiais de 1 a 13 são amostras de diferentes clones obtidos na varredura

4.3.1. Proteínas presentes nas preparações de membrana peritrófica de *Tenebrio molitor*

As preparações de membrana peritrófica são fonte das proteínas que fazem parte da estrutura tridimensional desta (rede de quitina e proteínas) e que auxiliam na montagem dessa estrutura como descrito em Ferreira *et al.*, (2008).

A membrana peritrófica de *Tenebrio molitor* apresenta uma quantidade de proteína de 11 µg/animal (proteína dosada segundo Smith *et al.*, 1985 e modificado por Morton e Evans, 1992). O resultado obtido na separação de proteínas dessa preparação em SDS-PAGE (Figura 29 A e B) mostra que existe uma pequena diversidade de proteínas na membrana peritrófica desse animal, um número de aproximadamente 15 bandas no SDS-PAGE.

Estudos com os anticorpos pré-ímmunes mostraram que dos coelhos testados, nenhum apresentava anticorpos específicos para proteínas de inseto na mesma diluição de 200x utilizado para o soro ímune (dados não mostrados). Temos que considerar que as amostras aplicadas contêm um número variável de proteínas. Dessa forma, a imunização gera diversos anticorpos para diferentes epitopos presentes nas várias proteínas existentes na amostra. Para se conseguir anticorpo contra todas as proteínas da amostra, assumimos que a banda mais fraca de proteína teria correspondido a pelo menos 15 µg de proteína, para ser injetado no coelho, como explicado no Materiais e Métodos. Podemos verificar que o anticorpo produzido contra a membrana peritrófica de *T.molitor* teve uma cobertura muito boa, uma vez que as bandas no SDS-PAGE estão quase todas reconhecidas no western blot (ver figura 10). A produção de uma população muito grande de anticorpos dirigidos a uma ampla gama de epitopos de proteínas de inseto pode levar mais facilmente ao fenômeno de reação cruzada, mas como temos um material enriquecido nas proteínas presentes na membrana peritrófica este não foi um grande problema.

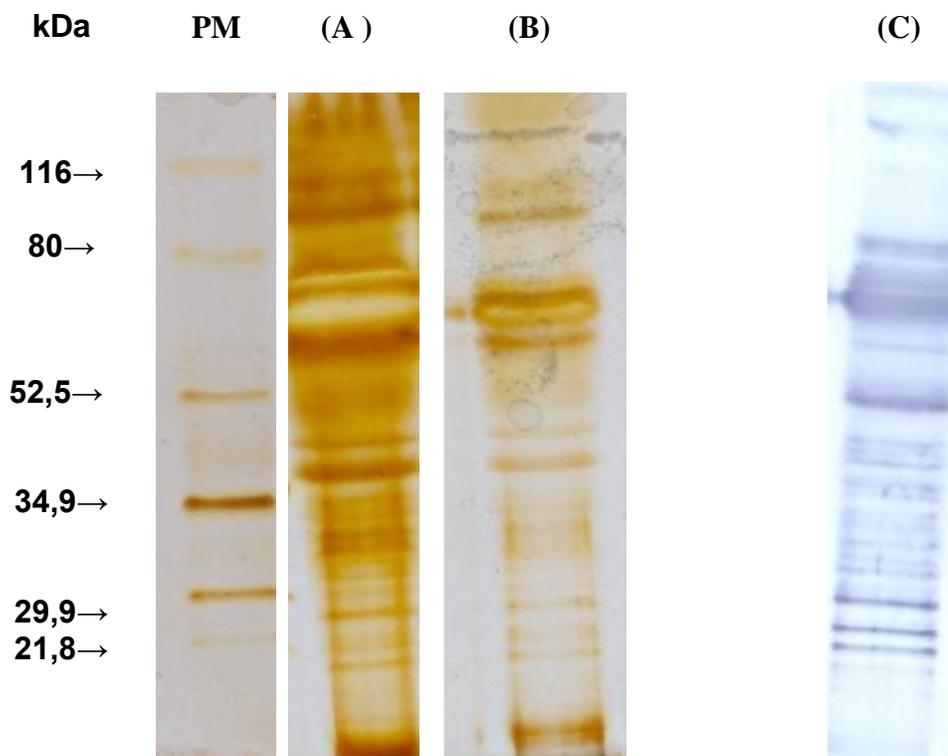


Figura 29: Separação de proteínas presentes na membrana peritrófica de *Tenebrio molitor* através de SDS-PAGE 12%. A membrana peritrófica foi preparada como descrito em materiais e métodos. Foi aplicado em torno de 100 µg de proteína na raia A e 50 µg de proteína na raia B. A raia C corresponde à foto do western blot feito com o anticorpo anti-membrana peritrófica (MP). PM, marcadores de massa molecular.

Os clones positivos coletados foram seqüenciados, resultando em 866 ESTs. Os ESTs foram analisados com os programas Phred, Phrap e Consed Linux (como descrito nos materiais e métodos) (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998), produzindo 45 contíguos (sendo 2 destes contíguos falsos, uma vez que foi verificado apenas a presença de 1 EST formando o falso contig) e 576 singletos, totalizando 621 sequências únicas ou *clusters*. As sequências são nomeadas por contíguo (se formado por 2 ou mais ESTs) ou por singleto (formada por um único EST).

A distribuição dos ESTs formadores de contíguos estão sumarizados na figura 30, sendo que 33 contíguos são formados por apenas 2 ESTs, enquanto que o contíguo com o maior número de sequências apresenta 207 ESTs.

Não se pode esperar que cada sequência única ou *cluster* seja um transcrito diferente, pois muitos dos ESTs que transmitem a mesma mensagem podem não se

sobrepor ou podem estar presentes no banco de ESTs representando *splicings* alternativos, pré-mRNAs, polimorfismos ou regiões de baixa qualidade, que dentro das condições de estringência adotadas podem levar a formação de contíguos diferentes de um mesmo transcrito.

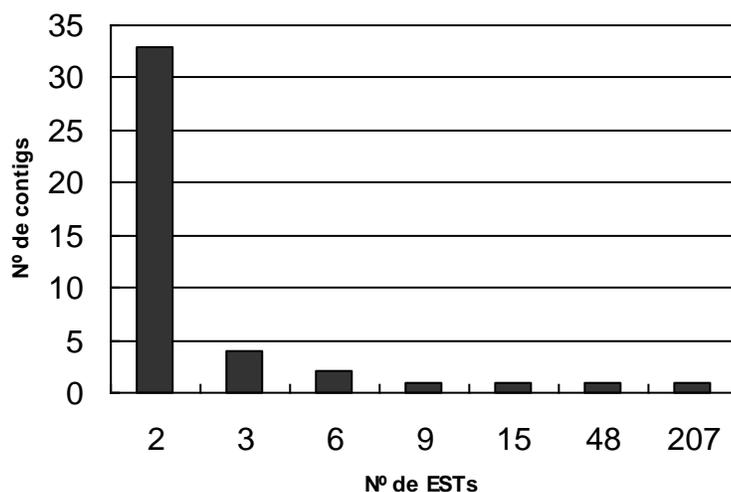


Figura 30. Distribuição e número de ESTs que formaram cada contíguo.

Os 621 *clusters* foram comparados usando o programa Blast2GO através de BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) contra o banco de dados não redundante do GENBANK (Benson *et al.*, 2000) de forma automatizada. Como esperado, o organismo mais similar a *Tenebrio molitor* foi o também Coleoptera *Tribolium castaneum* seguido de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Figura 31) em relação aos dados que temos hoje.

Species distribution

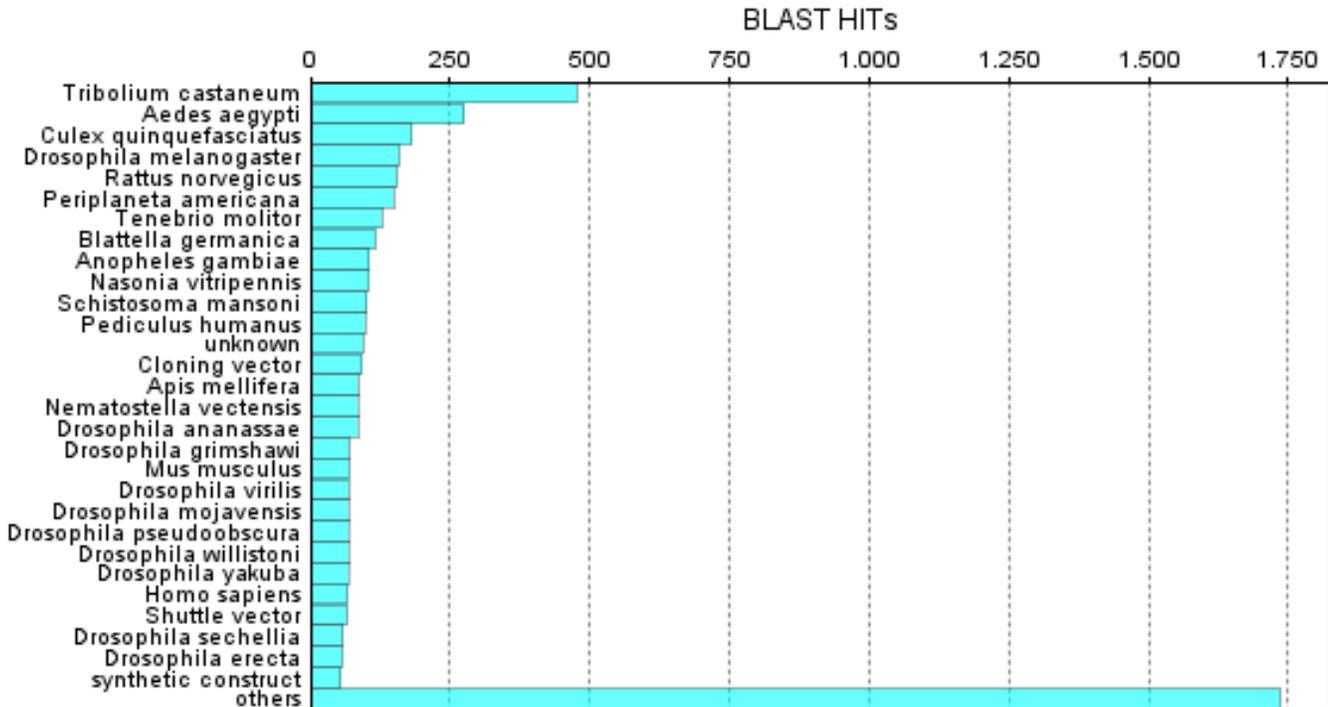


Figura 31: Distribuição das espécies mostrando o resultado obtido através de análises de BLASTX das seqüências obtidas após a varredura com o anticorpo anti-membrana peritrófica de *Tenebrio molitor*. Resultado obtido através de análises pelo programa Blast2GO.

Análise por BLASTX (banco de dados não redundante) mostrou que dos 621 clusters, 47 % deles não obtiveram similaridade significativa com o banco de dados. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho das seqüências ou até mesmo devido à falta de informação nos bancos de dados (vindas de outros insetos) referentes à membrana peritrófica, que é o enfoque do nosso trabalho. Dentro destes 47% a maioria são singletes. Nos contíguos, apenas 17% não tiveram hits (similaridade) quando comparados com o banco de dados do GenBank. Nós não descartamos a hipótese de que esse quadro possa mudar no futuro, quando seqüências adicionais ou até genomas completos de outros Coleoptera e até mesmo imun screenings de membranas peritróficas de outros insetos forem sendo depositados no banco de dados.

A maioria das seqüências possui um tamanho médio de 750 a 1000 nucleotídeos (figura 32), um tamanho bom quando se seqüência utilizando apenas um dos braços do vetor, como foi o nosso caso.

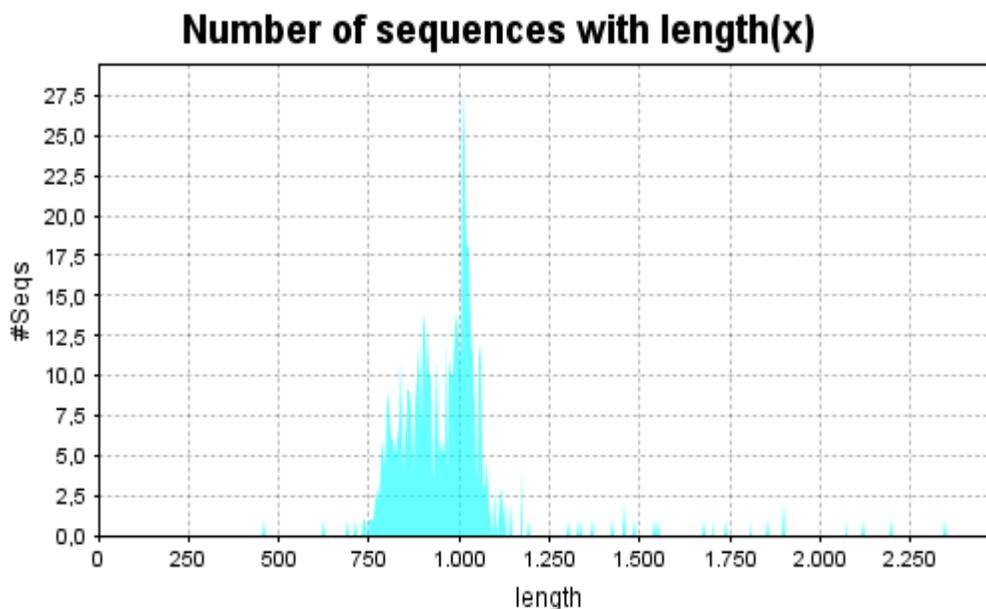


Figura 32: Este gráfico mostra a distribuição das seqüências de acordo com o tamanho.

Dentre os contíguos e singletes (tabelas 5 e 6) encontramos algumas enzimas digestivas como: serina proteinases, catepsinas D e L e alfa-amilases. Era esperado encontrar algumas enzimas digestivas nesta varredura da membrana peritrófica, pela sua proximidade do bolo alimentar e porque alguma contaminação por membrana microvilar pode ocorrer. Também encontramos proteínas relacionadas à divisão, arquitetura e controle do ciclo celular como actina, formina, septina, dentre outras. O nosso interesse nesta varredura eram as proteínas componentes da membrana peritrófica. Proteínas relacionadas à formação da membrana peritrófica como a quitina desacetilase e alérgenos como a PMAP já foram descritos (Ferreira *et al.*, 2008). Encontramos também a presença de proteínas relacionadas com o metabolismo celular em geral e manutenção da homeostase como: proteínas ribossomais, proteínas envolvidas com dobramento de outras proteínas como a tetraspanina dentre outras. Para melhor visualização das proteínas encontradas veja a tabela 5.

Tabela 5: Sumário dos Contíguos e alguns singletes referentes às sequências obtidas na varredura da biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* com o anticorpo anti-MP.

Nome	N of ESTs	Descrição	Tamanho	eValue	Similaridade
Contíguo12	2	---NA---	991		
Contíguo14	2	---NA---	844		
Contíguo17	2	---NA---	970		
Contíguo19	2	---NA---	1018		
Contíguo23	2	---NA---	891		
Contíguo35	2	---NA---	939		
Contíguo38	3	---NA---	1043		
Contíguo7	2	---NA---	996		
399	1	alpha amylase	1037	1,65E-93	80.3%
Contíguo21	2	alpha amylase	886	4,67E-112	77.75%
Contíguo24	2	alpha amylase	1037	1,76E-95	81.15%
Contíguo36	3	actin	1308	2,07E-142	64.1%
358	1	actin	919	2,59E-36	98.0%
Contíguo37	3	ac1147-like protein	1091	5,94E-32	63.45%
Contíguo29	2	adenosylmethionine decarboxylase	941	2,82E-01	54.0%
Contíguo3	2	bendless (ptn conjugada a ubiquitina)	900	1,48E-12	53.2%
Contíguo33	2	beta-hexosaminidase b	965	3,69E-28	67.7%
414	1	cathepsin b	978	4,67E-79	73.25%
Contíguo11	2	cathepsin b	978	5,17E-70	68.9%
Contíguo15	2	cathepsin b	969	3,92E-54	45.25%
Contíguo22	2	cathepsin b	1013	6,16E-73	55.45%
422	1	cathepsin I	851	6,41E-76	40.75%
Contíguo44	48	cathepsin I-like proteinase	1811	9,08E-174	73.8%
Contíguo27	2	Precursor de catepsina L	882	4,24E-67	63.65%
Contíguo20	2	cell cycle control protein	1013	9,34E-70	76.45%
449	1	chitin deacetylase 1	980	4,09E-75	58.7%

Contíguo28	2	chitin deacetylase 1	924	1,02E-80	57.8%
Contíguo18	2	cg6981 (memb microsomal e aprisona cálcio)	992	6,70E-57	75.2%
Contíguo16	2	dna directed rna polymerase ii polypeptide b	770	2,11E-88	95.7%
Contíguo25	2	dihydrolipoamide dehydrogenase	1065	3,97E-49	44.15%
Contíguo39	3	formin 2 (envolvida com divisão celular)	1486	3,96E-114	37.6%
Contíguo34	2	hypothetical protein (domínio motor de miosina ou dineína)	912	8,60E+00	60.0%
452	1	cockroach allergen-like protein	1001	2,37E-17	90.5%
Contíguo2	1	major allergen bla g	1025	1,23E-101	48.7%
Contíguo43	15	major allergen bla g	2200	0	42.5%
458	1	major allergen bla g	970	1,47E-65	48.4%
Contíguo10	2	mgc84763 protein (proteína predita de ligação)	1054	9,29E-92	63.65%
604	1	monocarboxylate transporter	1032	1,52E-14	60.6%
Contíguo30	2	5 nucleotidase	945	1,72E-14	44.6%
Contíguo41	6	p53 binding protein	922	1,21E-25	66.0%
Contíguo31	2	phosphogluconate dehydrogenase	922	6,13E-78	85.3%
445	1	peptidase d (dipeptidase)	811	3,66E-65	74.9%
447	1	peritrophic membrane chitin binding protein	1024	4,87E-82	63.0%
Contíguo32	2	protein	1036	3,67E-11	72.7%
Contíguo42	9	protein	2120	8,50E-41	78.5%
Contíguo45	207	ribosomal protein l32e	1900	1,82E-63	94.65%
Contíguo40	6	60s ribosomal protein l17	954	7,08E-24	61.6%
Contíguo8	2	rho guanyl-nucleotide exchange factor	846	2,85E-67	47.65%
Contíguo13	2	Septin (citocinese e ciclo celular)	463	3,72E-45	79.75%
364	1	Septin (citocinese e ciclo celular)	1081	1,96E-44	79.75%
435	1	serine proteinase	1082	7,06E-111	69.2%
Contíguo1	1	serine proteinase	1017	2,51E-30	54.2%
Contíguo5	2	serine proteinase	942	1,63E-65	56.8%
602	1	suppressor of potassium transport	1063	7,67E-66	77.2%
605	1	sugar transporter isoform 1 (GLUT)	1042	1,38E-18	53.14%
Contíguo26	2	tetraspanin 29fb (dobramento de prot. de membrana)	904	1,05E-50	67.55%
Contíguo6	2	tetraspanin 2a cg11415-pa	983	9,88E-45	72.7%

Contíguo9	2	udp- c:betagal beta- -n-acetylglucosaminyltransferase 5	940	1,47E-50	56.7%
Contíguo4	2	valyl-trna synthetase	986	1,69E-52	40.9%

Tabela 6: Sumário dos contíguos e singletes selecionados (para estudo durante este projeto) dentre os encontrados e demonstrados na tabela 3 (referente a varredura da biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* com o anticorpo anti-MP).

Nome	N of ESTs	Identificação	Descrição	Organismo	Tamanho	eValue	Similaridade
Alérgenos (PMAP)							
454	1	gbIAAP92419.1	cockroach allergen-like protein	<i>Tenebrio molitor</i>	1001	2,37E-17	90.5%
455	1	gbIAAP92419.1	cockroach allergen-like protein	<i>Tenebrio molitor</i>	1040	1,44E-04	76.5%
456	1	gbIAAP92419.1	cockroach allergen-like protein	<i>Tenebrio molitor</i>	872	1,19E-11	85.0%
Contíguo2	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1025	1,23E-101	48.7%
Contíguo43	15	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	2200	0	42.5%
457	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	970	1,47E-65	48.4%
458	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	991	6,89E-84	37.9%
459	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1026	3,73E-82	44.85%
460	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1025	1,23E-101	48.7%
461	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1008	9,59E-75	43.75%
462	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1035	4,48E-92	47.85%
463	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1010	7,20E-30	57.1%
464	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1034	2,13E-87	43.9%
465	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1016	5,88E-72	39.9%
466	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	995	4,20E-75	47.65%
467	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1046	4,80E-89	44.4%
468	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	1022	7,28E-76	44.2%
469	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	815	5,83E-95	43.0%
470	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	842	1,63E-91	44.15%

471	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	898	6,10E-83	45.2%
472	1	gbIAAP92419.1	major allergen bla g	<i>Tenebrio molitor</i>	855	4,22E-80	36.7%
Peritrofinas							
446	1	refINP_001103904.1	peritrophic membrane chitin binding protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1024	4,87E-82	63.0%
448	1	refINP_001103904.1	peritrophic membrane chitin binding protein	<i>Tribolium castaneum</i>	801	6,35E-51	45.0%
Citoesqueleto							
Contíguo34	2	refIXP_001895031.1	domínio motor de miosina ou dineína	<i>Plasmodium berghei</i>	912	2,38E-12	60.0%
Transportadores							
603	1	refIXP_972166.2	monocarboxylate transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	1032	1,52E-14	60.6%
604	1	refIXP_972166.2	monocarboxylate transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	967	2,07E-80	66.35%
605	1	refIXP_966866.2	sugar transporter isoform 1 (GLUT)	<i>Tribolium castaneum</i>	1042	1,38E-18	53.14%
602	1	refIXP_973935.1	suppressor of potassium transport	<i>Tribolium castaneum</i>	1063	7,67E-66	77.2%
Enzimas							
445	1	refIXP_971576.2	peptidase d (dipeptidase)	<i>Tribolium castaneum</i>	811	3,66E-65	74.9%

A tabela 6 foi construída com algumas sequências selecionadas dentre todas as encontradas (ver tabela 5) durante a varredura da biblioteca de cDNA com o anticorpo anti-MP. Esta tabela reúne proteínas que são do interesse deste projeto tais como as peritrofinas, transportadores em geral, proteínas relacionadas com o citoesqueleto ou alguma proteína que auxiliasse na montagem da membrana peritrófica.

Foram encontrados muitos alérgenos (21 no total), 1 singlete de peritrofina, um contíguo relacionado ao domínio motor de dineína (citoesqueleto), 4 sequências de transportadores (monocarboxilato e de açúcar) e um singlete correspondente a enzima dipeptidase. Estes singletes de alérgenos foram verificados e metade deles correspondia ao mesmo alérgeno encontrado na membrana microvilar de *T.molitor* descrito em Ferreira et al (2007), e a outra metade parece corresponder a proteínas auxiliares na estruturação da membrana peritrófica como descrito por Ferreira (2008) e nenhum deles é o objetivo deste trabalho.

Foi encontrado um transportador de açúcar do tipo GLUT (transportador facilitativo de glicose) (Bell et al, 1990; Carrunthers, 1990; Mueckler, 1994; Joost e thorens, 2001), o qual será estudado com mais detalhes no item 4.4.1.1.

Encontramos também 2 transportadores de monocarboxilato, os quais auxiliam na manutenção da glicólise e um supressor do transporte de potássio. O transporte de potássio é interessante porque em Lepidoptera, diferente das características de mamíferos em que o transporte de aminoácidos é acoplado ao sódio, verificou-se que o K^+ é secretado nestes insetos através da ação de uma H^+ V-ATPase apical e de um antiportador K^+/H^+ , assim promovendo a absorção de aminoácidos por um simportador K^+ -aminoácido (Castagna et al., 1997). Análises mais detalhadas foram feitas nestas sequências e estão mostradas no item 4.4.1 e nos seus subitens.

Enzimas digestivas que são integrantes das membranas microvilares também foram encontradas (Terra e Ferreira, 1994). Estas enzimas são: aminopeptidase, carboxipeptidase e dipeptidase. Estas enzimas participam da digestão final e localizam-se próximo as células. Enzimas digestivas são sempre importantes para o nosso laboratório devido à linha de pesquisa que seguimos.

4.3.2. Identificação de proteínas presentes na fração P1 do fracionamento celular isotônico do epitélio anterior e médio de *Tenebrio molitor*

O segundo anticorpo a ser utilizado para realizar o imunoscreening da biblioteca de cDNA do intestino médio de *T.molitor* foi o anti fração P1 do fracionamento celular dos epitélios do intestino anterior e médio do intestino médio do mesmo inseto. Esta fração é rica em ápices celulares (cuja denominação é fração P1) e provavelmente rica no maquinário que executa o fenômeno de secreção apócrina. Este fenômeno foi observado com enzimas digestivas na região anterior do intestino médio deste inseto segundo Cristofolletti et al (2001).

O anticorpo anti-P1 foi produzido e testado. Na figura 33 A, há a presença de várias bandas coradas com coomassie blue de tamanhos variados correspondentes a proteínas presentes na fração P1. A fig 33 B é uma foto de western blot realizado com anticorpo anti-P1 onde também foi aplicado o material da fração P1. Através do western blot verificamos uma boa cobertura do nosso anticorpo, pois temos um reconhecimento da maioria das bandas presentes no SDS-PAGE. As proteínas de tamanhos menores não foram muito bem reconhecidas pelo anticorpo anti-P1, mas suspeita-se que tenham passado através da membrana durante o tempo utilizado para transferência.

Antes de aplicar o material no coelho foi feita uma quantificação através de SDS-PAGE, utilizando a albumina de ovo como padrão, como descrita no item 3.5, e todas as proteínas estavam bem representadas para que fossem produzidos os anticorpos contra elas. Estas proteínas menores também podem não ser tão imunogênicas, o que levou a ausência de anticorpos contra elas no soro produzido pelo coelho.

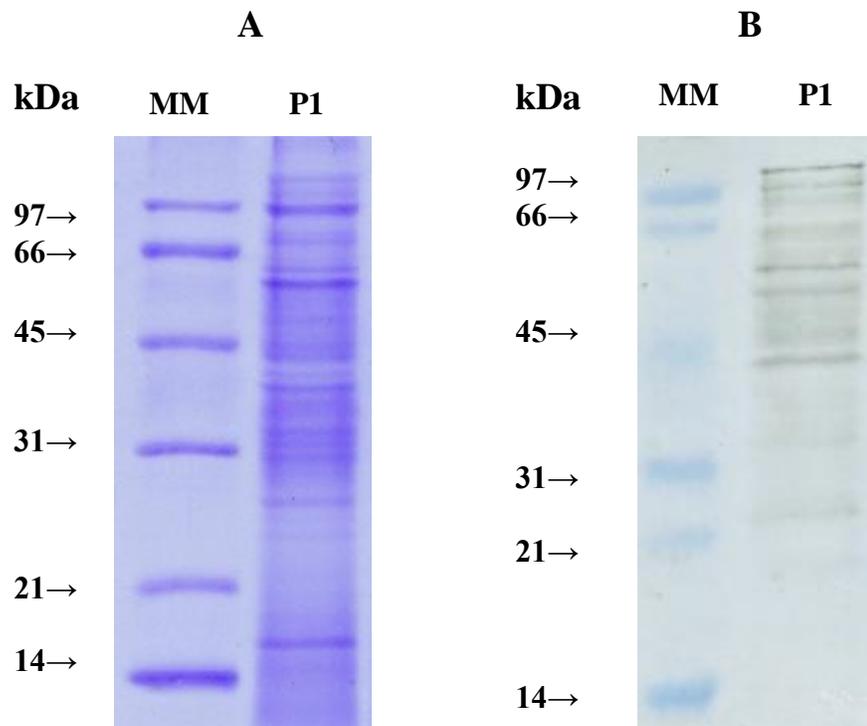


Figura 33 : Separação de proteínas presentes na fração P1 do fracionamento subcelular do epitélio do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor* através de SDS-PAGE 12%. O material de P1 foi preparado como descrito em materiais e métodos. Foi aplicado em torno de 70 μ g de proteína. A letra A corresponde a um gel de SDS-PAGE corado com coomassie blue e a letra B corresponde à foto do western blot feito com o anticorpo anti-P1. MM, marcadores de massa molecular.

Este anticorpo produzido em coelho foi então utilizado para realizar as varreduras da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Após algumas varreduras obtivemos vários clones positivos, os quais foram seqüenciados gerando 769 ESTs. Os ESTs foram analisados com os programas Phred, Phrap e Consed Linux (como descrito nos materiais e métodos) (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et. al.*, 1998), gerando 64 contíguo e 480 singletes totalizando 544 seqüências únicas ou clusters.

A distribuição dos ESTs formadores de contíguos está sumarizada na figura 34 sendo que 34 contíguos são formados por apenas 2 ESTs, enquanto que o contíguo com o maior número de seqüências apresenta 191 ESTs.

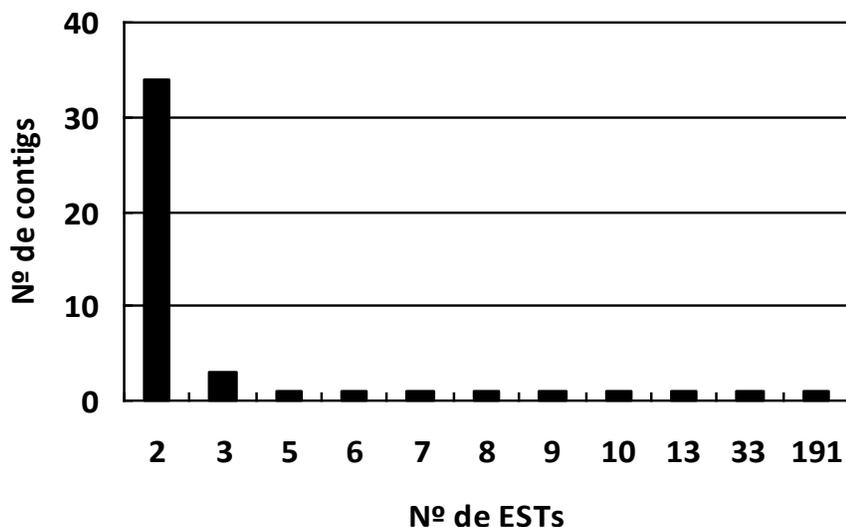


Figura 34: Distribuição e número de ESTs que formaram cada contígua

Os 544 *clusters* foram comparados usando o programa Blast2GO através de BlastX (Altschul *et al.*, 1997) contra o banco de dados não redundante do GENBANK (Benson *et al.*, 2000) de forma automatizada. Semelhante ao imunoscreeing da membrana peritrófica o organismo mais similar a *Tenebrio molitor*, ou seja, que tiveram os melhores hits no blastx, foi o também Coleoptera *Tribolium castaneum* seguido de *Aedes aegypti*. O terceiro inseto com mais “Blast hits” foi o Díptera *Drosophila melanogaster* (Figura 35).

Species distribution

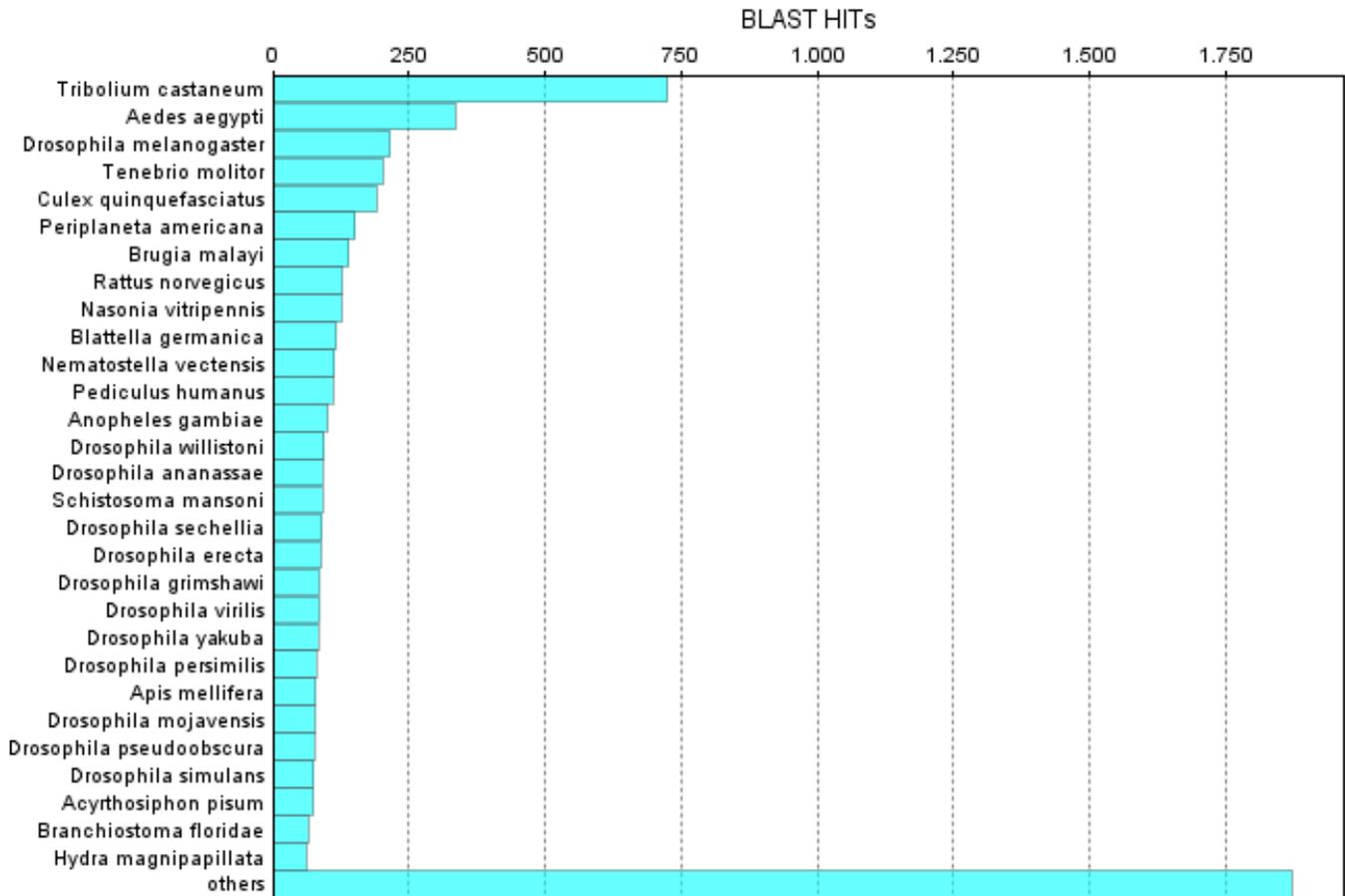


Figura 35: Distribuição das espécies mostrando o resultado obtido através de análises de BlastX das seqüências obtidas após a varredura com o anticorpo anti-fração P1 de *Tenebrio molitor*. Resultado obtido através de análises pelo programa Blast2GO.

Análise por BLASTX (banco de dados não redundante) mostrou que dos 544 clusters apenas 31 % deles não obtiveram similaridade significativa, ou seja, com um e-value confiável, com o banco de dados. Dentro destes 31% a maioria são singletes (devido ao maior número destes também). Esta falta de similaridade com os bancos de dados pode ser devido à falta de seqüências de insetos depositadas nos bancos de dados, pois ainda são poucos os insetos seqüenciados e isto restringe o espaço amostral no momento de identificar nossos clones. Nos contíguo apenas 11% não tiveram hits (similaridade) quando comparados com o banco de dados do GenBank. Observando o tamanho de todas as seqüências obtidas nesta varredura foi possível

construir a figura 36, na qual temos um aglomerado de seqüências que por volta de 600 nucleotídeos e outro em torno de 900, nos dando um tamanho médio das seqüências em torno de 750 nucleotídeos.

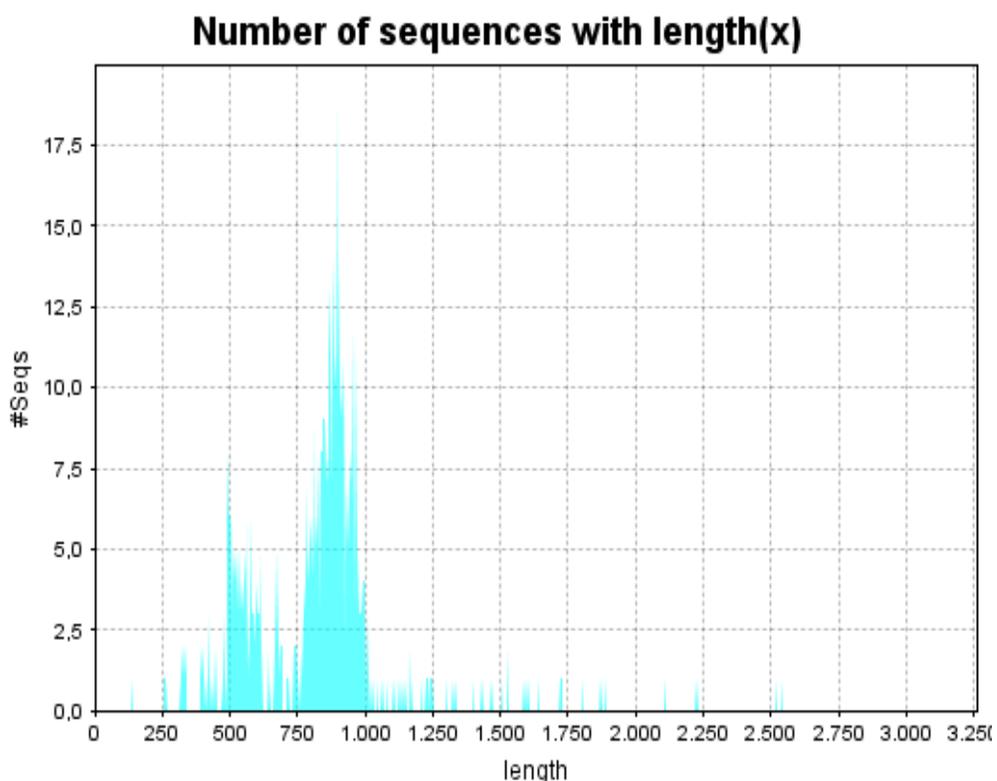


Figura 36: Este gráfico mostra a distribuição das seqüências obtidas na varredura com o anticorpo anti-P1 de acordo com o tamanho.

Todas as seqüências foram tratadas e foi utilizado o programa Blast2GO para análises das seqüências e geração da maioria dos gráficos apresentados.

P1 é a fração onde se encontra grandes vesículas que se desprendem das microvilosidades, ápices celulares e é bem abundante em mitocôndrias. Como era de se esperar, durante as análises encontramos seqüências relacionadas a mitocôndrias. Dentre estas seqüências estão algumas proteínas como: citocromo oxidase e ATPase (cadeia respiratória) e desidrogenase. Encontramos também alguns contíguos relacionados ao metabolismo basal ou “housekeeping” como: peroxidases, proteínas ribossomais e transferases. Muitas seqüências (dentre elas contíguos e singletes)

tiveram similaridade com proteínas relacionadas à membrana peritrófica como as peritrofinas (total de 14 sequências), chitina desacetilases (total de 4 sequências) e vários alérgenos (total de 40 sequências) que podem codificar proteínas que auxiliam na montagem da membrana peritrófica. Também apareceram proteínas relacionadas ao citoesqueleto, arquitetura celular, ciclo celular e movimento de vesículas como: actina, miosina, espectrina (proteína de ligação a actina), tubulina (compõem os microtúbulos) e ciclinas. Ainda encontramos várias enzimas digestivas como: beta-manosidases, carboxipeptidase b, catepsinas L, serino proteases, α e β manosidases, quitinases, esterase, tripsina, glicosidases, dipeptidases, aminopeptidases, além de alguns transportadores de açúcar e de aminoácidos (ver tabela 7).

As principais atividades solúveis em P1 resultam de enzimas aprisionadas no glicocálix do espaço intermicrovilar de células intestinais (a visualização por microscopia eletrônica desta fração mostra grandes vesículas com bordas em escova). Após o congelamento e descongelamento, estas vesículas provavelmente mudam de estrutura, as enzimas anteriormente presentes no espaço intermicrovilar do glicocálix são liberadas. Atividades solúveis no sobrenadante final (cujo material juntamente com o sedimento foi injetado no coelho para produção do anticorpo utilizado para as varreduras) podem resultar da liberação durante a homogeneização de enzimas perdidas por estarem ligadas ao glicocálix (Ferreira et al., 1990).

Nosso interesse nesta fração era encontrar alguma proteína que fizesse parte do mecanismo de secreção apócrina, onde ocorre um desprendimento de todo o ápice celular. Muitas proteínas devem estar envolvidas neste fenômeno, mas não sabemos se iremos encontrar uma vez que nunca foi estudada esta secreção a fundo e provavelmente não haverá hits no blast para algumas sequências encontradas.

As sequências interessantes para este projeto foram todas reunidas na tabela 6. Estas sequências serão utilizadas para um estudo mais detalhado com o decorrer deste projeto e para completar as encontradas através das outras técnicas de sequenciamento mostradas neste trabalho.

Tabela 7: Sumário dos Contíguos e alguns singletes referentes às sequências obtidas na varredura da biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* com o anticorpo anti-P1 (fração P1 do fracionamento celular).

Nome	N de ESTs	Descrição	Tamanho	eValue	Similaridade
	1	PREDICTED: copper transporter	497	1,22E-08	90.0%
	1	PREDICTED: (type VI secretion protein lcmF)	860	1,96E-35	52.8%
	1	PREDICTED: (type VI secretion protein lcmF)	954	1,47E-29	55.8%
Contíguo37	2	PREDICTED: (type VI secretion protein lcmF)	889	1,35E-34	55.8%
	1	PREDICTED: (Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain)	454	3,08E-13	41.0%
	1	PREDICTED: similar to AGAP012156-PA (ABC transporter)	891	5,89E-06	54.0%
	1	aaa atpase	871	2,80E-37	86.65%
Contíguo9	1	aaa atpase	871	2,80E-37	86.65%
	1	actin	794	6,13E-86	79.0%
Contíguo34	2	actin	795	9,21E-90	82.0%
	1	adp atp translocase	929	9,60E-91	64.8%
	1	alpha amylase	964	7,19E-40	45.75%
	1	alpha amylase isoform 1	560	9,45E-50	82.15%
Contíguo20	2	arginine kinase	1179	1,54E-61	94.7%
	1	atp synthase f0 subunit 6	583	4,74E-42	85.8%
	1	beta chain spectrin	586	3,12E-41	65.5%
	1	beta lysosomal (mannosidase)	532	5,34E-25	63.95%
	1	beta lysosomal (mannosidase)	843	6,44E-41	36.85%
	1	beta lysosomal (mannosidase)	876	1,45E-57	53.3%
Contíguo6	1	beta lysosomal (mannosidase)	532	5,34E-25	63.95%
Contíguo7	1	beta lysosomal (mannosidase)	843	6,44E-41	36.85%
Contíguo18	1	beta lysosomal (mannosidase)	876	1,45E-57	53.3%
	1	beta-tubulin at 97ef	959	2,25E-78	81.55%

18	1	carboxypeptidase d	992	2,64E-45	46.15%
19	2	carboxypeptidase d	995	1,62E-52	43.0%
20	1	cathepsin b-like proteinase	1004	8,07E-58	59.15%
21	1	cathepsin l-like protein cysteine proteinase	503	1,07E-55	60.85%
22	1	cathepsin l-like protein cysteine proteinase	518	1,66E-01	80.5%
23	1	cathepsin l-like protein cysteine proteinase	524	9,96E-82	63.65%
Contíguo11	1	cathepsin l-like protein cysteine proteinase	524	9,96E-82	63.65%
Contíguo13	1	cathepsin l-like protein cysteine proteinase	503	1,07E-55	60.85%
24	1	cathepsin l-like proteinase	889	5,39E-100	76.15%
25	1	cathepsin l-like proteinase	498	9,25E-28	72.85%
26	1	cathepsin l-like proteinase	860	5,67E-51	62.3%
27	1	cathepsin l-like proteinase	894	6,83E-95	74.15%
Contíguo56	5	cathepsin l-like proteinase	902	1,17E-126	79.05%
Contíguo21	2	cg15117 cg15117-pa	908	3,22E-76	31.75%
Contíguo42	2	cg3106 cg3106-pa	973	2,33E-14	49.0%
28	1	cg5065 cg5065-pa (Trasporte de carboidrato)	869	2,46E-01	70.0%
29	1	chitin deacetylase 1	911	1,86E-80	56.6%
Contíguo25	2	chitin deacetylase 1	1014	1,49E-83	57.9%
Contíguo48	2	chitin deacetylase 1	904	6,39E-40	48.9%
31	1	chitin deacetylase 6	903	1,29E-40	51.45%
33	1	chitin synthase	819	1,24E-60	55.9%
35	1	chitinase 3	963	4,42E-98	54.35%
Contíguo44	2	chitinase 3	878	6,28E-62	50.25%
36	1	cholesterol transporter tart1	861	4,57E-08	59.0%
37	1	cockroach allergen-like protein	874	1,73E-02	88.0%
38	1	cockroach allergen-like protein	854	5,13E-17	56.0%
39	1	cockroach allergen-like protein	906	1,75E-02	50.0%
40	1	cockroach allergen-like protein	943	5,77E-79	55.0%
41	1	cockroach allergen-like protein	963	9,97E-14	48.0%

42	1	cockroach allergen-like protein	900	3,76E-08	78.5%
43	1	cockroach allergen-like protein	822	7,13E-08	63.5%
44	1	cockroach allergen-like protein	768	1,50E-01	59.0%
45	1	cockroach allergen-like protein	443	2,05E-19	85.0%
46	1	cockroach allergen-like protein	432	1,19E-03	60.5%
47	1	cockroach allergen-like protein	917	1,13E+01	78.0%
48	1	cockroach allergen-like protein	692	3,61E-46	50.4%
49	1	cockroach allergen-like protein	898	1,29E+00	66.0%
50	1	cyclin a (ciclo celular e controle transcricional)	792	1,44E-10	50.75%
Contíguo59	8	cytochrome c oxidase subunit i	1648	0.0	90.05%
Contíguo40	2	cytochrome oxidase subunit ii	796	1,38E-69	92.4%
51	1	diaphanous protein (homologo a formina)	517	4,98E-22	79.4%
52	1	esterase	535	3,21E-09	70.2%
53	6	esterase	1214	2,96E-15	66.5%
54	1	g12 (alérgeno)	827	3,84E-90	53.8%
Contíguo46	2	glucosidase 2 subunit beta	963	6,65E-66	64.65%
Contíguo35	2	glutamate carboxypeptidase	927	2,57E-67	45.6%
Contíguo19	2	glutathione s transferase e6 cg17530-pa	925	2,47E-10	63.6%
Contíguo15	1	glutathione s-transferase 6a	776	1,32E-37	50.9%
Contíguo30	2	hypothetical protein THERM_02141640 [Tetrahymena thermophila]	813	3,91E-01	56.0%
Contíguo3	1	hypothetical protein [Tityus discrepans]	898	4,14E+01	69.0%
56	1	isoform a (transporte de aminoácidos)	887	8,10E-56	64.95%
55	1	lysosomal alpha-mannosidase	855	1,81E-41	52.2%
57	1	lysosomal alpha-mannosidase	909	2,31E-21	56.05%
Contíguo50	2	lysosomal alpha-mannosidase	855	1,81E-41	52.2%
58	1	major allergen bla g	902	1,43E-73	47.25%
59	1	major allergen bla g	909	1,38E-74	52.1%
60	1	major allergen bla g	528	4,10E-62	50.5%

61	1	major allergen bla g	901	1,10E-108	49.9%
62	1	major allergen bla g	832	4,14E-55	50.0%
63	1	major allergen bla g	855	5,56E-92	53.2%
64	1	major allergen bla g	902	2,77E-81	35.0%
65	1	major allergen bla g	845	1,38E-94	50.95%
66	1	major allergen bla g	842	1,94E-95	47.15%
67	1	major allergen bla g	796	1,43E-58	51.6%
68	1	major allergen bla g	935	3,20E-98	50.1%
69	1	major allergen bla g	977	9,53E-86	52.6%
70	1	major allergen bla g	935	4,63E-89	51.8%
71	1	major allergen bla g	906	6,14E-83	50.15%
72	1	major allergen bla g	995	1,10E-99	51.0%
73	1	major allergen bla g	674	1,20E-51	49.25%
74	1	major allergen bla g	683	7,45E-51	42.5%
75	1	major allergen bla g	777	3,49E-72	49.6%
76	1	major allergen bla g	901	4,47E-90	34.3%
77	1	major allergen bla g	897	8,13E-89	42.75%
78	1	major allergen bla g	883	4,25E-74	50.0%
Contíguo16	1	major allergen bla g	909	1,38E-74	52.1%
Contíguo58	7	major allergen bla g	1438	2,56E-173	49.55%
Contíguo60	9	major allergen bla g	2548	0.0	40.2%
Contíguo62	13	major allergen bla g	2234	0.0	33.45%
Contíguo64	191	major allergen bla g	3113	0.0	47.8%
79	1	membrane alanyl aminopeptidase	982	3,94E-90	55.1%
Contíguo41	2	mesoderm induction early response 1	752	1,13E-38	75.25%
80	1	mucin-like peritrophin	602	2,22E-21	54.85%
81	1	mucin-like peritrophin	507	1,06E-21	53.5%
82	1	mucin-like peritrophin	925	2,55E-15	52.95%
Contíguo12	1	mucin-like peritrophin	602	2,22E-21	54.85%

Contíguo32	2	mucin-like peritrophin	698	2,41E-22	54.45%
83	1	mucin-like protein	549	1,03E-21	63.85%
Contíguo17	1	mucin-like protein	549	1,03E-21	63.85%
84	1	myosin vi	875	5,23E-92	80.3%
85	1	oligopeptide transporter	546	2,77E-11	88.0%
Contíguo51	2	oxidase peroxidase	786	2,37E-82	53.95%
86	1	peptidase d (dipeptidase)	806	5,20E-64	67.4%
87	1	peritrophic membrane chitin binding protein	402	1,36E-18	59.4%
88	1	peritrophic membrane chitin binding protein	877	1,80E-79	37.25%
89	1	peritrophic membrane chitin binding protein	921	1,75E-24	44.8%
90	1	peritrophic membrane chitin binding protein	974	4,93E-81	60.85%
Contíguo4	1	peritrophic membrane chitin binding protein	921	1,75E-24	44.8%
Contíguo14	2	peritrophic membrane chitin binding protein	402	1,36E-18	59.4%
Contíguo39	2	peritrophic membrane chitin binding protein	882	1,15E-86	61.0%
Contíguo2	1	protein	591	6,32E-13	75.5%
Contíguo54	3	rrna promoter binding protein	615	3,56E-17	73.7%
Contíguo5	1	senescence-associated protein	816	4,00E-35	64.75%
91	1	serine arginine repetitive matrix 1	886	1,40E+01	38.75%
92	1	serine arginine repetitive matrix 2	1148	3,48E-03	43.3%
93	1	serine proteinase	894	7,05E-100	60.7%
94	1	serine proteinase	870	5,10E-47	66.7%
95	1	serine proteinase	901	9,11E-63	63.05%
96	1	serine proteinase	487	6,55E-26	63.1%
97	1	serine proteinase	560	2,04E-37	60.05%
98	1	serine proteinase	538	2,77E-45	72.55%
99	1	serine proteinase	502	1,31E-53	68.0%
100	1	serine proteinase	591	9,38E-33	59.35%
101	1	serine proteinase	917	1,78E-74	38.65%
102	1	serine proteinase	824	2,73E-100	65.65%

103	1	serine proteinase	911	5,69E-20	66.2%
104	1	serine proteinase	976	9,67E-77	38.8%
105	1	serine proteinase	954	6,12E-68	63.1%
106	1	serine proteinase	774	3,94E-66	65.0%
107	1	serine proteinase	885	8,93E-63	60.65%
Contíguo1	1	serine proteinase	824	2,73E-100	65.65%
Contíguo8	1	serine proteinase	901	9,11E-63	63.05%
Contíguo10	1	serine proteinase	502	1,31E-53	68.0%
Contíguo22	2	serine proteinase	879	1,01E-66	61.6%
Contíguo26	2	serine proteinase	917	3,92E-85	54.45%
Contíguo33	2	serine proteinase	538	2,77E-45	72.55%
Contíguo52	2	short-chain dehydrogenase	747	3,56E-85	77.6%
108	1	sodium hydrogen exchanger 8	919	2,26E-40	69.75%
109	1	sugar transporter	937	2,09E-81	66.75%
110	1	tetraspanin 29fa	544	2,00E-30	63.7%
111	1	thiamine transporter 1	821	2,61E-42	79.6%
112	1	thiamine transporter 1	947	3,33E-42	79.6%
113	1	trypsin-like proteinase	903	4,01E-34	46.25%
Contíguo47	2	trypsin-like proteinase	903	4,01E-34	46.25%
114	1	tubulin alpha-1 chain	679	2,75E-73	51.0%
Contíguo29	2	tubulin alpha-1 chain	679	2,75E-73	51.0%
115	1	tubulin beta chain	903	1,31E-86	48.8%
Contíguo23	2	tubulin beta chain	903	1,31E-86	48.8%
Contíguo38	2	wd-repeat protein	873	1,53E-83	72.4%

Tabela 8: Sumário dos contíguos e singletes selecionados da tabela 5 (para estudo durante este projeto) referente a varredura da biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* com o anticorpo anti-P1. Esta tabela contém os números de acesso e os organismos com o qual a sequência teve o melhor “blast hit”.

Nome	N de ESTs	N de Acesso	Organismo	Descrição	Tamanho	eValue	Similaridade
Citoesqueleto							
7	1	gb ACO60321.1	<i>Rhodnius prolixus</i>	actin	794	6,13E-86	79.0%
Contíguo34	2	gb ACO60321.1	<i>Rhodnius prolixus</i>	actin	795	9,21E-90	82.0%
13	1	ref XP_969687.1	<i>Tribolium castaneum</i>	beta chain spectrin	586	3,12E-41	65.5%
84	1	ref XP_975060.2	<i>Tribolium castaneum</i>	myosin vi	875	5,23E-92	80.3%
114	1	gb ABU24274.1	<i>Monochamus alternatus</i>	tubulin alpha-1 chain	679	2,75E-73	51.0%
Contíguo29	2	gb ABU24274.1	<i>Monochamus alternatus</i>	tubulin alpha-1 chain	679	2,75E-73	51.0%
115	1	ref XP_968314.1	<i>Tribolium castaneum</i>	tubulin beta chain	903	1,31E-86	48.8%
Contíguo23	2	ref XP_968314.1	<i>Tribolium castaneum</i>	tubulin beta chain	903	1,31E-86	48.8%
Alérgenos							
	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	874	1,73E-02	88.0%
38	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	854	5,13E-17	56.0%
39	1	ref XP_971572.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	906	1,75E-02	48%
40	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	943	5,77E-79	55.0%
41	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	963	9,97E-14	48.0%
42	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	900	3,76E-08	78.5%
43	1	ref XP_971572.1	<i>Tribolium castaneum</i>	cockroach allergen-like protein	822	7,13E-08	63.5%
44	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	768	1,50E-01	59.0%
45	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	443	2,05E-19	85.0%
46	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	432	1,19E-03	60.5%
47	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	917	1,13E+01	78.0%

48	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	cockroach allergen-like protein	692	3,61E-46	50.4%
49	1	ref XP_971572.1	<i>Tribolium castaneum</i>	cockroach allergen-like protein	898	1,29E+00	66.0%
54	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	g12 (alérgeno)	827	3,84E-90	53.8%
58	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	902	1,43E-73	47.25%
59	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	909	1,38E-74	52.1%
60	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	528	4,10E-62	50.5%
61	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	901	1,10E-108	49.9%
62	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	832	4,14E-55	50.0%
63	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	855	5,56E-92	53.2%
64	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	902	2,77E-81	35.0%
65	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	845	1,38E-94	50.95%
66	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	842	1,94E-95	47.15%
67	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	796	1,43E-58	51.6%
68	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	935	3,20E-98	50.1%
69	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	977	9,53E-86	52.6%
70	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	935	4,63E-89	51.8%
71	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	906	6,14E-83	50.15%
72	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	995	1,10E-99	51.0%
73	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	674	1,20E-51	49.25%
74	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	683	7,45E-51	42.5%
75	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	777	3,49E-72	49.6%
76	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	901	4,47E-90	34.3%
77	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	897	8,13E-89	42.75%
78	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	883	4,25E-74	50.0%
Contíguo16	1	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	909	1,38E-74	52.1%
Contíguo58	7	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	1438	2,56E-173	49.55%
Contíguo60	9	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	2548	0.0	40.2%
Contíguo62	13	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	2234	0.0	33.45%
Contíguo64	191	gb AAP92419.1	<i>Tenebrio molitor</i>	major allergen bla g	3113	0.0	47.8%

Peritrofinas

80	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like peritrophin	602	2,22E-21	54.85%
81	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like peritrophin	507	1,06E-21	53.5%
82	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like peritrophin	925	2,55E-15	52.95%
Contíguo12	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like peritrophin	602	2,22E-21	54.85%
Contíguo32	2	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like peritrophin	698	2,41E-22	54.45%
83	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like protein	549	1,03E-21	63.85%
Contíguo17	1	ref XP_967419.2	<i>Tribolium castaneum</i>	mucin-like protein	549	1,03E-21	63.85%
87	1	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	402	1,36E-18	59.4%
88	1	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	877	1,80E-79	37.25%
89	1	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	921	1,75E-24	44.8%
90	1	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	974	4,93E-81	60.85%
Contíguo4	1	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	921	1,75E-24	44.8%
Contíguo14	2	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	402	1,36E-18	59.4%
Contíguo39	2	ref NP_001103904.1	<i>Tribolium castaneum</i>	peritrophic membrane chitin binding protein	882	1,15E-86	61.0%

Transportadores e Bombas

6	1	XP_001814283.1	<i>Tribolium castanaeum</i>	aaa atpase	871	2,80E-37	86.65%
Contíguo9	1	XP_001814283.1	<i>Tribolium castanaeum</i>	aaa atpase	871	2,80E-37	86.65%
5	1	XP_970882.2	<i>Tribolium castanaeum</i>	ABC transporter	891	5,89E-06	54.0%

36	1	ref XP_974514.1	<i>Tribolium castaneum</i>	cholesterol transporter tart1	861	4,57E-08	59%
28	1	ref XP_973431.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Transporte de carbohidrato isoform a (transporte de aminoácidos)	869	2,46E-01	70.0%
56	1	ref XP_972574.2	<i>Tribolium castaneum</i>	oligopeptide transporter	887	8,10E-56	64.95%
85	1	ref XP_972519.1	<i>Tribolium castaneum</i>	sodium hydrogen exchanger 8	546	2,77E-11	88.0%
108	1	ref XP_001807104.1	<i>Tribolium castaneum</i>	sugar transporter	919	2,26E-40	69.75%
109	1	ref XP_970364.2	<i>Tribolium castaneum</i>		937	2,09E-81	66.75%

Enzimas

29	1	ref NP_001103906.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitin deacetylase 1	911	1,86E-80	56.6%
Contíguo25	2	ref NP_001103906.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitin deacetylase 1	1014	1,49E-83	57.9%
Contíguo48	2	ref NP_001103905.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitin deacetylase 1	904	6,39E-40	48.9%
31	1	ref NP_001103905.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitin deacetylase 6	903	1,29E-40	51.45%
33	1	ref NP_001034492.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitin synthase	819	1,24E-60	55.9%
35	1	ref NP_001034515.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitinase 3	963	4,42E-98	54.35%
Contíguo44	2	ref NP_001034515.1	<i>Tribolium castaneum</i>	chitinase 3	878	6,28E-62	50.25%
57	1	ref XP_001810123.1	<i>Tribolium castaneum</i>	lysosomal alpha-mannosidase	909	2,31E-21	56.05%
Contíguo50	2	ref XP_001810123.1	<i>Tribolium castaneum</i>	lysosomal alpha-mannosidase	855	1,81E-41	52.2%
86	1	ref XP_971576.2	<i>Tribolium castaneum</i>	peptidase d (dipeptidase)	806	5,20E-64	67.4%

Utilizamos o programa Blast2GO para fazer a categorização dos ESTs obtidos na varredura da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* com o anticorpo anti-P1. Esta classificação foi feita segundo o Gene Ontology consortium e se divide em 3 categorias: componente celular, função molecular e processo biológico. Uma provável função molecular foi designada para 172 sequências sendo a maior quantidade classificada como atividade de endopeptidase tipo serina, seguida de ligação a ATP e atividade de receptor. Estas são classificações mais genéricas, pois existem muitas subdivisões dos termos de GO. Os resultados desta categoria função molecular podem ser observados nas figuras 37 e 38, sendo que na figura 38 temos classificações mais específicas. Na subdivisão componente celular foram categorizadas 123 sequências (figura 39 e 40). Na figura 39 podemos observar um grande número de sequências correspondentes a localização da mitocôndria, o que era de se esperar uma vez que a fração P1 é rica em mitocôndrias.

Foram categorizadas 356 sequências dentro da divisão processo biológico e alguns termos de GO encontrados estão sumarizados nas figuras 41 e 42. Na figura 41 observamos a maior quantidade de termos de GO referente à proteólise, o que é normal de ser encontrado em Coleoptera uma vez que este inseto é rico em proteinases digestivas já comprovadas em Terra e Cristofolletti (1996), seguido de proteínas relacionadas a transporte, que são do nosso interesse e proteínas envolvidas com o metabolismo aeróbico, mitocôndria e metabolismo da quitina.

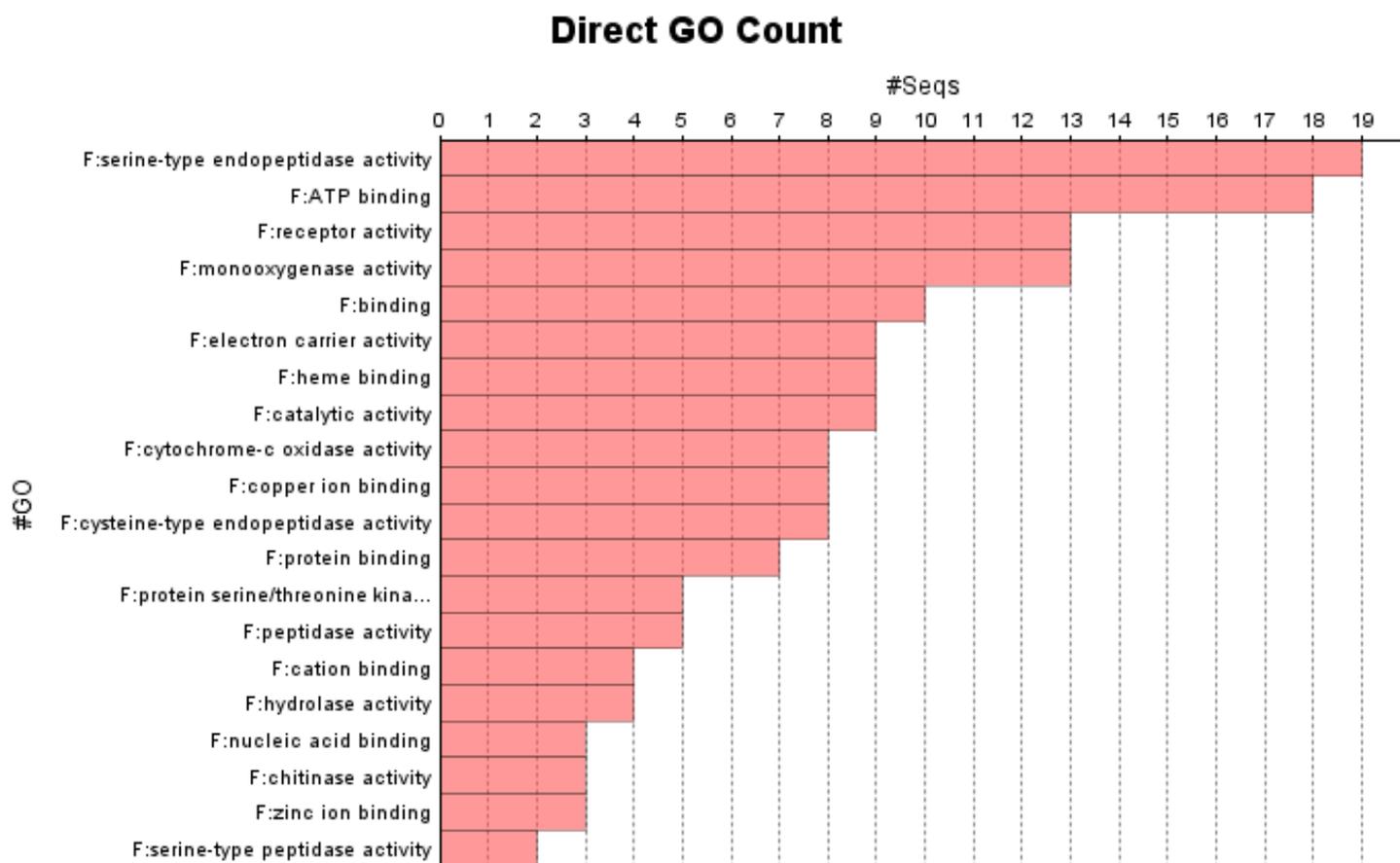


Figura 37: sumarização dos termos de GO encontrados em P1 para a categoria função molecular usando como filtro os 20 maiores termos encontrados.

molecular_function Level 7

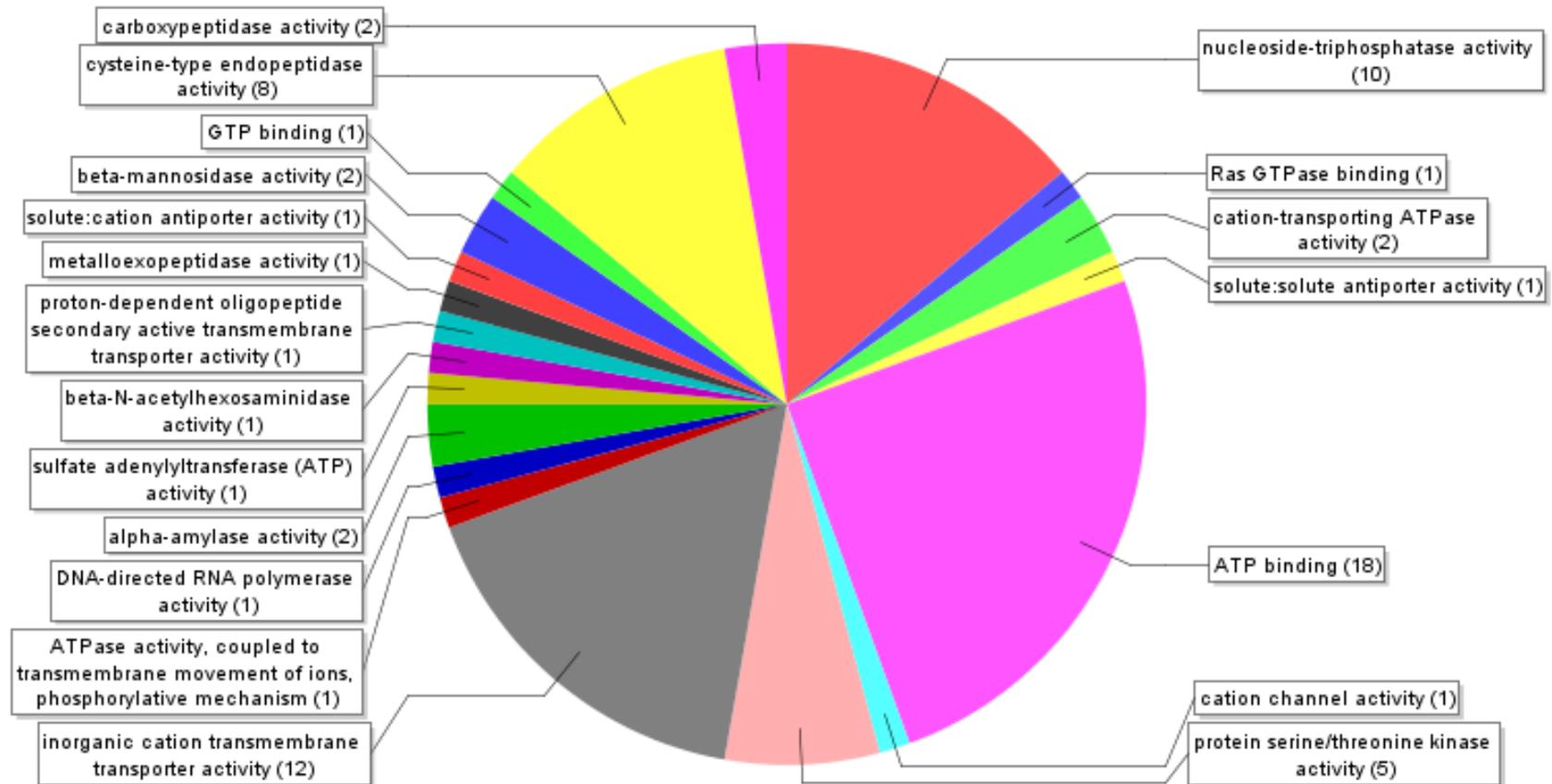


Figura 38: Esta figura ilustra a distribuição das sequências encontradas na varredura da biblioteca com o anti P1 na categoria função molecular. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências que se encaixaram neste GO.

cellular_component Level 5

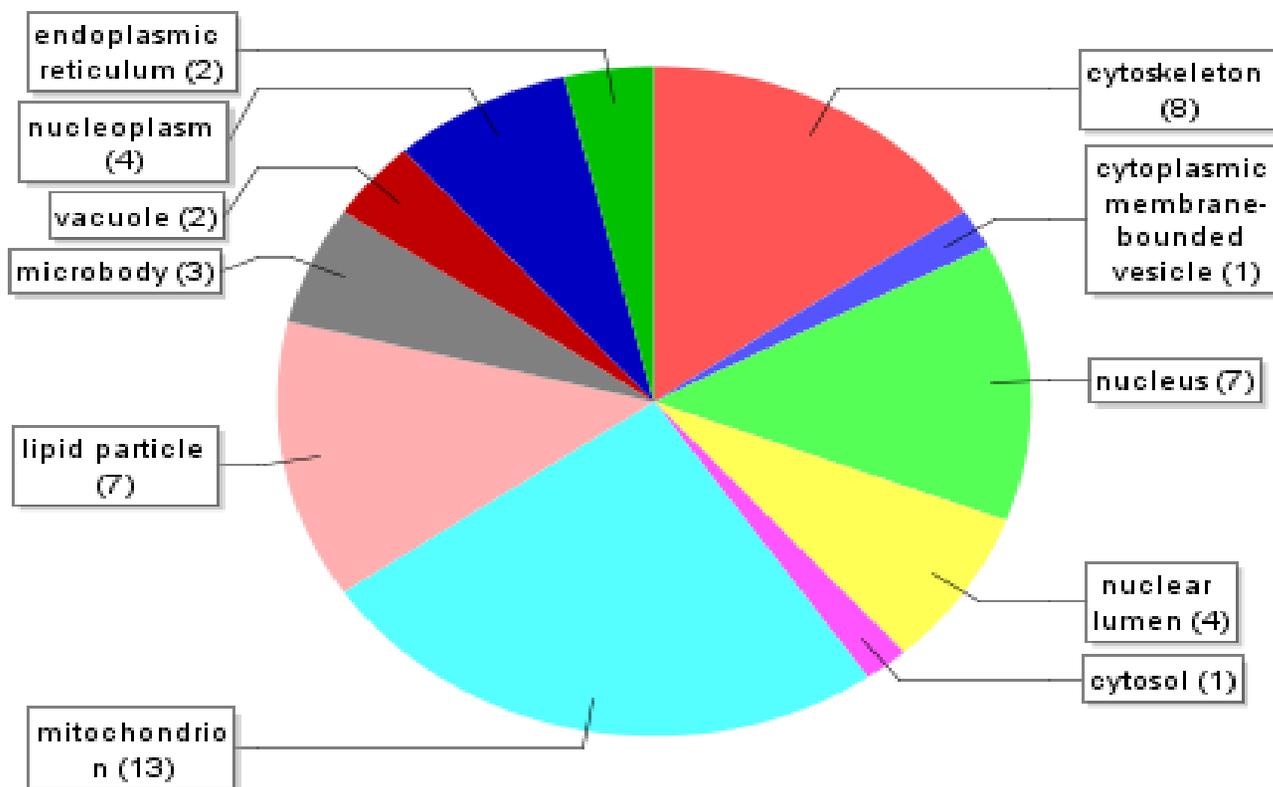


Figura 39: Esta figura ilustra a distribuição das sequências encontradas na varredura da biblioteca com o anti P1 na categoria componente celular. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências que se encaixaram neste GO.

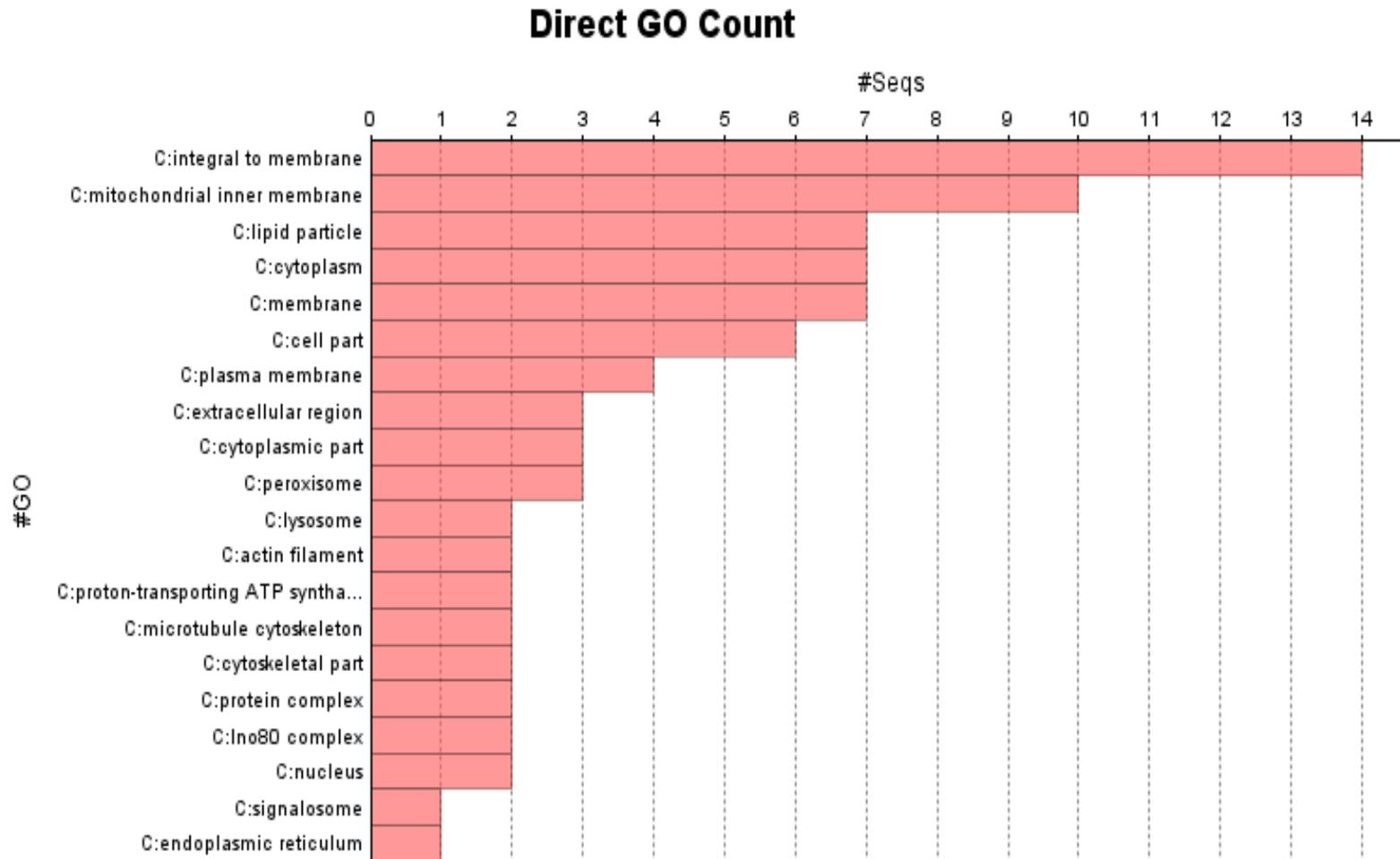


Figura 40: sumarização dos termos de GO encontradas na varredura da biblioteca com o anti P1 para a categoria componente celular usando como filtro os 20 maiores termos encontrados

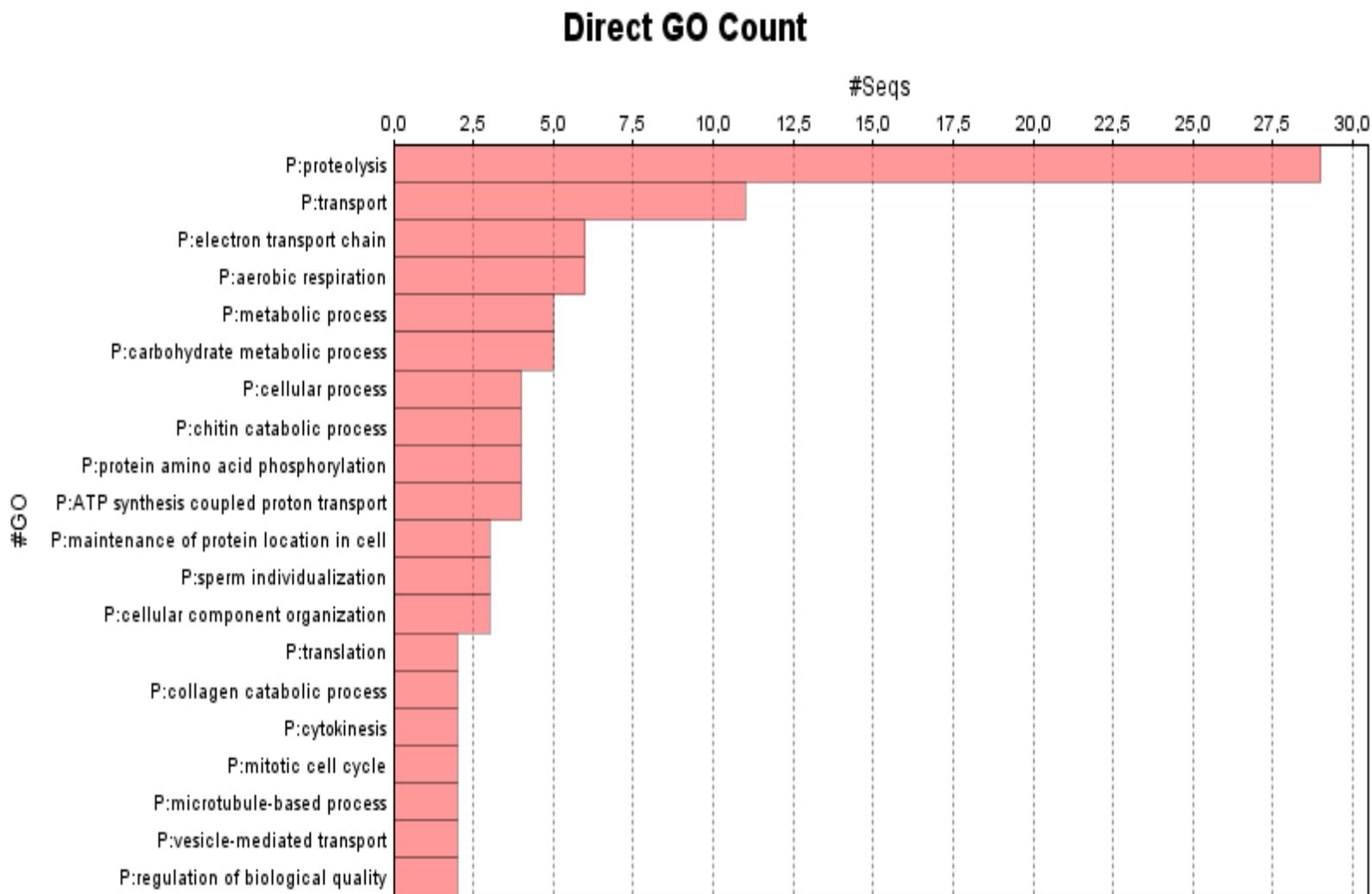


Figura 41: sumarização dos termos de GO encontradas na varredura da biblioteca com o anti P1 para a categoria processo biológico usando como filtro os 20 maiores termos encontrados

biological_process Level 7

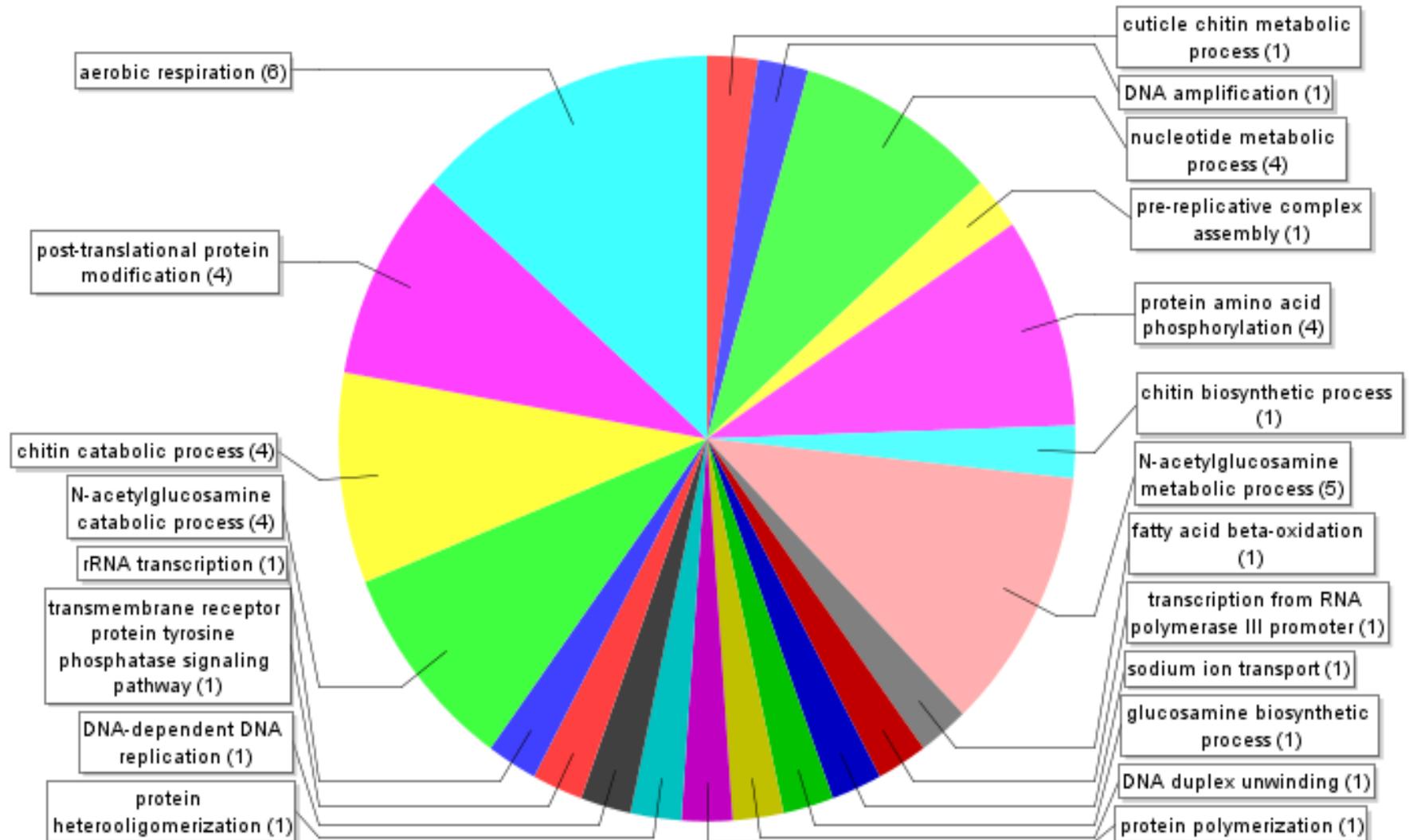


Figura 42: Esta figura ilustra a distribuição das seqüências na categoria processo biológico. Os números entre parênteses indicam a quantidade de seqüências que se encaixaram neste GO.

4.3.3. Identificação de proteínas presentes na fração P3 do fracionamento celular isotônico do epitélio anterior e médio de *Tenebrio molitor*

A fração P3 do fracionamento celular é uma fração rica em vesículas de células e outras estruturas. Como a fração utilizada para injetar no coelho foi à fração solúvel de P3 após todos os ciclos de congelamento e descongelamento esperávamos obter proteínas solúveis que estavam no conteúdo de vesículas secretórias.

De acordo com o trabalho de Ferreira et al (1990), carboxipeptidases e tripsinas possuem uma elevada atividade específica na porção solúvel da fração P3. A produção deste anticorpo foi realizada com o intuito de encontrar mais informações referentes ao mecanismo de secreção apócrina de enzimas digestivas. Uma secreção apócrina de enzimas digestivas é observada na região anterior do intestino médio da larva de *T.molitor* (Cristofolletti et al., 2001).

Podemos observar na figura 43 A, a presença de várias bandas coradas com Coomassie blue de tamanhos variados correspondentes a proteínas presentes na fração P3. A fig 43 B é uma foto de western blot realizado com anticorpo anti-P3 onde também foi aplicado o material da fração P3. Através do western blot, verificamos uma boa cobertura do nosso anticorpo, pois temos um reconhecimento da maioria das bandas presentes no SDS-PAGE.

O anticorpo anti-fração P3 foi usado para varrer a biblioteca de expressão de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* do mesmo modo como foi realizado com os anticorpos anti membrana peritrófica e anti-fração.

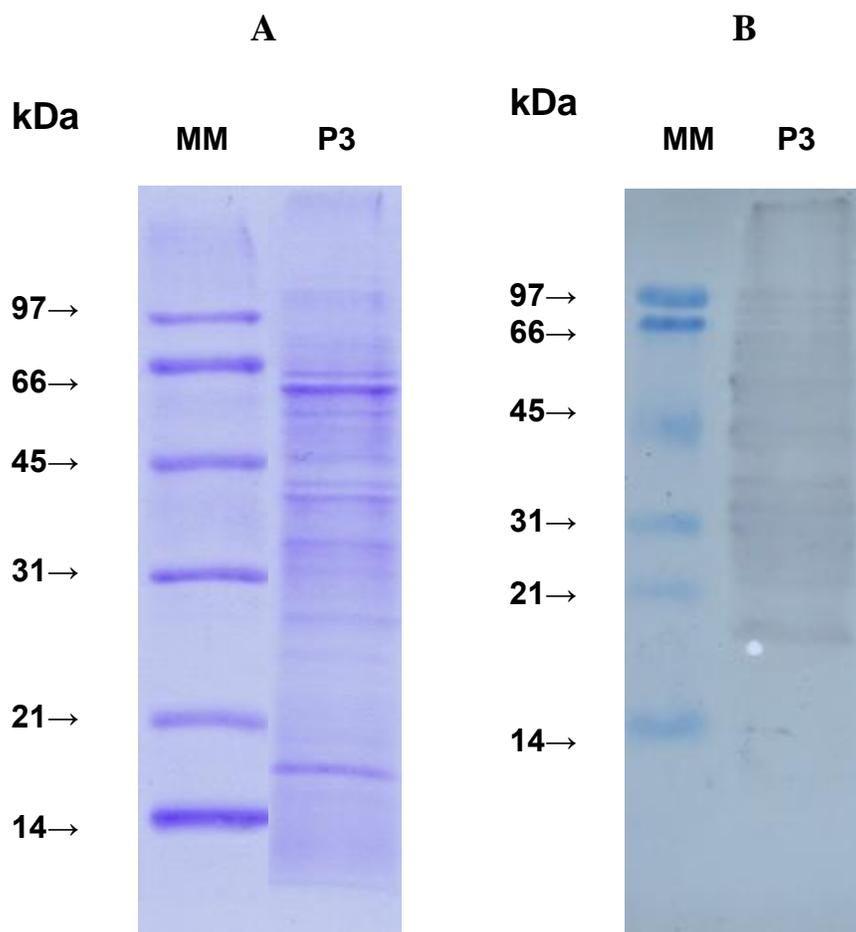


Figura 43: Separação de proteínas presentes na fração P3 do fracionamento subcelular do epitélio do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor* através de SDS-PAGE 12%. O material de P3 foi preparado como descrito em materiais e métodos. Foi aplicado em torno de 50 µg de proteína. A letra A corresponde a um gel de SDS_PAGE corado com coomassie blue e a letra B corresponde à foto do western blot feito com o anticorpo anti-P3. MM, marcadores de massa molecular.

O tecido utilizado como material inicial para preparação da fração P3 foram os epitélios correspondentes aos 2/3 iniciais do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

Algumas proteínas coradas pelo corante coomassie não foram reconhecidas pelo anticorpo anti-P3 através do western blot. Este fato pode ter ocorrido devido ao fato de algumas proteínas não serem tão imunogênicas ou serem muito parecidas com as proteínas endógenas do coelho, o que levou a ausência de anticorpos contra elas no

soro produzido pelo coelho. Foi feita uma varredura inicial da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* coletando 96 clones que reagem positivamente para o anticorpo.

Uma das proteínas que esperávamos encontrar nesta varredura seriam enzimas digestivas. Dentre as proteínas encontradas podemos destacar algumas enzimas digestivas: alfa-glicosidase (1), alfa-amilase (2), quimotripsina (1), tripsina (1), serino-proteinases (2).

As enzimas alfa-amilases encontradas provavelmente são a alfa-amilase de *Tenebrio molitor* já caracterizada e imunolocalizada dentro de vesículas que são descarregadas na região anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor* por secreção apócrina (Cristofolletti *et al*, 2001).

Tenebrio molitor possui um gradiente de pH dentro do seu tubo digestivo que vai desde 5,6 no conteúdo da região anterior até 7,9 na região posterior (Terra *et al.*, 1985). Este gradiente de pH ajuda na compartimentalização da digestão ao longo do tubo digestivo deste inseto. Desta forma, a digestão de carboidratos ocorre na região anterior (onde o pH é mais ácido) e a digestão de proteínas na região posterior (onde o pH é mais básico). Nas varreduras, utilizando os anticorpos, muitas proteinases digestivas seriam encontradas, uma vez que *Tenebrio molitor* é extremamente rico em proteinases como: cisteína-proteinases e serino-proteinases. No entanto, o aparecimento destas enzimas foi reduzido propositalmente, uma vez que nas preparações do fracionamento celular apenas os 2/3 iniciais do intestino médio foram utilizados. A não utilização da região posterior do intestino médio foi realizada para que outras proteínas menos expressas e características da região anterior e média deste inseto fossem enriquecidas.

Nas varreduras anteriores (MP e P1) apareceram algumas proteinases digestivas e nesta varredura de P3 encontramos 4 destas enzimas cujo blast identifica como sendo do próprio *Tenebrio molitor*. Estas enzimas digestivas já estão sendo estudadas por outro doutorando do nosso laboratório.

Devido ao fato de existir na região anterior de *Tenebrio molitor* uma enorme desorganização nos ápices celulares das células, proteínas de citoesqueleto devem ser encontradas nesta varredura com o anticorpo anti-P3. Estas proteínas devem facilitar a liberação do topo celular sem que a célula morra e assim, acredita-se que um

mecanismo refinado e controlado deva existir por trás de toda esta desorganização. Encontramos nesta varredura com anti-P3 apenas a proteína tubulina e esta já havíamos encontrado nas varreduras com os outros anticorpos.

A enzima α -glicosidase foi encontrada apenas na varredura com o anticorpo anti-P3. Esta é uma enzima do nosso interesse que cliva ligações glicosídicas com configuração α . A α -glicosidase intestinal de *Tenebrio molitor* é abundante segundo dados não publicados do nosso laboratório e poderá ser purificada diretamente do inseto para futuras caracterizações, juntamente com a obtenção da sequência completa desta enzima, com o auxílio de iniciadores específicos, utilizando como molde a biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*.

As outras proteínas encontradas nesta varredura são proteínas de metabolismo energético (mitocôndria), fato este que já esperávamos uma vez que a fração P3 do fracionamento isotônico é rica em mitocôndrias.

Dentre as proteínas encontradas na varredura com o anti-P3, utilizaremos a sequência da α -glicosidase para estudos futuros, como já foi dito anteriormente e as outras sequências obtidas em P3 foram agrupadas a todas as sequências obtidas ao longo do nosso estudo com o inseto *Tenebrio molitor*. Estas sequências podem ter sido originadas tanto do seqüenciamento aleatório de ESTs com mais de 1600 clones sequenciados, quanto das 3 varreduras da biblioteca de cDNA do intestino médio deste inseto com os 3 anticorpos: anti-MP, anti-P1 e anti-P3. Falaremos mais desta união das sequências no próximo item.

4.3.4. Resultados da união das sequências obtidas no sequenciamento ao acaso e do imunoscreening da biblioteca com os anticorpos anti-MP, anti-fração P1 e anti-fração P3

Após o seqüenciamento aleatório da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* e as varreduras com os anticorpos anti-MP, anti-fração P1 e anti-fração P3 os dados coletados foram reunidos e as sequências foram novamente analisadas através do programa CAP3. Novos contíguos foram formados e algumas sequências de interesse tiveram seu tamanho aumentado, outras que antes eram singletes se juntaram formando um contíguo, melhorando cada vez mais as análises do transcriptoma deste Coleoptera. Estes dados estão sumarizados na figura 44.

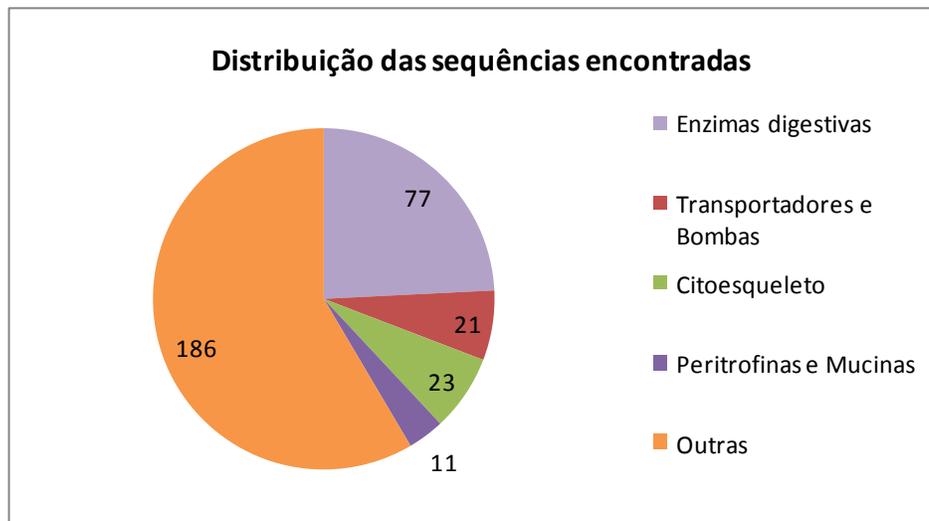


Figura 44: Sumário das seqüências encontradas após o sequenciamento ao acaso e as varreduras da biblioteca de cDNA com os anticorpos anti MP, anti P1 e anti P3.

Podemos agrupar as proteínas de interesse em 4 grandes grupos: (A) Transportadores e bombas, (B) enzimas digestivas, (C) peritrofinas e (D) proteínas relacionadas com a secreção apócrina e de citoesqueleto.

4.4. Transcritos codificantes de proteínas importantes identificadas no intestino médio de *T. molitor*

4.4.1. Transportadores

As larvas do besouro da farinha *T. molitor* estão próximas do tipo mais basal dos insetos holometabólicos (metamorfose completa). Eles apresentam um ventrículo anterior ácido, onde ocorre principalmente digestão de carboidratos, e um ventrículo posterior básico responsável pela maior parte da digestão protéica. Como nos demais insetos, ocorre um contra fluxo de fluido intestinal contra a direção do bolo alimentar (Terra et al. 1985). Estamos em busca do detalhamento a nível molecular dos sítios absorptivos, sistemas de tamponamento luminiais e processos secretores de enzimas digestivas.

A absorção de água, açúcares, aminoácidos e íons são realizados por proteínas integrantes de membrana chamadas de transportadores. Estes podem ser uniportadores (apenas um composto é transportado por vez), simportadores (dois

compostos são transportados na mesma direção), antiportadores (dois compostos são transportados em direções contrárias) e bombas de íons (transporte de íons ativado por ATPases) (Kikuta, S et al. 2010).

Ao longo das análises dos dados gerados pelo pirosequenciamento, muitas sequências foram identificadas através de blast em bancos de dados públicos, como tendo a função de transportadores como mostrado na figura 45. Foram identificados alguns antiportadores de íons como: H^+/K^+ ; K^+/Na^+ ; k^+Ca^{++} e Na^+/H^+ , permeases, transportadores de aminoácidos, transportadores associados a vesículas (H^+ V-ATPases) e transportadores de açúcar os encontrados em maior número. Também podemos destacar três sequências correspondentes a aquaporinas.

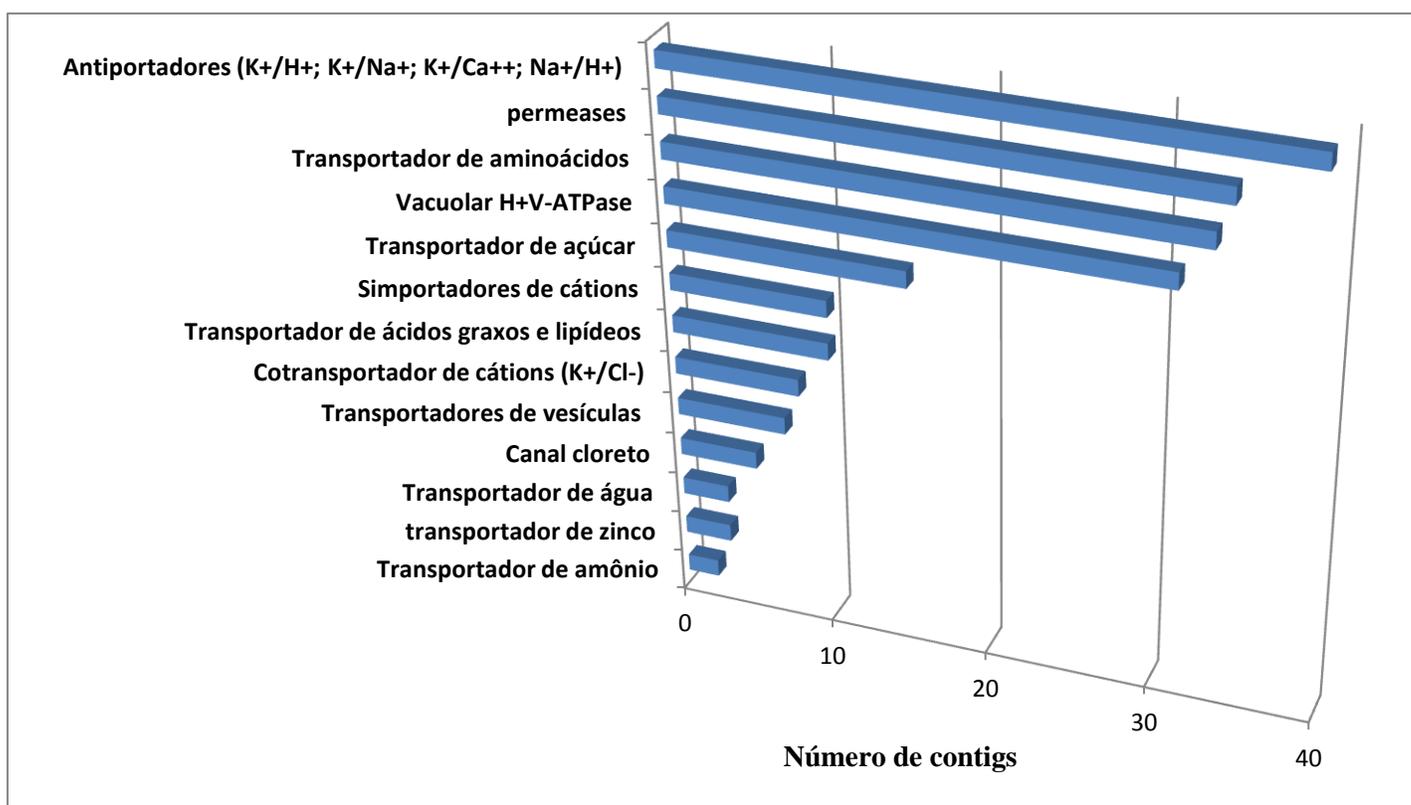


Figura 45: Contigs referentes aos transportadores.

4.4.1.1. Transportadores de açúcar

Com os dados obtidos do transcriptoma de *Tenebrio molitor*, foram realizadas comparações com os bancos de dados KOG, pfam e GO, utilizando a ferramenta

dCAS. Foram encontradas 20 sequências que correspondiam a transportadores de açúcar, que após curagem se reduziram aos 15 apresentados na tabela 9.

Os transportadores de açúcar foram identificados como sendo do tipo GLUT ou SGLT com o auxílio de programas que verificam motivos característicos destes dois tipos de transportadores. Os do tipo GLUT foram identificados utilizando o software Interproscan do site expazy onde verificamos a presença de motivos característicos (InterPro IPR003663, IPR005828 e IPR005829), incluindo 12 alças transmembranas e as assinaturas previstas pelo site NPS@PROSCAN como descrito acima. Os transportadores do tipo SGLT foram identificados pelos mesmos programas citados acima para identificar os GLUTs, além de observarmos resíduos conservados entre alinhamentos de sequências de SGLTs de outros insetos e vertebrados. Estes resíduos são a Gly 95, Arg 135, Gly 195 e Gly 196 (número do SGLT1 humano, Turk e Wright, 1997). Os transportadores do tipo SGLT possuem entre 10 e 14 alças transmembrana e na região N-terminal possuem um sítio de ligação para cátions (Wright, 2001). Não há predição de peptídeo sinal para nenhuma sequência de transportadores em *T.molitor* e *T.castaneum*. Como o mesmo ocorre com os transportadores GLUT de vertebrados, eles devem compartilhar o mesmo processo de endereçamento à membrana plasmática sem um peptídeo reconhecido pelo algoritmo SignalP.

Seguindo a classificação entre GLUTs e SGLTs, encontramos no transcriptoma do intestino médio de *T.molitor* 13 GLUTs e 2 SGLTs.

Podemos verificar dentre os transportadores encontrados, quais são os mais expressos no tubo digestório de *Tenebrio molitor*, de acordo com o número de reads encontrados para cada contig mostrado na tabela 9. Desta forma, o transportadores mais expressos são os contigs 5 (SGLT) e 10 (GLUT).

Para entendermos melhor qual a localização dos transportadores de açúcar encontrados no transcriptoma foi feito um refinamento nas análises, e os 15 transportadores de açúcar tiveram seus sítios de transcrição identificados através de PCR com transcrição reversa (RT-PCR). Estes resultados podem ser visualizados na figura 46.

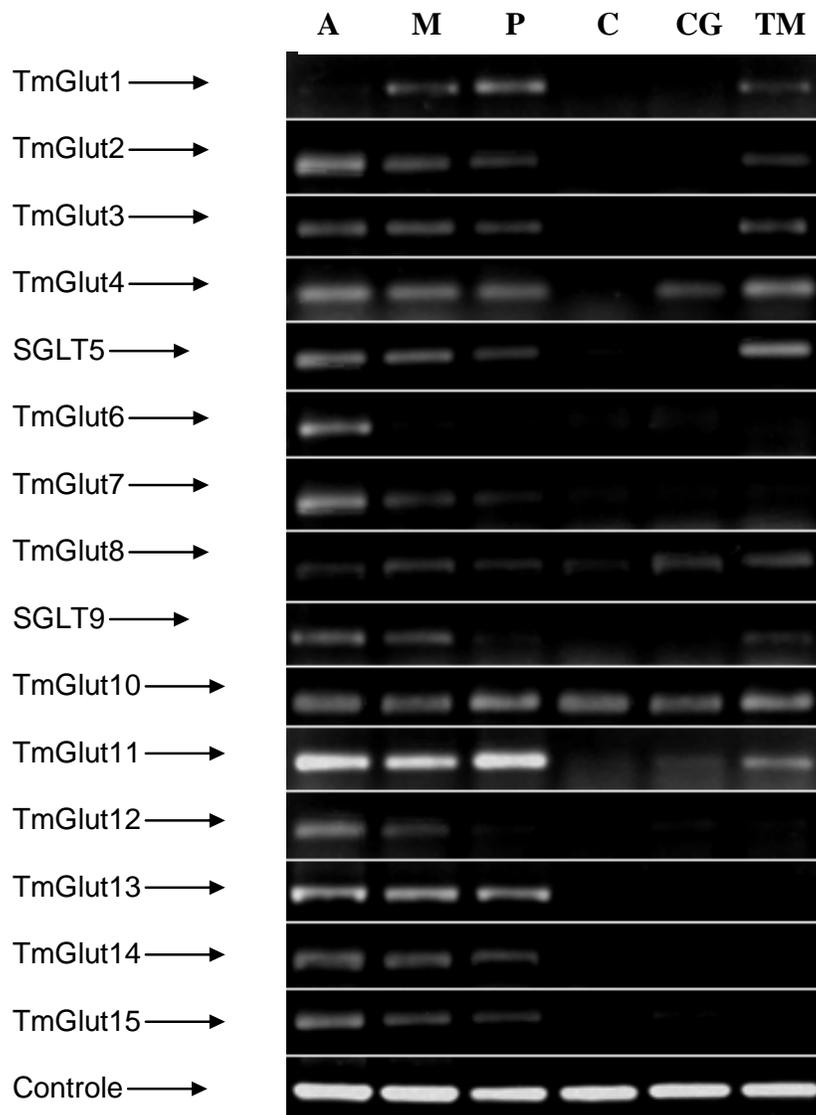


Figura 46: Padrão de expressão dos mRNA dos transportadores de açúcar em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. Quantidades iguais (5ng) de RNA total de diferentes tecidos foram extraídos e usados como molde para a reação da transcriptase reversa. O produto desta reação (cDNA) foi usado na reação de PCR usando primers específicos para amplificação dos transportadores de 1 a 15. O produto foi visualizado em gel de agarose 1%. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de malpighi; TmGlut são os transportadores de açúcar de *Tenebrio molitor* de 1 a 15. O controle é a actina.

Analisando a figura 46 constatamos um padrão de expressão bastante ubíquo em alguns transportadores de açúcar que tiveram uma distribuição nos diversos tecidos analisados de *T.molitor* e estes são: TmGlut 4, 8 e 10. Alguns transportadores tiveram seus sítios de expressão somente nas regiões correspondentes ao intestino médio (A, M e P) e nos Túbulos de Malpighi e estes são: TmGlut 1, 2, 3,11 e TmSGLT5 e TmSGLT9. Outros transportadores tiveram seus transcritos expressos somente no intestino médio de *T.molitor* e estes são: TmGlut 7, 12, 13, 14, 15. Os transportadores que tiveram seus sítios de transcrição mais restritos foram os seguintes TmGlut 6 e 12, os quais aparecem somente nas regiões anterior (A) e anterior (A) e média (M) respectivamente.

Tabela 9: Resumo das análises realizadas com os 15 transportadores de açúcar obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de transportadores de açúcar encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial, **P:** prenilação e **N-Gli** são N-glicosilações. Não há predição de peptídeo sinal para nenhuma sequência de transportadores em *T.molitor* e *T.castaneum*. Como o mesmo ocorre com os transportadores GLUT de vertebrados, eles devem compartilhar o mesmo processo de endereçamento à membrana plasmática sem um peptídeo sinal. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **T:**túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	Anotação NR	Espécie	Tipo	Nº Reads	Sítios de Expressão	P S	P	PI/MW	N-gli	A T	OBS
1	469	XP_966866.2 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	33	M P T	Não	Não	8.71 / 50431.43	4	12	completa
2	508	XP_971034.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	24	A M P T	Não	Não	8.97 / 56708.62	2	12	
3	416	XP_973332.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	26	A M P T	Não	Não	9.46 / 45990.63	não	10	Completa
4	302	XP_972450.2 glucose transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	28	Todo	Não	Não	9.15 / 34366.00	1	4	
5	531	XP_001651636.1 sugar transporter	<i>Aedes aegypt</i>	SGLT	87	A M P T	Não	sim	5.61 / 58320.92	6	12	Completa
6	530	XP_002370765.1 sugar transporter	<i>Toxoplasma gondii</i>	GLUT	20	A	Não	Não	6.22 / 58203.28	4	12	
7	404	XP_967393.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	16	A M P	Não	Sim	5.76 / 44775.88	não	10	
8	417	XP_967445.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	53	Todo	Não	Não	5.83 / 46551.74	não	11	
9	510	XP_972526.1 Sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	SGLT	7	A M T	Não	Não	5.26 / 56372.62	1	11	Completa
10	488	XP_001664193.1 sugar transporter	<i>Aedes aegypti</i>	GLUT	75	Todo	Não	Não	5.87 / 52678.85	4	12	Completa
11	452	XP_967445.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	23	A M P T	Não	Não	5.84 / 49017.48	1	12	Completa
12	389	XP_971347.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	13	A M	Não	Não	9.26 / 43421.72	3	8	
13	344	XP_971406.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	13	A M P	Não	Não	9.81 / 38596.09	1	8	
14	510	XP_969450.1 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	38	A M P	Não	Não	5.20 / 54733.85	1	12	
15	374	XP_967275.2 sugar transporter	<i>Tribolium castaneum</i>	GLUT	7	A M P	Não	Não	8.47 / 41667.11	não	9	

Os transportadores do tipo GLUT possuem normalmente 12 alças, mas os do tipo SGLT possuem de 10 a 14 alças, dessa forma, não podemos concluir nada a respeito dos contigs TmGlut6 e TmGlut12, pois estes não estão completos e possuem 12 e 8 alças transmembrana respectivamente. Ambos possuem as assinaturas características de transportadores de açúcar (AVPLIERLGRRTLMLWG) encontradas pelo programa NPS@PROSCAN. Estas sequências serão provavelmente completadas para melhorar as análises em torno dos transportadores encontrados somente no intestino médio de *T.molitor*.

Foi feito também uma análise filogenética de todos os transportadores encontrados no transcriptoma de *T.molitor*. Esta análise foi feita utilizando o programa MEGA 4. Para a construção deste cladograma, foram utilizadas sequências de transportadores de açúcar do Coleoptera *T.castaneum*, por ser um inseto da mesma ordem que *T.molitor*, e também duas sequências do Hemiptera *Dysdercus peruvianus*, por serem sequências já identificadas e classificadas como intestinais.

O cladograma da figura 47 mostra um agrupamento monofilético de GLUT e outro de sequências de SGLT. O agrupamento de GLUT é dividido em três ramos monofiléticos, sendo que em dois destes ramos, com os bootstraps 91 e 92 podemos observar que sequências de *T.molitor* estão mais próximos das de *T.castaneum* do que entre si mesmos, revelando uma expansão gênica antes da especiação dos dois insetos. O terceiro ramo monofilético, com bootstrap 59, inclui sequências de *T.molitor* que estão mais próximos entre si, indicando que a expansão do gene, neste caso, ocorreu após a especiação.

Dentre os ramos monofiléticos, os mais interessantes são os de bootstrap 91 e 92, pois nestes ramos temos sequências com expressão apenas no intestino médio e túbulos de Malpighi, com exceção do contig TmGlut8. Os transportadores do tipo SGLTs de *T.molitor* se agruparam no ramo monofilético com bootstrap 74, juntamente com outras duas sequências sendo uma delas o SGLT já caracterizado do intestino médio de *Dysdercus peruvianus*.

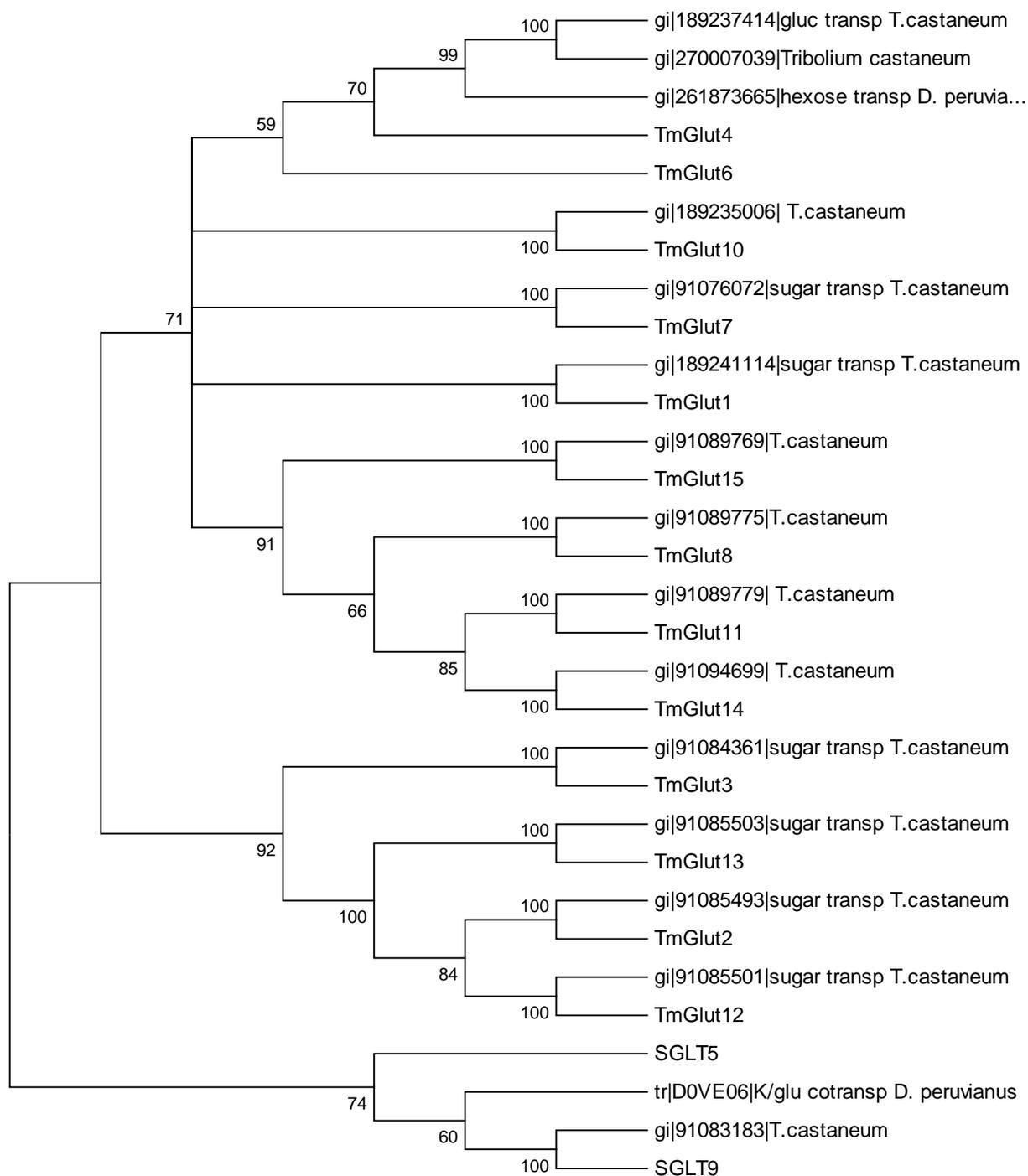


Figura 47: Análise filogenética dos transportadores de açúcar revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

4.4.1.2. Transportadores de aminoácidos

Ao longo das análises dos dados gerados pelo pirossequenciamento, foram selecionados 14 contigs que pelo programa dCAS possuíam similaridade com transportadores de aminoácidos. Estes transportadores possuem em média 14 alças transmembranas, podendo variar entre as famílias de transportadores, e alças extracelulares e intracelulares como mostrado na figura 48.

Tabela 10: Resumo das análises realizadas com os 14 transportadores de aminoácidos obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de transportadores de aminoácidos encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial.. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **TM:**túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit Blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
1	484	171	XP_969657.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	8.48 / 53050.96	Não	10	completa
3	483	141	XP_967023.2	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP TM	5.91 / 52413.56	Não	14	completa
4	630	24	EFA09380.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP C	8.96 / 69029.50	Não	10	completa
5	387	93	XP_967105.2	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	5.41 / 41411.88	Não	10	completa
6	476	53	XP_967658.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	8.51 / 52006.55	Não	6	-
7	218	23	XP_974302.2	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP	6.56 / 23991.29	Não	4	-
8	211	39	XP_971788.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP	6.26 / 23040.20	Não	6	-
9	202	14	XP_971788.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	9.45 / 22338.14	Não	5	-
10	255	35	XP_968408.2	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	5.39 / 28498.30	Não	8	-
11	471	13	XP_969879.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AP C	9.00 / 52122.64	Não	8	-
12	430	6	XP_966371.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	TODO	5.96 / 47958.49	Não	6	-
13	278	8	XP_975607.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP	7.03 / 30605.48	Não	3	-
14	184	7	EFA01485.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	AMP	8.47 / 20876.92	Sim	4	-
15	157	9	XP_970665.1	<i>T.castaneum</i>	Amino acid transporters	-	9.10 / 17225.93	Não	4	-

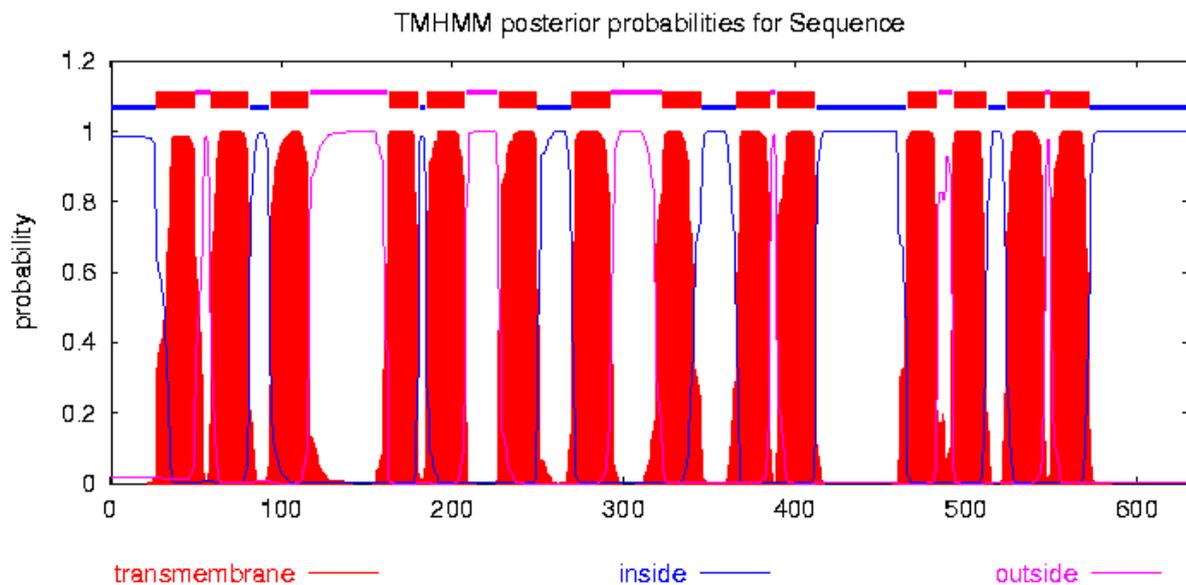


Figura 48: Topologia dos transportadores de aminoácidos contendo 14 alças transmembranas e regiões intracelulares e extracelulares como mostrado na legenda acima. A figura foi gerada no site <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, com os dados do contig 1.

Por convenção de nomenclatura do sistema, os membros dentro de uma família SLC tem homologia de sequência entre si entre 20-25%. Em contraste, a homologia entre as famílias SLC é muito baixa ou inexistente. (Hoglund, P. J, et al, 2010) Assim, os critérios para a inclusão de uma família no grupo SLC não é parentesco evolutivo para outras famílias SLC mas funcional (ie, uma proteína integrante de membrana que transporta um soluto). De acordo com estes estudos, confirmamos a inviabilidade de se obter um alinhamento entre todas as sequências de transportadores de *Tenebrio molitor*, uma vez que a homologia de sequência entre transportadores de solutos de famílias diferentes é muito baixa.

Analisando somente as sequências dos transportadores é muito difícil classificá-los dentro de alguma das famílias de carreadores de solutos (SLCs) e desta forma, foi feito também uma análise filogenética de todos os transportadores de aminoácidos encontrados no transcriptoma de *T.molitor*.

Esta análise foi feita utilizando o programa MEGA 4. Para a construção deste cladograma, foram utilizadas sequências de transportadores de aminoácidos do Coleoptera *T.castaneum*, por ser um inseto da mesma ordem que *T.molitor*. Também foram utilizadas algumas sequências já classificadas dentro das possíveis famílias de transportadores de aminoácidos.

O cladograma da figura 49 mostra 2 agrupamentos monofiléticos. O primeiro agrupamento (bootstrap 70) é dividido em três ramos monofiléticos, sendo o primeiro

dos ramos, com bootstrap 57, onde se localizam membros da família SLC 36 dos carreadores de soluto, designados “Proton-coupled amino acid transporter” e também os contigs 1, 6, 11 e 12 de *Tenebrio molitor*. Desta forma, podemos nos aproximar de uma classificação segundo a função para estes contigs. Um segundo ramo monofilético, com bootstrap 99 encontra-se apenas transportadores sem classificação, juntamente com o contig 13 de *T.molitor*. A respeito destes contigs podemos dizer que estão bem próximos dos membros da família SLC 36 descrito acima, pois são englobados por um grande agrupamento com bootstrap 99. Por último, o ramo com bootstrap 53 engloba membros das famílias SLC 1 e 38.

No segundo e último grande agrupamento monofilético, temos a presença de dois ramos monofiléticos, no primeiro, com bootstrap 98, identificamos a presença de membros da família SLC 7 e o contig 9 de *Tenebrio molitor* e no segundo com bootstrap 100 também identificamos membros da família SLC 7 e os contigs 3, 4 e 5 de *T.molitor*. Provavelmente houve esta divisão dentro deste agrupamento pois nas classificações dos transportadores podemos verificar que o grupo SLC 7 possui famílias com funções diferentes, podendo ser “Cationic amino acid transporters” (SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3 e SLC7A4) ou então “Glycoprotein-associated/light or catalytic subunits of heterodimeric amino acid transporters” (SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13 e SLC7A14). Desta forma a árvore filogenética nos deu informações até da subdivisão dentro da mesma família dos transportadores.

O contig 15 de *T.molitor* ficou fora dos dois ramos comentados acima.

As sequências de *T.molitor* estão mais próximos das de *T.castaneum* do que entre si mesmos, revelando uma expansão gênica antes da especiação dos dois insetos.

Resumindo, os contigs de *T.molitor* dividem-se nos grupos: SLC 36 (contigs 1, 6, 7, 11 e 12), SLC 7 temos o contig 9 em um ramo e os contigs 3, 4 e 5 em outro ramo mostrando ter subgrupos dentro da mesma família SLC7. O contig 15 de *T.molitor* aproxima-se mais da família SLC 7 e o contig 13 situa-se no agrupamento com transportadores de aminoácidos sem classificação, mas próximo da família SLC 36.

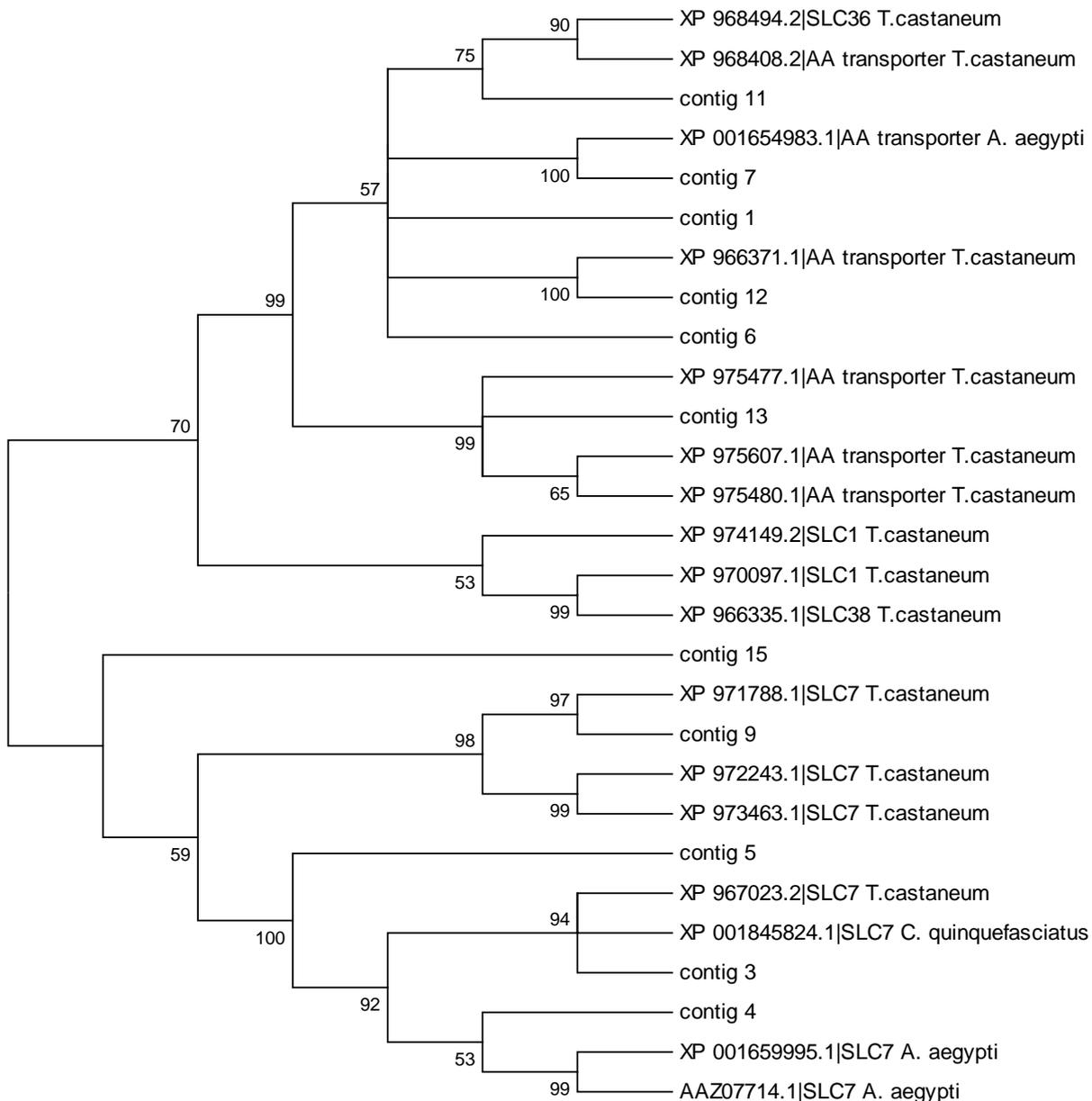


Figura 49: Análise filogenética dos transportadores de aminoácidos revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T. molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor-joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições. Os contigs 2, 8, 10 e 14 não encontram-se no agrupamento filogenético.

Para entendermos melhor qual a localização dos transportadores de aminoácidos encontrados no transcriptoma foi feito um refinamento nas análises, e os 13 transportadores de aminoácidos tiveram seus sítios de transcrição identificados através de PCR com transcrição reversa (RT-PCR). Estes resultados podem ser visualizados na figura 50.

Podemos verificar dentre os transportadores encontrados, quais são os mais expressos no tubo digestório de *Tenebrio molitor*, de acordo com o número de reads

encontrados para cada contig mostrado na tabela 10. Desta forma, o transportadores mais expressos são os contigs 1 e 3. O contig 1 é expresso em todos os tecidos estudados, não sendo desta forma um transportador específico do tubo digestivo, diferente do contig 3, cuja expressão ocorre somente no tubo digestivo e túbulos de Malpighi.

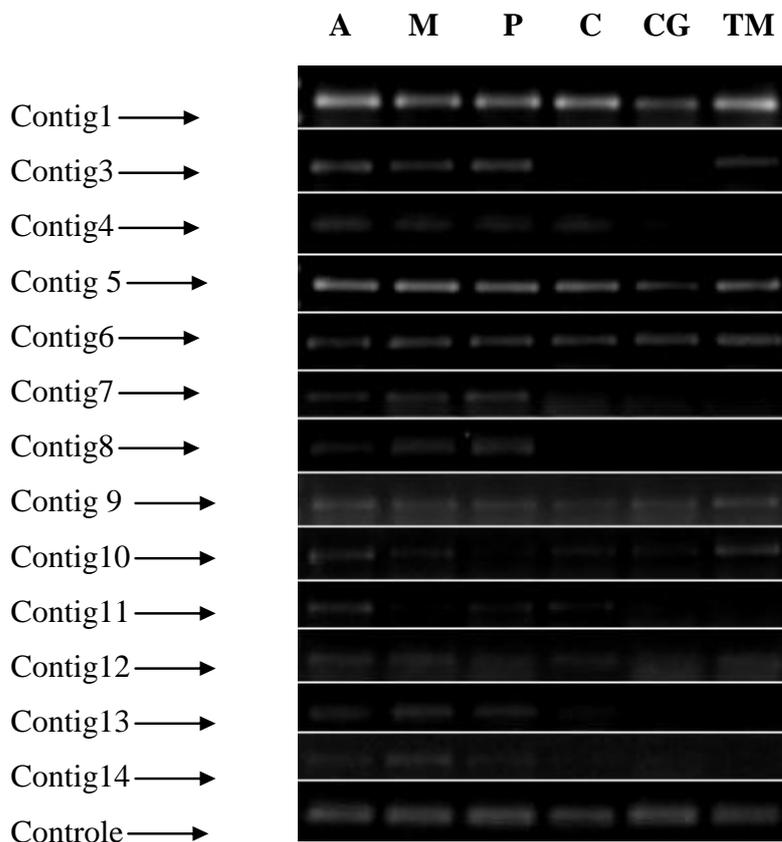


Figura 50: Padrão de expressão dos mRNA dos transportadores de aminoácidos em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. Quantidades iguais (5ng) de RNA total de diferentes tecidos foram extraídos e usados como molde para a reação da transcriptase reversa. O produto desta reação (cDNA) foi usado na reação de PCR usando primers específicos para amplificação de todos os transportadores encontrados. O produto foi visualizado em gel de agarose 1%. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

Analisando a figura 50 constatamos um padrão de expressão bastante ubíquo em alguns transportadores de aminoácidos que tiveram uma distribuição nos diversos tecidos analisados de *T.molitor* e estes são: contigs 1, 5, 6, 9, 10, 12. Alguns transportadores tiveram seus sítios de expressão somente nas regiões correspondentes ao intestino médio (A, M e P) e nos Túbulos de Malpighi e estes

são: contigs: 3, 7, 8, 13, 14. O contig 4 teve sua expressão no tubo digestivo e também na carcaça e o contig 11 teve sua expressão nas regiões A, P e TM.

4.4.1.3. Transportadores de bicarbonato

Após os refinamentos das sequências obtidas no pirossequenciamento do cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* e alguns alinhamentos com sequências dos bancos de dados finalizamos com 9 sequências de transportadores de bicarbonato (tabela 11).

Tabela 11: Resumo das análises realizadas com os 9 transportadores de bicarbonato obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de transportadores de bicarbonato encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial.. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **TM:**túbulos de Malpighi

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
9	186	16	XP_003245170.1	<i>T.castaneum</i>	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Exchanger	TODO	4,89 / 20089	Não	2	-
45	679	43	XP_968452.1	<i>T.castaneum</i>	Bicarbonate Exchanger	TODO	8.68 / 67129.91	Não	10	completa
162	554	6	EFA00234.1	<i>T.castaneum</i>	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Exchanger	P C CG TM	4.39 / 19383.51	Não	3	
178	132	8	XP_969278.1	<i>T.castaneum</i>	Bicarbonate Exchanger	P TM	5.23 / 14974.19	Não	0	
196	588	104	XP_969133.2	<i>T.castaneum</i>	Bicarbonate Exchanger	P TM	8.59 / 64846.18	Não	10	-
197	254	166	EFA08929.1	<i>T.castaneum</i>	Bicarbonate Exchanger	AMP	5.55 / 28313.27	Não	3	-
265	60	7	ACH67478.1	<i>T.castaneum</i>	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Exchanger	TODO	7.93 / 2712.33	Não	1	-
314	387	12	XP_972994.2	<i>T.castaneum</i>	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Exchanger	A P TM	8.76 / 43801.50	Não	8	-
344	207	8	EFA00234.1	<i>T.castaneum</i>	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Exchanger	TODO	8.78 / 23099.69	Não	4	-

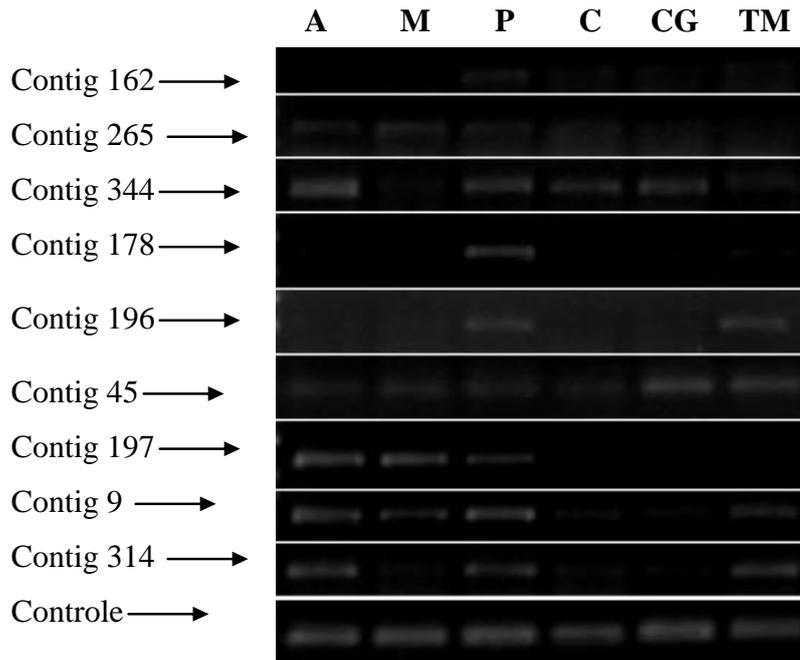


Figura 51: Padrão de expressão dos mRNA dos transportadores de bicarbonato em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. Quantidades iguais (5ng) de RNA total de diferentes tecidos foram extraídos e usados como molde para a reação da transcriptase reversa. O produto desta reação (cDNA) foi usado na reação de PCR usando primers específicos para amplificação de todos os transportadores encontrados. O produto foi visualizado em gel de agarose 1%. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de malpighi. O controle é a actina.

Analisando a figura 52 podemos observar que temos 8 das 9 sequências compondo o cladograma, ficando apenas 1 sequência de fora desta análise, devido a alguma incompatibilidade da sequência com as outras. Esta sequência foi eliminada das análises.

Na figura 52 temos dois grandes ramos com bootstraps 99 e 51. Estes ramos agrupam sequências de transportadores de *T.molitor*, sendo que no primeiro temos apenas transportadores de bicarbonato, já no segundo temos também transportadores de sulfato. No ramo com bootstrap 51 encontramos os contigs 162, 178, 196 e 197 de *T.molitor*, onde os contigs 178 e 196 possuem a sua expressão restrita ao intestino médio posterior e nos túbulos de Malpighi, o contig 197 possui a sua expressão ao longo do intestino médio (anterior, média e posterior) e o contig 162 possui a sua expressão no intestino médio posterior, carcaça, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi, de acordo com a figura 51.

Os contigs 314 e 344 encontram-se junto com transportadores de bicarbonato no ramo com bootstrap 99, mais precisamente com sequências de transportadores de *Tribolium castaneum*, e o contig 314 tem a sua expressão no epitélio anterior e posterior do intestino médio e nos túbulos de Malpighi e o contig 344 já possui uma expressão mais ampla ao longo do intestino médio e também nos outros tecidos do inseto.

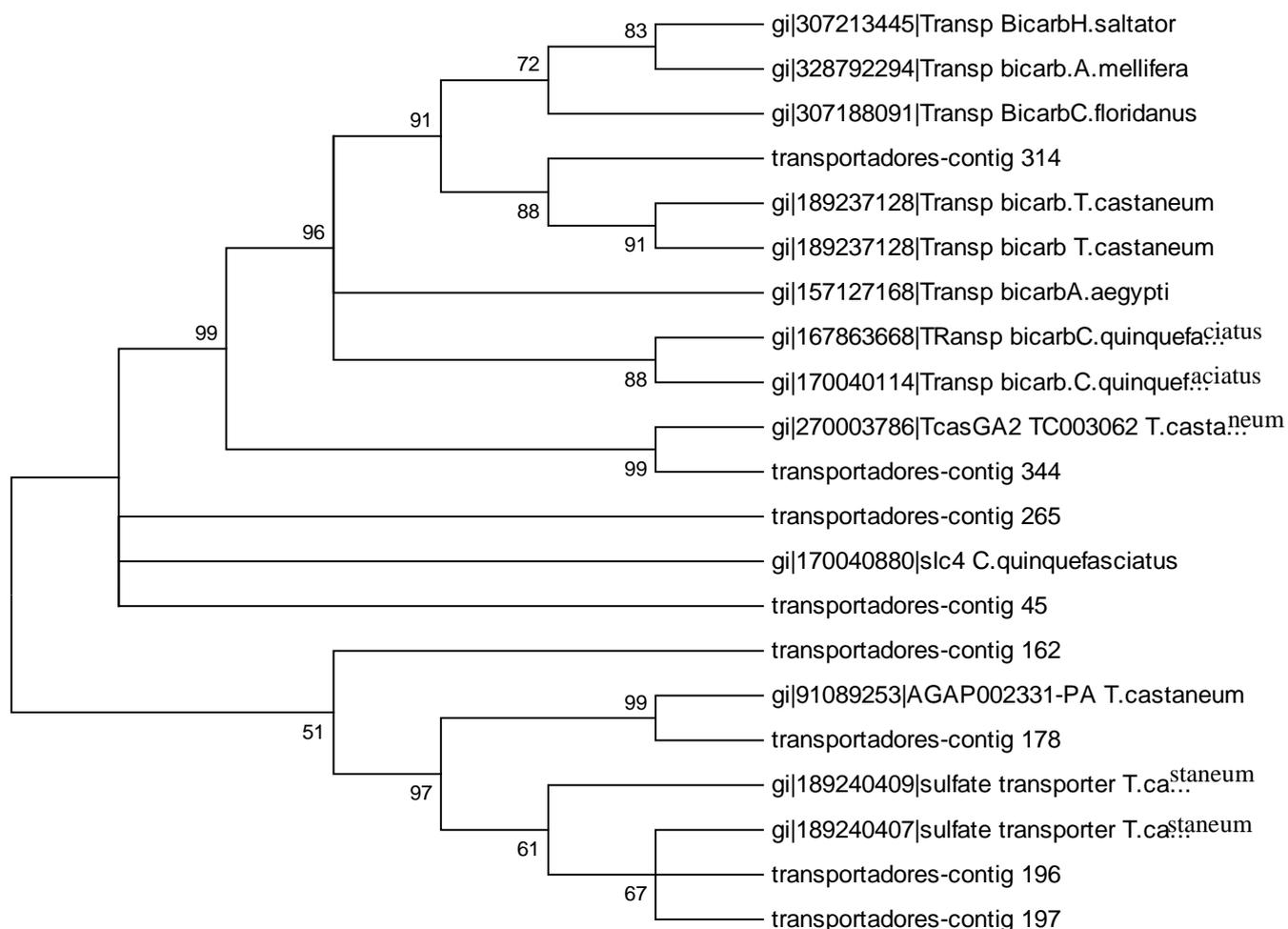


Figura 52: Análise filogenética dos transportadores de bicarbonato revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições. O contig 9 não encontra-se no agrupamento filogenético

4.4.1.4. Canais de cloreto

Com o intuito de obter informações a respeito dos canais de cloreto existentes no intestino médio de *T. molitor*, foram selecionadas sequências com similaridade com este tipo de proteínas (tabela 12).

Tabela 12: Resumo das análises realizadas com os 6 canais de cloreto obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de canais de cloreto encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial.. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **TM:**túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
312	426	51	EGI60436.1	<i>T.castaneum</i>	Chloride Channel	TODO	7.49 / 47114.68	Não	8	-
313	260	110	XP_970142.1	<i>T.castaneum</i>	Chloride Channel	A M P	5.62 / 29771.30	Não	1	-
321	240	41	XP_001653972.1	<i>A.Aegypti</i>	Chloride Channel	TODO	5.91 / 25903.19	Não	2	-
354	74	6	XP_002070302.1	<i>A.gambiae</i>	Chloride Channel	TODO	10.32 / 8575.93	Não	1	-
361	197	8	XP_974480.1	<i>T.castaneum</i>	Chloride Channel	A M TM	9.83 / 22420.58	Não	1	-
370	117	8	EFN77493.1	<i>H. saltator</i>	Chloride Channel	A M	4.60 / 12503.86	Não	1	-

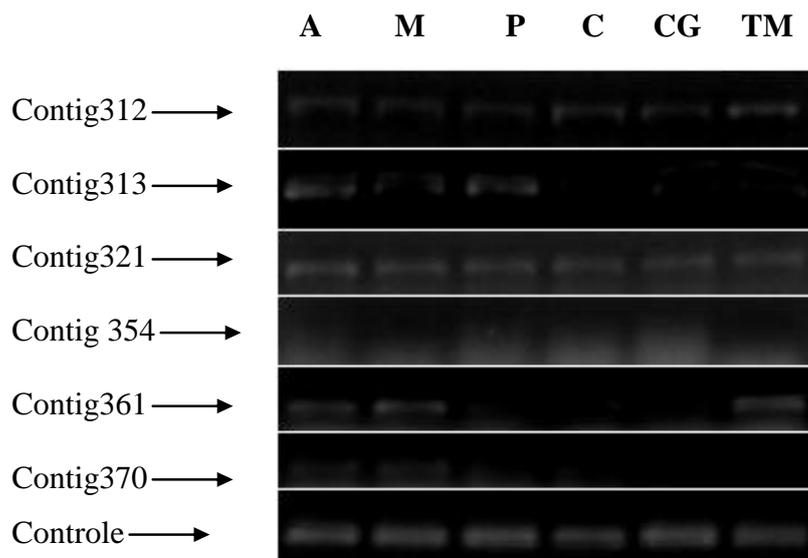


Figura 53: Padrão de expressão dos mRNA dos canais de cloreto em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

Uma análise filogenética foi feita reunindo as sequências de *T.molitor* contendo similaridade com canais de cloreto com sequências de canais de cloreto de outros insetos obtidas nos bancos de dado públicos.

As sequências de *Tenebrio molitor* se dividiram em 4 ramos na figura 54. O primeiro deles que foi o contig 313, o qual se uniu a uma sequência de *T.castaneum* considerada um transportador intracelular com número de bootstrap 96. Analisando por RT-PCR esta sequência como mostrado na figura 53, este contig encontra-se somente no intestino médio de *T.molitor*, nas regiões anterior, média e posterior levando-o a se tornar um excelente candidato a ser o responsável pela manutenção da homeostase no tubo digestivo. O contig 321 encontra-se no ramo com bootstrap 100 juntamente com sequências de canais de cloreto de *T.castaneum*, *C.floridanus* e *H.saltator*. Este contig teve sua expressão encontrada no tubo digestivo de *T.molitor*, mas também em regiões como a carcaça e o corpo gorduroso, não sendo considerada específica do tubo digestivo. Tanto o contig 370, quanto o contig 354 encontram-se na base da árvore e, portanto não podemos assumir nenhuma similaridade com as sequências utilizadas, mas o contig 370 possui uma expressão bem interessante, uma vez que só se encontra expresso nas regiões anterior e média do intestino médio. Pode ser que este seja um transportador mais basal frente aos outros encontrados em *T.molitor*.

O contig 361 agrupou-se no ramo com bootstrap 99, juntamente com a sequência do transportador de *T. castaneum*. Este contig possui a sua expressão somente nas regiões anterior e média do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi, tornando-se um alvo para ser monitorado quanto a sua função na fisiologia intestinal de *T.molitor*.

Podemos dizer que os transportadores de *T.molitor* são mais similares aos transportadores de outros insetos do que com seus próprios transportadores, isto nos leva a pensar que suas diferentes sequências de transportadores já existiam antes do aparecimento deste inseto.

O contig 312 não aparece na árvore devido a alguma incompatibilidade no programa utilizado, o MEGA4. Este contig possui uma expressão ampla em todos os tecidos de *Tenebrio molitor*, similar aos contigs 321 e 354, como mostrado na figura 53.

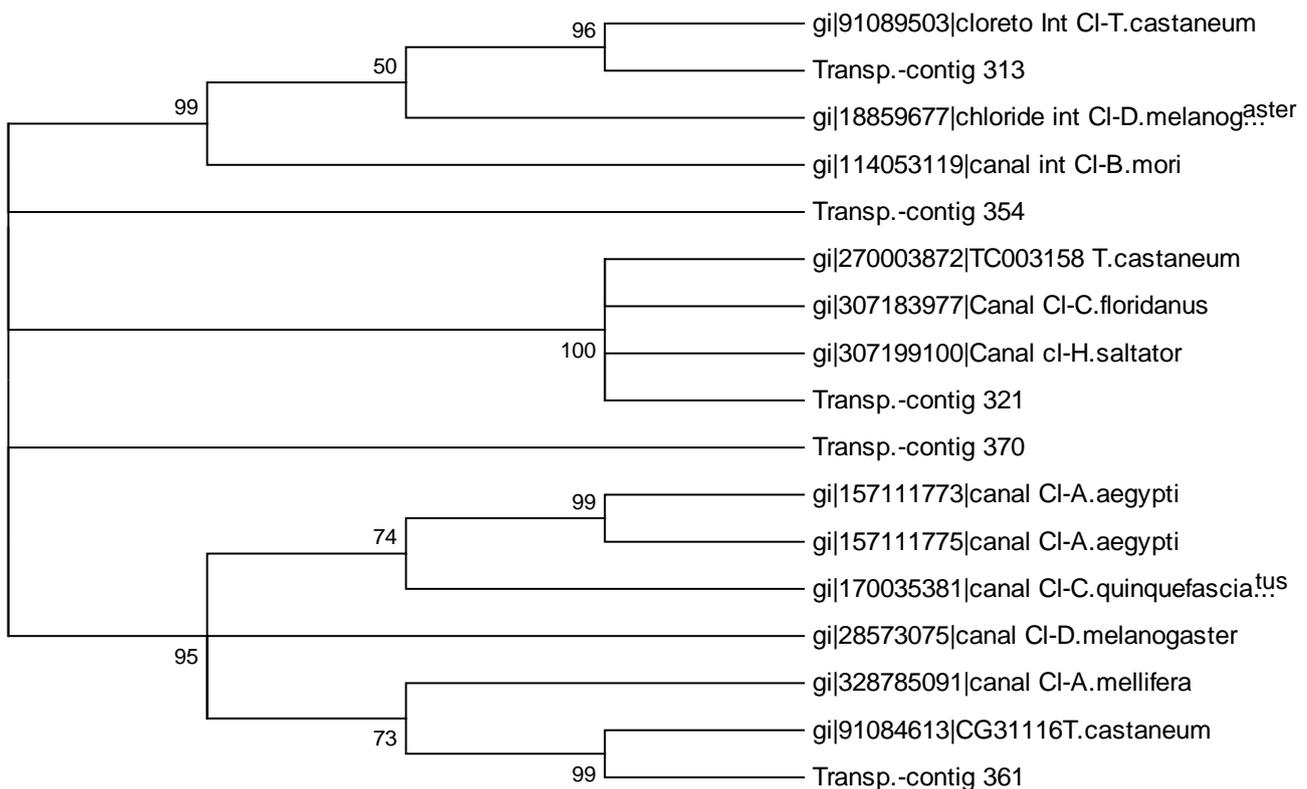


Figura 54: Análise filogenética dos canais de cloreto revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições. O contigs 312, não se encontra no agrupamento filogenético.

4.4.1.5. Canais de potássio

Canais de potássio foram identificados no transcriptoma intestinal de *Tenebrio molitor*, o qual foi estudado e comparado com transportadores de outros insetos pertencentes a esta mesma família (tabela 13).

Tabela 13: Resumo das análises realizadas com os 3 canais de potássio obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de canais de potássio encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial.. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **TM:**túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
309	491	7	XP_969255.2	<i>T.castaneum</i>	K+ Channel	M	9.38 / 56702.57	Não	2	-
355	88	6	XP_969255.2	<i>T.castaneum</i>	K+ Channel	TODO	11.91 / 10412.27	Não	1	-
467	181	103	XP_001653531.1	<i>A.Aegypti</i>	K+ Channel	TODO	4.47 / 19778.59	Não	1	-

Segundo a figura 55, o contig 309 aproxima-se evolutivamente de uma sequência de *T.castaneum* com bootstrap 98. Esta sequência encontra-se no ramo com bootstrap 71 e a outra sequência de *Tenebrio molitor*, o contig 355, encontra-se no ramo com bootstrap 62. O contig 467 encontra-se fora dos outros agrupamentos, por razão não clara até o momento. O contig 309 possui 7 reads coletados ao longo do pirosequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

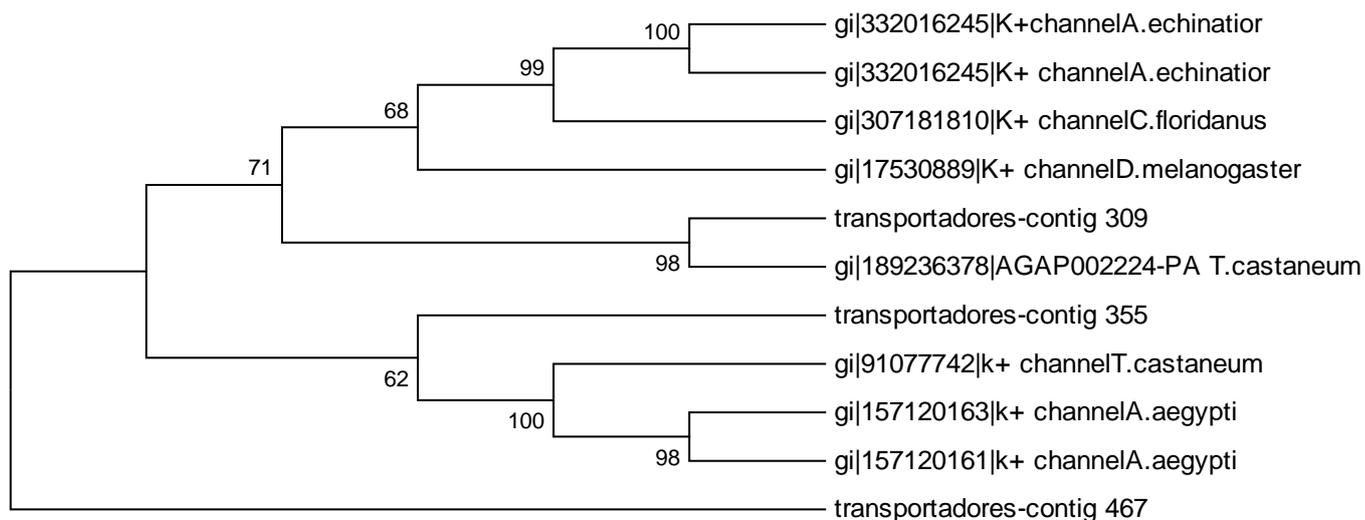


Figura 55: Análise filogenética dos canais de potássio revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor-joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições. Para compor a árvore foram escolhidas sequências de canais de potássio de outros insetos.

Na figura 56 temos um padrão de expressão dos 3 transportadores de potássio de *T.molitor* e podemos observar que o contig 309 tem sua expressão restrita a porção média do intestino médio, podendo estar envolvido com manutenção da homeostase celular, do pH luminal e da reciclagem de potássio para as bombas. Os outros dois contigs de *T.molitor*, 355 e 467 possuem uma expressão mais ubíqua tendo amplificações dos primers específicos em todos os tecidos analisados.

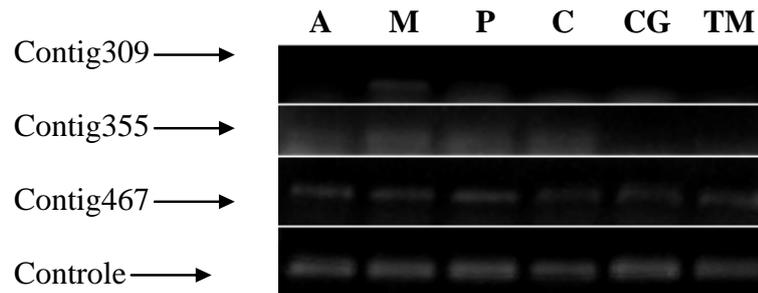


Figura 56: Padrão de expressão dos mRNA dos canais de potássio em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

4.4.1.6. Cotransportador de K^+/Cl^-

Em nossas análises do transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor*, foram identificados 3 contigs com similaridade com sequências de cotransportadores de K^+/Cl^- de outros insetos (tabela 14).

Tabela 14: Resumo das análises realizadas com os 3 cotransportadores de K⁺/Cl⁻ obtidos no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. Sequências de canais de potássio encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **PI/MW:** ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. **OBS:** Sequência completa ou sequência parcial.. **Todo:** expressa em todo o tubo digestivo, **A:** anterior, **M:** médio, **P:** posterior e **TM:**túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
88	69	19	EFA11214.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Cotransporter K ⁺ /Cl ⁻	P	5.22 / 7793.01	Não	1	-
141	320	18	EFA11214.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Cotransporter K ⁺ /Cl ⁻	P	9.31 / 36588.70	Não	2	-
186	97	12	EFA11214.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Cotransporter K ⁺ /Cl ⁻	TODO	7.84 / 10603.69	Não	3	-

Foram selecionadas algumas sequências de cotransportadores de K^+/Cl^- de insetos para construirmos a árvore filogenética, juntamente com as sequências de *T.molitor*. Foram eliminadas sequências curtas ou sem a identidade necessária com este tipo de transportador. A figura 57 mostra a análise filogenética feita com os transportadores de K^+/Cl^- e podemos concluir que o contig 186 de *T.molitor* se aproxima mais da sequência vinda de outro Coleoptera o *T.castaneum*. Isto indica que os transportadores evoluíram juntamente com as espécies e provável que *T.castaneum* também tenha mais de um contig que codifique este tipo de transportador. Os contigs 88 e 141 não apareceram na árvore filogenética e desta forma não podemos concluir se realmente são tão diferentes dos outros transportadores de insetos, ou se são específicos do besouro *T.molitor*.

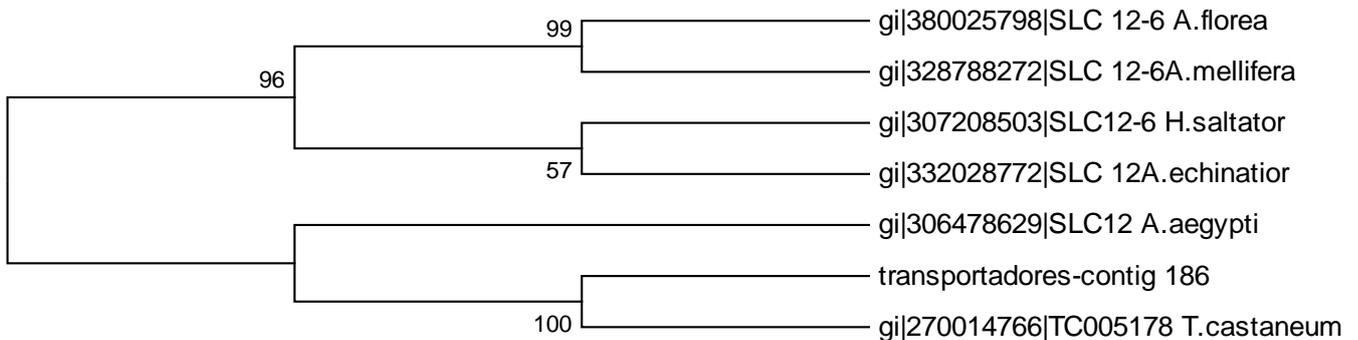


Figura 57: Análise filogenética dos cotransportadores de K^+/Cl^- revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

Através da análise do padrão de expressão dos transportadores de K^+/Cl^- podemos dizer que os contigs 88 e 141 são expressos somente na região posterior do intestino médio com número de reads iguais a 19 e 18, respectivamente, já o contig 186 tem um padrão de expressão amplo em todas as regiões analisadas de *T.molitor*. Podemos visualizar estes resultados através da figura 58.

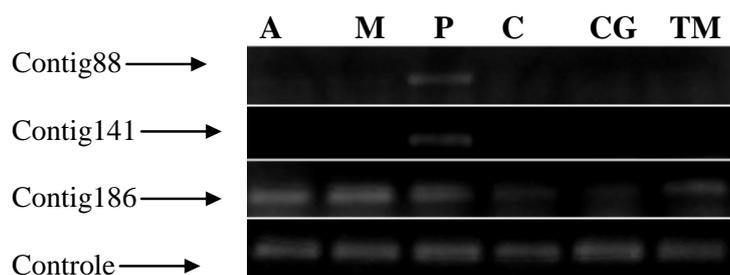


Figura 58: Padrão de expressão dos mRNA dos cotransportadores de K^+/Cl^- em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

4.4.1.7. V-ATPase

Como foi falado no item 1.10.7, em insetos as V-ATPases são encontradas na membrana apical de quase todos os tecidos epiteliais, garantindo o transporte ativo secundário pelo epitélio (Wieczorek *et al.*,2009).

Em *T.molitor* foram encontradas 3 sequências de V-ATPases por meio do transcriptoma do intestino médio de *T.molitor* (tabela 15).

O contig 7 possui 121 reads e foi expresso apenas nas 3 regiões do intestino médio (anterior, média e posterior). Já o contig 8 com 26 reads foi expresso nas 3 regiões do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi. O contig 9, com 46 reads, foi expresso nas regiões anterior e posterior do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi.

O resumo desta expressão pode ser observado na figura 59. Onúmero de reads dos contigs está apresentado na tabela 15.

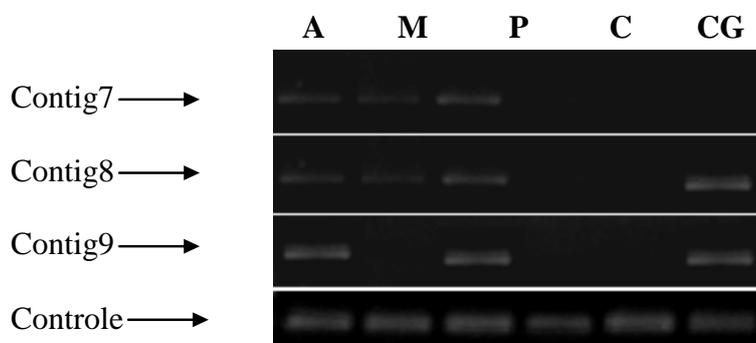


Figura 59: Expressão avaliada por RT-PCR dos transportadores de H^+ do tipo V-ATPase de *Tenebrio molitor*. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

Tabela 15: Resumo das análises realizadas com as 3 sequências de V-ATPases obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. PS: peptídeo sinal. AT: alça transmembrana. PI/MW: ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. OBS: Sequência completa ou sequência parcial.. Todo: expressa em todo o tubo digestivo, A: anterior, M: médio, P: posterior e TM:túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
7	429	121	CAD27758.1	<i>A. gambiae</i>	V-ATPase	A M P	6.02 / 49202.96	Não	7	-
8	842	26	XP_966700.1	<i>Tribolium castaneum</i>	V-ATPase	A M P TM	6.16 / 96508.19	Não	6	-
9	406	46	XP_974187.1	<i>Tribolium castaneum</i>	V-ATPase	A P TM	5.37 / 46382.77	Não	1	-

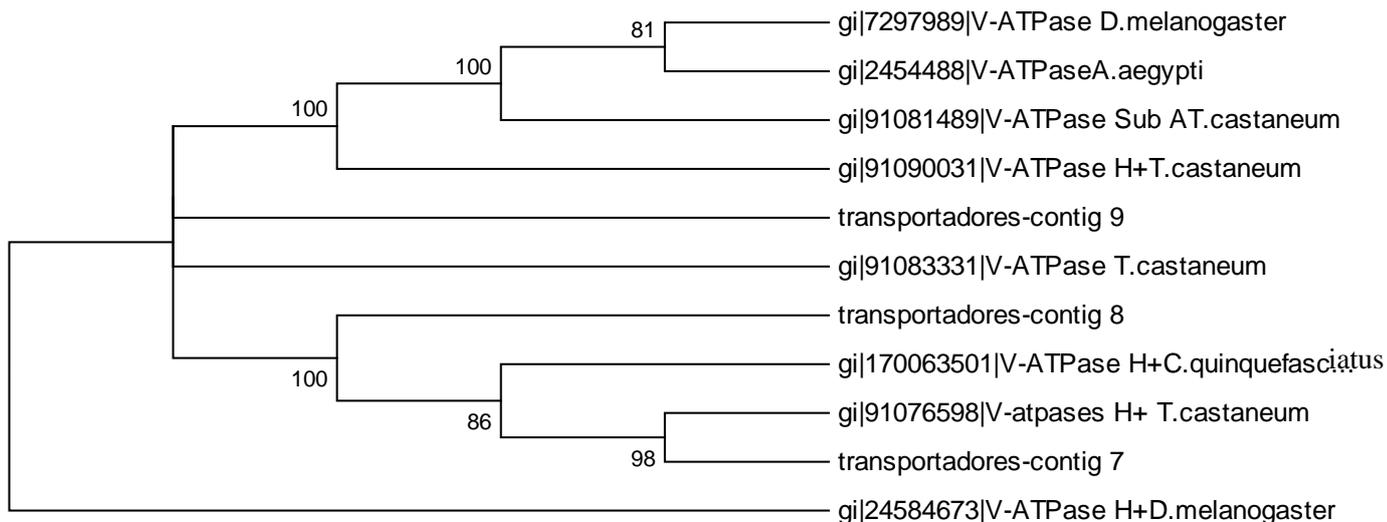


Figura 60: Análise filogenética das V-ATPases que transportam H^+ revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor-joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

De acordo com o cladograma mostrado na figura 60 acima, podemos afirmar que os transportadores de *T.molitor*, contigs 7, 8 e 9, encontram-se misturados aos outros transportadores de insetos, demonstrando que estas diferentes sequências do mesmo tipo de transportador já existia antes da divisão entre as espécies. O contig 7 encontra-se em um ramo com bootstrap 98 juntamente com uma V-ATPase de *T.castaneum* e estes se unem ao contig 8 através de um ramo com bootstrap 100. O contig 9 encontra-se fora dos dois grandes ramos com bootstraps 100, que se formaram com as V-ATPases buscadas nos bancos de dados de sequências. Uma das sequências de *D.melanogaster* encontra-se como um ramo externo as outras sequências da análise filogenética.

4.4.1.8. Transportador de amônia

Foram encontradas duas sequências correspondentes a transportadores de amônio (tabela 16).

Tabela 16: Resumo das análises realizadas com as 2 sequências de transportador de amônio, obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. PS: peptídeo sinal. AT: alça transmembrana. PI/MW: ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. OBS: Sequência completa ou sequência parcial.. Todo: expressa em todo o tubo digestivo, A: anterior, M: médio, P: posterior e TM:túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	Nº de reads	Best hit Blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
Ammonium 1	80	66	XP_975360.2	<i>Tribolium castaneum</i>	Ammonium transporter	A M	4.82 / 8720.37	Não	2	-
Ammonium 2	201	24	XP_975360.2	<i>Tribolium castaneum</i>	Ammonium transporter	A M	6.12 / 21168.54	Não	3	-

Na figura 61 temos a expressão dos mRNAs correspondentes a duas seqüências de transportadores nas diferentes regiões do inseto *T.molitor*. Podemos notar que a expressão destes transportadores ocorre somente nas regiões anterior e média do intestino médio, mostrando ser regionalizada e pode ter um papel importante na fisiologia molecular intestinal deste inseto, no que diz respeito ao tamponamento.

A expressão do gene que codifica o transportador de amônia ocorre em regiões onde o pH luminal é ácido e, desta forma, este transportador deve estar transportando os íons amônio para o lúmen e assim o acidificando.

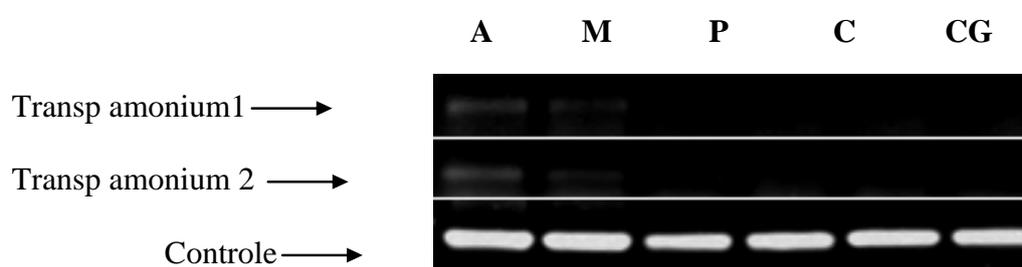


Figura 61: Expressão avaliada por RT-PCR dos transportadores de amonium de *Tenebrio molitor*. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

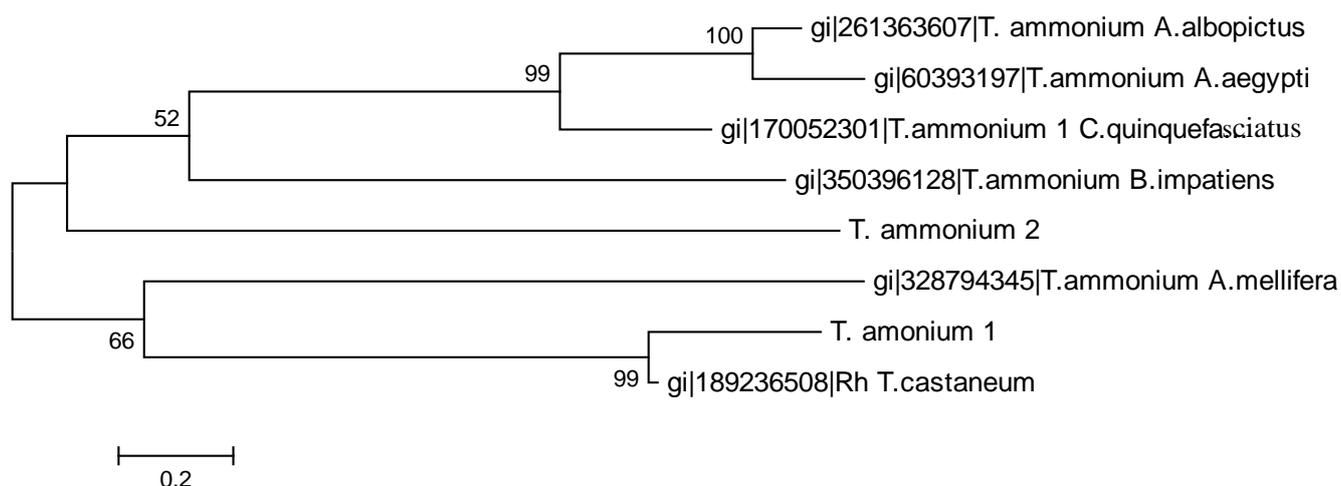


Figura 62: Análise filogenética dos transportadores de amonium revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

A figura 62 mostra um cladograma onde se vê que os transportadores de amônio, está no ramo que inclui transportadores do tipo RH (Rhesus), responsáveis pelo transporte bidirecional de NH_3 (Zidi-Yahoui *et al.*, 2005). Já o transportador de amônio 2 se encontra junto com transportadores do íon amônio (NH_4^+) (Wu *et al.* 2010).

4.4.1.9. Aquaporinas

O transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*, permitiu a identificação de 3 sequências de aquaporinas (tabela 17). Destas 3 sequências, a aquaporina 3 é expressa em todos os tecidos analisados, tanto nas partes do intestino médio (anterior, médio e posterior) quanto nos tecidos com funções diferentes das digestivas como: carcaça, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi, sendo desta forma uma aquaporina não específica das funções de homeostase do intestino médio. As aquaporinas 1 e 2 possuem expressão mais restrita que a aquaporina 3, encontrando-se expressas nas regiões média e posterior do intestino médio e também na carcaça e túbulos de Malpighi. Esta expressão condiz melhor com as aquaporinas já estudadas e citadas acima, uma vez que está presente mais nas regiões finais do intestino médio e o fato de estar nos túbulos de Malpighi pode ser devido à participação desta proteína nos fenômenos de reciclagem de água filtrada neste órgão do inseto. O significado da expressão de aquaporina na carcaça não é claro no momento.

Tabela 17: Resumo das análises realizadas com as 3 sequências de aquaporinas, obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. PS: peptídeo sinal. AT: alça transmembrana. PI/MW: ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. OBS: Sequência completa ou sequência parcial.. Todo: expressa em todo o tubo digestivo, A: anterior, M: médio, P: posterior e TM:túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
1	187	18	XP_968342.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Aquaporin	M P TM	6.05 / 19722.93	Não	4	-
2	248	24	XP_972862.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Aquaporin	M P TM	6.19 / 26476.23	Não	6	-
3	254	6	XP_970728.1	<i>Tribolium castaneum</i>	Aquaporin	TODO	6.14 / 27152.88	Não	7	-

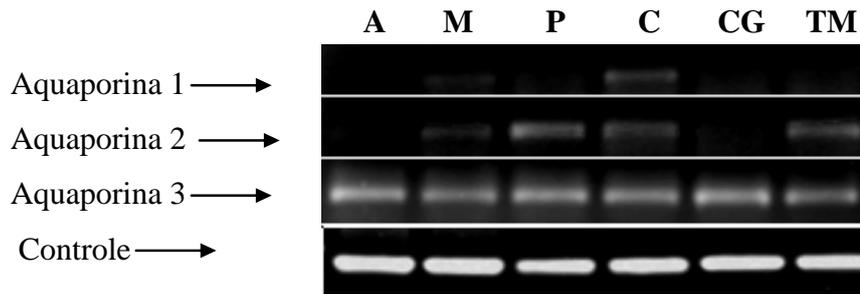


Figura 63: Expressão avaliada por RT-PCR das aquaporinas de *Tenebrio molitor*. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

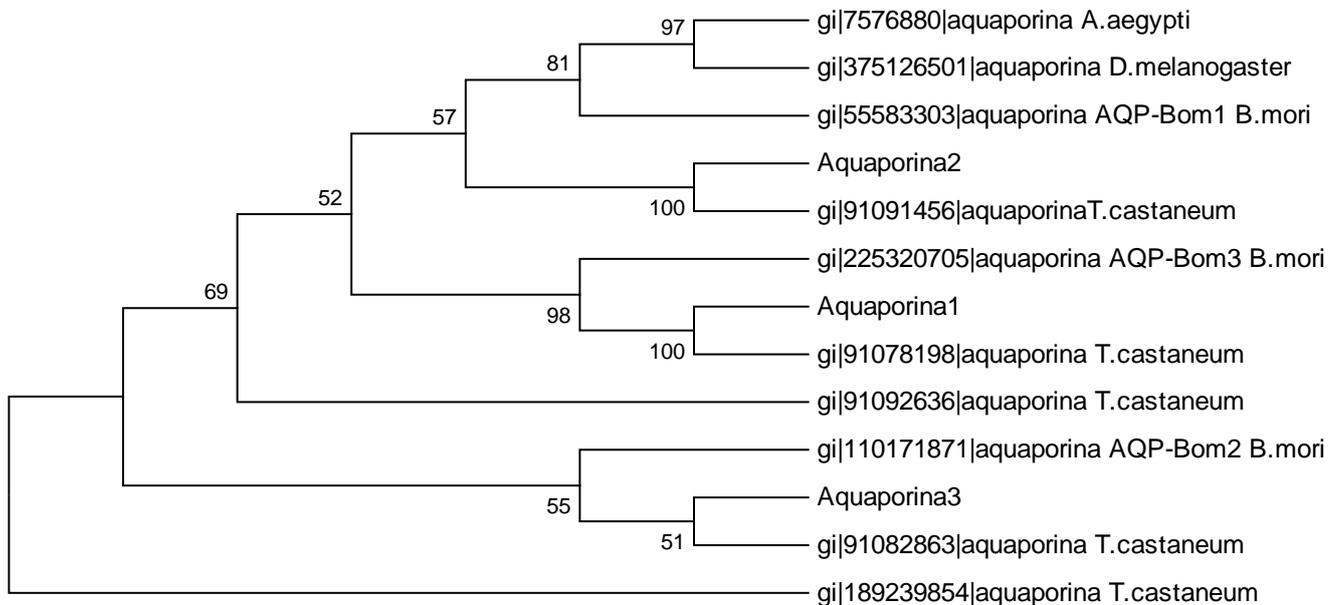


Figura 64: Análise filogenética das aquaporinas reveladas pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

A figura 64 mostra uma análise filogenética feita com as 3 sequências de aquaporinas encontradas no transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Neste cladograma podemos visualizar 3 ramos com bootstraps 57, 98 e 55, nos quais temos em cada um dos ramos uma sequência de *T.molitor*. Desta forma, podemos concluir que as sequências de *T.molitor* são mais semelhantes às sequências de *T. castaneum* do que entre elas mesmas, revelando uma expansão gênica antes da especiação entre os dois insetos.

A aquaporina 3 de *T.molitor* é a sequência de distribuição tecidual menos específica das 3 encontradas. É interessante notar que ela se encontra fora do grande ramo com bootstrap 69, onde se encontram as sequências de aquaporina 1 e 2.

4.4.1.10. Simportador de H⁺/oligopeptídeos

Foram encontradas duas sequências similares a transportadores de H⁺/oligopeptídeos no transcriptoma do intestino médio de *Tenebrio molitor*., chamados contig 284 e 285, cujos reads são 69 e 237 respectivamente (tabela 18).

De acordo com a figura 65 podemos dizer que o contig 284 é mais similar a uma sequência de *Tribolium castaneum* com bootstrap 100 e a outra sequência, contig 285, é mais similar a outras duas sequências de *T.castaneum* ambas com identificação de transportador de oligopeptídeo com bootstrap 97. Interessante é que as sequências de *Tenebrio molitor* são mais similares às sequências de *Tribolium castaneum* do que entre si mesmas, mostrando que anterior a divergência entre as espécies de Coleoptera já existiam diferentes sequências correspondentes a transportadores de oligopeptídeos/H⁺. Ambas as sequências de *Tenebrio molitor* ficaram separadas das sequências dos Diptera colocadas na árvore filogenética, mostrando serem mais similares as sequências de outro Coleoptera do que aos Diptera.

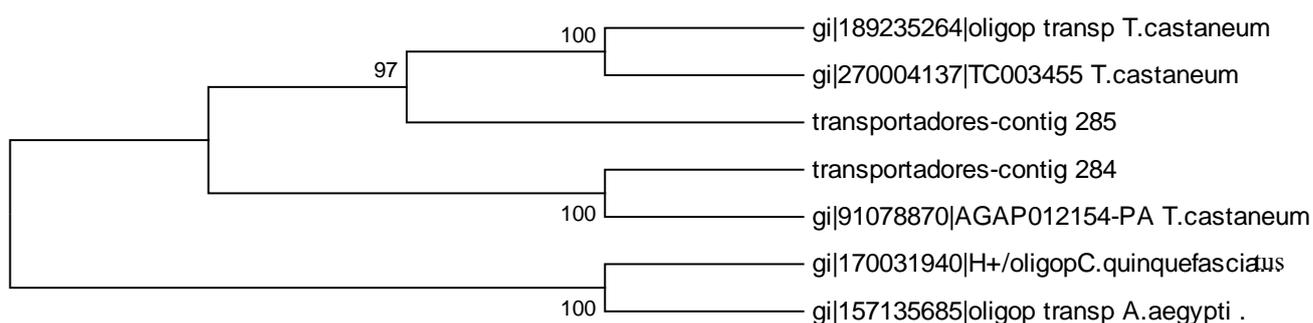


Figura 65: Análise filogenética dos transportadores de H⁺/oligopeptídeos revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

Tabela 18: Resumo das análises realizadas com as 3 sequências de transportadores de H⁺ Oligopeptídeos, obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de *T.molitor*. PS: peptídeo sinal. AT: alça transmembrana. PI/MW: ponto isoelétrico/massa molecular teóricos. OBS: Sequência completa ou sequência parcial.. Todo: expressa em todo o tubo digestivo, A: anterior, M: médio, P: posterior e TM:túbulos de Malpighi.

Contig	Nº de AA	N de reads	Best hit blast	Espécie	Anotação NR	Sítio de expressão	PI/MW	PS	AT	OBS
284	654	69	XP_972519.1	<i>Tribolium castaneum</i>	H+ Oligopep Transp	P TM	5.09 / 73348.20	Não	10	-
285	709	237	XP_972470.2	<i>Tribolium castaneum</i>	H+ Oligopep Transp	A M P	4.82 / 79290.92	Não	11	-

Observando a figura 66, podemos dizer que o contig 284 mostra-se expresso mais intensamente na região posterior do intestino médio e pouco expresso nos túbulos de Malpighi. Já o contig 285 possui a sua expressão mais ampla que o contig 284, mas restrita às regiões ligadas diretamente à digestão, ou seja, encontra-se nas regiões anterior, média e posterior do intestino médio.

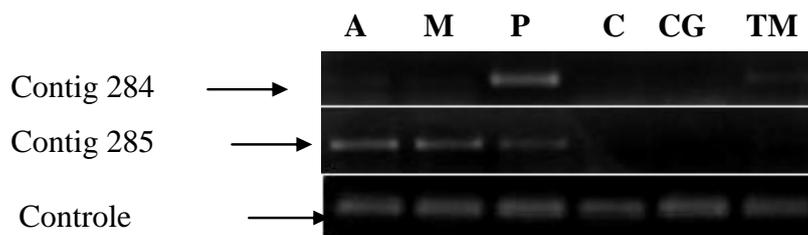


Figura 66: Expressão avaliada por RT-PCR dos mRNAs correspondentes aos transportadores de H^+ /oligopeptídeos de *Tenebrio molitor*. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

Como apresentado na introdução, há 2 tipos de transportadores de peptídeos, um deles encontra-se na região apical, onde estão as membranas com borda em escova com a função de absorção no intestino médio. O outro tipo de transportador de peptídeo encontra-se na região basolateral, juntamente com transportadores de aminoácidos e bombas de sódio e potássio. As duas diferentes sequências de transportadores de peptídeos encontradas no pirosequenciamento podem ser equivalentes às representadas na figura 8, uma vez que inclusive possuem expressões diferentes ao longo do tubo digestivo (figura 66).

4.4.1.11. Na^+/K^+ ATPase

Estas bombas de sódio e potássio são, na maioria das vezes, responsáveis pelo equilíbrio de cargas entre as células e o lúmen e também com a hemolinfa e, estão presentes na maioria dos tipos celulares.

Investigamos a presença deste tipo de transportador no transcriptoma do intestino médio de *T. molitor* e foram encontradas 3 sequências correspondentes a Na^+/K^+ ATPase. Estas sequências foram utilizadas como molde para o desenho de iniciadores específicos para serem utilizados durante as análises de RT-PCR destes

transportadores. Das 3 sequências, apenas uma delas foi amplificada com os iniciadores desenhados, mesmo usando diversas temperaturas e condições. Elas podem ser sequências pouco expressas nesta região do intestino médio, necessitarem de condições especiais para serem amplificadas, ou ainda serem artefatos.

A sequência amplificada por RT-PCR teve sua expressão nas 3 regiões do intestino médio (anterior, média e posterior) além da sua amplificação nos túbulos de Malpighi. Isto pode ser visualizado através da figura 67 abaixo. Esta sequência quando traduzida verificamos a presença de 1008 aminoácidos, com 8 alças transmembranas e com *pI* de 5,39.

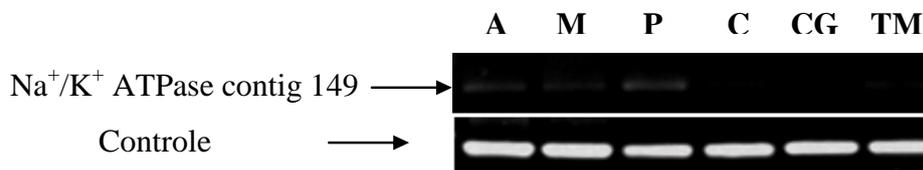


Figura 67: Expressão avaliada por RT-PCR dos mRNAs dos transportadores de Na^+/K^+ ATPase de *Tenebrio molitor*. A banda amplificada aparece no tecido quando o mRNA correspondente é transcrito. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de Malpighi. O controle é a actina.

Na figura 68, temos uma análise filogenética das sequências deste transportador de sódio e potássio de *Tenebrio molitor*, juntamente com sequências desta bomba de outros insetos depositadas nos bancos de dados. O contig 149 foi o único que tivemos a amplificação através de RT-PCR, como foi mostrado na figura 65 e este teve sua expressão mapeada com 33 reads. Este contig ficou no mesmo ramo que a bomba de *Tribolium castaneum* com bootstrap 93. Em outros dois ramos encontramos as outras duas sequências de *Tenebrio molitor*. O contig 294 também está mais próximo a uma sequência de *Tribolium castaneum* do que da sua própria sequência e encontra-se com bootstrap 95 e talvez seja na realidade um cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, a julgar pelo ramo onde se encontra. O contig 402 situa-se no ramo onde encontramos somente sequências com a denominação Na^+/K^+ ATPase beta, ou seja, são sequências correspondentes a subunidade beta desta proteína carreadora destes íons. Devido ao aparecimento deste ramo em separado podemos concluir que estas subunidades são realmente diferentes entre si, até mesmo evolutivamente.

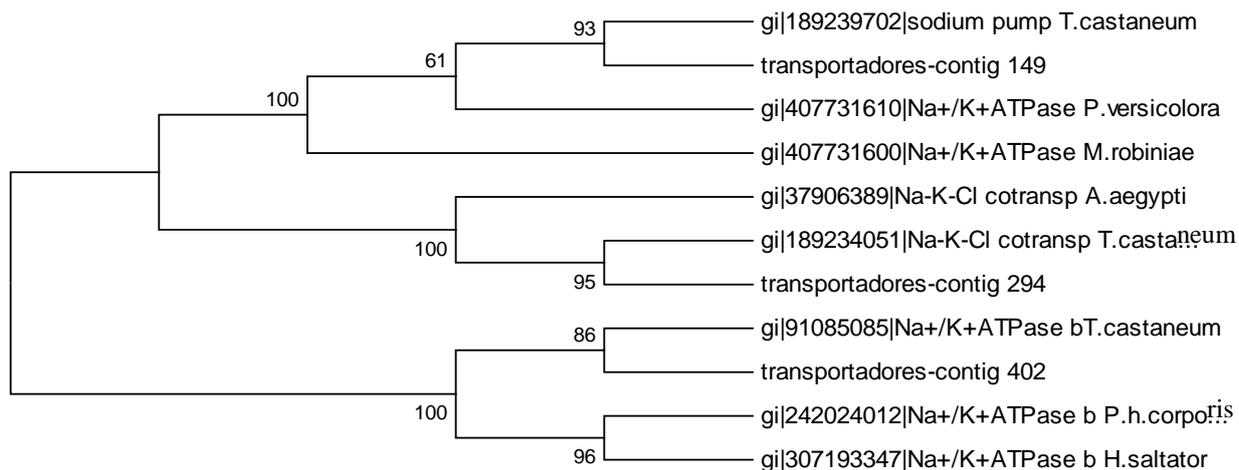


Figura 68: Análise filogenética dos transportadores de Na^+/K^+ ATPase revelados pelo transcriptoma do intestino médio de *T.molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os ramos foram estatisticamente suportados pela análise de bootstraps com corte em 50 baseado em 1000 repetições.

4.5. Enzimas digestivas

4.5.1. α -Manosidase

4.5.1.1. Caracterização, Origem e função das α -manosidases digestivas de *Tenebrio molitor*

A α -manosidase é uma enzima bastante estudada no nosso laboratório e foram obtidos alguns resultados com a purificação desta enzima do tubo digestivo de *Tenebrio molitor*. Foram utilizadas colunas cromatográficas para a purificação das α -manosidases solúveis e estes passos estão resumidos na figura 69. Ao longo da purificação desta enzima observamos apenas um pico de atividade sobre o substrato sintético p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo e apenas na coluna fenil superose de interação hidrofóbica, o pico de atividade que antes era único, se separa em dois, mostrando a presença de duas enzimas: Man1 e Man2 (figura 69 A, B e C). Na figura 69 D, temos um resumo das propriedades de Man 1 e Man 2, onde podemos concluir que não diferem muito uma enzima da outra.

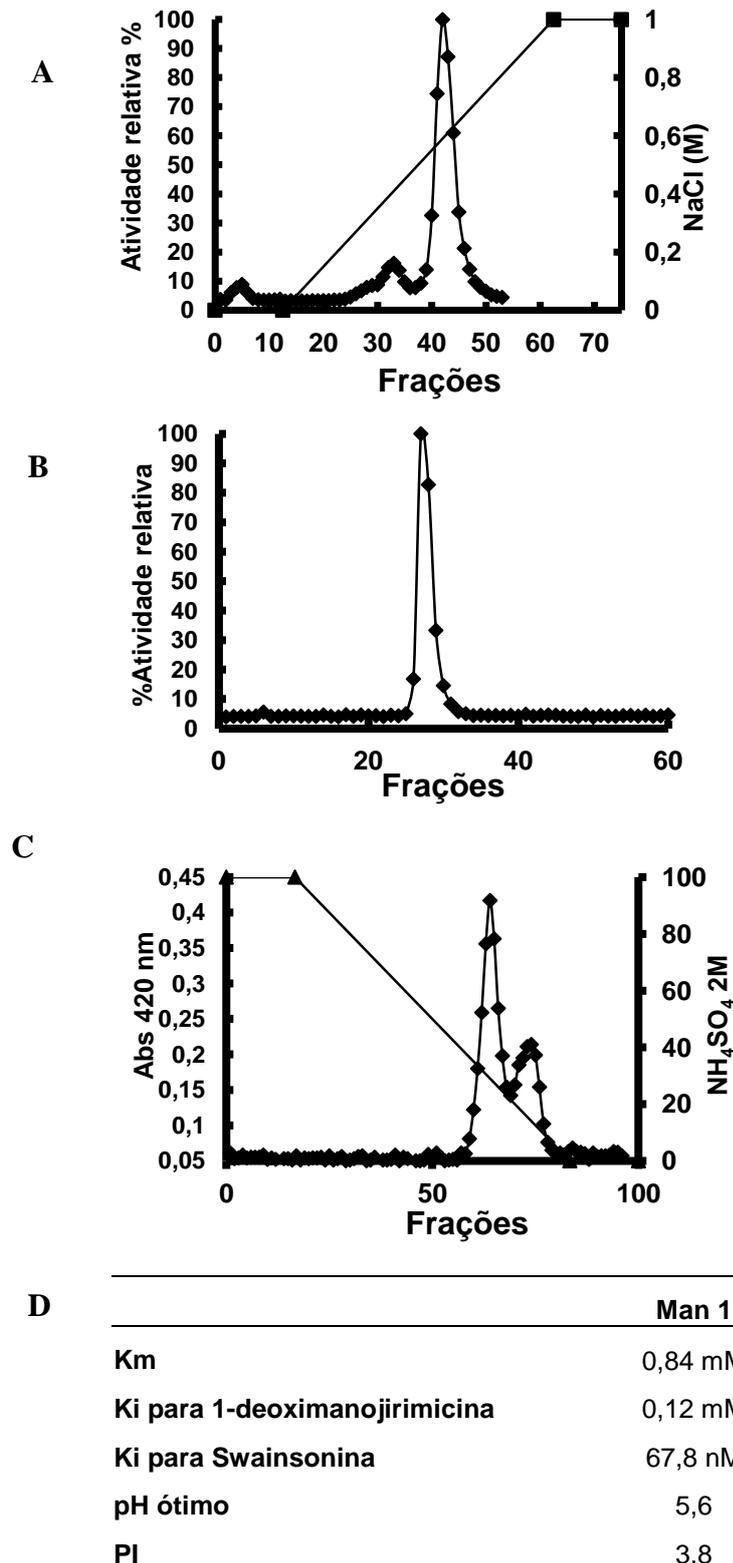


Figura 69: Resumo dos passos de purificação das α -manosidasas solúveis de *Tenebrio molitor* e também de algumas propriedades destas enzimas. **A:** coluna Hitrap Q (troca iônica), **B:** resultado de uma coluna de filtração em Gel Superdex 75, **C:** temos o resultado após a coluna de interação hidrofóbica (fenil superose) e **D:** um resumo das propriedades destas duas enzimas. **Km**, constante de afinidade e **Ki** constantes de inibição. **PI:** ponto isoelétrico. 1-deoximanojirimicina e Swainsonina são inibidores de α -manosidasas.

Um fragmento de sequência identificado como sendo uma α -manosidase foi conseguido através das varreduras da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*. Com o intuito de estender e se possível completar esta sequência foram utilizadas várias técnicas como RACE 3' e PCRs com iniciadores específicos reversos juntamente com um iniciador que se alinha com o braço do vetor. Os PCRs foram feitos utilizando várias temperaturas de pareamento dos iniciadores, além de mudanças nas concentrações de Mg^{2+} , força iônica e número de ciclos nas reações.

Apenas com um fragmento de sequência não era possível associá-la a nenhuma das duas enzimas purificadas do inseto. Para tentar solucionar este problema e descobrir quais eram os contigs correspondentes as sequências das enzimas purificadas, realizamos o pirosequenciamento da biblioteca de biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*.

Com os dados do pirosequenciamento muitas sequências correspondentes a enzimas α -manosidases foram encontrados e os mesmos foram unidos com o intuito de completar o máximo de sequências possível.

O fragmento de sequência que tínhamos anteriormente teve seu DNA da região 5' completado com a ajuda da plataforma 454, onde tínhamos dois contigs que se completavam, mas faltava cerca de 3 aminoácidos para a junção destes contigs.

Para termos certeza de que os dois contigs formavam a mesma proteína foram pedidos iniciadores, sendo um iniciador de cada contig encontrado e a reação de PCR entre os iniciadores (um de cada contig) foi feita e a banda correspondente a α -manosidase completa pode ser visualizado na figura 70. Nesta figura, temos uma banda entre 2000 e 2500 nucleotídeos. Esta banda foi recortada e seqüenciada pelo método de Sanger para confirmação da sequência e desta maneira foi gerada a figura 70.

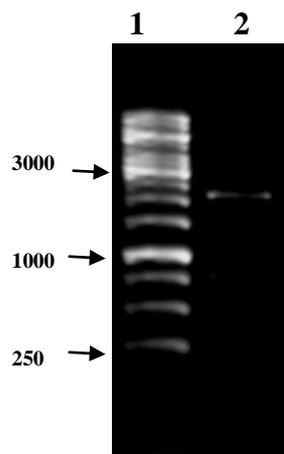


Figura 70: Separação das bandas amplificadas por reação de PCR com primers específicos de α -manosidase. Gél de agarose 1%. Raia 1: padrão de peso molecular de 1Kb; e raia 2: raia corresponde a amostra de DNA.

Na figura 71 temos a sequência, obtida pelo método de Sanger, da α -manosidase de *Tenebrio molitor*, onde podemos visualizar 3 sítios de N-glicosilações, a clivagem do peptídeo sinal indicando que esta é uma enzima secretada e também podemos ver na letra B desta figura os domínios presentes nesta proteína. Os domínios são descritos como: domínio N-terminal, domínio do meio e domínio C-terminal. Todos estes domínios pertencem a família 38 das glicosídeo hidrolases. Esta sequência possui 972 aminoácidos com um ponto isoelétrico de 4,52 e uma massa molecular de aproximadamente 109 KDa.

A

↓

```

atgagcctgctggtggtttctgttttgcttttagcctgtttctgggctgaaacccaacccg
M S L L V F L F C F S L F L G V N T K P
tatgaagcggatgcgccgagctgctggctatgatgctgcccgggaagcggatccgagcgcg
Y E A D A P S C G Y D A C P E A D P S A
ctgaacgtgcatattgtgcccgatagccatgatgatgtgggctggctgaaaaccctggat
L N V H I V P H S H D D V G W L K T L D
cagtattatcttcaggatgtgcagaacgtgattagcagcgtgattgtggcgtgaaactg
Q Y Y F Q D V Q N V I S S V I V A L K L
aaccgggaacgcccgtttgtgaggtggaacccgcttttttaactgtggtggagccgc
N P E R R F V Q V E T A F F K L W W S R
cagaacgatattattaagaagcgggtgcagaacctggtgaacaacggccagctggaatct
Q N D I I K E A V Q N L V N N G Q L E F
attaacggcgcgtggagcatgaacgatgaagcggcgggtgcattatcagagcaccattgat
I N G A W S M N D E A A V H Y Q S T I D
cagtttaccctgggctgctatattgaagataacctgggcccgtgctgctgcccggaaa
Q F T L G L R Y I E D N L G R C A R P K
gtgggctggcagattgatccgtttggccatagccgcgaacaggcggagcattagcgcgcag
V G W Q I D P F G H S R E Q A S I S A Q
ctgggctttgatagcatgttttttgcgcgcctggattatcgcgataaaaaccgcccgatg
L G F D S M F F A R L D Y R D K N R R M

```

gatgataaaaccatggatctgctgtggtggcgcgccagcgcgaacctgggcaacaacgcggat
D D K T M D L L W R G S A N L G N N A D
atTTTTaccagcgtgctgtatcagcattatagcgcgcggggcgcttttgctttgatatt
I F T S V L Y Q H Y S A P G G F C F D I
gtgtgcaacgatgaagtgattattgatgatgaagaagatccggattataacctggaaaaa
V C N D E V I I D D E E D P D Y N L E K
cgcgtggggaatttgccgatcagatgcgcgatcgcgcggaacattatccgaccaacaac
R V G E F A D Q M R D R A E H Y P T N N
attctggtgaccatgggcgatgattttcgcctatgaagcggcgatgaccacctatatgaac
I L V T M G D D F R Y E A A M T T Y M N
ctggatctgctgattaaaggctttgatctgtttgaacagacctataacgataaacgcatt
L D L L I K G F D L F E Q T Y N D K R I
aaagtgttttatagcaccgccgagctgctataccaaagcggggaacgattatgtgaacagc
K V F Y S T P S C Y T K A V N D Y V N S
aacaactataacctggaactgaaaaccgatgattttttccgatgccgatggcaccaac
N N Y N L E L K T D D F F P Y A D G T N
acctattggaccggctattttaccagccgcgcgaccagcaaacttttgaacgccagggc
T Y W T G Y F T S R A T S K H F E R Q G
aacaacctgctgcaggtgagcaaacagctggcggcggaacgcgcagggcagctatgataac
N N L L Q V S K Q L A A N A Q G S Y D N
gaacagattaacacctgaaagaagcgggtgggctgatgcagcatcatgatgcgattacc
E Q I N T L K E A V G V M Q H H D A I T
ggcaccgaaaaacagcatgtggcgaacaactattatctgcgcctgagccgcggcatgcag
G T E K Q H V A N N Y Y L R L S R G M Q
agcgcggcggatgccccgggaggtgctgagcaacctgattaccggcgatgataccaac
S A A D A G A G C Q V L S N L I T G D D T N
ctggaatttgatgctgctggcgaacgtgagcgcgtgcaccagaccgaaagcgt
L E F D S C L L A N V S A C T Q T E S D
acctttaccgtggcgggtgataaccgcgtgagccgcaccagaccgcgattgtgacctg
T F T V A V Y N P L S R T Q T A I V T L
ccgggtgtttgatcagcagaactatcagattcgcgatccggatgataacgatgtgccgtat
P V F D Q Q N Y Q I R D P D D N D V P Y
cagctggatgagcagcctgaccgatttttagctatgtggaaaacgcgcgcaccagccagacc
Q L D A S L T D F S Y V E N A R T S Q T
acctgcagtttgccggcgaagatctgcccgcctgggctttaaagtgtatcgctttagc
T L Q F A A K D L P P L G F K V Y R F S
gccccgataaacagccgaaaagcaaccgcgtgctgaaaaaacccgaaacctgagcgtg
A A D K Q P K S N P L L K K T P N L S V
ggctatgaagaaaccagctttgaaattagcgaacagaccggcctgctggaaagcattacc
G Y E E T S F E I S E Q T G L L E S I T
atgaacggcgtgacctgacggtgaccaggattttcagtattataaccagccagaacagc
M N G V T L Q V T Q D F Q Y Y T S Q N S
agcggcgcgtatattttgtgcccgggtgaaaccgatccgagccgcgtggcgggcccgg
S G A Y I F V P V E T D P S R V A G G P
attaccaccacctggtgagcggcgatgtgagccagggcgtgctgcaggaatttggcagc
I T T T L V S G D V S Q G V L Q E F G S
tgggcgccagtttattaaagtgtataacgatgataaaagctatattgaatttgattgg
W A R Q F I K V Y N D D K S Y I E F D W
attgtgggcccgcctggatatttagcgtggcgtgggcaagaagtgggtgagcaatttagc
I V G P L D I S D G V G K E V V S K F S
accccgctggaaccaacggccagttttataccgatagcaacggccgcaagtgtgctgag
T P L E T N G Q F Y T D S N G R E V L Q
cgcacccgcaacagcccccggattatgattataccgatgaacagccgggtggcgggcaac
R T R N S R P D Y D Y T D E Q P V A G N
tattatccggtgaccagcaaaattgtgattgaagatgatgatgtggaatttgcgggtgctg
Y Y P V T S K I V I E D D D V E F A V L
accgatcgcagccagggcggcagcagcattaacgatggcgaagtggaaactgatgggtgat
T D R S Q G G S S I N D G E V E L M V H
cgcgcgtgcccagcatgatgatggccgcggcgtgggcaaacctgaacgaacaggaattt
R A C Q H D D G R G V G E N L N E Q E F
ggcgtggcattcgcgtgcccggcaaacattttctggtgctgggcccgaaggcggcaac

```

G D G I R V R G K H F L V L G P K G G N
ggcgataaaagcattgCGGCGGTGGAACGCGATGTGGCGCAGCGCAAACCTGCTGAGCCCG
G D K S I A A V E R D V A Q R K L L S P
tggaccttttgTgaccaaacaggtggataacctgaacaacctgcagtttagcggcctgaaa
W T F V T K Q V D N L N N L Q F S G L K
aacagcctgCCGGATAACGTGCAGATTCTGACCCTGGAACCGTGGAGCGAAAACACCCTG
N S L P D N V Q I L T L E P W S E N T L
ctgttttcgCCTGGAACATGTGCTGGAAAACGGCGAAGATGATAACCTGAGCCAGGAAGTG
L F R L E H V L E N G E D D N L S Q E V
accgtggatgtgagcgatctgtttaccctgttttagcattaccgaactgaaagaaaccacc
T V D V S D L F T L F S I T E L K E T T
ctgggCGCGAACATGCTGCTGGAAGAAAACGTGCGCCTGAGCTGGCCGGGCGAGCAGCACC
L G A N M L L E E N V R L S W P G S S T
accgatgatcaggtggaaaaacgCGATGTGGATGATCTGACCCTGACCCTGCAGCCGATG
T D D Q V E K R D V D D L T V T L Q P M
CagatttcgcacctttctggCGACCGTGAGCTATAAC
Q I R T F L A T V S Y N

```

B

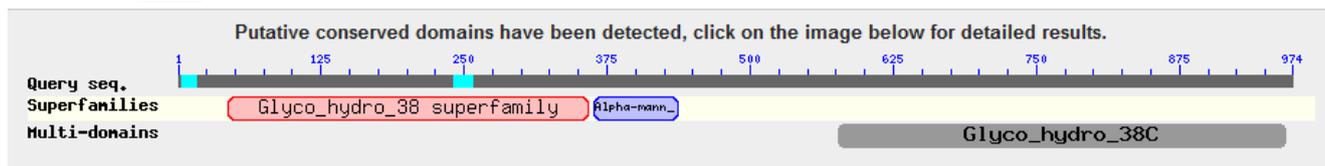


Figura 71: (A) Nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzida do cDNA que codifica α -manosidase de *Tenebrio molitor*. As N-glicosilações são mostradas pelo N na sequência em vermelho e a seta indica onde é o sítio de clivagem do peptídeo sinal. (B) mostra a visualização dos domínios encontrados na sequência da α -manosidase de *tenebrio molitor*.

Na tabela 19 temos um resumo das análises realizadas com as sequências das α -manosidasas obtidas através da plataforma 454. Das 19 sequências identificadas apenas 4 estão completas. A existência de muitas sequências incompletas deve-se ao grande tamanho exibido por estas enzimas, que ficam na faixa entre 1000 e 2000 aminoácidos. Estas 19 sequências foram divididas entre enzimas citosólicas, que são enzimas que não possuem peptídeo sinal e nem alça transmembrana, e enzimas secretas e/ou lisossomais, que são enzimas que possuem peptídeo sinal para sinalizar sua ida para outro compartimento no inseto. Temos 11 enzimas classificadas como citosólicas (contigs 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 16 e 18) e 8 secretadas e/ou lisossomais (contigs 3, 6, 8, 12, 14, 15, 17 e 19). Como somente uma das enzimas citosólicas está completa, pode ser que a classificação de algumas das enzimas incompletas se altere quando suas sequências forem completadas. Não foram encontradas enzimas típicas de membrana, utilizando os

parâmetros como: alças transmembrana, âncora de GPI, peptídeo sinal dentre outros. A coluna natureza da tabela 19 foi construída com base nas análises dos parâmetros citados acima.

Na tabela 19 podemos ver a presença de dois contigs correspondentes a sequências completas de enzimas secretadas e solúveis com níveis de expressão consideráveis. Estes são os contigs 4 e 12 com 103 e 433 reads, respectivamente. Através de Blast utilizando como isca a enzima contra a qual foi feita o anticorpo (manosidase inicial), podemos concluir que o contig inicial corresponde ao contig 12 encontrado no pirossequenciamento do cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Este contig 12 não é a sequência mais expressa no tubo digestivo de *T.molitor* quando comparamos o número de reads dos contigs, mas corresponde a enzima Man2 (minoritária) em atividade sobre os substratos testados e na marcha de purificação.

A Sequência mais expressa dos contigs encontrados no pirossequenciamento é a do contig 14 com 1052 reads. Este contig é expresso somente no tubo digestivo e nos túbulos de Malpighi e assim poderia corresponder a outra enzima das duas enzimas solúveis purificadas (Man1). Contudo, o fato de mesmo com tantos reads não ter gerado uma sequência completa, sugere que não se trate de uma α -manosidase típica. Não é claro no momento qual seria o seu significado.

Tabela 19: Resumo das análises realizadas com as 20 α -manosidases obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de dos *T.molitor*. A presença de peptídeo sinal, alça transmembrana e âncora de GPI também são apresentados. **Lys:** lisossomal, **PS:** peptídeo sinal. **AT:** alça transmembrana. **OBS:** Sequência completa ou em branco são as sequências parciais, **N-Glic** são N-glicosilações e **O-Glic** são O-glicosilações. Não há predição de prenilação para nenhuma sequência. **C:** citosólica; **S/L:** secretada ou lisossomal. * Não foi feito RT-PCR destas sequências.

Nome	Anotação NR	Espécie	Sítios de expressão	Natureza	PS	âncora GPI	N-glic	O-glic	AT	Nº Reads	PI/MM	OBS
Contig5	Alfa-man classe2	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	0	Não	Não	7	5,70 / 28368,35	
Contig11	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	2	Não	Não	7	4,91 / 16896,58	
Contig6	Alfa-man Golgi	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	1	Não	Não	8	6,53 / 20642,78	
Contig16	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	3	Não	Não	9	5,33 / 67962,94	
Contig17	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	1	Não	Não	9	5,46 / 21909,33	
Contig2	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	1	2	Não	14	8,09 / 15071,00	
Contig19	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	0	Não	Não	17	5,22 / 14407,20	
Contig8	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	3	8	Não	27	4,50 / 101625,98	Completa
Contig7	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	0	Não	Não	34	5,06 / 105179,41	
Contig10	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	1	3	Não	34	5,05 / 39168,02	
Contig1	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	1	Não	Não	40	4,51 / 45084,96	
Contig3	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	1	1	Não	44	4,50 / 39105,19	
Contig15	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	S/L	Sim	Não	3	Não	Não	76	4,86 / 111955,14	Completa
Contig12	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	A M P	S/L	Sim	Não	3	Não	Não	103	4,52 / 109006,35	Completa
Contig9	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	*	C	Não	Não	1	Não	Não	119	4,53 / 71268,54	
Contig18	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	A M P	C	Não	Não	0	Não	Não	121	6,06 / 9057,25	
Contig13	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	A M P	C	Não	Não	1	Não	Não	221	4,44 / 19075,62	
Contig4	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	A M P	C	Não	Não	3	Não	Não	433	4,60 / 111216,40	Completa
Contig14	Lys alfa-man	<i>T. castaneum</i>	A M P T	S/L	Sim	Não	3	Não	Não	1052	5,04 / 93963,12	

Dentro do banco de dados CAZy encontramos 4 classes de enzimas sendo uma delas a das glicosídeo hidrolases. Dentro desta classe temos 122 famílias e podemos destacar duas: as famílias 47 e 38, onde encontramos α -manosidases de várias espécies, incluindo eucariotos (em grande maioria) e também Archaea e bactérias.

Foram feitas análises evolutivas moleculares e filogenéticas através de cladogramas utilizando o programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis versão 3.1 (MEGA 3.1) (Kumar et al., 2004).

As 19 sequências de α -manosidases obtidas através do transcriptoma (pirossequenciamento) intestinal de *T. molitor* foram usadas para montar um cladograma juntamente com sequências representativas das famílias 47 e 38 das glicosídeo hidrolases, afim de tentar identificar com qual destas famílias as sequências mais se assemelham.

Na figura 72 A podemos identificar dois ramos monofiléticos com bootstrap 50 e 100 que se separam. Os dois ramos se diferenciam porque um deles agrupa as sequências da família 47 (ramo com bootstrap 100) e o outro as sequências correspondentes as da família 38 (ramo com bootstrap 50), ficando a sequência de *Tenebrio molitor* (TmMan1) encontrada dentre as sequências da família 38. Este agrupamento da sequência de *Tenebrio molitor* juntamente com as sequências da família 38 nos leva a acreditar que ela pertence a esta família. A figura 72 A, mostrou que todas as nossas sequências, exceto o contig 6 e 7, pertencem à família 38. Algumas sequências (contigs 1, 2, 3, 5, 10, 11, 17, 18), por serem muito pequenas, não apareceram no cladograma.

O cladograma da figura 72 B foi construído utilizando as sequências obtidas através do pirossequenciamento de *Tenebrio molitor* juntamente com sequências somente da família 38 com algumas sequências descritas como sendo lisossomais e de Golgi. Nesta figura, podemos observar que todas as sequências, exceto o contig 13, 4 e 7 que não possuem peptídeo sinal, reuniram-se em um único grupo monofilético. Este cladograma da figura 72 B foi feito com a intenção de esclarecer a origem citológica das α -manosidases de *T.molitor*: lisossômica ou de Golgi, o que não fica tão claro por este cladograma.

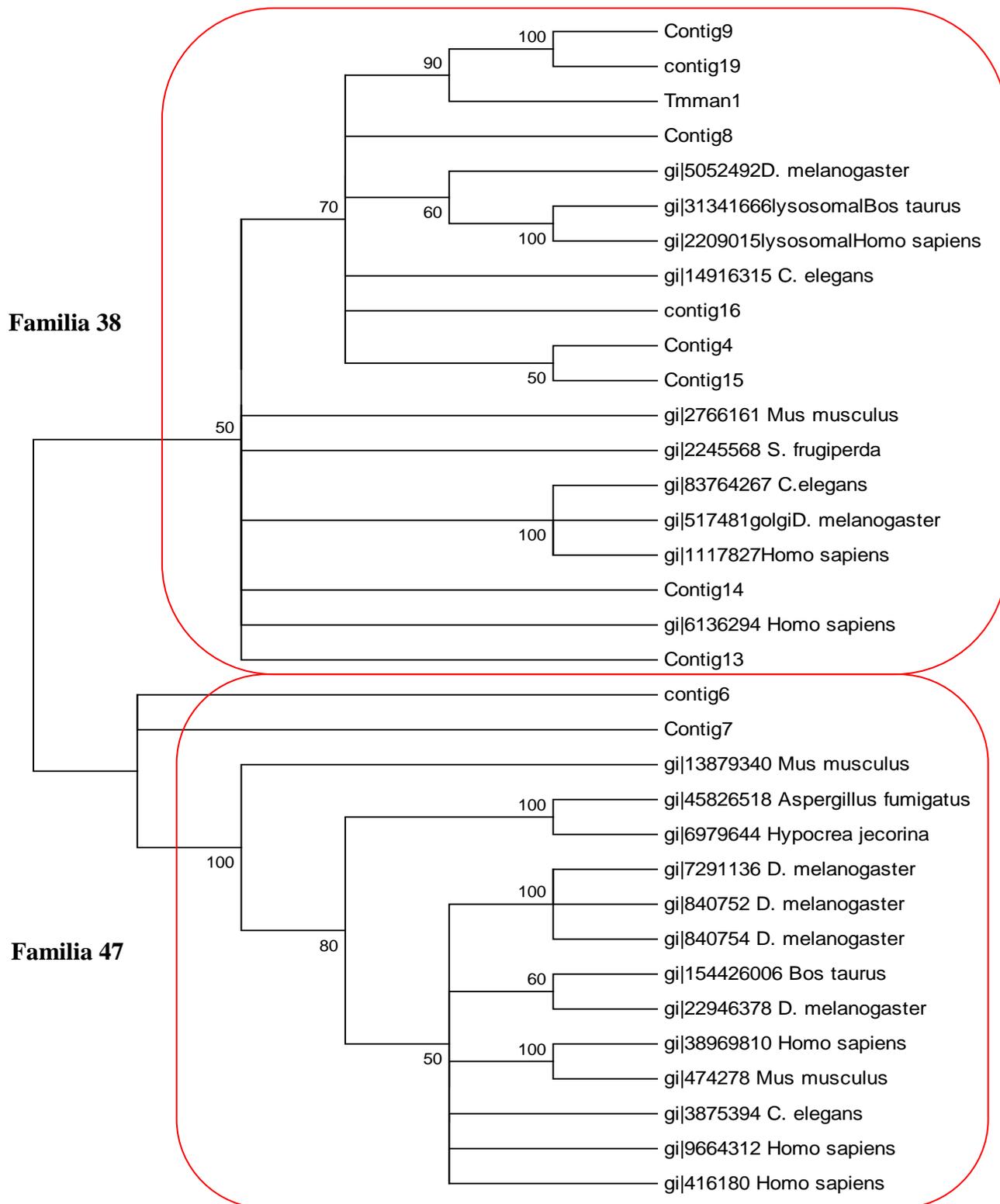


Figura 72 A: Cladograma de sequências de α -manosidases obtidas através do pirossequenciamento do intestino médio de *Tenebrio molitor* juntamente com sequências representativas das famílias 38 e 47 das glicosídeo hidrolases. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor-joining (NJ). Os números de acesso destas sequências encontram-se na própria figura e os ramos foram estatisticamente suportados por análises de bootstraps (com corte de 50) baseado em 1000 réplicas.

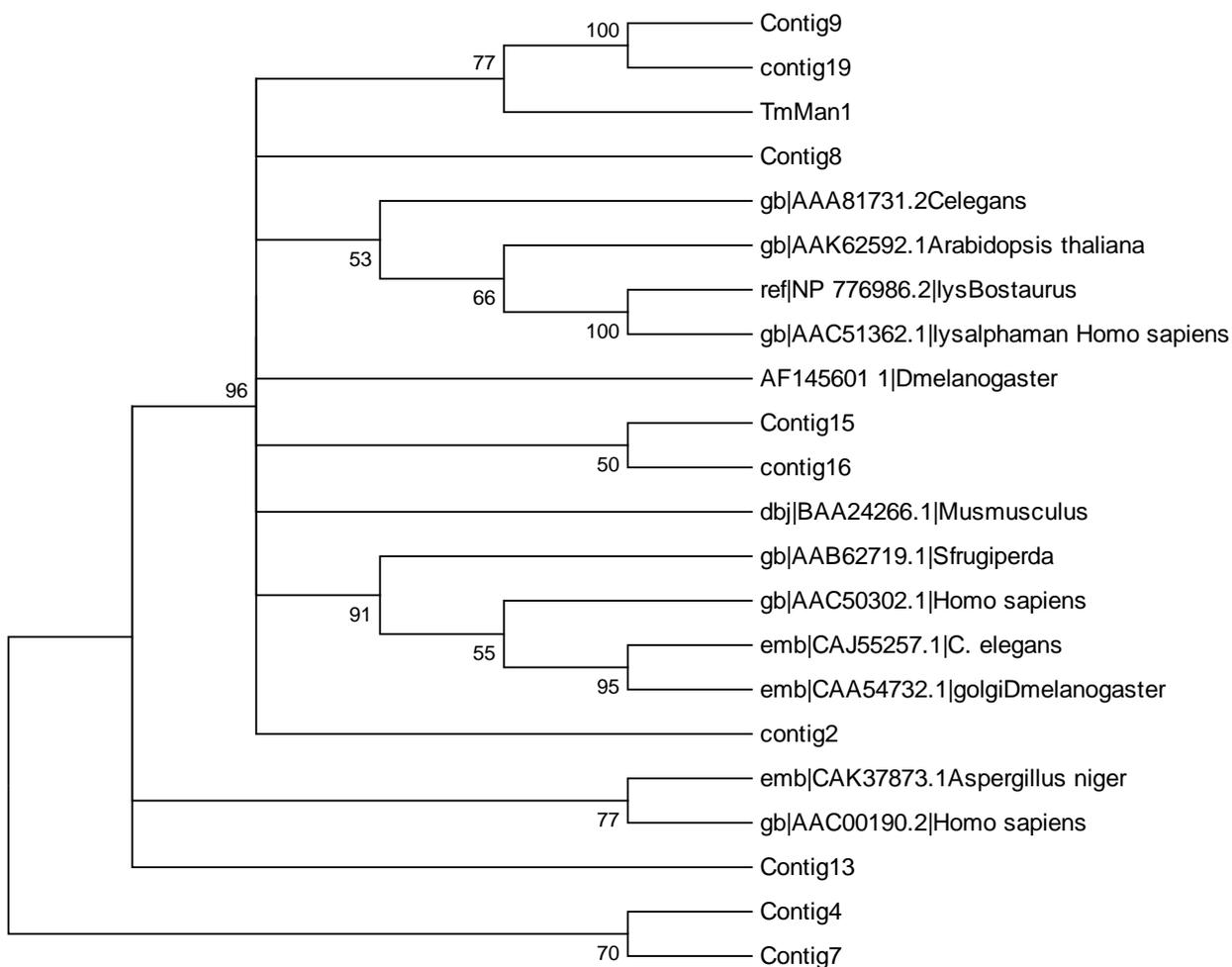


Figura 72 B: Cladograma de sequências de α -manosidases obtidas através do pirosequenciamento do intestino médio de *Tenebrio molitor* juntamente com sequências representativas das famílias 38 e 47 das glicosídeo hidrolases. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os números de acesso destas sequências encontram-se na própria figura e os ramos foram estatisticamente suportados por análises de bootstraps (com corte de 50) baseado em 1000 réplicas.

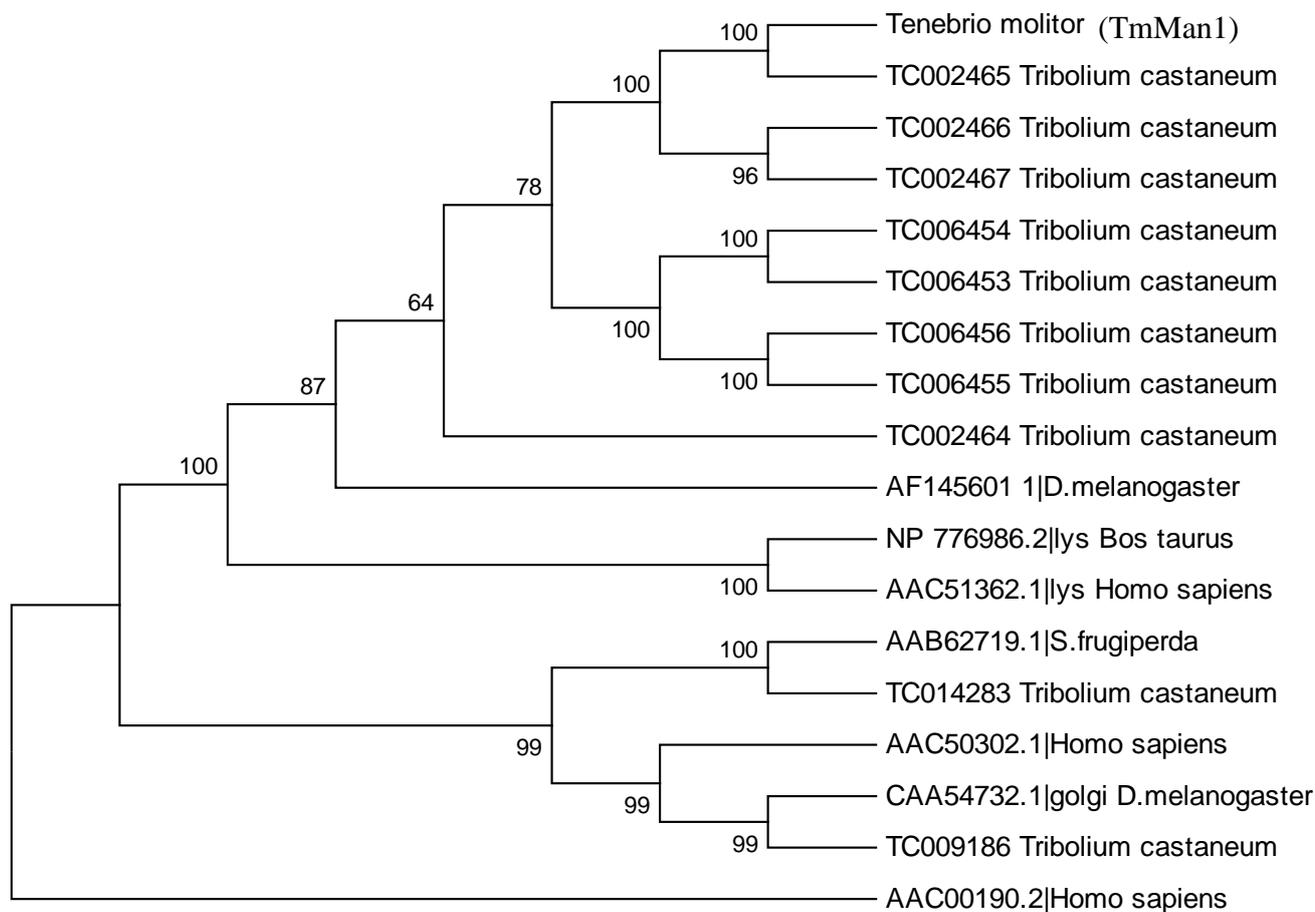


Figura 73: Cladograma de sequências de α -manosidases depositadas no CAZy juntamente com todas as α -manosidases de *Tribolium castaneum* e a sequência de *Tenebrio molitor*. Foi utilizado o software MEGA 4 e a filogenia verificada através do neighbor- joining (NJ). Os números de acesso destas sequências encontram-se na própria figura.

A figura 73 mostra um cladograma que se divide em dois ramos monofiléticos: um com bootstrap 100 que possui a maioria das sequências de *Tribolium castaneum*, algumas sequências descritas como lisossomais, juntamente com a sequência de *Tenebrio molitor*. O outro ramo possui bootstrap 99, onde se encontram várias sequências de *Tribolium castaneum*, 2 sequências de *Homo sapiens*, 1 de *S. frugiperda* e 1 representante das α -manosidases de Golgi de *D. melanogaster*. O principal motivo para separação entre grupos monofiléticos é a suposta origem citológica da enzima: lisossômica ou de Golgi.

A sequência obtida de *Tenebrio molitor* (TmMan1) primeiramente ficou no ramo da família 38 das glicosídeo hidrolases (figura 72 A) e num segundo cladograma se agrupou com as enzimas lisossomais do Diptera *D. melanogaster*

(figura 73). Desta forma, podemos dizer que a α -manosidase purificada de *Tenebrio molitor* e identificada durante o pirosequenciamento, é uma enzima da família 38 das glicosídeo hidrolases de origem lisossomal e que a separação entre enzimas de Golgi e lisossômicas deve ser anterior à separação das ordens Diptera e Coleoptera na evolução.

Foram escolhidas 6 sequências para fazermos uma análise das expressões destes contigs nos diversos tecidos do inseto em estudo utilizando RT-PCR (figura 74).

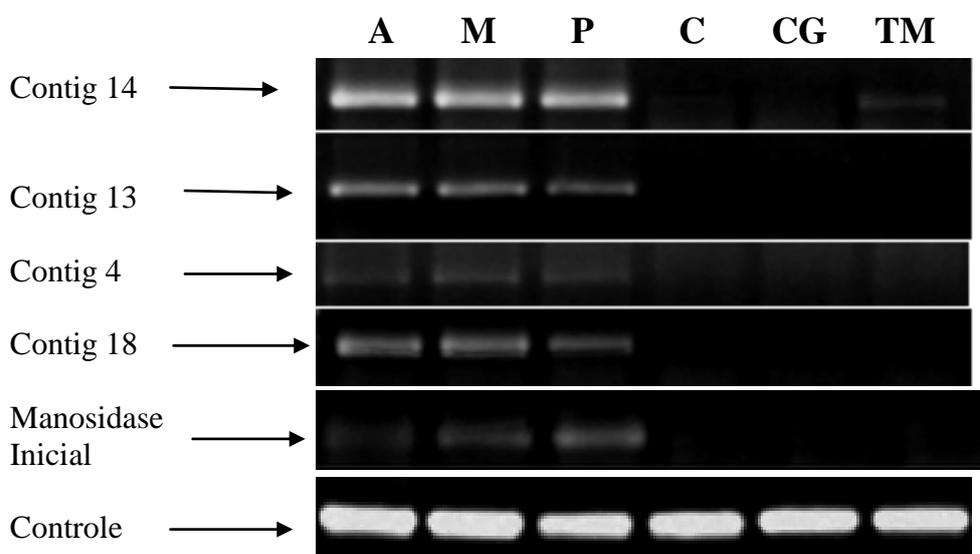


Figura 74: Padrão de expressão dos mRNA de α -manosidasas em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de malpighi. O controle é a actina de *T.molitor*.

Estes 6 contigs escolhidos são os mais expressos no tubo digestivo de *Tenebrio molitor* e a partir da figura 74 podemos verificar que estão sendo sintetizados somente nas regiões correspondentes ao tubo digestivo do inseto (A, M e P), exceto o contig 14 que inclui o túbulo de Malpighi. O contig 9 não foi amplificado e foi descartado. Desta forma, das α -manosidasas encontradas neste transcrito do tubo digestivo as que distribuem similarmente ao contig 12 (manosidase inicial) deve ser realmente enzima digestiva, as demais talvez sejam enzimas de processamento, como as α -manosidasas de Golgi e de Retículo endoplasmático.

4.5.1.2. Estudo da especificidade por substrato das α -manosidase de *Tenebrio molitor*

Duas α -manosidases (Man1 e Man2) foram purificadas do conteúdo intestino médio de *Tenebrio molitor* utilizando métodos cromatográficos de acordo com os procedimentos descritos na dissertação de mestrado de Nathália Ramalho Moreira depositada no banco de dissertações da USP e dados mostrados no item 4.5.1.1. Para uma melhor classificação das α -manosidases digestivas de *Tenebrio molitor* foram testados 3 substratos: 2 α -manobiose, 3 α -manobiose, 6 α -manobiose como descrito no item 3.24. Foram realizados ensaios enzimáticos incubando a enzima com diferentes concentrações dos substratos durante um único tempo.

Após o tempo de incubação do experimento, o ensaio foi revelado com o reativo DNS. Este reagente possui um limite de detecção alto e isto complicou um pouco os experimentos, uma vez que os substratos são caros, tínhamos pouco material e o máximo de diferença entre o branco de substrato e o valor de absorvância do ensaio seria o dobro.

Devido ao fato destes substratos serem moléculas redutoras foi feito uma curva padrão de cada substrato nas concentrações utilizadas durante o ensaio.

Montamos inicialmente o experimento com algumas concentrações de substrato até um máximo de 30 mM. Após plotar os dados no gráfico de Michaelis-Menten e fazer as análises, verificamos que estávamos trabalhando na faixa linear do plote de Michaelis-Menten, o que significa que as inclinações são proporcionais a $V_{\text{máx}}/K_m$. Os resultados estão apresentados nas figuras 75, 76 e 77 e, sumarizados na tabela 20.

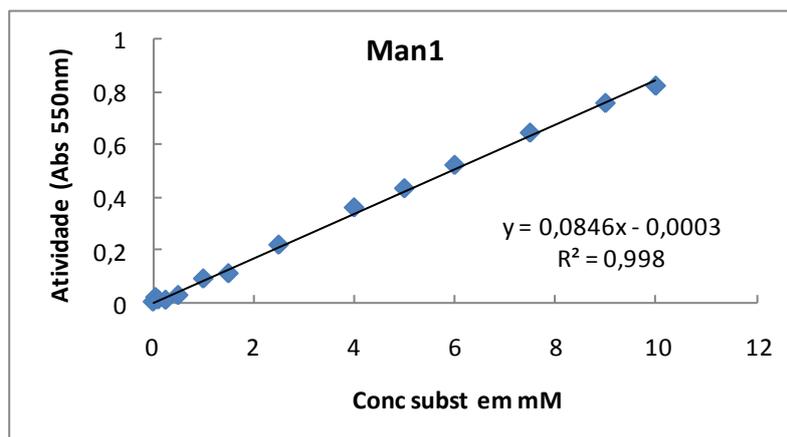
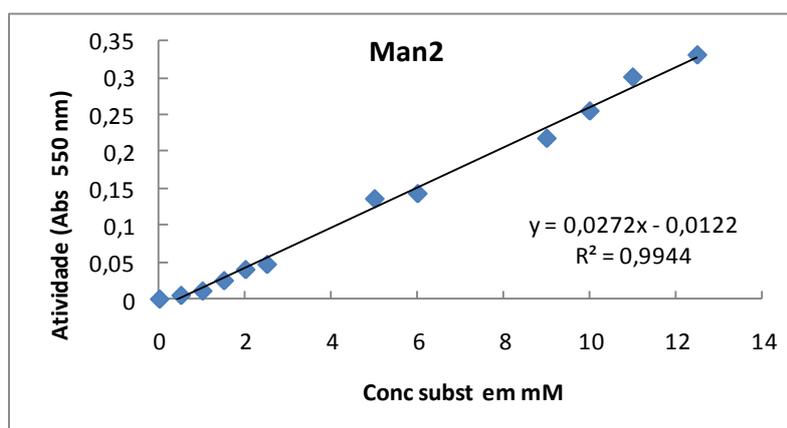
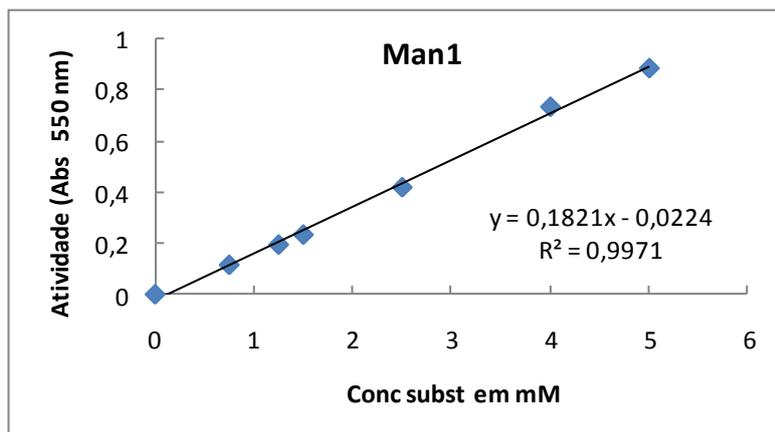
A**B**

Figura 75: Gráficos plotados após ensaios com o substrato 2 α -manobiose com as enzimas Man1 (A) e Man2 (B) purificadas por métodos cromatográficos do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

A



B

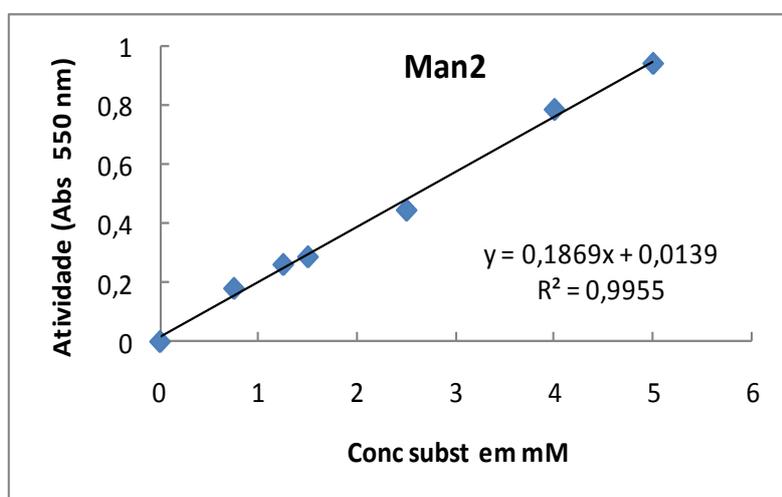
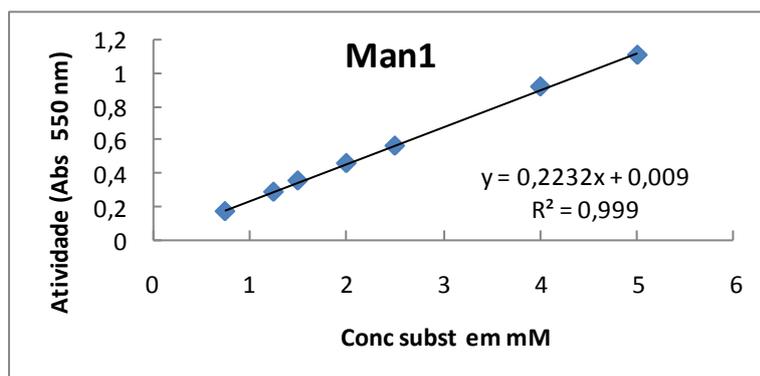


Figura 76: Gráficos plotados após ensaios com o substrato 3 α -manobiose com as enzimas Man1 (A) e Man2 (B).

A



B

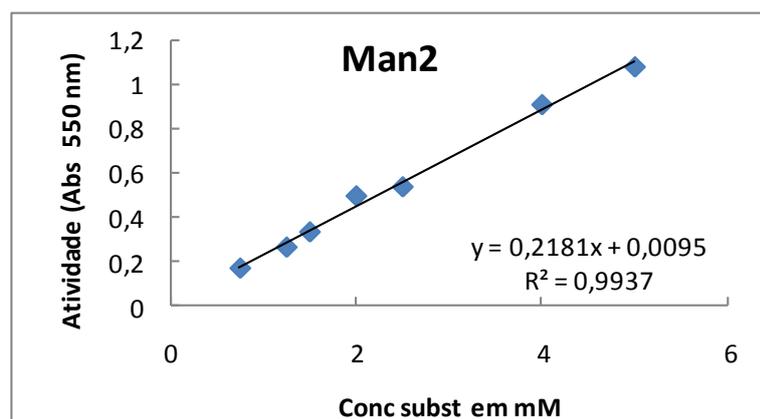


Figura 77: Gráficos plotados após ensaios com o substrato 6 α -manobiose com as enzimas Man1 (A) e Man2 (B).

Tabela 20: Especificidade relativa a diferentes substratos da Man1 e Man2.

Substrato	V _{máx} /K _m relativo	
	Man1	Man2
2 α -manobiose	100 \pm 1	50 \pm 2
3 α -manobiose	24,4 \pm 0,5	100 \pm 3
6 α -manobiose	34,1 \pm 0,5	86,7 \pm 3,5

Foram feitos os cálculos para verificarmos sobre qual substrato as α -manosidases (Man1 e Man2) seriam mais ativas e assim poderíamos classificá-las em algum grupo dentro das famílias das glicosídeo hidrolases.

De acordo com a tabela acima podemos verificar que a Man1 é ativa preferencialmente sobre o substrato 2 α -manobiose, o qual possui a ligação α -1,2 entre duas manoses. Logo poderíamos classificá-las como sendo da família 47 das glicosídeo hidrolases (<http://www.cazy.org/GH47.html>).

A enzima Man2 se mostrou ativa preferencialmente sobre os substratos 3 α -manobiose (ligação α -1,3) e 6 α -manobiose (ligação α -1,6). Hidrolisando estes dois tipos de ligações, esta enzima é considerada menos seletiva ao tipo de ligação presente no substrato. Isso significa que podemos classificá-la como sendo da família 38 das glicosídeo hidrolases. Já foi demonstrado (dissertação de Nathália Ramalho Moreira) que Man2 é melhor inibida por Swainsonina, um inibidor típico desta família 38.

O fato de Man2 hidrolisar preferencialmente as ligações α 1-3 e α 1-6 entre duas manoses e da sequência de uma α -manosidase (TmMan1) obtida da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* ter sido agrupada com as lisossomais dentro da família 38, como exposto no item 4.5.1.2, nos leva a concluir que a sequência TmMan1 obtida por métodos de biologia molecular provavelmente é a Man2 purificada por métodos cromatográficos diretamente do inseto. Esta correlação entre sequência de cDNA e a enzima purificada do inseto nos leva a classificar e caracterizar a primeira α -manosidase digestiva de insetos.

Além de todas estas evidências de que a sequência TmMan1 obtida de α -manosidase corresponde a Man2 purificada por métodos cromatográficos do inseto resolvemos desenhar dois peptídeos. Estes peptídeos foram acoplados a uma proteína chamada KLH para produção de anticorpos anti-peptídeo. Este acoplamento é necessário porque só o peptídeo sozinho gera poucos epitopos e desta forma se torna pouco imunogênico.

Estes peptídeos foram escolhidos através do software Bioedit no setor de análise de proteína com o programa “Hopp e Woods sacale mean hidrophilicity” com o auxílio do professor Doutor Ariel Mariano Silber do ICB-USP. Foram escolhidas regiões hidrofílicas porque são regiões expostas ao meio e desta maneira devem estar na superfície da proteína, regiões com mais que 10 aminoácidos e que no blast

o “Best hit” era uma α -manosidase. A figura 78 foi retirada do Bioedit e demonstra as regiões hidrofílicas da sequência da α -manosidase de *Tenebrio molitor*.

Os peptídeos desenhados para síntese química para depois serem injetados no coelho situam-se nas regiões dos aminoácidos 349 a 370 e 373 a 393 sendo as suas sequências de resíduos: ISDGVGKEVVSKFSTSLETNG para o primeiro peptídeo e TDSNGREVLQRTRNSRPDYDY para o segundo peptídeo. O círculo na figura 13 corresponde a região onde os peptídeos foram desenhados.

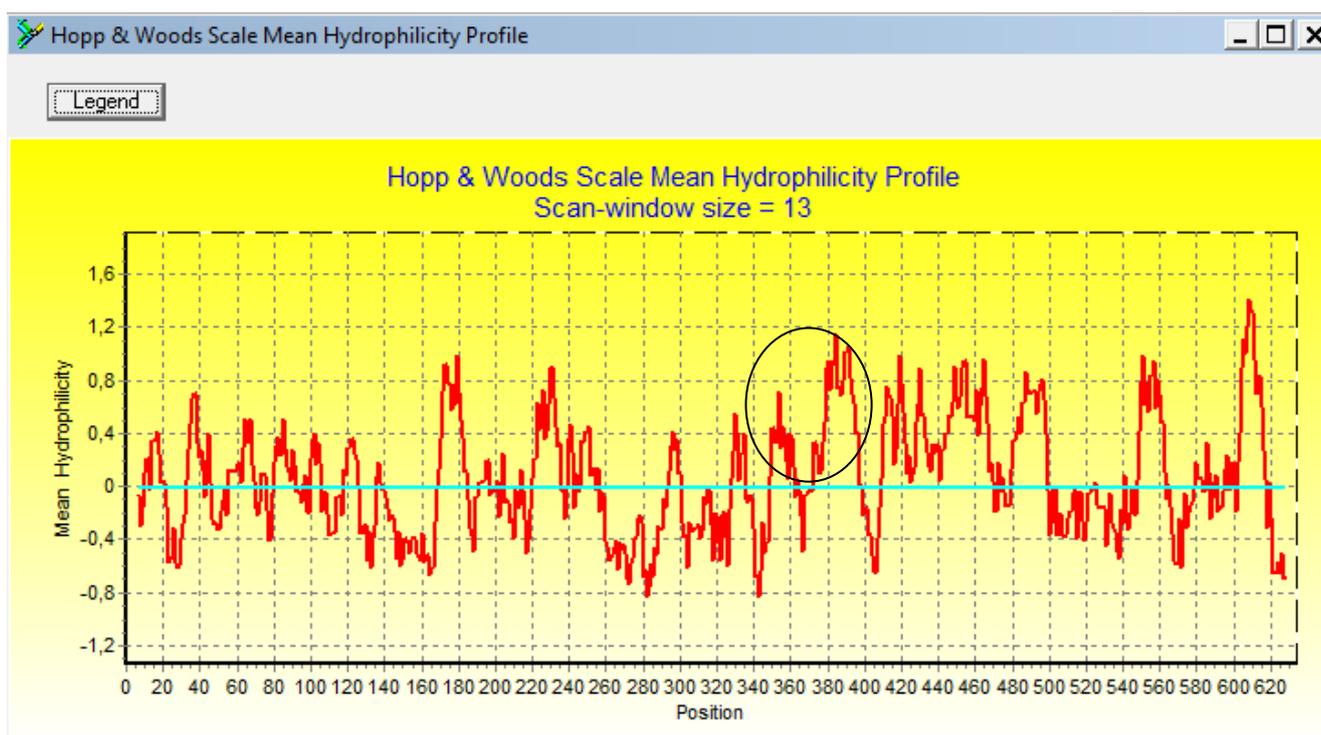


Figura 78: Perfil de hidrofobicidade da sequência da α -manosidase de *Tenebrio molitor*. No eixo x temos os números dos aminoácidos e no eixo y o nível de hidrofobicidade. O círculo corresponde à região onde os dois peptídeos foram desenhados.

4.5.1.3. Teste da eficiência do anticorpo produzido contra α -manosidase e Imunocitocalização

Os anticorpos foram gerados em coelhos contra os peptídeos e apenas um deles reconheceu as α -manosidasas purificadas de *Tenebrio molitor*. Na figura 79 temos a foto do western blot realizado para confirmação da especificidade do anticorpo.

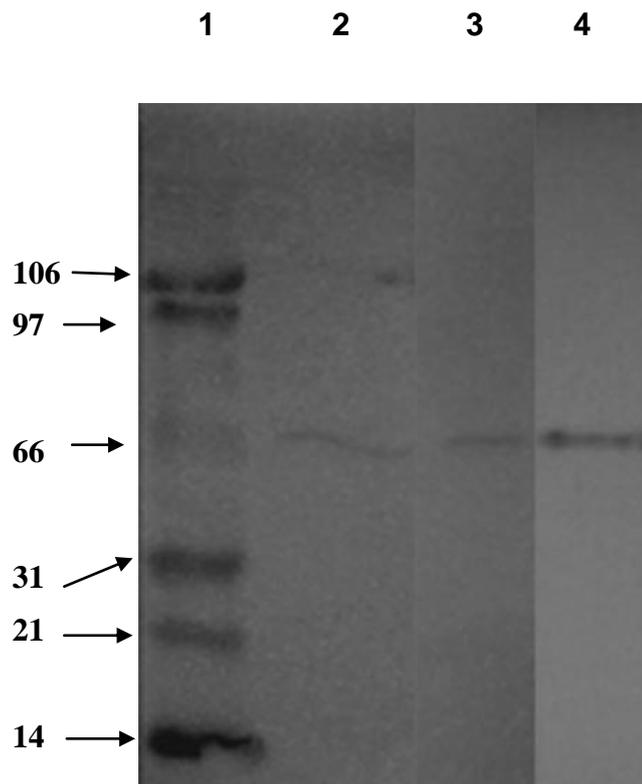


Figura 79: Western blot após SDS-PAGE 12% Raias: 1-Padrão de massa molecular; 2-conteúdo luminal do intestino de *Tenebrio molitor*; 3- tecido epitelial do tubo digestório e 4- Man2 purificada do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

Não se sabia se este anticorpo anti-peptídeo iria reconhecer a enzima Man2 purificada e por isso foi feito um western blot para testar o anticorpo. Houve o reconhecimento de uma banda única de aproximadamente 70 KDa tanto no conteúdo luminal, que corresponde a enzima secretada no lúmen do tubo digestório, no tecido epitelial e na enzima Man2 purificada, todos com a mesma migração. Isto fortalece a hipótese da enzima Man2 ser a sequência obtida.

Após este reconhecimento da enzima no tecido do inseto, foi possível realizar experimentos iniciais de imunocitocalização, como podemos visualizar na figura 80 abaixo.

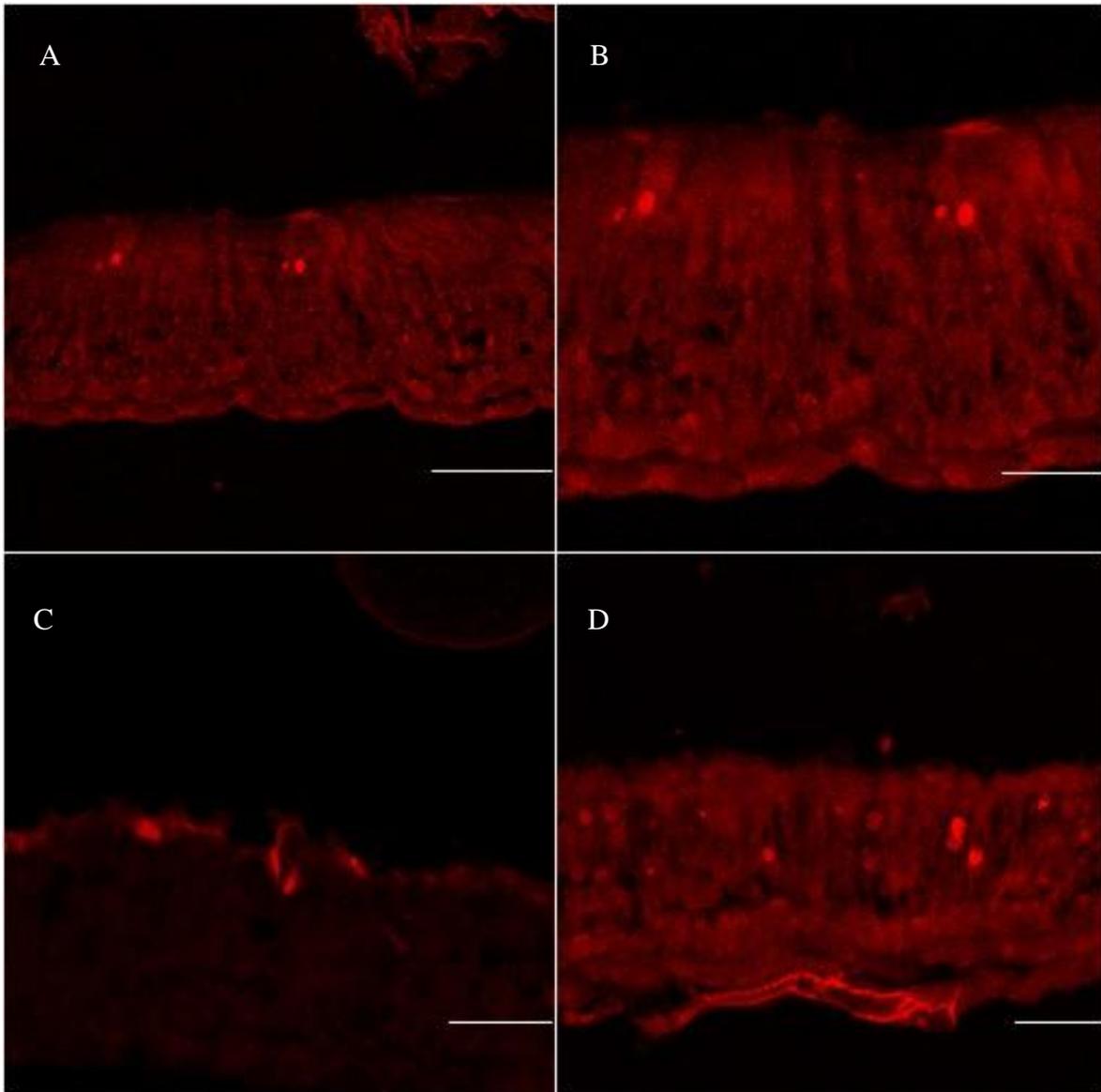


Figura 80: Visualização da imunofluorescência de α -manosidase no intestino médio de *T.molitor*. (B) é um aumento de (A) e (A-B-D) são fotos do intestino médio anterior onde podemos visualizar células individuais fluorescendo. (C) intestino médio anterior, mostrando células com fluorescência concentrada no citoplasma apical. Barras: 25 μ m (A), 15 μ m (B), 20 μ m (C,D).

De acordo com Ferreira et al.(1990), em larvas de *Tenebrio molitor*, estudos de fracionamento celular revelaram que enzimas digestivas são encontradas dentro de vesículas secretoras. Estes dados favorecem uma rota exocítica para a secreção de enzimas digestivas em larvas de *T.molitor*, embora as proteínas secretadas apocrinamente possam ser também transportadas dentro de células (vesículas que fundem entre si, gerando o aposomo, corpo formado por muitas vesículas que é eliminado junto com o ápice). Cristofolletti et al (2001), utilizando anticorpos contra duas proteínas de *Tenebrio molitor* (α -amilase e tripsina), revelou que no intestino

médio anterior e médio existem células com extrusões apicais dispersas em um padrão regular, caracterizando a secreção apócrina (parte apical da célula é descarregado no lúmen) para a enzima α -amilase. A enzima tripsina por sua vez é secretada na região posterior do intestino médio, através de vesículas exocíticas.

Como a enzima α -manosidase de *T.molitor* possui uma distribuição onde a maior parte desta enzima encontra-se na região anterior do intestino médio, podemos supor que a sua rota de secreção seja a mesma da α -amilase, isto é, através de secreção apócrina. Nesse caso, ocorre uma desorganização do citoplasma apical, perda de organelas, assim como o desaparecimento das microvilosidades na região da extrusão, antes do ápice ser descarregado no lúmen, sem morte celular. Para verificar se a enzima α -manosidase seria secretada desta mesma maneira, foi realizado o experimento de imunofluorescência para ver onde o anticorpo contra esta enzima iria marcar.

Observando a figura 80 podemos ver que o anticorpo marcou vesículas de secreção na região anterior do intestino médio, mas nesta figura ainda não era possível visualizar os aglomerados de vesículas característico das secreções apócrinas. Desta forma, novas imagens foram realizadas à procura destas evidências como mostrado nas figuras a seguir.

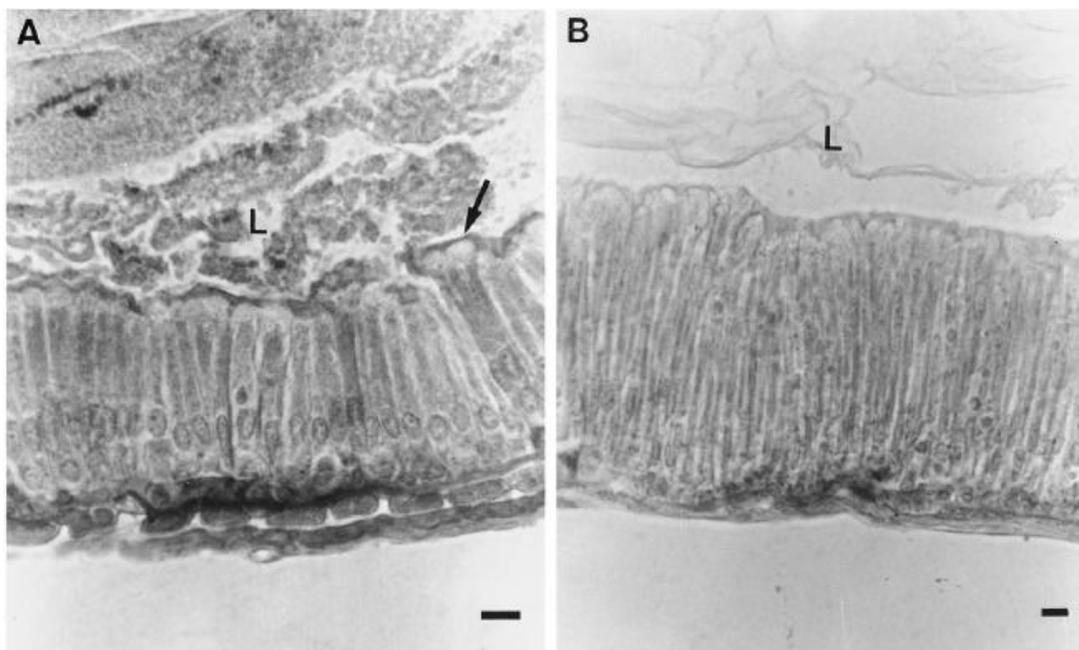


Figura 81: Células do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor*. (A) células do intestino médio anterior. Note extrusão apical (setas). (B) Células do intestino médio posterior. Note que estas células são maiores e mais finas que as células do intestino médio anterior. L, lúmen. Barra: 10 μ m. Retirado de P.T. Cristofolletti et al.2001.

A figura 81 foi colocada para exemplificar e demonstrar como é um epitélio deste tipo de inseto e como podemos visualizar as secreções apócrinas por meio de micrografias. Desta maneira, podemos agora analisar as micrografias eletrônicas obtidas após as marcações com o anticorpo anti- α -manosidase.

A figura 82 mostra a imunocitocalização desta enzima nas regiões anterior e média (figura 82 A) e na região posterior (figura 82 B). De acordo com os resultados obtidos através da imunocitocalização da α -manosidase podemos comparar a secreção desta enzima com a de outras enzimas que também possuem este tipo de secreção apócrina, como é o caso da α -amilase de *Tenebrio molitor* descrita por Cristofolletti et al. (2001). Com base nestes dados da literatura e observando a figura 82 podemos descrever que a α -manosidase é detectada em vesículas secretoras grandes (Sv) perto do ápice da célula (figura 82 A), e, aparentemente, no processo de ser extruída a partir da célula devido a marcações nas microvilosidades (Mv) da região anterior e média do intestino médio.

Com base nas imagens mostradas e as comparações com dados da literatura, podemos concluir que a α -manosidase de *T.molitor* é uma enzima secretada apócrinamente através das regiões anterior e média e, isto é mostrado claramente através da imagem 82 A, onde podemos ver a confluência de vesículas com marcações positivas com o anticorpo anti- α -manosidase, característico deste fenômeno da secreção apócrina, o que não ocorre na região posterior do intestino médio.

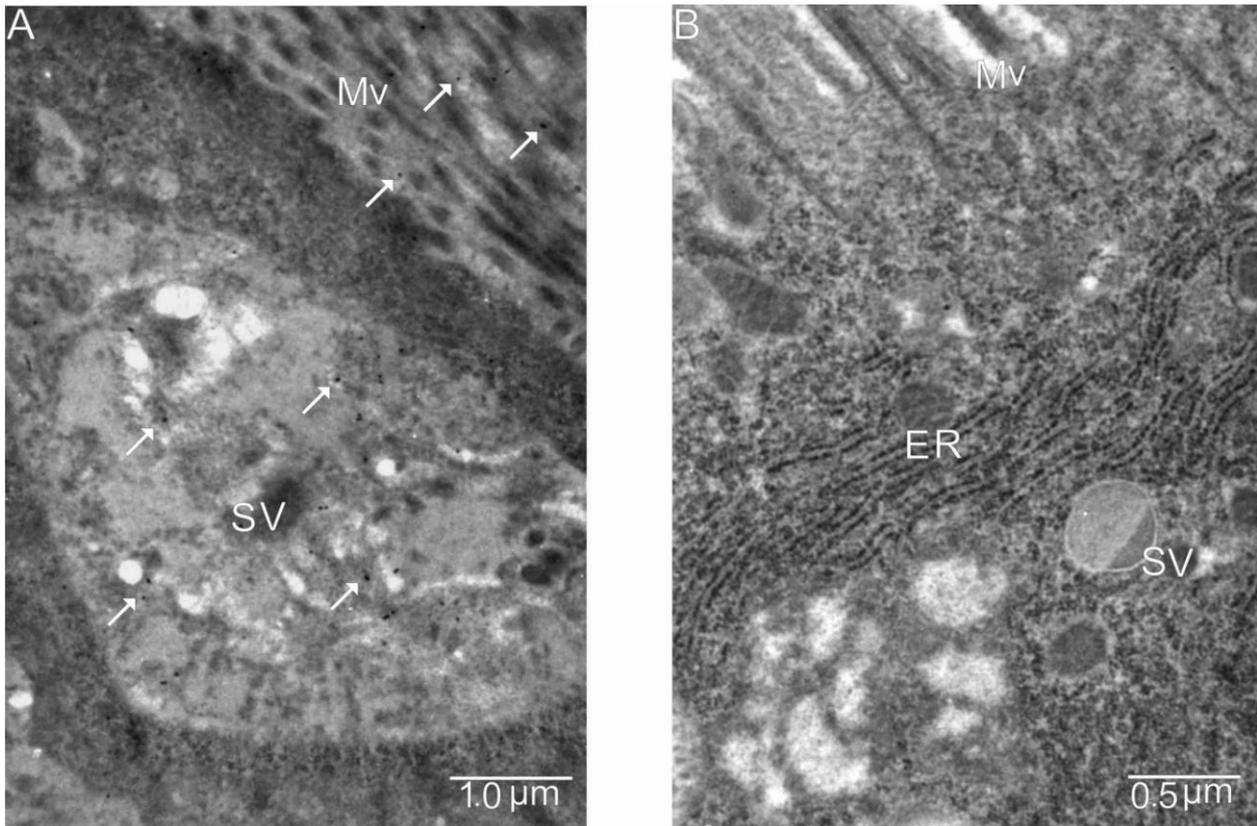


Figura 82: Imunomarcção de α -manosidases em células do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor*. (A) células do intestino médio anterior. Notar marcações (setas) no interior de vesículas grandes (Sv), que é na realidade um aposomo. Notar também marcações fora da célula, nas microvilosidades (Mv). (B) células do intestino médio posterior. Notar ausência de marcações. ER, retículo endoplasmático; Mv, microvilosidades; Sv, vesícula secretora.

4.5.2. α -Glicosidase

α -Glicosidases (EC 3.2.1.20) catalisam a hidrólise de resíduos de glicose terminais, não redutores e ligados por ligação α -1,4 em aril-glicosídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos com eficiência variada.

Nosso laboratório possui dados não publicados relacionados à α -glicosidases de *T.molitor*. Dados relacionados à distribuição das atividades de α -glicosidases demonstram que este inseto, assim como muitos outros insetos, possui α -glicosidases solúveis (mais abundante) e de membrana como mostrado na tabela 21 B. Estas α -glicosidases solúveis em *T.molitor* predominam na região anterior e média do intestino médio segundo Ferreira et al, (1990). Resultados obtidos com a purificação da enzima solúvel em *T.molitor* descrevem a presença de duas α -

glicosidases solúveis separadas cromatograficamente como mostrado na figura 83 e algumas de suas propriedades descritas na tabela 21 A.

A α -glicosidase de membrana de *T.molitor* não foi purificada e por isso não foram realizados ensaios enzimáticos e nem testes que descrevessem o comportamento desta enzima no intestino deste inseto.

Tabela 21: (A) Resumo das Propriedades analisadas de duas α -glicosidases solúveis purificadas do intestino médio de *T.molitor*. PI: ponto isoelétrico; $T_{1/2}$: Meia vida. (resultados não publicados do nosso laboratório) e (B) Distribuição das α -glicosidases de *T.molitor* sendo EpV- epitélio do ventrículo, S_{MP} -fração solúvel da membrana peritrófica e S_{TDT} fração solúvel do tubo digestivo total.

(A)

	α -gli 1	α -gli 2
Massa molecular (MM)	72 KDa *	95 KDa *
PI	4,1	5,4
pH ótimo	5,8	5,8
$T_{1/2}$ a 50°C	5 min	80 min
Maioreficiência catalítica (Kcat/Km)	pNP- α -glicosídeo	maltotriose

*As enzimas foram submetidas à eletroforese em géis de diferentes concentrações de poliacrilamida, resultando em diferentes migrações relativas (Rf) e o valor de massa molecular foi calculado pelo plote de Ferguson (Hames & Rickwood, 1990).

(B)

	Atividade específica	mU/animal
EpV	30,4 mU/mg	0,8
S_{MP}	140,9 mU/mg	43,3
S_{TDT}	151,2 mU/mg	85,3

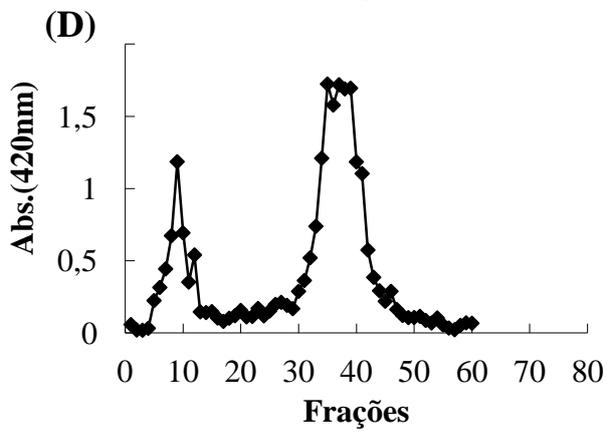
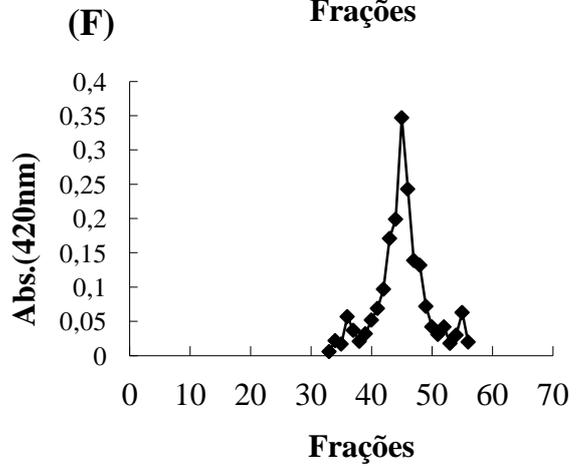
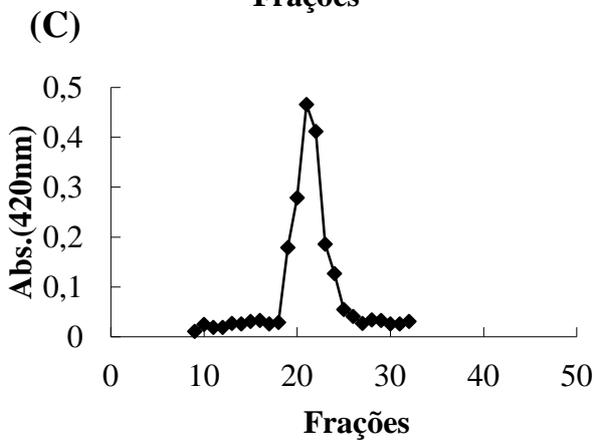
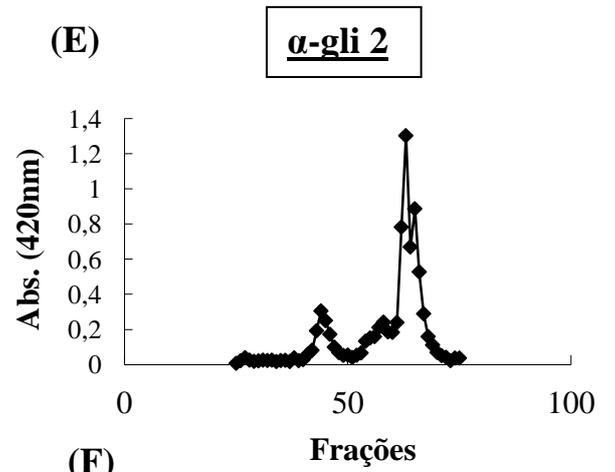
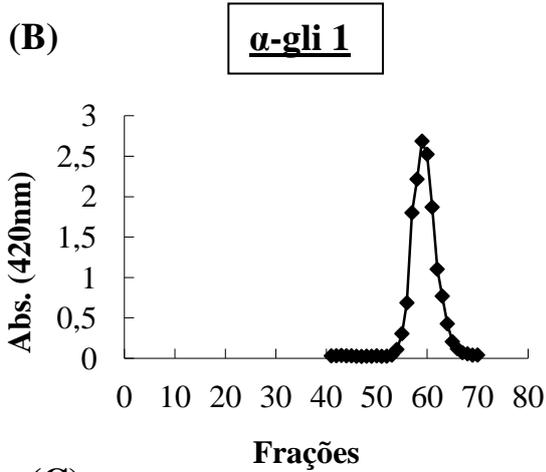
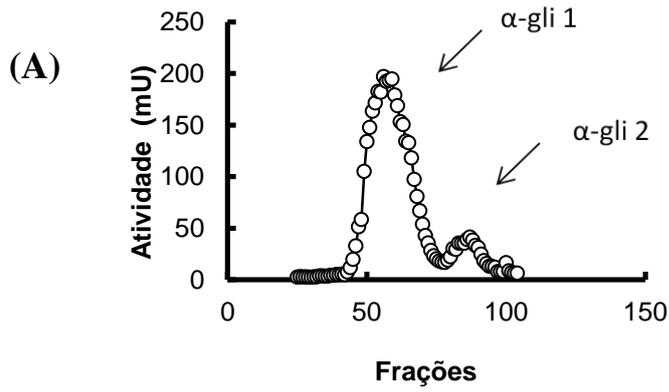


Figura 83: Passos de purificação das α -glicosidases solúveis a partir do intestino médio de *Tenebrio molitor*. (A)-Eletroforese preparativa (Prepcell da BioRad) do conteúdo do intestino médio de *T.molitor* separando em dois picos com atividade sobre o substrato p-nitrofenil- α -D-glicosídeo. (B), (C) e (D) são respectivamente os passos de troca iônica em uma coluna MonoQ, uma hidrofóbica Octil Sepharose e por último uma filtração em gel em coluna Superose 12 (Pharmacia) do pico 1 (α -gli1). (E) e (F) são os passos de purificação da α -gli2 respectivamente com uma troca iônica MonoQ e em seguida uma hidrofóbica octil Sepharose.

Foram encontradas 21 sequências no transcriptoma de *T.molitor* que correspondiam a α -glicosidases. As α -glicosidases fazem parte da família das glicosídeo hidrolases (GH) e podem ser classificadas em duas famílias: famílias 13 ou 31 das GH, de acordo com o banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>). Destas 21 sequências encontradas, após curagem, restaram 12 sequências, que foram comparadas. Todas as apresentadas nessa tese tinham identidade menor que 90%.

Esses contigs selecionados foram submetidos à Blast X no banco de dados não redundante do NCBI, o que permitiu verificar se a anotação da sequência estava correta e se a sequência estava completa ou não dentre outros parâmetros resumidos na tabela 22.

Das 12 sequências curadas 2 podem ser proteínas de membrana (contigs 6 e 9), 6 citossólicas (contigs 4, 2, 5, 10, 8 e 11), 3 secretadas (contigs 1, 3 e 7) e uma incerta (contig 12). Esta classificação baseia-se no seguinte: (a) as sequências secretadas/lisossomais possuem peptídeo sinal, mas não tem alça transmembrana e nem âncora de GPI, (b) as proteínas tidas como citossólicas são as que não possuem peptídeo sinal e nem alça transmembrana e, (c) as proteínas de membrana são aquelas que possuem peptídeo sinal juntamente com alça transmembrana ou com âncora de GPI. A coluna “natureza” da tabela 6 foi construída com base nessas considerações.

Tabela 22: Resumo das análises realizadas com as 12 α -glicosidases obtidas no transcriptoma do intestino médio da larva de dos *T.molitor*. Sequências de α -glicosidases encontrados a partir do pirosequenciamento dos RNAs mensageiros do intestino médio de *T.molitor*. A presença de peptídeo sinal, alça transmembrana e âncora de GPI também são apresentados. **PS**: peptídeo sinal. **AT**: alça transmembrana. **OBS**: Sequência completa ou em branco são as sequências parciais, **N-Glic** são N-glicosilações e **O-Glic** são O-glicosilações. **M**: membrana; **C**: citosólica e **S**: secretada. **Todo**: expressa em todos os tecidos, **A**: anterior, **M**: médio, **P**: posterior e **T**: túbulos de malpighi. **A, B, C, D, E e F** são as classes estabelecidas neste relatório para os diferentes tipos de α -glicosidases encontradas no transcriptoma de *T.molitor* (ver texto)

Contig	Nº de AA	Anotação NR	Espécie	Nº de reads	Natureza	Sítios de expressão	Classe	PS	PI/MW	âncora GPI	O-glic	N-glic	AT	OBS
9	492	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	0*	M	Todo	B	sim	7.27 / 54438.16	Não	não	6	Sim	
4	401	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	0*	C	Todo	B	não	8.03 / 44683.38	Não	não	5	não	
2	218	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	0*	C	A M	A	não	5.22 / 25112.73	Não	não	não	não	
12	874	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	95	?	A M P T	B	não	4.77 / 99569.22	Não	1	12	sim	Completa
5	536	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	58	C	Todo	C	não	4.55 / 60958.06	Não	não	11	não	Completa
10	739	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	11	C	Todo	F	não	6.83 / 84836.12	Não	não	12	não	
1	906	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	40	S	Todo	A	sim	5.61 / 100374.80	Não	não	18	não	Completa
8	739	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	100	C	A M	A	não	4.43 / 83098.39	sim	2	0	não	Completa
6	636	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	100	M	A M P	D	sim	4.16 / 67773.22	sim	não	9	não	Completa
11	827	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	9	C	A M P	A	não	4.69 / 94198.74	Não	1	13	não	Completa
3	838	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	69	S	A M P	A	sim	4.46 / 93932.32	Não	não	3	não	Completa
7	573	α -glicosidase	<i>T.castaneum</i>	33	S	A M P	E	sim	4.28 / 62898.93	Não	não	11	não	Completa

*Genes de expressão variada. Não foram encontrados no transcriptoma do tubo digestivo inteiro, embora tenham ocorrido no transcriptoma da região anterior do tubo digestivo.

Para confirmar as regiões de expressão dos transcritos correspondentes a α -glicosidasas foi feito RT-PCR semi-quantitativo de todos os 12 contigs similares a α -glicosidasas e foi gerada a figura 84 abaixo.

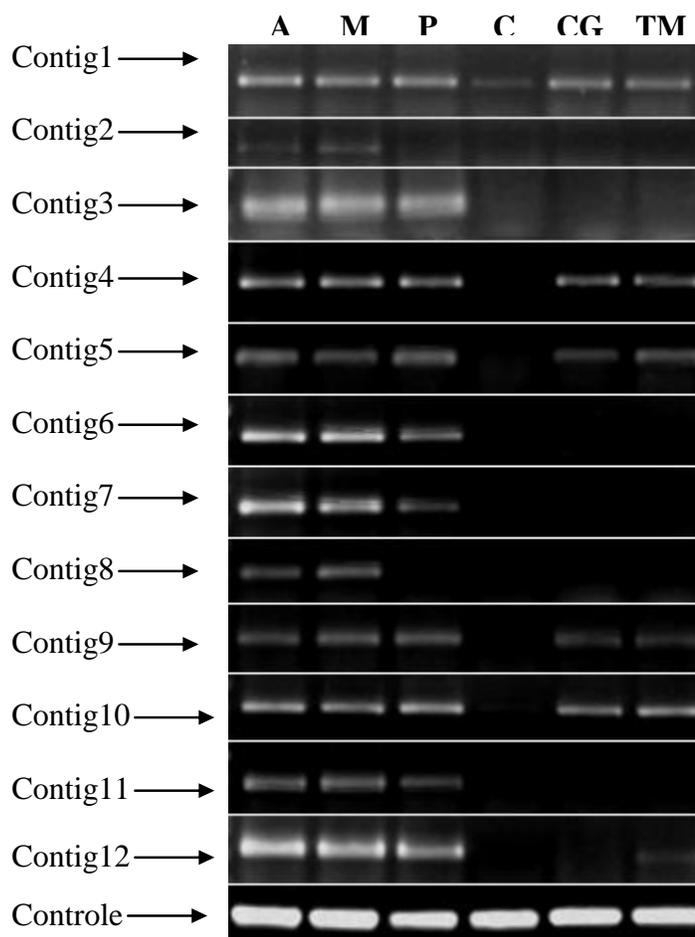


Figura 84: Padrão de expressão dos mRNA de α -glicosidasas em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor* como mostrado por RT-PCR semi-quantitativo. Quantidades iguais (5 ng) de RNA total de diferentes tecidos foram extraídos e usados como molde para a reação da transcriptase reversa. A, intestino médio anterior; M, intestino médio médio; P, intestino médio posterior; C, carcaça; CG, corpo gorduroso; TM, túbulos de malpighi. O controle é a actina de *T.molitor*.

Os sítios de expressão de mRNAs dos contigs de α -glicosidasas analisados até o momento são visualizados na figura 18 e podemos concluir que os contigs 1, 4, 5, 9, 10 e 12 são contigs que possuem sua expressão em outros tecidos do inseto além do intestino médio. Os contigs 3, 6, 7 e 11 são contigs que possuem seus sítios de

expressão nas três regiões do intestino médio. Os contigs que possuem uma expressão mais restrita são os contigs 2 e 8, os quais possuem expressão somente nas regiões anterior e média do intestino médio.

Algumas destas sequências não estão completas, mas utilizando o programa cds no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), que monitora domínios conservados, podemos distribuir os contigs de acordo com a sua similaridade a sequências depositadas nos bancos de dados que contêm domínios conservados encontrados em vários tipos de α -glicosidases. Desta maneira, conseguimos encontrar dentre as 12 sequências, 7 tipos de domínios de α -glicosidases diferentes. Destas 12 sequências, 11 delas são caracterizadas como α -glicosidases com mecanismo retentor da configuração do carbono anomérico do substrato durante a clivagem e apenas uma corresponde a enzima com um mecanismo inversor (contig 10). Esta sequência possui domínio similar a sequências da família 63 das glicosídeo hidrolases (GH63), onde se encontram enzimas com mecanismo inversor da configuração do carbono anomérico e possuem estrutura tridimensional $(\alpha/\alpha)_6$. Esta família 63 das GH é a primeira enzima da via de processamento de oligossacarídeos N-ligados e será denominada aqui como letra (F) das classes das α -glicosidases.

As outras 11 sequências são classificadas na família 31 das glicosídeo hidrolases sendo que, dentro desta mesma família, podemos subdividir as sequências de acordo com a sua função e especificidade, desta forma temos 5 tipos de α -glicosidases diferentes: (A) GH31_GANC_GANAB_alpha, (B) GH31_MGAM_SI_GAA, (C) Glucosidase II beta subunit-like protein, (D) GH31_glucosidase_KIAA1161 e (E) AmyAc_maltase.

Os contigs 1, 2, 3, 8 e 11 são classificados no grupo (A) das GH31_GANC_GANAB_alpha pertencentes a família 31 das glicosídeo hidrolases, grupo onde se encontram enzimas neutras do tipo alfa-glicosidase C (Ganc) e subunidade alfa heterodimérica da alfa-glicosidase neutra AB (GANAB). Ganc e GANAB são enzimas chave no metabolismo de glicogênio que hidrolisam ligações α -1,4 da extremidade não-redutora retirando resíduos de glicose do glicogênio, principalmente no retículo endoplasmático.

Os contigs 4, 9 e 12 são classificados como sendo do grupo (B) das GH31_MGAM_SI_GAA onde temos três tipos de enzimas intimamente relacionados: maltase-glicoamilase (MGAM), sacarase-isomaltase (SI), e ácido lisossomal alfa-glicosidase (GAA), também conhecida como ácido maltase. MGAM é uma das duas enzimas responsáveis por catalisar a etapa de liberação de glicose na digestão final do amido. SI está envolvido na digestão de amido na dieta e dissacarídeos importantes, como sacarose e isomaltose, enquanto GAA degrada glicogênio no lisossomo, clivando ligações glicosídicas alfa-1, 4 e alfa-1,6. MGAM e SI são ancorados na pequena borda em escova de células epiteliais intestinais. A arquitetura de domínio da GAA inclui um N-terminal TFF domínio (trefoil família factor), além do domínio GH31 catalítico.

O terceiro grupo identificado no transcriptoma foi o grupo (C) das Glucosidase II, esta enzima catalisa a remoção seqüencial de dois resíduos de glicose ligados por α -1,3 na segunda etapa do processamento de oligossacarídeos N-linked. A subunidade beta é necessária para a solubilidade e estabilidade da enzima heterodimérica, e está envolvida na retenção da enzima dentro do retículo endoplasmático. Esta família também inclui um sensor de RE para glicoproteínas deformadas e, portanto, provável que seja um domínio genérico. O único contig encontrado classificado nesta categoria foi o contig 5.

O contig 6 pertence ao quarto tipo de α -glicosidase (D), as chamadas GH31_glucosidase_KIAA1161, onde KIAA1161 é uma proteína de *Homo sapiens* não caracterizada da família 31 das glicosídeo hidrolases (GH31), com domínio que é homólogo à glicosidase de *Escherichia coli* YihQ. Ortólogos de KIA1161 são encontrados em eucariontes e procariontes. Em bactérias, YihQ (junto com YihO) é importante para a montagem da cápsula bacteriana.

O contig 7 pertence ao último tipo de α -glicosidase encontrado neste transcriptoma, AmyAc_maltase (E), onde maltases (EC 3.2.1.20) hidrolisam resíduos de glicose com ligações α -1,4 no terminal não-redutor da maltose, liberando alfa-D-glicose. Na maioria dos casos, maltase é equivalente a alfa-glicosidase, mas o termo "maltase" enfatiza a natureza dissacarídeo do substrato a partir do qual a glicose é clivada, e o termo "alfa-glicosidase" enfatiza o tipo de ligação entre os açúcares.

4.5.3. Peritrofinas

4.5.3.1. Identificação, seqüenciamento e análise dos cDNAs que codificam peritrofinas do intestino médio de *Tenebrio molitor*

Após as análises do seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Tenebrio molitor* e das varreduras desta mesma biblioteca com os anticorpos anti-MP, anti-P1 e anti-P3 foi feita uma união de todas as sequências com as sequências obtidas no piroseqüenciamento. Após este agrupamento das sequências foram obtidas 11 com similaridade nos bancos de dados a domínio ligantes de quitina ou Chitin binding domains (CBD). Estes domínios estão presentes em alguns tipos de enzimas como quitinases, proteínas de traquéia e proteínas estruturais como as peritrofinas. As peritrofinas são proteínas integrantes da membrana peritrófica constituídas por domínios CBD. Estes domínios possuem seis cisteínas conservadas e as distâncias entre as cisteínas são características relevantes para classificá-las como peritrofinas como descrito no item 1.7.4.

Foi feito um alinhamento entre as 10 sequências das peritrofinas (figura 85). As 6 cisteínas conservadas juntamente com alguns aminoácidos que são 100% idênticos nas peritrofinas encontradas de *Tenebrio molitor*, encontram-se destacadas em negrito e aminoácidos similares encontram-se destacadas em cinza.

```

          10      20      30      40      50      60
perit1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
perit2  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit3  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit4  -GLILGRSDIAGKLLFAIILVVGAAAGSISAADPLCEGLPPNEIFAFPHETNCSLYYECTG
perit5  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit6  --KVCDWPQDAGCEDVNTPTASPSPTPSRTPKPTTKTPK-----|
perit7  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit8  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit9  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
peritCBD2CBD3 RGLILGRSDIAGKLMFAIILVIGAAGSISAADPLCEGLPPNEIFAFPHETNCSLYYECTG
Clustal Consensus
          70      80      90      100     110     120
perit1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit2  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit3  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit4  GNKILMACANGLWFNSDTQSCDFPDESGCTNKESICTN---VVIDYFPHPSDCSRYIEC
perit5  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit6  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
perit7  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

```

perit8 -----APLSFLVLNVL-ADSNIE-CPPVDG-PDAVYFPHETDCTKFYEC
perit9 -----TTRNPTTP-----ADNDPRCTG----QGLSYWSPHIYCNKYIEC
peritCBD2CBD3 GNKILMACANGLWFNSDTQSCDFPDESGCTNKESICTN----VVIDYFPHPSDCSRYIEC
Clustal Consensus          *          :  :  *  :  :  *

```

```

          130          140          150          160          170          180
perit1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
perit2  SNGTPYLFDCPAGLHFNPKRKNVCDWEPWRAGCRTA-----NN-
perit3  YQGNSYLYTCPEGLWHEEISQCDYEGDF~CDNDATTQ-----TGPTTPTT
perit4  SNGTPYLFDCPANLHFNPKLNVCWEPDQAGCNGS-----SGSGSSESSDWSNS
perit5  YQGNSYEMSCQPGLWFHSGLKKCVSEDESDCMGFTTP-----PWTTPHPLCW
perit6  SNGTPYLFDCPANLHFNPKLNVCWEPDQAGCNGS-----SGSGSSESSD--SSP
perit7  DNGQKVEFDCPDGLHFNEELEVCDWEPYAGCEDIEFP-----PCPTGPPSST
perit8  SNGVAYEFDCPDILVFDPRINVCVWPDYDCEGNSSGTTEDDIVTDGTTENDVVDTTTE
perit9  SNGVPYLFQC PAGLDFNPTKNVCDYEPQAGCRSKTT-----PSSSAAPTSSANPSSS
peritCBD2CBD3 YQGNSYEMNCPAGLYFHSQEKRHCVNPESESEC-GRTEP-----PTHGPT---
Clustal Consensus  : *          *          *          *          *

```

```

          190          200          210          220          230          240
perit1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
perit2  SGTTPS-----PRAEFDIKLM
perit3  SSESESSDSSSS-----SSSE-----SSESDSSSSSSSSSESSESAE
perit4  GVRPS-----ETVLKPYEGDCRKYWCIGADMTLHDCPNHLLFDDSRQL
perit5  SSESESSDSSSS-----SSSE-----SSE-----SSISSESTE
perit6  PPEPKPTPIDPECPWPDPNLNYTVHLPHETDCTKFYKCDNGQKVEFDCPDGLHFNKELEV
perit7  NDVVTDTTENDVVTDTTENDVVTDTTENDVVTDTTENDVVTDTTENDVVTDTTTE
perit8  SARPSSTEGSSSSVRPSSSSEGPSSSSARPSSSSAGPSSSTEGPSSSSARPSISSEKPS
perit9  SERPT-----DWTPHP---DCS-----WPXHLG-----
peritCBD2CBD3 GVRPS-----ETVLKPYEGDCRKYWCIGADMTLHDCPNHLLFDESQRQL
Clustal Consensus

```

```

          250          260          270          280          290          300
perit1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
perit2  -----
perit3  D-----
perit4  CDFPETVHCDDSTRTPDPWTTTRPHTTRYPT-----
perit5  D-----
perit6  CDLAQXCRCELVN---PPSTASPFNTF-----
perit7  DDVVTDTTENDVVTDTTTEPHAVTRRYTDDDDIXTDDTTEHDVVTDTTEDDVGTDXXTE
perit8  SSSARPTGSTRKPKSQHQGLGPTNQKRTTPLL-----
perit9  -----
peritCBD2CBD3 CDFPETVNCDDSTRTPDPWTTTRPPTTRNPTTPADNDPRCTGQGLSYWSPHIYCNKYIECY
Clustal Consensus

```

```

          310          320          330          340          350          360
perit1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
perit2  -----
perit3  -----
perit4  -----
perit5  -----
perit6  -----
perit7  -----
perit8  -----
perit9  -----
peritCBD2CBD3 NGGSYEMNCPAGLYFHSQEKRHCVNPESEECGRTEPPTHGPTSERPTDWTPHPDCPWPESE
Clustal Consensus

```

```

          370          380          390          400          410
perit1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

```

perit1 -----
perit2 -----
perit3 -----
perit4 -----
perit5 -----
perit6 -----
perit7 -----
perit8 -----
perit9 -----
peritCBD2CBD3 GKLMPYPGDCTKIFYECAEGKKVAMNCPNALWFNPSILECDYPYQAGCQWGFLD
Clustal Consensus

```

Figura 85: Alinhamento de todas as peritrofinas de *Tenebrio molitor* utilizando o programa Bioedit (Thompson ,J.D et al, 1994).

Observando a figura 85 podemos verificar que cada domínio CBD ou domínio peritrofina-A possui aproximadamente 56 aminoácidos contando da primeira a sexta cisteína. Existem poucos aminoácidos conservados entre as cisteínas e eles são em sua maioria aminoácidos aromáticos. Estes resíduos de aminoácidos conservados devem ser importantes para a função das peritrofinas.

Tabela 23: Sumário do número de CBDs encontradas nas peritrofinas de *Tenebrio molitor* e das distâncias entre as 6 cisteínas conservadas dos domínio.

Peritrofina	Número de CBDs completos	Distâncias entre as cisteínas	Tamanho médio do CBD
1	1	CX ₁₅ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	48
2	2	CX ₁₅ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₆	47
3	1	CX ₁₅ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	48
4	3	CX ₁₃ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	46
5	1	CX ₁₅ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	48
6	2	CX ₁₇ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	50
7	1	CX ₁₅ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	48
8	1	CX ₁₆ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	49
9	1	CX ₁₃ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	46
PeritCBD2CBD3	5	CX ₁₃ CX ₅ CX ₉ CX ₁₂ CX ₇	46

O número de CBDs de cada peritrofina de *Tenebrio molitor* e as distâncias entre as 6 cisteínas conservadas podem ser visualizadas na tabela 23 acima. Estes domínios peritrofina-A possuem o consenso de espaçamento entre as cisteínas adjacentes de

Tellam *et al*, 1999 (CX₁₁₋₁₇CX₅CX₉₋₁₄CX₁₂CX₆₋₇C). Estas proteínas foram denominadas de peritrofinas segundo a classificação de Jasrapuria *et al* (2010). O número de CBDs nesta família de proteínas pode variar de 1 até 14 e o tamanho dos CBDs individualmente variou de 46 a 50 aminoácidos, contando da primeira cisteína até a sexta. Normalmente quando existe mais de um CDB na mesma proteína, estes são altamente similares entre si.

A peritrofina nomeada peritCBD2CBD3 (tabela 23) foi escolhida para sua clonagem, expressão, purificação e produção de anticorpo. Esta foi a peritrofina escolhida porque foi a primeira a aparecer nas varreduras, com maior número de CBDs, que tinha o maior número de ESTs e que provavelmente seria a mais expressa pelo inseto. Estes passos serão descritos no item a seguir.

4.5.3.2. Análise da sequência da peritCBD2CBD3 de *Tenebrio molitor*

A sequência de nucleotídeos da peritCBD2CBD3 juntamente com a sua sequência de aminoácidos está exposta na figura 86. Nesta figura podemos visualizar os cinco CBDs encontrados através do programa ProSite dentro das ferramentas do site expasy (<http://expasy.org/prosite/>) destacados no seu começo e fim por caixas cinza. As 6 cisteínas de cada domínio estão destacadas em vermelho e o provável sítio do clivagem do peptídeo sinal esta mostrado por uma seta entre os resíduos 31 e 32 da sequência (Signal P 3.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Os sítios de N-glicosilações foram preditos pelo programa NetNGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) e estão destacados por círculos em volta da asparagina que será glicosilada. Por último temos os iniciadores escolhidos para clonagem destacados por setas sob as sequências de nucleotídeos.

```

Agaggggtaataactggggaggagtgatattgcggggaaattgatgtttgcgataataactg 60
 R G L I L G R S D I A G K L M F A I I L 20
gtgatcggagctgcgctcgggcatttcagcagcagatcctttatgcaagggtccttcctccg 120
 V I G A A S G I S A A ↑ D P L C E G L P P 40
Aacgagatatttgcctttccccacgagaccaactgttcctctattacgaatgcaccggg 180
 N E I F A F P H E T (N) C S L Y Y E C T G 60
Ggtaacaagatccttgatggcatgtgcaatggattatggttcaacagtgacacccagtc 240
 G N K I L M A C A N G L W F N S D T Q S 80
Tgcgattttcccgacgagctctggatgcacaaacaaagaatccatctgcaccaacgctcgtg 300
 C D F P D E S G C T N K E S I C T N V V 100

```

```

Atcgattacttcccgcacatcccagcgcattggtccagatatatcgagtgctaccaaggtaac 360
 I D Y F P H P S D C S R Y I E C Y Q G N 120
Tcctacgagatgtcttgccagcctggattgtgggtccattctgggctaaagaaatgcgta 420
 S Y E M S C Q P G L W F H S G L K K C V 140
tctcctgacgagtcagactgcatgggattcactacaccaccatggacgactccccatcca 480
← S P D E S D C M G F T T P P W T T P H P 160
Ctttgctgggggtacgtcccagcgcagaccgtggtgaaaccgtacgaggggtgattgcagg 540
 L C W G V R P S E T V L K P Y E G D C R 180
Aagtactggcaatgtattggggctgacatgaccctccacgactgtcccaaccatttgctc 600
 K Y W Q C I G A D M T L H D C P N H L L 200
ttcgatgaaagtcgacaactttgtgattttcccgaacagtcactgtgatgatagtagtact 660
 F D E S R Q L C D F P E T V N C D D S T 220
Cggacaccagatccctggacaacaaggccgcctactaccgcaatcctaccactccagcc 720
 R T P D P W T T R P P T T R (N) P T T P A 240
Gacaacgatccacggttcaccggtcaaggattatcttactgggtctcatccgattttattgc 780
 D N D P R C T G Q G L S Y W S H P I Y C 260
Aacaagtacatagaatgctataatggaggcagctacgaaatgaattgtcccgcgggtttg 840
 N K Y I E C Y N G G S Y E M N C P A G L 280
Tacttcagccaagagaagagacactgcgtaaatcctagcgcagtcagagtgcggaagaact 900
 Y F S Q E K R H C V (N) P S E S E C G R T 300
Gagccaccgacgcatggtcccacgagcgcagagaccaactgattggacgccgcatccagat 960
 E P P T H G P T S E R P T D W T P H P D 320
Tgtccgtggccagaaagcgcagggtaaattgatgccttatccaggagattgcaccaagttc 1020
 C P W P E S E G K L M P Y P G D C T K F 340
Tactgagtgctgaaggaaagaaggtcgcgatgaattgtccaaatgctgtgtggtttaat 1080
 Y E C A E G K K V A M N C P N A L W F N 360
Ccatcgatattggagtgcgattatccctatcaggcaggctgccagtggggattccttggat 1140
 P S I L E C D Y P Y Q A G C Q W G F L D 380
Taa 1143
-

```

Figura 86: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos de cDNA de uma peritrofina da membrana peritrófica do intestino médio de *Tenebrio molitor* chamada peritCBD2CBD3 .

Na figura 87 destacamos os 5 domínios ligantes de quitina (CBDs) da peritrofina peritCBD2CBD3 mostrados por retângulos vermelhos e na mesma figura observamos barras azuis paralelas que indicam domínios semelhantes a mucinas (regiões ricas em serinas e treoninas e altamente glicosiladas) onde encontramos sítios de O-glicosilações através do programa NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Para afirmarmos que é uma O-glicosilação as barras azuis devem ultrapassar a linha vermelha mostrada na figura 16. Concluímos então que temos 2 regiões bastante glicosiladas e uma terceira região um pouco menos glicosilada intercaladas com os domínios ligantes de quitina (CBDs). Estas duas regiões bastante glicosiladas para serem domínios semelhantes a mucina teriam que ter pelo

menos umas 20 glicosilações em sequência, podendo variar desde 20 até mais de 100 glicosilações numa mesma proteína. A presença destes dois tipos de domínios em uma peritrofina já foi descrito por alguns trabalhos como Wang e Granados, 1997; Shen e Jacobs-Lorena, 1998; Tellam et al., 1999) .

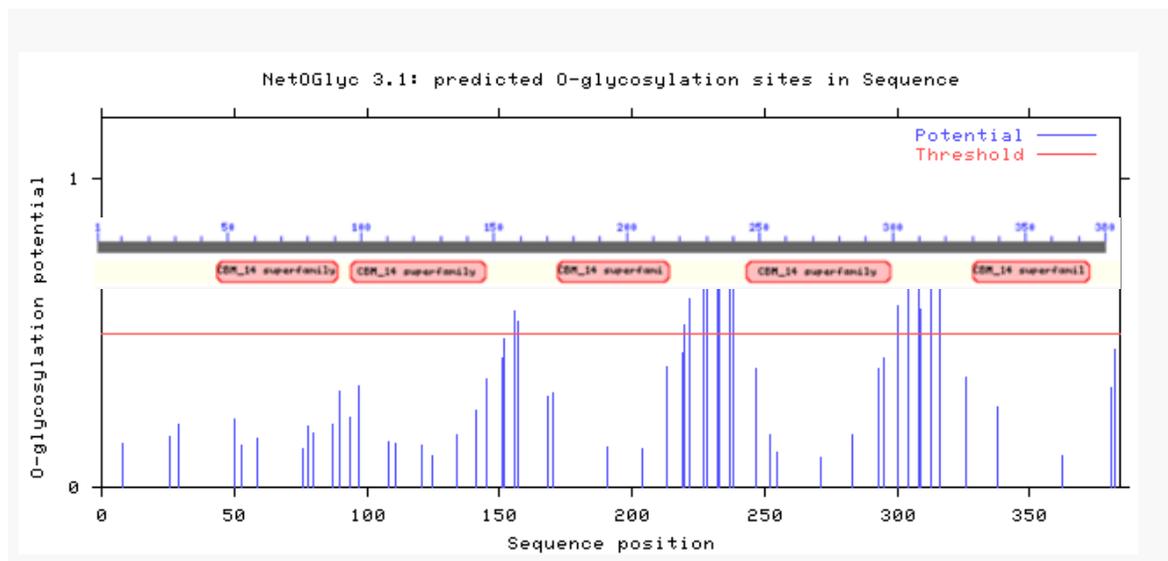


Figura 87: Distribuição dos domínios ligantes de quitina (CBDs) mostrado em vermelho e as barras paralelas em azuis indicam sítios de O-glicosilações.

4.5.3.3. Clonagem, expressão e purificação de alguns CBDs da peritrofina majoritária de *Tenebrio molitor*

Escolhemos clonar e expressar a peritrofina peritCBD2CBD3 de duas maneiras: uma expressando dois CBDs nomeado de CBD2 e a outra expressando 3 CBDs em sequência dos 5 contidos nesta peritrofina e o chamamos de CBD3. Foram escolhidas estas duas maneiras de clonagem para testarmos posteriormente as interações entre os CBDs e a quitina coloidal e tendo ambas as construções podemos ter uma idéia se há diferença entre a interação de uma peritrofina com 2 CBDs, que poderia conectar duas fibras de quitina e uma peritrofina com 3 CBDs que poderia se conectar em mais de dois pontos nas fibras de quitina e desta forma, formando as malhas da membrana peritrófica.

A sequência de cDNA codificante tanto para o CBD2 quanto para o CBD3 foi amplificada por uma reação de polimerase em cadeia (PCR) usando como molde a biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* juntamente com os oligonucleotídeos

específicos CBD2-F1-pAE com o sítio de restrição para a enzima Bam H1 para ambas as construções e os primers reversos CBD2-R1-pAE e CBD3-R2-pAE com os sítios de restrição para a enzima Eco RI para as construções de CBD2 e CBD3 respectivamente. Na figura 88 temos as sequências do CBD2 e CBD3 utilizadas para clonagem e expressão. O fragmento de PCR amplificado para o CBD2 é de 340 pb e para o CBD3 é de 546 pb.

A

```

tgCGAAGGTcttctcccaacgagatatttgcctttccccacgagaccaactgttccctc
C E G L P P N E I F A F P H E T N C S L
tattacgaatgcaccggggtaacaagatcttgatggcatgtgCGAATggattatggttc
Y Y E C T G G N K I L M A C A N G L W F
aacagtGACaccagctcttgCGattttcccgacgagctctggatgcacaaacaaagaatcc
N S D T Q S C D F P D E S G C T N K E S
atctgcaccaacgtcgtgatcgattacttcccgcatcccagcGATTgttccagatatac
I C T N V V I D Y F P H P S D C S R Y I
gagtGctaccaaggtaactcctacgagatgtcttgccagcctggattgtggttccattct
E C Y Q G N S Y E M S C Q P G L W F H S
gggctaaagaaatgcgtatctcctgacgagtcagactgc
G L K K C V S P D E S D C

```

B

```

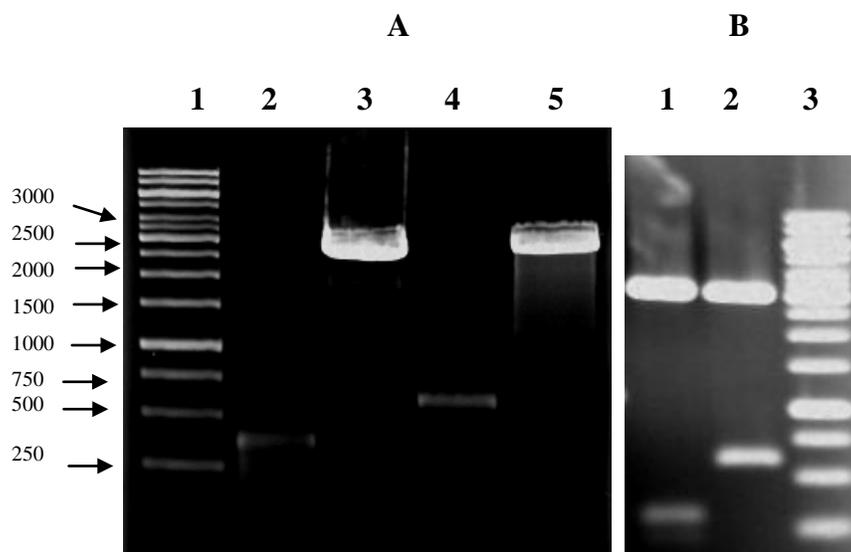
tgCGAAGGTcttctcccaacgagatatttgcctttccccacgagaccaactgttccctc
C E G L P P N E I F A F P H E T N C S L
tattacgaatgcaccggggtaacaagatcttgatggcatgtgCGAATggattatggttc
Y Y E C T G G N K I L M A C A N G L W F
aacagtGACaccagctcttgCGattttcccgacgagctctggatgcacaaacaaagaatcc
N S D T Q S C D F P D E S G C T N K E S
atctgcaccaacgtcgtgatcgattacttcccgcatcccagcGATTgttccagatatac
I C T N V V I D Y F P H P S D C S R Y I
gagtGctaccaaggtaactcctacgagatgtcttgccagcctggattgtggttccattct
E C Y Q G N S Y E M S C Q P G L W F H S
gggctaaagaaatgcgtatctcctgacgagtcagactgcattgggattcactacaccacca
G L K K C V S P D E S D C M G F T T P P
tggacgactccccatccactttgctgggggtacgtcccagcGAGaccgtgttgaaaccg
W T T P H P L C W G V R P S E T V L K P
tacgaggggtgattgcaggaagtactggcaatgtattggggctgacatgaccctccacgac
Y E G D C R K Y W Q C I G A D M T L H D
tgtcccaaccatttgctcttcgatgaaagtcgacaactttgtgattttcccgaaacagtc
C P N H L L F D E S R Q L C D F P E T V
aactgt
N C

```

Figura 88: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes ao CBD2 (A) e CBD3 (B) utilizados para clonagem e expressão.

O produto do PCR foi digerido com as enzimas Bam HI e Eco RI e posteriormente clonado no vetor pAE (Ramos et al, 2004), previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando nos plasmídeos pAE/CBD2 e pAE/CBD3 (figura 89 letras C e D).

Também na figura 89 podemos observar na letra (A) a foto do gel de agarose 1% cujas bandas que aparecem correspondem aos produtos de PCR (digeridos com as enzimas de restrição descritas acima) de CBD2 e CBD3 nas raias 2 e 4 e nas raias 3 e 5 observamos o pAE digerido com as mesmas enzimas de restrição descritas para o fragmento de PCR. Na letra (B) da figura 89 temos a foto da digestão das construções mostradas nas letras C e D desta mesma figura e desta forma a confirmação de que as construções continham o inserto.



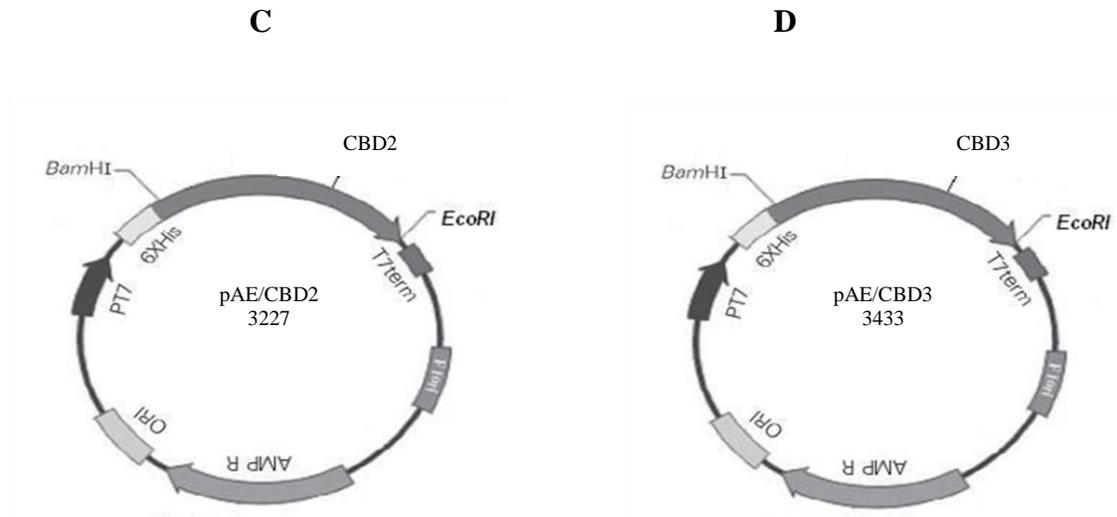


Figura 89: (A) Gel demonstrando os fragmento de PCR de CBD2, pAE, CBD3 e pAE nas colunas de 2 a 5 respectivamente, após digestão com as enzimas de restrição Bam HI e Eco RI para posteriormente serem ligados e formarem as construções mostradas na letra (C) e (D). A coluna de número 1 é o padrão de peso molecular de 1Kb. A letra B da figura mostra a digestão das construções mostradas nas letra C e D sendo (1) CBD2, (2) CBD3 e (3) padrão de peso molecular.

Tanto o CBD2 quanto o CBD3 recombinantes possuem em seu N-terminal um peptídeo de fusão que contém 6 resíduos de histidina para facilitar a sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

As construções pAE/CBD2 e pAE/CBD3 foram utilizadas para transformar as bactérias Origami (DE3) e BL21. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de LB Agar contendo ampicilina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Desta placa foram selecionadas algumas colônias e PCR de colônia foi feito usando os mesmos iniciadores utilizados para clonar, para saber se o inserto ainda estava dentro do plasmídeo (figura 90).

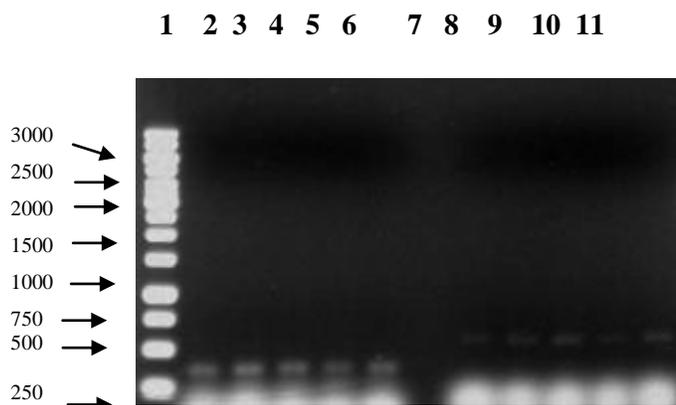


Figura 90: PCR de colônia demonstrando a presença dos insertos de CBD2 e CBD3 dentro dos plamídeos que transformaram a Origami (DE3). O coluna 1 corresponde ao padrão de massa molecular dos fragmentos, As colunas de 2 a 6 são as colônias pegas da placa correspondente a transformação com a construção CBD2 e as colunas de 7 a 11 corresponde a CBD3.

Como foi observado pelo PCR de colônia que as colônias escolhidas tinham o inserto, estas colônias foram utilizadas para fazer os pré-inóculos. Estes pré-inóculos foram crescido por 16 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Estes pré-inóculos foram utilizados para fazer os inóculos. Os inóculos começaram seu crescimento com uma absorbância de 0,1 e foram crescidos e 3 temperaturas: 37°C, 25°C e 20°C. Estes inóculos nas várias temperaturas foram feitos tanto para Origami quanto para BL21 e foram crescidos nas respectivas temperaturas até atingirem uma absorbância entre 0,6 e 1,0. Atingida esta absorbância foi retirada a alíquota da amostra não induzida e adicionado o IPTG. Após 3h da incubação a amostra de 37°C foi retirada e as outras duas temperaturas ficaram 20h crescendo após IPTG. Um controle foi feito transformando as bactérias com pAE sem inserto.

As células não-induzidas e induzidas foram analisadas através de SDS-PAGE 12%.

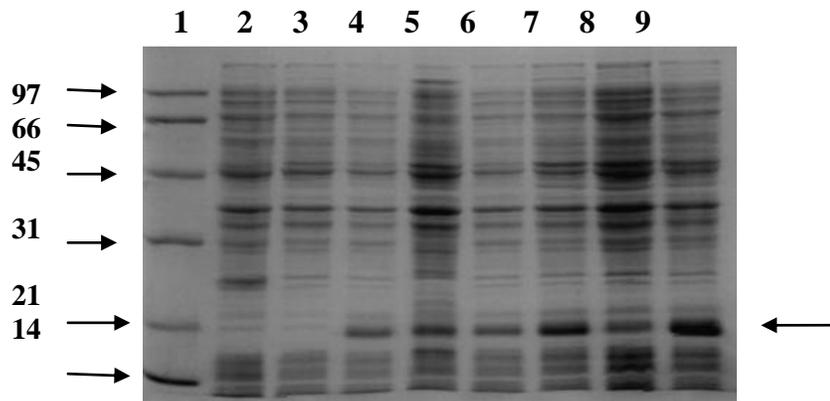


Figura 91: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CBD2 com o plasmídeo pAE em células Origami (DE3). A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final) em 3 temperaturas: 37°C, 25°C e 20°C. Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 pAE controle não induzido e induzido respectivamente; 4 e 5 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 37°C; 6 e 7 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 25°C e 8 e 9 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 20°C. O gel foi corado por coomassie Blue R-250.

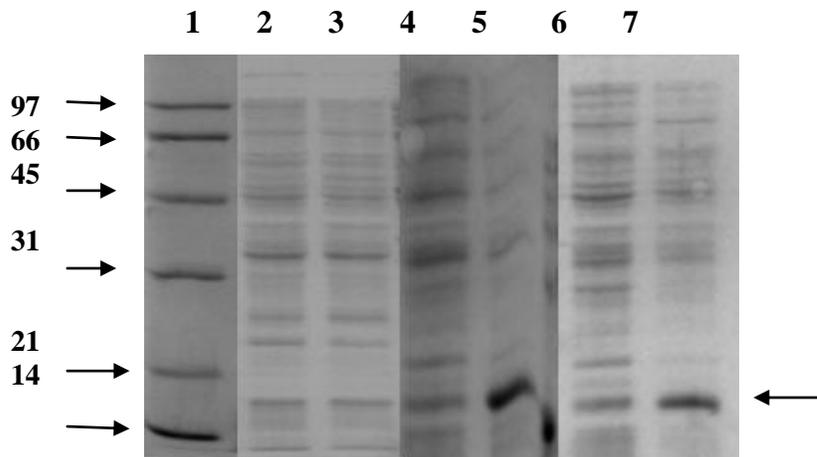


Figura 92: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CBD2 com o plasmídeo pAE em células BL21. A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final) em 3 temperaturas: 37°C, 25°C e 20°C. Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 37°C; 4 e 5 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 25°C e 6 e 7 pAE/CBD2 não induzido e induzido a 20°C. O gel foi corado por coomassie Blue R-250.

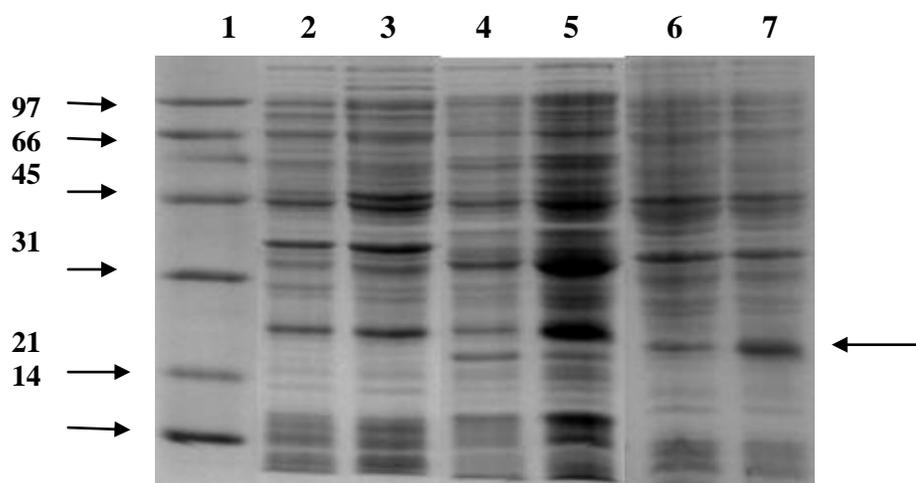


Figura 93: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CBD3 com o plasmídeo pAE em células Origami (DE3). A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final) em 3 temperaturas: 37°C, 25°C e 20°C. Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 37°C; 4 e 5 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 25°C e 6 e 7 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 20°C. O gel foi corado por coomassie Blue R-250.

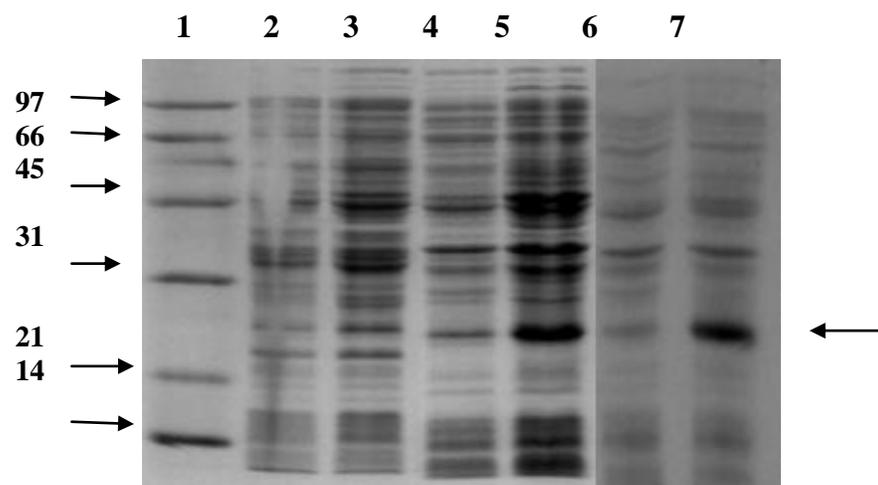


Figura 94: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CBD3 com o plasmídeo pAE em células Origami (DE3). A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final) em 3 temperaturas: 37°C, 25°C e 20°C. Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 37°C; 4 e 5 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 25°C e 6 e 7 pAE/CBD3 não induzido e induzido a 20°C. O gel foi corado por coomassie Blue R-250.

Nota-se através das figuras 91 até 94 que o IPTG levou a uma intensa produção das proteínas CBD2 e CBD3 de massa molecular de aproximadamente 18 e 26 KDa respectivamente em ambas as células (origami e BI21). Através das ferramentas do

expazy calculamos as massas moleculares teóricas dos CBDs e estas são 13 e 21 KDa para CBD2 e CBD3 repectivamente. Observamos uma diferença de 5 KDa entre as massas calculadas e as observadas em SDS-PAGE e isto pode ser devido as histidinas adicionadas ao N-terminal das proteínas e também a uma migração anômala destes domínios. Para verificarmos se a proteínas recombinantes apresentavam-se solúveis, células induzidas nas 3 temperaturas (37°C, 25°C e 20°C) e dos dois tipos de células foram lisadas por sonicação, sendo que o lisado foi submetido a centrifugação a 14.000g por 30 min. O sobrenadante recuperado corresponde ao material solúvel enquanto que o precipitado ao material insolúvel bacteriano.

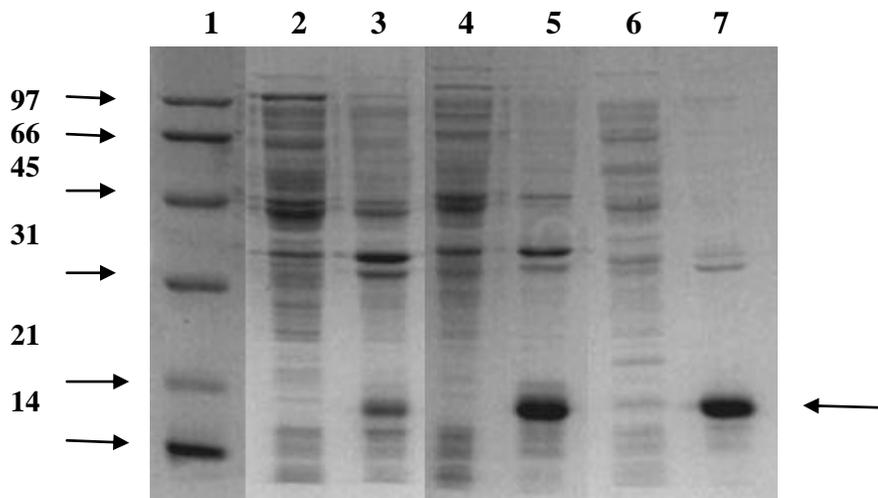


Figura 95: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão da construção pAE/CBD2 em células BL21. A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final). Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 37°C por 3 horas lisadas e centrifugadas; 4 e 5 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 25°C por 20 horas lisadas e centrifugadas e 6 e 7 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 20°C por 20 horas lisadas e centrifugadas. O gel foi corado por coomassie Blue R-250. A seta indica a proteína recombinante.

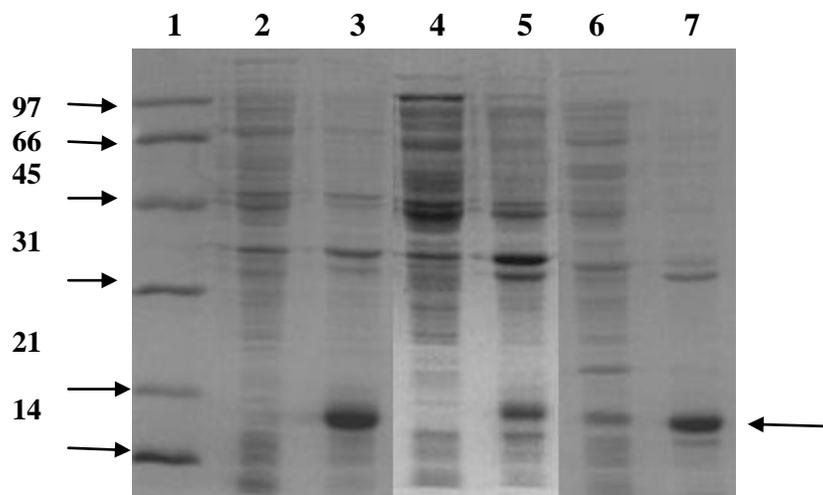


Figura 96: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão da construção pAE/CBD2 em células Origami (DE3). A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final). Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 37°C por 3 horas lisadas e centrifugadas; 4 e 5 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 25°C por 20 horas lisadas e centrifugadas e 6 e 7 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 20°C por 20 horas lisadas e centrifugadas. O gel foi corado por coomassie Blue R-250. A seta indica a proteína recombinante.

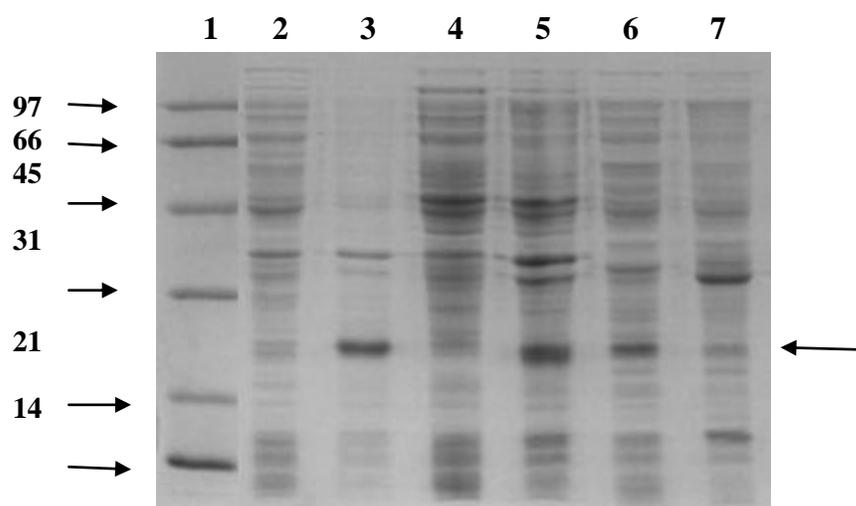


Figura 97: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão da construção pAE/CBD3 em células Origami (DE3). A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final). Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 37°C por 3 horas lisadas e centrifugadas; 4 e 5 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 25°C por 20 horas lisadas e centrifugadas e 6 e 7 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 20°C por 20 horas lisadas e centrifugadas. O gel foi corado por coomassie Blue R-250. A seta indica a proteína recombinante.

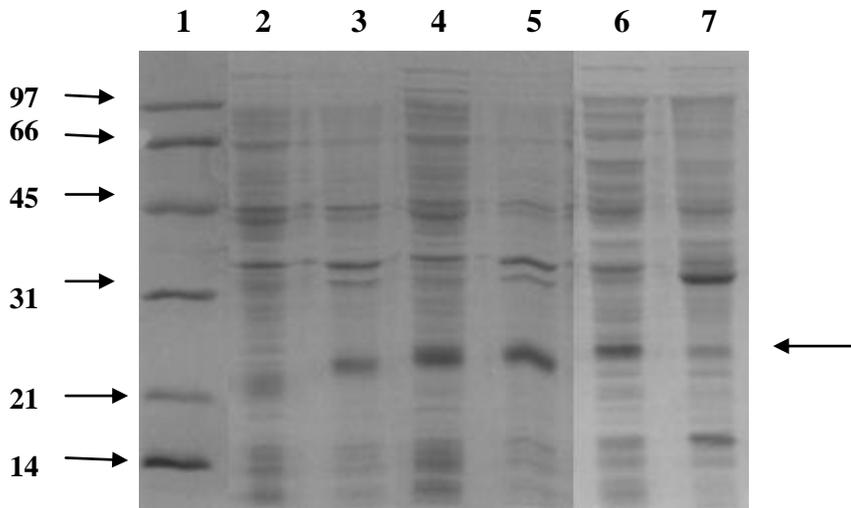


Figura 98: Análise em SDS-PAGE 12% da expressão da construção pAE/CBD3 em células BL21. A indução foi feita com IPTG 1 mM (concentração final). Temos nas seguintes raias: 1-padrão de massa molecular; 2 e 3 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 37°C por 3 horas lisadas e centrifugadas; 4 e 5 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 25°C por 20 horas lisadas e centrifugadas e 6 e 7 sobrenadante e precipitado das bactérias induzidas a 20°C por 20 horas lisadas e centrifugadas. O gel foi corado por coomassie Blue R-250. A seta indica a proteína recombinante.

Nas figuras 95 a 98 observamos que as proteínas recombinantes são recuperadas parcialmente na forma solúvel. As proteínas encontram-se em maior quantidade na fração solúvel na indução feita a 20°C com a bactéria Origami (DE3) como pode ser visto na figura 97 e 98 para CBD2 e CBD3 respectivamente.

A fração solúvel destas duas induções (CBD2 e CBD3) foram purificadas por coluna de afinidade de Níquel, que se liga a cauda de histidina fusionada a extremidade N-terminal de CBD2 e de CBD3. A proteína foi eluída da coluna com um gradiente de imidazol (ver item 3.22.3). Uma alíquota das frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e mostrou que CBD2 e CBD3 apresentavam-se purificados na eluição com 300 mM de imidazol (figura 99 e 100 na raia 13).

Estas frações solúveis purificadas foram utilizadas para realizar os experimentos de interação com a quitina coloidal discutida mais a frente deste relatório.

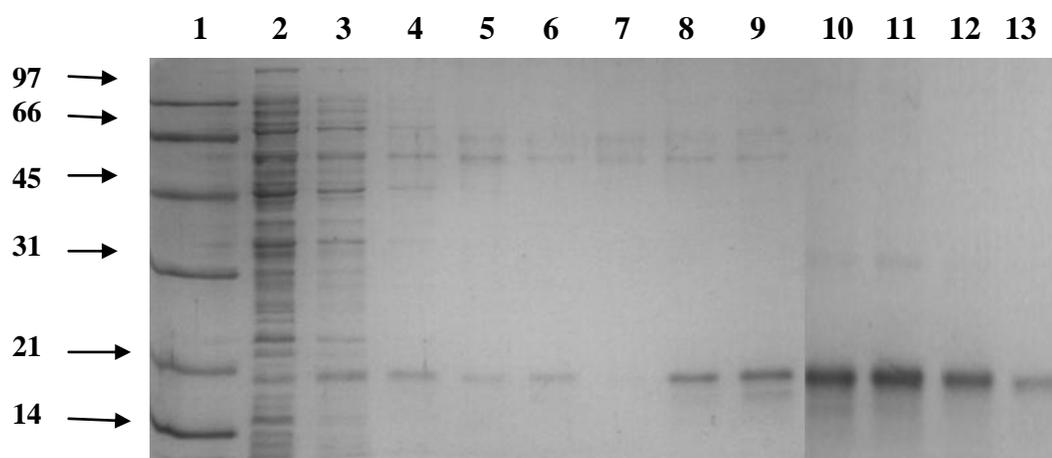


Figura 99: Análise em SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} para purificação do CBD2 recombinante. Raias: 1-Padrão de massa molecular; 2-não retido (tudo que não se ligou na coluna); 3 a 7 são as lavagens da coluna com o mesmo tampão de lise das células; raias de 8 a 13 são as eluições do CBD2 da coluna com as seguintes concentrações de imidazol: 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM respectivamente.

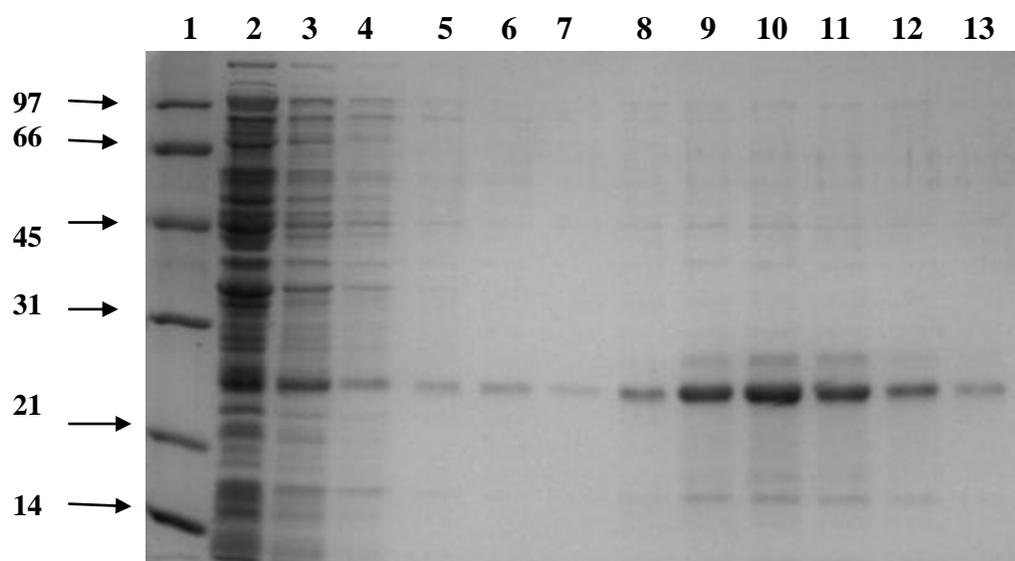


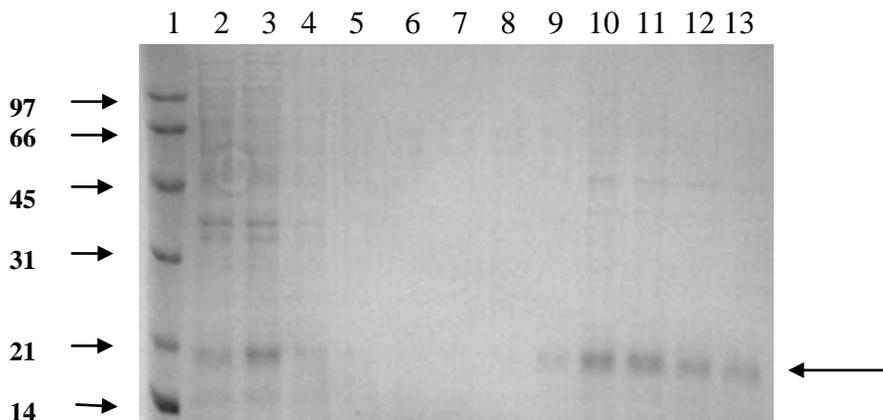
Figura 100: Análise em SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} para purificação do CBD3 recombinante. Raias: 1-Padrão de massa molecular; 2-não retido (tudo que não se ligou na coluna); 3 a 7 são as lavagens da coluna com o mesmo tampão de lise das células; raias de 8 a 13 são as eluições do CBD3 da coluna com as seguintes concentrações de imidazol: 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM respectivamente.

4.5.3.4. Purificação e produção de anticorpo utilizando os corpos de inclusão das bactérias contendo CBD2 e CBD3

Foram feitas as induções em 3 temperaturas (37°C, 25°C e 20°C) e em 2 tipos de células (Origami e BL21) e após todo estes experimentos foi escolhida a indução a 20°C na célula Origami a que produziu uma maior quantidade de proteína na forma solúvel. A quantidade de proteína na forma solúvel não era muito grande e para obter material suficiente para injetar no coelho teria que reunir muitas induções e purificações. Desta forma, optou-se por produzir o anticorpo anti-CBD2 e anti-CBD3 a partir dos precipitados destas induções, reservando o material solúvel para os experimentos de interação com a quitina coloidal, porque neste experimento é necessário a proteína solúvel.

Foi utilizado o manual da coluna de Ni_2^+ como base para as extrações dos CBDs dos corpos de inclusão. A extração foi feita segundo descrito no item 3.22.4, utilizando uréia como agente desnaturante. As eluições primeiramente foram feitas utilizando um gradiente de pH, partindo de 8, passando por 6,3 até 5,9 no último tampão. Esta eluição das proteínas ligadas a coluna através de gradiente de pH não foi muito eficiente para meios de purificação dos CBDs e resolvemos realizar a eluição semelhante a purificação dos CBDs solúveis (item 3.22.3), com gradiente de imidazol ver figura 101 A e B.

A



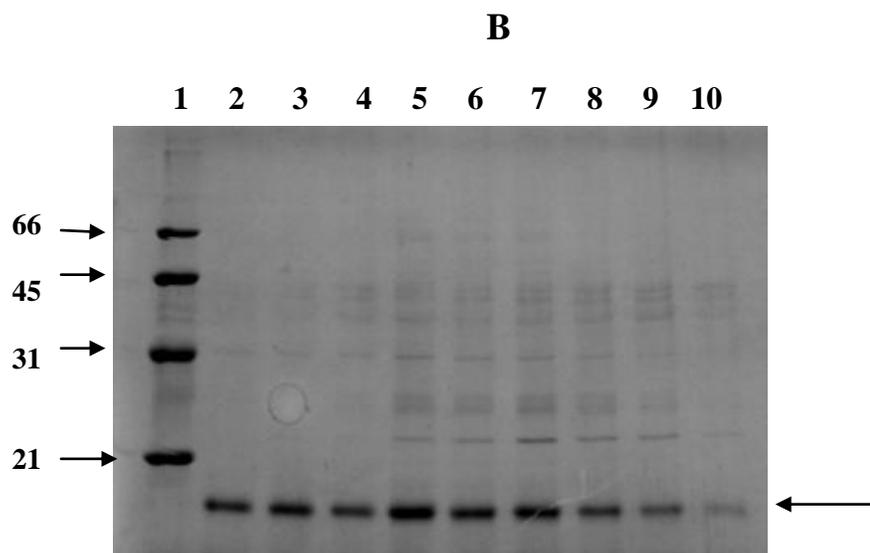


Figura 101: Análise em SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ para purificação do CBD2 (A) e CBD3 (B) recombinante. Raias: 1-Padrão de massa molecular; 2, 3, 4 e 5 são as lavagens da coluna; 6 a 13 são as eluições do CBD2 (A) e CBD3 (B) da coluna com as seguintes concentrações de imidazol: 25, 50, 75, 100, 150, 300 e 300 mM respectivamente.

Desta forma, as bandas correspondentes ao CBD2 e CBD3 foram quantificadas através de uma curva padrão em gel utilizando ovoalbumina como proteína de massa conhecida. Após as quantificações, as bandas dos géis correspondentes ao CBD2 e CBD3 foram recortadas, descoradas e o material foi injetado no coelho. Foi injetado o correspondente a 500 µg da proteína recombinante na primeira injeção e outras duas injeções espaçadas de 300 µg cada. O coelho no qual foi injetada a proteína recombinante correspondente ao CBD2 ficou doente e morreu e desta forma ainda não conseguimos a produção deste anticorpo, mas ele já está sendo refeito. Foi recolhido o soro do coelho com anti-CBD3 e foi feita toda a purificação do anticorpo como descrito no item 3.6.

O anticorpo anti-CBD3 foi testado e os resultados são expostos na figura 102 abaixo.

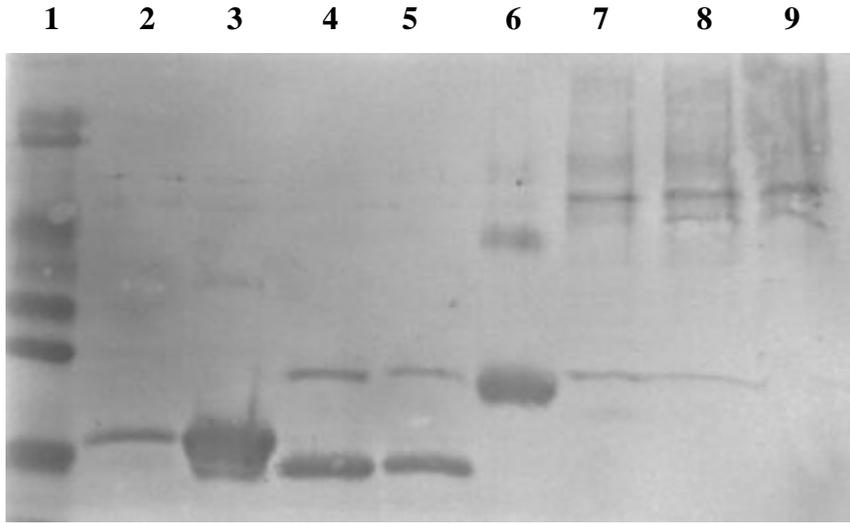


Figura 102: Análise em western blot após SDS-PAGE 12% Raias: 1-Padrão de massa molecular; 2- amostra de CBD2 extraído do precipitado, 3- amostra de CBD2 solúvel, 4 e 5- amostra de CBD3 extraídos do precipitado (10 e 20 μ g respectivamente), 6- amostra de CBD3 solúvel e 7,8 e 9 são amostras de membrana peritrófica extraída de acordo com o item 3.2 em concentrações de 20,10 e 5 μ g de amostra.

A primeira coisa a ser observada na figura 102 é que o anticorpo testado reconhece a proteína usada com antígeno. A segunda informação obtida deste western blot é que o anticorpo também reconhece a proteína recombinante correspondente ao CBD2, tanto o extraído do precipitado quanto a proteína purificada da fração solúvel (raias 2 e 3). Nas raias 4 e 5 observamos a presença de duas bandas reconhecidas pelo anticorpo. A raia maior, de aproximadamente 26 KDa corresponde ao CBD3 e a raia menor possui o tamanho de 1 CBD (6 KDa calculado mais a migração anômala gerando uma banda de aproximadamente 11 KDa). O aparecimento desta banda menor deve ocorrer devido a uma degradação do CBD3 entre os domínios 1 e 2 e entre os domínios 2 e 3 gerando o monômeros de CBD. Verificamos se haveria sítios de clivagem entre os domínios CBDs e observamos que entre o primeiro e o segundo CBD temos uma lisina (K), aminoácido este reconhecido tanto por tripsina como por proteinase K de bactéria, e entre o segundo e o terceiro domínio temos uma fenilalanina (F) e um triptofano (W) que poderiam ser reconhecidos pela enzima quimotripsina clivando o CBD.

Outro ponto importante está nas raias 7 e 8 da figura 102, onde podemos verificar o reconhecimento pelo anticorpo de uma banda de aproximadamente 26 KDa correspondentes ao CBD3 e outras duas bandas maiores presentes no material da membrana peritrófica. O reconhecimento destas bandas maiores no material da membrana peritrófica nos indica que este CBD deve estar presente em outras duas proteínas existentes na membrana peritrófica, que devem possuir aproximadamente o dobro de CBDs (6 CBDs aproximadamente). Este anticorpo poderá ser utilizado para futuras varreduras da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor* para encontrarmos esta proteína de aproximadamente 6 ou mais CBDs.

4.5.3.5. Espectros de fluorescência do CBD2 e CBD3

Ladokhin (2000) demonstra que o triptofano é o grande responsável pela fluorescência intrínseca da grande maioria das proteínas, juntamente com a tirosina e mais raramente a fenilalanina. Para este ensaio, foi usado o comprimento de onda de excitação de 295 nm, com o qual selecionamos somente o sinal observado para a fluorescência intrínseca do triptofano.

Quando a proteína encontra-se com o seu dobramento correto, os triptofanos encontram-se no cerne hidrofóbico e possuem alta intensidade de fluorescência, o que não ocorre quando a proteína não encontra-se dobrada corretamente e os triptofanos ficam expostos ao solvente hidrofílico, reduzindo desta forma a sua intensidade de fluorescência. Além disso, a intensidade de fluorescência e o comprimento de emissão máximo podem variar se o triptofano é usado como sonda.

Após preparar as amostras das proteínas recombinantes purificadas do sobrenadante e do precipitado, ambas as amostras foram submetidas a leituras para tirar o espectro de fluorescência, para identificarmos se as amostras estavam ou não dobradas corretamente para executarem a sua função.

Na figura 104 A temos os gráficos sobrepostos do CBD2 solúvel (linha vermelha) e CBD2 precipitado (linha azul). Analisando este gráfico podemos verificar que o CBD2 solúvel está estruturado quando comparado ao CBD2 purificado do precipitado que fica totalmente sem estrutura, assim como relata Ladokhin (2000). O pico de emissão desta proteína foi em torno de 380 nm

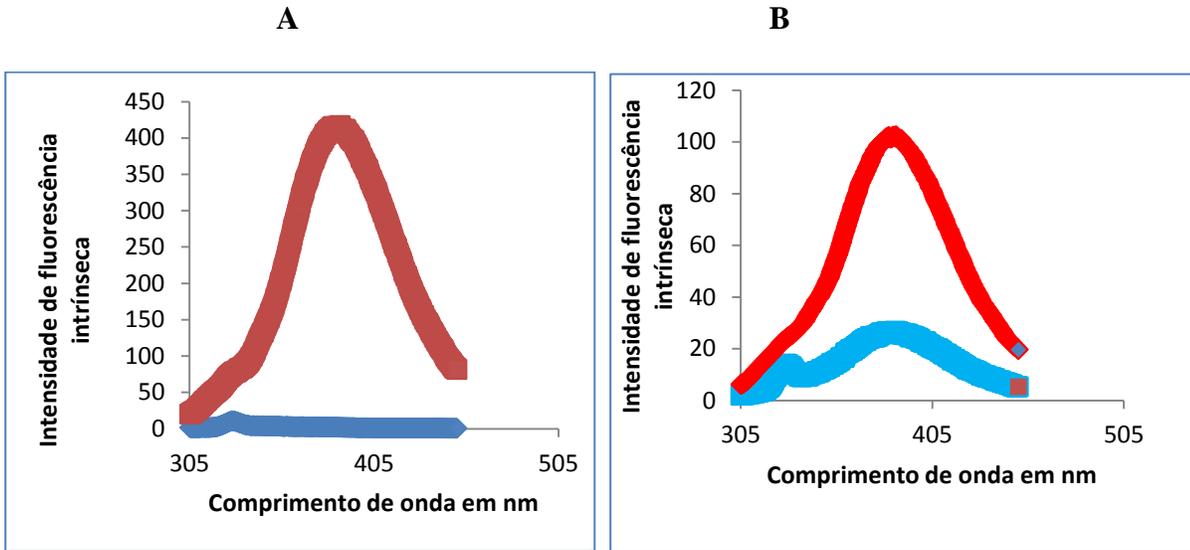


Figura 103: Espectros de fluorescência intrínseca do CBD2 (A) e CBD3 (B) excitado em diferentes comprimentos de onda .As linhas azuis são os CBDs do precipitado e as linhas vermelhas são os CBDs solúveis.

Na figura 103 B temos o gráfico plotado com os dados provenientes do espectro de fluorescência do CBD3. A linha vermelha indica o CBD3 solúvel e a linha azul corresponde ao espectro do CBD3 purificado do precipitado. Podemos visualizar através deste gráfico que o CBD3 solúvel encontra-se muito provavelmente dobrado corretamente assim como o CBD2 solúvel mostrado na figura 103 A. O pico correspondente ao comprimento de emissão de fluorescência da proteína corresponde ao mesmo do CBD2, 380 nm e também podemos ver que o CBD3 do precipitado não foi totalmente desnaturado como o CBD2 do precipitado.

De acordo com os dados obtidos acima, podemos realizar os experimentos de interação com a quitina coloidal, pois tudo indica que estes domínios encontram-se dobrados corretamente de maneira a poder interagir com a quitina coloidal.

4.5.3.6. Ensaaios de interação entre quitina coloidal e domínios ligante de quitina (CBD)

Após a purificação do CBD2 e CBD3 solúveis, estes foram usados para realizar os experimentos de interação com a quitina coloidal como descrito no item 3.23.

As peritrofinas são proteínas constituídas pelos domínios ligantes de quitina (CBD), os quais possuem em sua estrutura secundária folhas- β formadas dentro dos domínios ligadas por pontes dissulfeto entre as cisteínas, criando um bolso de ligação onde resíduos hidrofóbicos (item 1.7.4) conservados formam interações com a quitina. Observando estes detalhes da interação entre a quitina e o CBD provavelmente ocorre uma interação hidrofóbica. Os resultados obtidos após os experimentos de incubação da quitina com o CBD estão relatados nas figuras 104 e 105.

Este experimento foi realizado para verificar a função destes CBDs “in vitro” frente a sua função biológica de se ligar a quitina formando a membrana peritrófica. Na figura 104 temos o experimento realizado com o controle negativo. Este controle é uma proteína, neste caso a albumina sérica bovina, a qual não se liga a quitina e desta forma toda a proteína usada no experimento de interação com a quitina é eluída na fração não ligada (NL) e nada é eluído nas frações de lavagem (L1=lavagem com tampão, L2=lavagem com tampão + 1M de NaCl, L3=ácido acético 100 mM e L4=tampão de amostra com β -mercaptoetanol e SDS+10 min de fervura). Também na figura 104 temos o resultado do experimento de interação da quitina com o CBD2, no qual observamos que certa quantidade do CBD2 não se liga a quitina e, portanto aparece na fração não ligada (NL). Nas lavagens seguintes com tampão fosfato 50 mM pH 8 (L1) e este mesmo tampão com 1 M de NaCl (L2) podemos ver uma banda do tamanho esperado de aproximadamente 18 KDa. Na lavagem L1 pouca proteína do CBD é eluída da do meio e o restante é recuperado na lavagem L2 que seria com 1M de NaCl.

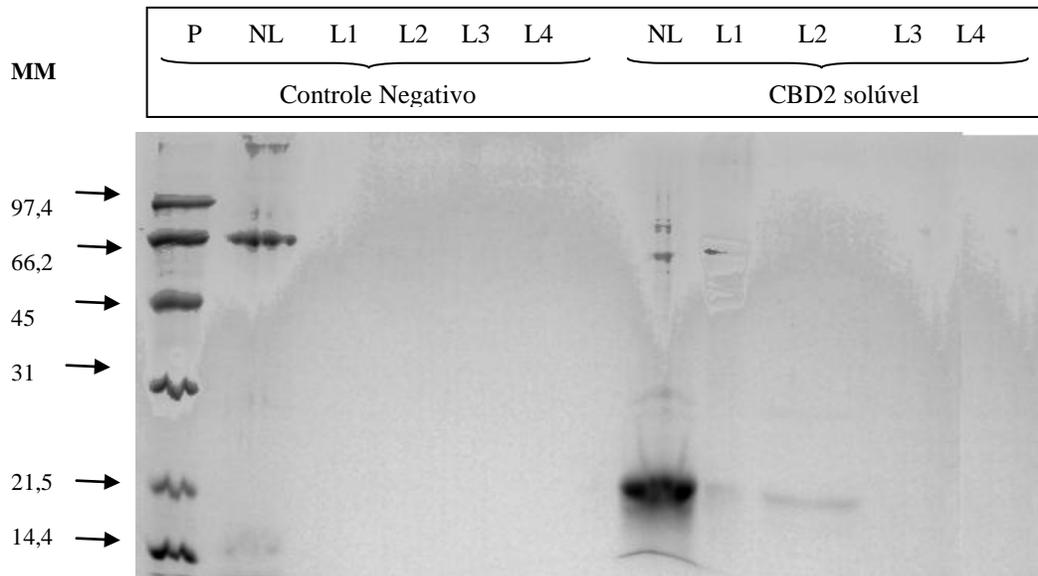


Figura 104: Análise das interações entre quitina e o controle e entre quitina e o CBD2. Gel de poliacrilamida 12%. L1=lavagem com tampão, L2=lavagem com tampão + 1M de NaCl, L3=ácido acético 100 mM e L4=tampão de amostra com β -mercaptoetanol e SDS+10 min de fervura

Na figura 105 podemos verificar o resultado da interação entre o CBD3 e a quitina coloidal. Nesta figura temos parte da concentração do CBD3 que não se liga a quitina coloidal e é liberada na fração não ligada (NL). Outra fração do 1 μ g total incubado com a quitina interagiu com ela. Na lavagem 1 (L1) foi recuperada uma certa quantidade da proteína, na segunda lavagem (L2), recuperamos mais um pouco do CBD3 e na lavagem 4 (L4) recuperamos o restante da proteína

Comparando a figura 104 (CBD2) com a figura 105 (CBD3) verificamos uma diferença na interação, sendo que o CBD3 interage mais fortemente do que o CBD2, mas ambas interagem com a quitina coloidal. Isso nos deixa aberto para a realização de novos experimentos de interação utilizando principalmente a técnica de ressonância plasmônica de superfície.

Também foi realizado o mesmo experimento de interação utilizando um tampão fosfato 10 mM com força iônica 5 vezes menor para verificar se a força iônica influenciaria na interação. No experimento utilizando uma concentração de 10 mM observamos que a interação do CBD piorou, sugerindo que o aumento da força iônica

poderá favorecer a interação do CBD com a quitina coloidal, uma vez que esta interação provavelmente é hidrofóbica.

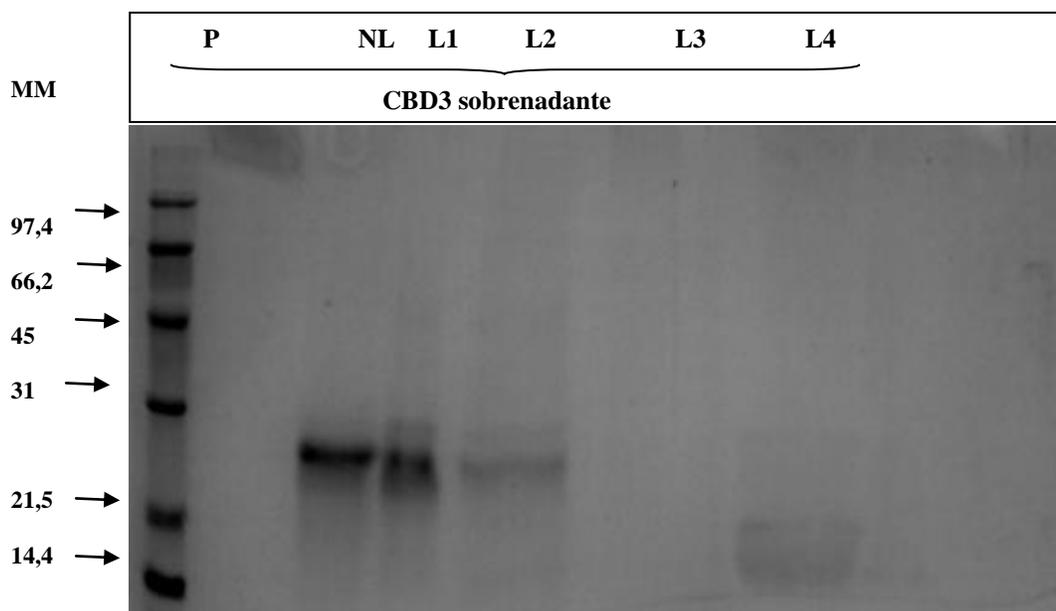


Figura 105: Análise das interações entre quitina e o controle e entre quitina e o CBD3. Gel de poli-acrilamida 12%. L1=lavagem com tampão, L2=lavagem com tampão + 1M de NaCl, L3=ácido acético 100 mM e L4=tampão de amostra com β -mercaptoetanol e SDS+10 min de fervura.

4.5.3.7. Medida da interação de peritrofinas com quitosana utilizando a técnica de Ressonância plasmônica de superfície.

A técnica de ressonância plasmônica de superfície utiliza uma câmara de detecção de imagem, que é a chamada CCD (Charge coupled device ou dispositivo de carga acoplado) e o equipamento é denominado SPRi. Com este método pode-se obter a visualização de toda a área da superfície do sensor, que pode ser dividida em pequenas áreas (“spots”), sendo possível efetuar diferentes funcionalizações em cada uma delas. A variação na reflectância devido à interação molecular (ou biomolecular) em cada um dos spots é então registrada pela câmara CCD.

Nos experimentos realizados e descritos aqui foi utilizado o polímero natural quitosana aplicado à superfície de ouro do prisma do equipamento, como suporte para possível formação de monocamadas ou bicamadas.

Quitosana é um polímero obtido a partir de quitina, por um processo de desacetilação parcial, através de tratamento com hidróxido de sódio 40% a 120°C com duração aproximada de 3 horas. Esse tratamento produz um grau de desacetilação de 70% a 80%. Sua estrutura molecular é formada pela repetição de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-ribose) unidos entre si por ligações β (1-4). O grau de desacetilação determina também o grau de solubilidade do polímero em soluções ácidas diluídas ($2 < \text{pH} < 6$) Chatelet et al. (2001) e Ravi Kumar et al. (1999).

Utilizamos a quitosana para realizar estes experimentos, por se tratar de um polímero derivado de quitina, que é o componente estrutural da membrana peritrofica de *Tenebrio molitor*, juntamente com as peritrofinas. As peritrofinas interagem com a quitina na formação desta membrana, revestindo o tubo digestivo inseto e adquire as diversas funções relacionadas a membrana peritrofica já citada na introdução.

Para gerarmos resultados mais isentos de interferentes e mais quantitativos, foi escolhido o uso do equipamento de SPRi.

Durante os experimentos com SPRi, foi utilizada a quitosana solúvel em pH 6,5 e o pH utilizado para as injeções do CBD3 foi 5,0, ambos em tampão acetato 50 mM. Foram escolhidos estes pHs porque são os pHs nos quais ambas as formas que estão interagindo não tem cargas e desta maneira a interação entre quitosana e o CBD3 não seria uma interação por carga, tornando a interação mais específica.

O primeiro passo nos experimentos foi tornar a superfície do ouro saturada de quitosana para que não ficasse livre nenhuma superfície do ouro, pois o ouro é muito reativo e poderia gerar interações inespecíficas com o CBD3.

A figura 106 mostra a cinética de adsorção da quitosana em superfície de ouro como descrito no item 3.23.

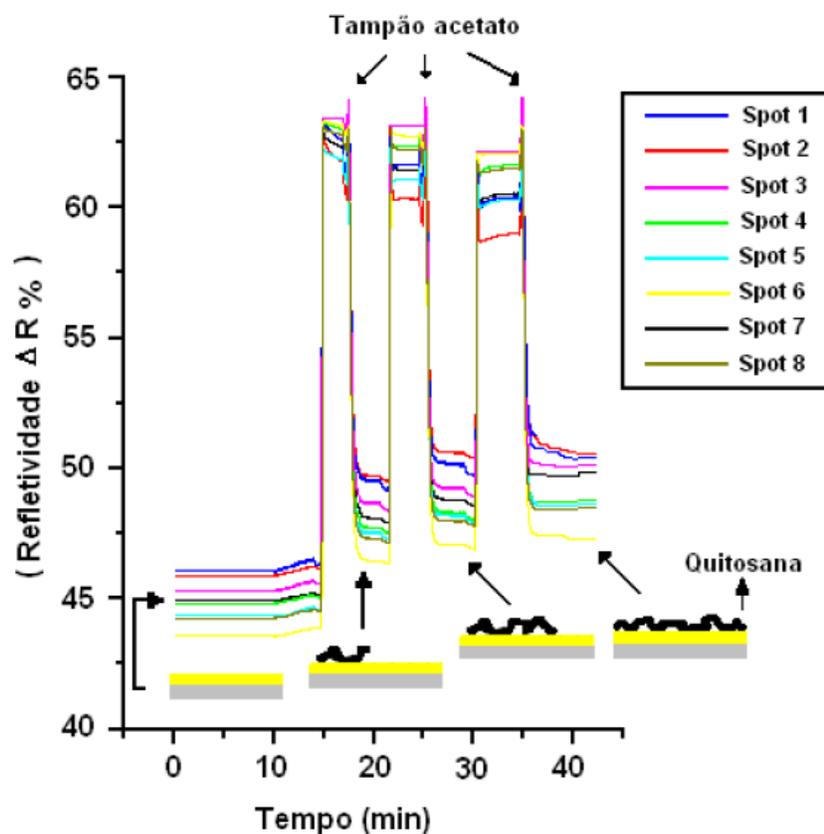


Figura 106: Variação da reflectividade em função do tempo de adsorção de quitosana. São indicados os momentos de injeção de quitosana (10 mg/mL). As injeções de tampão indicadas referem-se ao tampão acetato pH 6,5.

Pode-se observar na figura 106 que a injeção das soluções de quitosana em tampão pH 6,5 causam mudança na reflectividade da superfície de ouro/tampão e isto pode ser visto nas imagens de SPRi, onde o clareamento (aumento da reflectividade) de uma determinada região em comparação com outra, indica a ocorrência de adsorção. As imagens da figura 107 mostram que, do momento anterior à injeção da quitosana (imagem A) até 25 minutos após o início da adsorção (imagem C) ocorrem variações na imagem, tornando-se mais heterogênea em (C) do que em (A). Esta heterogeneidade mostra a mudança de refração na superfície do prisma de ouro, detectada pela câmera, mostrando que a quitosana está ligada nesta superfície.

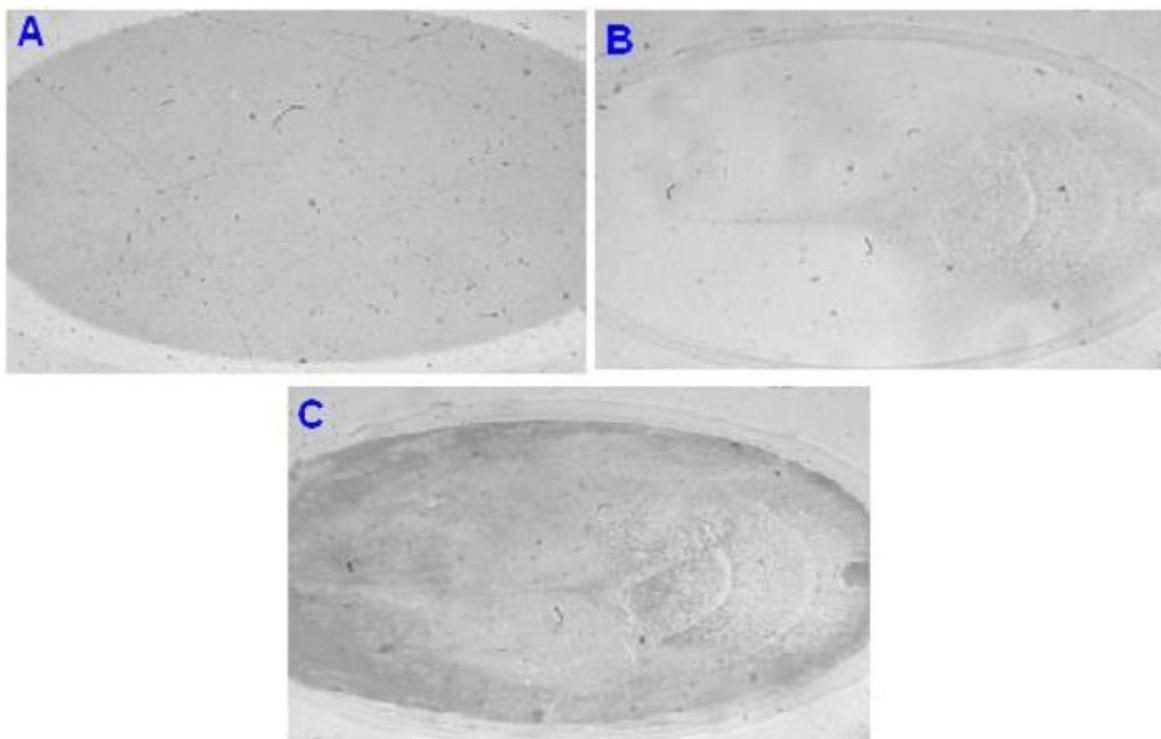


Figura 107: Imagens obtidas por SPRi na adsorção de quitosana sobre o eletrodo de ouro. (A) superfície do prisma antes da injeção de quitosana, (B) Prisma após 10 minutos de adsorção da quitosana, (C) Prisma após a última lavagem com tampão acetato.

Após as análises acima, verificamos que a superfície do prisma estava coberta pelo filme de quitosana como mostrado nas figuras 106 e 107. Mais um teste foi realizado para confirmar que nenhuma fresta de ouro estava exposta ao meio. Para isso foi injetada a proteína BSA (soro albumina bovina) na concentração de 2mg/mL, muito utilizada para preencher espaços não ocupados pelo polímero de quitosana, uma vez que esta proteína consegue penetrar em ranhuras não alcançadas pelo polímero devido ao seu tamanho. Após esta injeção, foi possível dar início as injeções contendo CBD3.

A camada de quitosana ligada na superfície do ouro proporciona um suporte para acomodação do domínio ligante de quitina (CBD3) e após esta modificação, começaram os experimentos para saber se ocorre e de que maneira acontece a ligação entre a quitosana e o CBD3. A eficiência de sistemas multicamadas baseados na adsorção em superfícies de ouro foi descrito anteriormente para quitosana/fosfolipídeos (Faldt, Bergenstahl & Claesson, 1993).

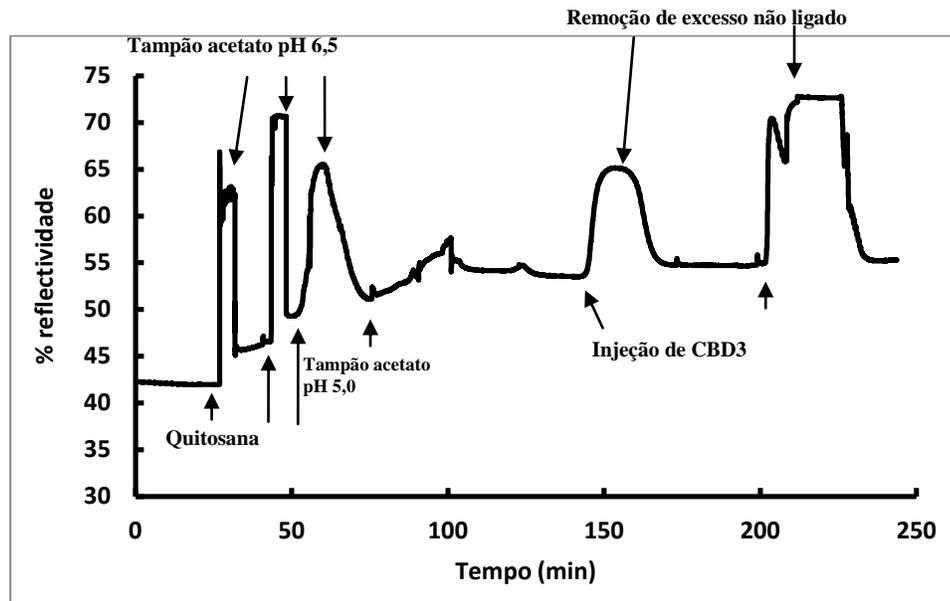


Figura 108: Variação da reflectividade em função do tempo durante a adsorção do CBD3 em meio tamponado sobre monocamada de quitosana. São indicados os momentos das adsorções de CBD3. As injeções de tampão também são indicadas.

O gráfico da figura 108 esboça a cinética de adsorção do CBD3 na quitosana, de acordo com o protocolo descrito no item 1.12. Nota-se que ocorre uma grande variação de reflectividade quando uma solução de proteína CBD3 entra em contato com a camada de quitosana. Verifica-se que mesmo após a lavagem com tampão, a camada de CBD3 ligado mantêm-se ligado, sendo lavado apenas o excesso não ligado, isto é a linha horizontal após remoção do excesso é mais alta que imediatamente antes da adição do CBD3.

A quantidade de proteína ligada na superfície foi pequena, mas comprova a interação entre a quitosana e o domínio ligante de quitina. Esta interação não é desfeita quando injeta-se tampão para lavar o excesso de proteína que estava no meio.

Esta interação agora será refinada utilizando-se as outras construções de domínio ligantes de quitina (CBD) e será monitorada a eficiência de interação destes com a quitosana. Também tentaremos fazer uma nova camada de quitosana sobre o CBD3 ligado para verificar se a quitosana ligaria, mostrando mais uma vez que a

quitosana está interagindo com o CBD e formando uma nova camada. Mutações sítio-dirigidas também podem ser feitas nos resíduos hidrofóbicos que imagina-se que seja o responsável pela interação entre os domínios ligantes de quitina e a quitosana, repetindo-se a seguir o experimento para medir a interação de CBD3 com quitosana.

Para mensurar a quantidade de proteína CBD3 que se ligou à superfície de quitosana foi utilizada algumas fórmulas mostradas ao longo da tese onde levamos em conta alguns parâmetros extraídos dos dados obtidos no equipamento SPRi

Utilizando-se as equações 2 e 3 no cálculo da espessura da camada de quitosana e quantidade de material adsorvido, e admitindo-se os valores de ($\Delta(\%R) =$ reflectividade após interação – reflectividade antes interação), ($\Delta(\%R)/\Delta n = 2739,41$), ($n_{\text{eff}} = 1,33672$ para quitosana e $n_{\text{eff}} = 1,1,3379$ para CBD3), $n_b =$ nacetato 50 mM = 1,3336 para a quitosana e 1,3375 que é o n_b após a adsorção da quitosana utilizado como linha base para a interação do CBD3 e ($n_a = n_{\text{quitosana}} = 1,50$ e $n_{\text{proteína}} = 1,8$. (Huang et al., (2003)) calculou-se que a monocamada de quitosana tinha 24 \AA° (2,4 nm) de espessura e a quantidade de quitosana adsorvida era de $2,67 \text{ ng/mm}^2$. Esta espessura do filme de quitosana está condizente com a literatura, que diz que filmes de quitosana variam desde 7 até 30 \AA° de espessura para várias camadas de quitosana, dependendo do grau de desacetilação (Huang et al., 2003, Sorlier et al., 2003 e Fujimoto et al., 2002).

Para os valores encontrados para CBD3, temos que a o filme de proteína formado possui uma espessura de $3,2 \text{ \AA}^{\circ}$ e a quantidade de CBD3 interagindo com a quitosana é de $0,03 \text{ ng/mm}^2$.

Para fazer os cálculos de quantificação da interação de CBD3 com a quitosana foram utilizados valores de dn/dc encontrados na literatura para outras proteínas e estão todos na ordem de 1,8.

Esta quantificação da interação do CBD3 com a quitosana poderá ser muito útil na comparação entre os diferentes tipos de peritrofinas clonadas ao longo deste projeto, uma vez que poderemos comparar as afinidades entre proteínas com diferentes números de domínios ligantes de quitina e desta forma quantificar esta diferença de interação e também gerar modificações sítio-dirigidas que comprovem o local desta interação.

5. Discussão geral

5.1. α -Manosidase

As α -manosidases intestinais da larva de *T. molitor* ocorrem na forma solúvel (82% da atividades total) e ligada a membrana microvilar (18%). As formas solúveis foram submetidas a 3 passos cromatográficos, resolvendo duas atividades: uma majoritária Man1 e outra minoritária Man2.

As duas manosidases apresentam propriedades muito semelhantes, tais como peso molecular de 123 kDa (filtração em gel), pH ótimo (5,6) e sensibilidade para Swainsonina (Ki Man1, 68 nM e Ki para Man 2, 63 mM). Já as especificidades por substrato variam um pouco: Man1 prefere ligações α -1,2 manosídicas, enquanto que Man 2 quebra melhor α -1,3 manosídicas, embora nos dois casos as ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 sejam atacadas. Essas características permitem classificar essas α -manosidases como da classe II, isto é das manosidases catabólicas, que pertencem à família 38 das glicosídeo hidrolases (Henrissat & Bairoch, 1993), junto às manosidases lisossômicas (Howard et al., 1997). Enzimas semelhantes foram encontradas no besouro *Rhynchophorus palmarum* (Bedikou et al., 2009a; 2009b).

Os dados do transcriptoma (pirosequenciamento) intestinal de *T. molitor* foi usado para completar uma sequência de α -manosidase que havia sido descoberta em varredura ao acaso de biblioteca de cDNA (sequenciamento Sanger) e para obter dados sobre outras α -manosidases. O pirosequenciamento revelou 19 sequências de α -manosidases, mas nenhum contig correspondia a sequência descoberta anteriormente. Após alinhamentos múltiplos, desconfiou-se que o contig 12 era a continuação da sequência original da α -manosidase. Utilizando-se de iniciadores apropriados, a suspeita foi confirmada e uma sequência completa foi obtida e denominada de TmMan1.

Um cladograma gerado com as sequências de todos os contigs obtidos, assim como de sequências representativas das famílias 38 e 47 das glicosídeos hidrolases, mostrou que todas as nossas sequências, exceto o contig 7, pertencem à família 38. Algumas sequências, por serem muito pequenas, não apareceram no cladograma.

Um cladograma, agora só das sequencias da família 38, mostrou que todos os nossos contigs , exceto o contig 13, 4 e 7 que não possuem peptídeo sinal, reuniram-se em um único grupo monofilético.

Todas as sequências com mais de 100 reads (exceto o contig 9) tiveram a sua expressão tecidual avaliada por RT-PCR. Os resultados mostraram que só são expressos no intestino ou intestino e túbulo de Malpighi, implicando na possibilidade de serem digestivas. Dessas sequencias, as únicas com peptídeo sinal são a TmMan1 (contig 12) e o contig 14 e, portanto, devem corresponder às atividades Man1 e Man2. Levando em conta o número de reads, TmMan1 deveria corresponder a Man2 e o contig 14 à Man1. É possível, embora necessite de confirmação, que os contigs 8 e 15 sejam de expressão lisossômica.

Um peptídeo sintetizado que correspondia a sequencia única da TmMan1 foi usado para gerar anticorpos, que reconheceram a Man2, mas não a Man1, confirmando a identificação de TmMan1 com a Man2. Esse anticorpo foi também utilizado para imunolocalizar a TmMan1 nas células intestinais de *T. molitor*. Os resultados mostraram que a TmMan1 é secretada de forma apócrina pela região anterior de intestino de *T. molitor*.

Esse trabalho é o primeiro que mostra a ocorrência de α -manosídeses com especificidade similar àquelas lisossômicas, mas que são secretadas apócrinamente para fora da célula, devendo agir no lúmen intestinal, removendo resíduos de manoses de oligossacarídeos manosilados.

5.2. Fisiologia molecular intestinal

5.2.1. Considerações gerais

O número de transportadores e canais encontrados no transcriptoma intestinal de *T.molitor* de cada tipo escolhido (em número de 10) foi muito grande. Uma parcela significativa desses deve desempenhar funções gerais da célula e não estar envolvido diretamente nos eventos relacionados à digestão. Dessa forma, na elaboração dos modelos fisiológicos só foram levados em conta aqueles expressos exclusivamente no intestino médio ou no intestino médio e túbulos de Malpighi. As sequências co-expressas no intestino médio e túbulos de Malpighi foram levadas em consideração

porque é conhecido que os túbulos de Malpighi nos insetos (Beyenbach, K. W, 2003), assim como nos rins dos vertebrados, (Boron e Boulpaep, 2005) compartilham transportadores e mesmo algumas enzimas digestivas com o intestino médio. Isso é compreensível, porque após o filtrado inicial (tanto dos túbulos de Malpighi e rins), este deve ser reabsorvido seletivamente de forma a recuperar nutrientes e íons de importância biológica.

5.2.2. Transporte facilitativo e ativo de íons

Os tipos de transportadores e canais melhor conhecidos (revisitos na introdução) foram considerados aqui. Contudo, a discussão dos canais de cloreto, transportadores de bicarbonato, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ e o co-transportador K^+/Cl^- foi reunida aos sistemas descritos nos próximos itens, onde sua participação é relevante.

As **V-ATPases** são altamente conservadas na sua evolução e se relacionam com diversas funções dos organismos eucarióticos. Esta bomba pode acidificar uma grande variedade de organelas intracelulares e também bombeia prótons através das membranas criando um gradiente de prótons que é utilizado como energia para a execução de muitas funções celulares como, por exemplo, o transporte de solutos através das membranas.

Em *T. molitor*, através do pirosequenciamento do cDNA do intestino médio, foram encontradas 3 sequências similares a V-ATPases e destas 3 sequências uma delas foi expressa somente no intestino médio, mas distribuída ao longo das 3 regiões do mesmo (A, M e P). A outra sequência foi expressa ao longo do intestino médio e nos túbulos de Malpighi e a última sequência é expressa nas regiões anterior e posterior do intestino médio e nos túbulos de Malpighi (Fig. 109).

A V-ATPase em *T. molitor* parece ser uma bomba usada para energizar muitos dos transportes ao longo do intestino médio como, por exemplo, o de oligopeptídeos (ver Transporte de nutrientes), mas não é possível avançar somente com os dados disponíveis.

As sequências similares às de **canais de potássio** encontrados no pirosequenciamento intestinal de *T. molitor* foram em número de 3 sequências e somente uma delas foi específica do tubo digestivo. Esta sequência foi expressa

somente na região média do intestino médio de *T.molitor* com 19 reads. Este canal pode estar envolvido na manutenção da homeostase celular e também no potencial eletroquímico, uma vez que muitos transportadores utilizam Na^+ e H^+ como íons para auxiliarem no transporte e o K^+ poderia repor a carga retirada por estes tipos de transportadores. Os dados não permitem uma discussão mais detalhada.

As **bombas de Na^+ e K^+** são responsáveis pelo equilíbrio de cargas (ver introdução) e, portanto estão presentes na maioria dos tipos celulares. Foram encontradas 3 sequências similares a este tipo de transportador. Os resultados do RT-PCR nos mostraram uma distribuição ao longo do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi do único contíg que pode ser amplificado. O cladograma das sequências mostrou ramos onde as sequências de *Tenebrio molitor* sempre tiveram maior similaridade com bombas de Na^+ e K^+ de *T.castaneum*.

Daqueles resultados se depreende que aquelas diferentes bombas divergiram antes da especiação de *T.molitor* e *T.castaneum* e que no intestino médio devem ocorrer na base celular e desempenhar funções de homeostase iônica a elas geralmente atribuídas.

Duas sequencias de **cotransportadores de oligopeptídeos/ H^+** foram encontradas no pirosequenciamento. Estas duas sequências se expressam de forma crescente ao longo do intestino médio, sendo sua maior expressão na região posterior com 148 reads contra 79 reads da região anterior e 79 reads da região média (Fig. 109). É compreensível que sua expressão seja maior na região posterior, uma vez que ali é a última possibilidade de absorção dos oligopeptídeos que ainda estiverem no lúmen, remanescentes da digestão final de proteínas que ocorre nesta região posterior de *T.molitor*, segundo Cristofolletti et al. (2001).

Abaixo temos a figura 115 mostrando um panorama geral de distribuição dos transportadores de *T.molitor* que são típicos de algumas regiões do intestino médio e possivelmente exercem sua função dentro da fisiologia molecular deste inseto.

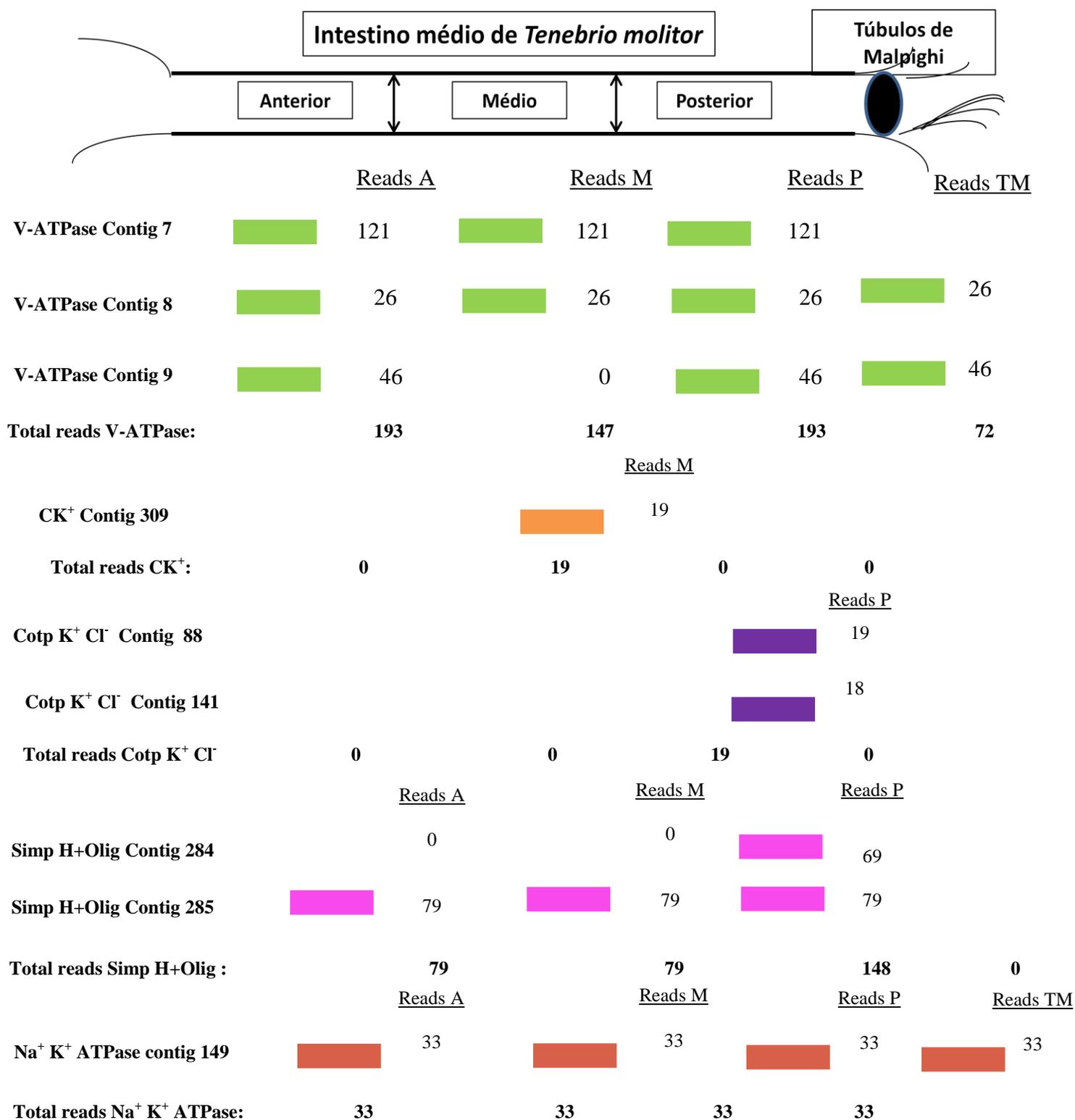


Figura 109: Distribuição dos transportadores de íons ao longo do tubo digestivo de *T. molitor*. O número de reads foi obtido através do pirosequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T. molitor* e os mesmos foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foram detectados pela presença de expressão do transportador.

5.2.3. Transporte de nutrientes

Os **transportadores de aminoácidos** estão representados por 13 sequências dentre os 10 tipos de transportadores pesquisados no transcriptoma. Dentre as 13 sequências, quatro mostraram-se específicas de tubo digestivo, com expressão uniforme ao longo do seu comprimento. Um dos 13 transportadores teve sua expressão encontrada no tubo digestivo e também nos túbulos de Malpighi, como mostrado na figura 110 abaixo. Com este panorama dos transportadores de aminoácidos mostrados na figura 50 e resumidos na figura 110, podemos dizer que estes participam da captação de aminoácidos ao longo do tubo digestivo. Apesar da digestão de proteínas em *T. molitor* ser mais significativa na região posterior do intestino médio (Terra et al., 1985), o contrafluxo intestinal desloca água e nutrientes para as regiões anterior e média do intestino médio. Desta forma os transportadores de aminoácidos em qualquer posição estariam envolvidos na captação de aminoácidos para as células.

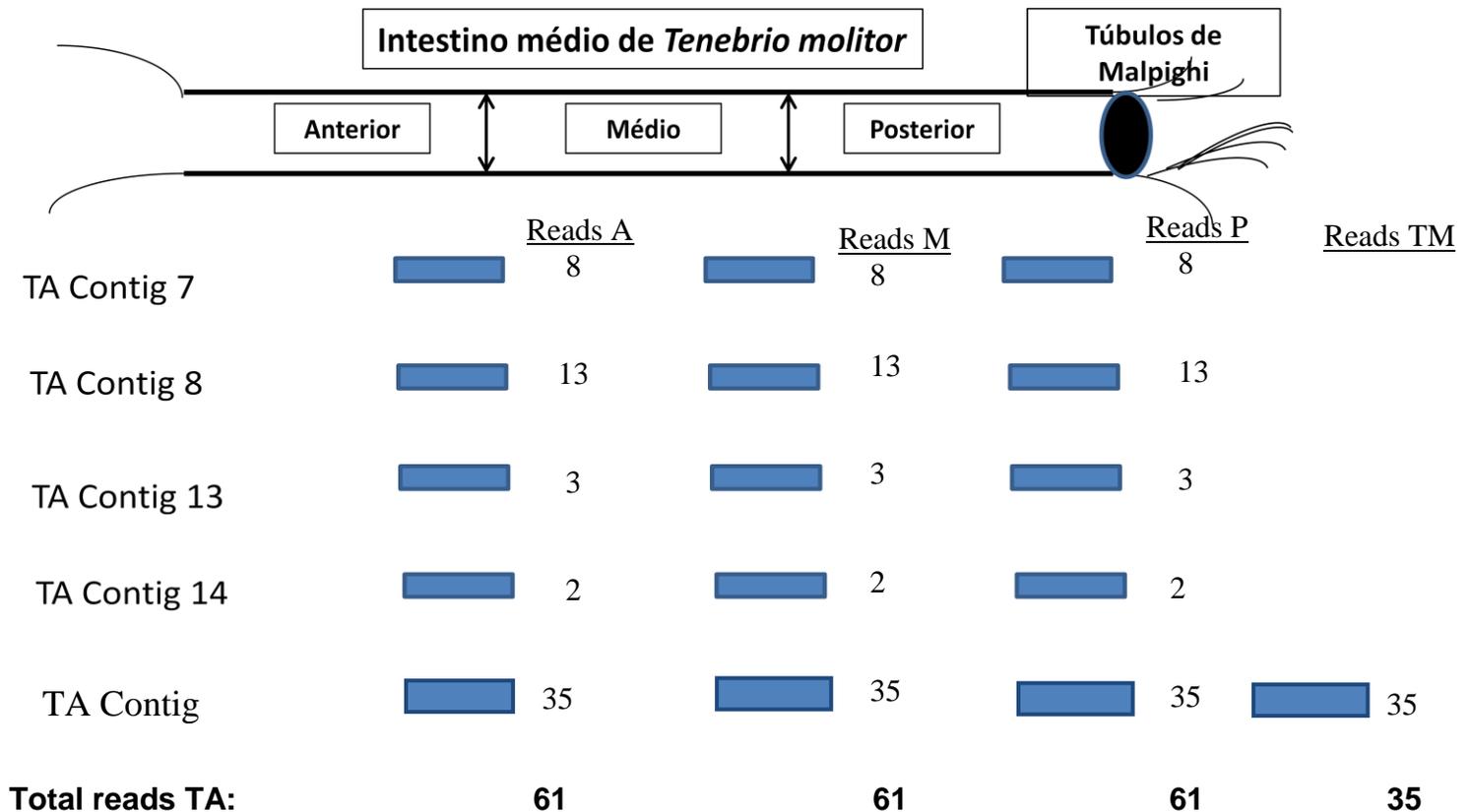


Figura 110: Distribuição das sequências dos transportadores de aminoácidos com expressão nas diferentes regiões do intestino médio (anterior, média e posterior) e também nos túbulos de Malpighi. O número de reads foi obtido através do pirosequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T.molitor* e os mesmo foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foi detectado a expressão do transportador. Esta distribuição igualitária foi feita porque não podemos diferenciar as expressões somente pelo RT-PCR que é qualitativo. TA= transportador de aminoácidos.O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões. Os transportadores que tiveram a sua expressão em outras regiões além do intestino médio de túbulos de Malpighi não aparecem nesta figura.

Foram encontrados 15 sequências diferentes de **transportadores de açúcar**, sendo dois destes do tipo SGLT e 13 do tipo GLUT. Destes 15, 6 deles são expressos somente no tubo digestivo de *T.molitor* e somando o nº de reads destes transportadores específicos de tubo digestivo podemos ter um panorama geral da localização destes transportadores e a sua importância quanto aos fenômenos de absorção de açúcar dentro da fisiologia molecular de *T.molitor*. De acordo com a figura 111, na qual podemos visualizar a soma dos reads dos transportadores ao longo do intestino médio de *T.molitor* e também os que são expressos em túbulos de Malpighi. A soma dos reads dos transportadores específicos de tubo digestivo nos demonstra uma uniformidade na expressão dos transportadores de açúcar ao longo do intestino médio. Esta expressão dos transportadores sugere que eles favorecem o transporte dos açúcares resultantes da digestão de carboidratos ao longo de todo o intestino médio, de forma similar ao discutido para os aminoácidos.

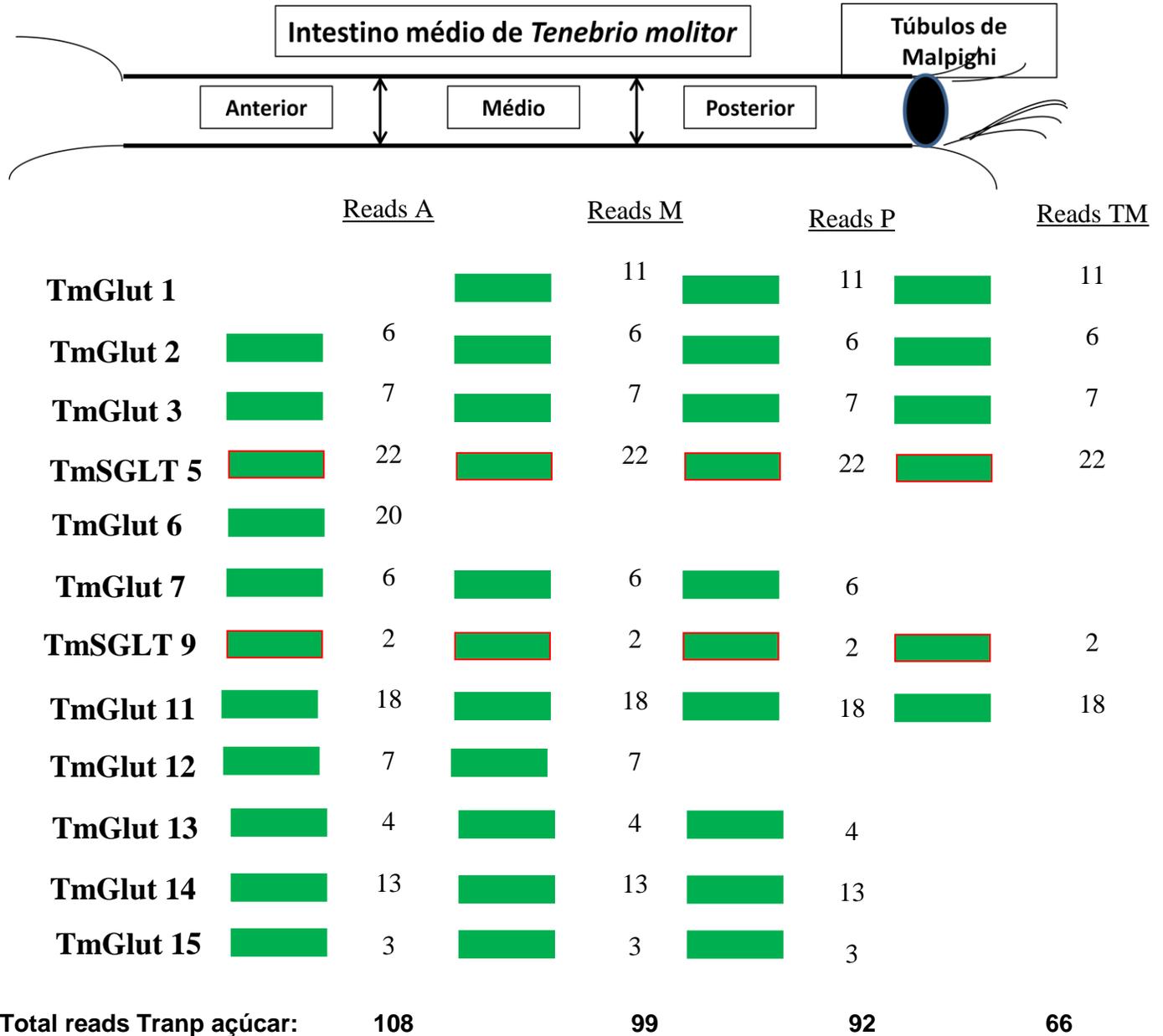


Figura 111: Distribuição das sequências dos transportadores de açúcar com expressão nas diferentes regiões do intestino médio (anterior, média e posterior) e também nos túbulos de Malpighi. O número de reads foi obtido através do pirossequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T. molitor* e os mesmos foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foi detectado presença de expressão do transportador. Esta distribuição igualitária foi feita porque não podemos diferenciar as expressões somente pelo RT-PCR que é qualitativo. TmGlut= transportador de açúcar do tipo Glut. TmSGLT: transportador de açúcar do tipo SGLT. O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões. Total de reads específicos foi feito somando os reads dos contigs que são expressos somente nas 3 regiões do tubo digestivo. Os transportadores que tiveram a sua expressão em outras regiões além do intestino médio de túbulos de Malpighi não aparecem nesta figura (contigs TmGlut4, TmGlut8 e TmGlut10).

5.2.4. Tamponamento do pH luminal

O intestino médio de *T.molitor* apresenta um pH luminal tamponado de 5,6 nas regiões anterior e média e de cerca de 8 na região posterior (Terra et al., 1985). A manutenção desses pHs deve estar relacionada a existência de transportadores com expressão regionalizada ao longo do intestino. Um exame dos resultados obtidos com o transcriptoma identificou bons candidatos para gerar os tampões adequados.

A figura 113 resume a expressão confinada dos **transportadores de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$** às regiões onde o pH do intestino médio do inseto é mais ácida, o que concorda com o fato de que o íon amônio NH_4^+ , quando lançado no lúmen, liberará H^+ reduzindo o pH do meio devido ao aumento de H^+ livre.

O pH de uma solução de NH_4Cl é cerca de 5,6, o mesmo valor do pH encontrado na região anterior do intestino médio de *T.molitor*. Existem dois tipos de transportadores de amônio/amônia que se separam no cladograma. Um deles reúne-se com conhecidos transportadores bidirecionais NH_3 (amonium 1, amônia) e o outro com o transportador do íon amônio (amonium 2, NH_4^+). Por outro lado, há uma expressão de **transportadores de cloreto** que se manifesta mais intensamente na região anterior (figura 114). Reunindo essas informações é possível propor o modelo abaixo (figura 112) para acidificação da região anterior do intestino médio de *T.molitor*.

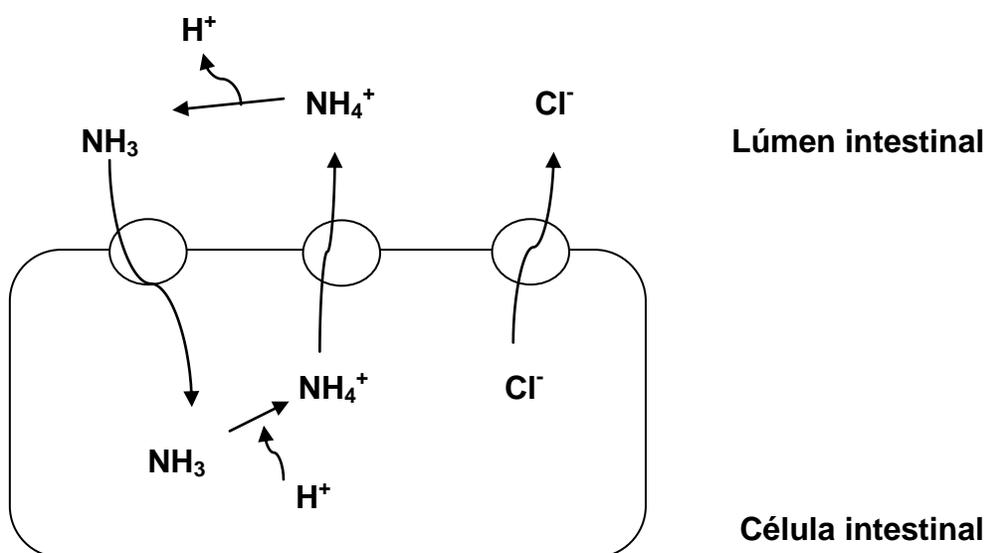


Figura 112 : Modelo para explicar a acidificação das regiões anterior e média do intestino médio de *T.molitor*. Amônia celular é protonada, quando o íon amônio que é levado ao lúmen pelo transportador amônio 2, acompanhado pelo íon cloreto que passa ao lúmen pelo canal de cloreto. O íon amônio desprotona no lúmen, acidificando o meio e gerando amônia que volta à célula pelo transportador de amônio 1.

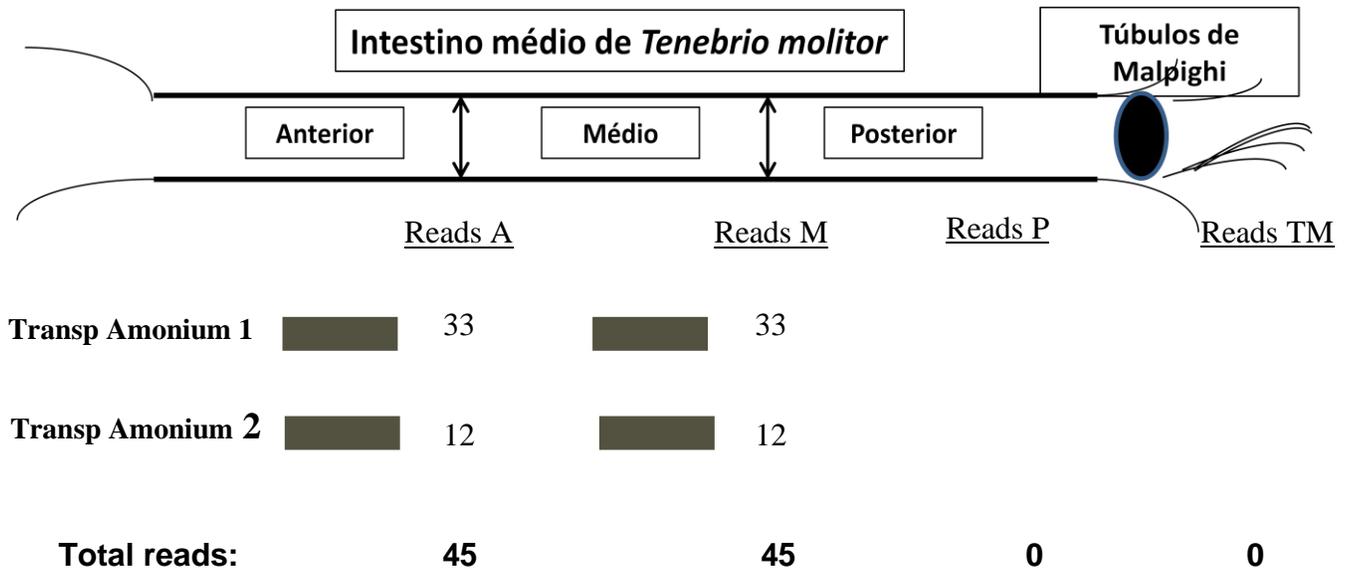


Figura 113: Distribuição dos transportadores de amônia/amônio. O número de reads foi obtido através do pirossequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T.molitor* e os mesmo foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foram detectados pela presença de expressão do transportador.

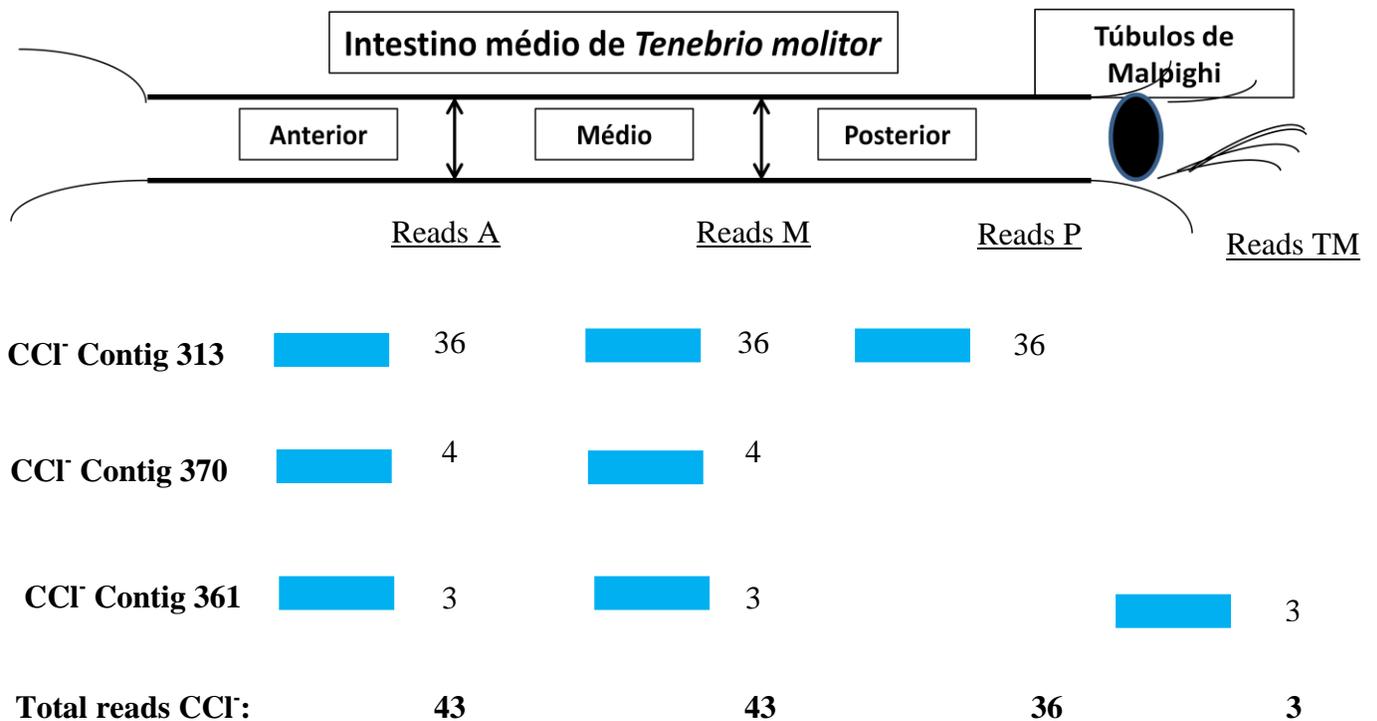


Figura 114: Distribuição dos canais de cloreto. O número de reads foi obtido através do pirossequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T.molitor* e os mesmo foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foram detectados pela presença de expressão do transportador.

O outro transportador relevante aqui é o **transportador de bicarbonato**. Foram encontradas 9 sequências identificadas como sendo similar a este tipo de transportador. Destas 9 sequências, 2 delas possuem uma expressão restrita a região posterior do intestino médio e aos túbulos de Malpighi (contigs 178 e 196). O contig 197 possui a sua expressão nas três regiões do intestino médio e o contig 314 possui a sua expressão nas regiões anterior e posterior do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi.

Os transportadores de bicarbonato que são expressos em outros tecidos de *T.molitor* sem ser o digestivo podem estar envolvidos com outras funções gerais sem ser a digestão ou então podem ser os transportadores que se diferenciam devido à localização na membrana celular. É possível que alguns dos transportadores mais gerais sejam voltados para a hemolinfa (região basal da célula) e outros se situem na região apical da célula e assim podem estar envolvidos com o processo de alcalinização da região posterior.

Este tipo de transportadores podem ser cotransportadores de HCO_3^- juntamente com Na^+ ou então trocadores de HCO_3^- por Cl^- . A secreção de HCO_3^- leva ao aumento do pH na região, uma vez que sequestra H^+ para formar H_2CO_3^- , gerando água e CO_2 . Este é um equilíbrio tamponante e pode ser um dos atores principais para explicar o fenômeno fisiológico de alcalinização da região posterior do intestino médio.

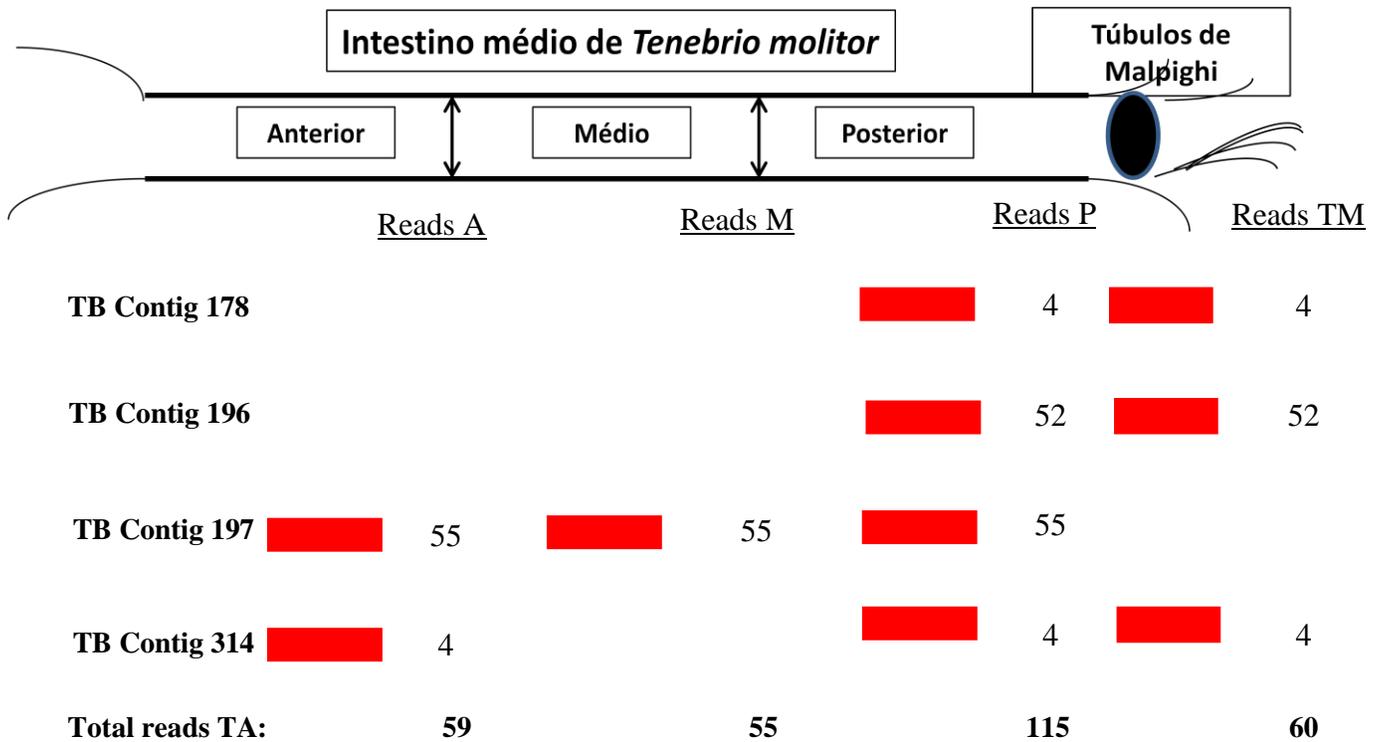


Figura 115: Distribuição dos transportadores de bicarbonato. O número de reads foi obtido através do pirossequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T.molitor* e os mesmos foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foram detectados pela presença de expressão do transportador. Esta distribuição igualitária foi feita porque não podemos diferenciar as expressões somente pelo RT-PCR que é qualitativo. O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões.

Na figura 115 podemos visualizar que a distribuição dos contigs dos transportadores de bicarbonato encontra-se mais expressiva na região posterior do intestino médio, sugerindo a relação deste tipo de transportador com a alcalinização do pH luminal nesta região posterior de *T.molitor*.

Resumindo, os resultados sugerem que a acidificação na região anterior do intestino de *T.molitor* pode resultar da secreção de NH_4^+ acompanhado do íon cloreto e a alcalinização na região posterior do lançamento no lúmen de bicarbonato (figura 116). A importância dos canais de cloreto é que o mesmo balanceia as cargas e desta forma pode ser útil juntamente com o transporte de NH_4^+ , que gera uma carga no lado onde é transportado.

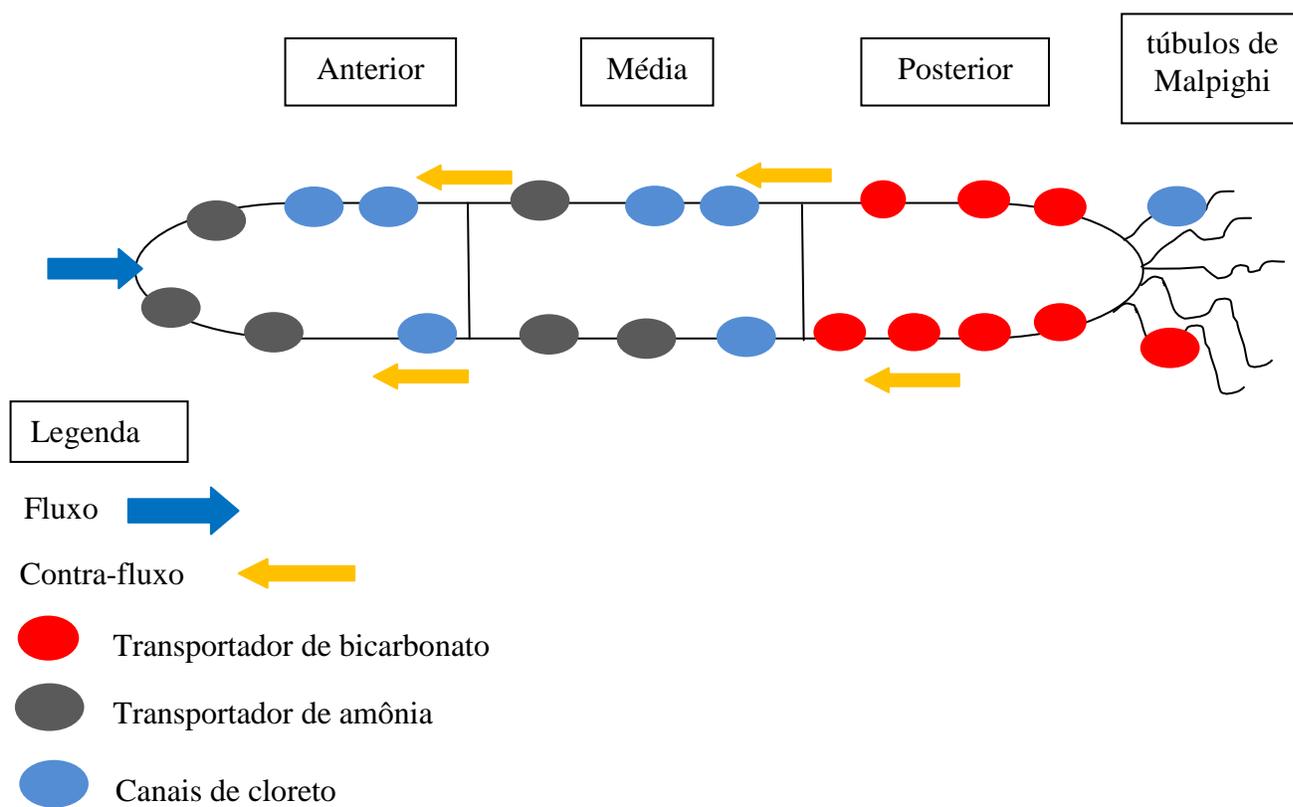


Figura 116: Resumo da localização dos transportadores envolvidos no tamponamento intestinal de *T. molitor* na forma de desenho esquemático das 3 regiões do intestino médio de *T. molitor*. A legenda resume os códigos mostrados na figura. O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões.

5.2.5. Bases moleculares dos contrafluxos intestinais

Os insetos apresentam um fluxo de fluidos contrário ao do bolo alimentar no intestino médio. O bolo alimentar se movimenta no interior da membrana peritrófica (membrana quitino-proteica que envolve o alimento no intestino médio), enquanto que o referido contrafluxo ocorre no espaço ectoperitrófico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal). O contrafluxo é causado pela secreção de fluido na região posterior e a sua absorção na região anterior. A existência do contrafluxo foi evidenciada pela observação do movimento de corantes não absorvíveis no intestino médio, assim como por uma de suas principais consequências, que é a recuperação das enzimas difundindo-se da membrana peritrófica e o seu deslocamento para frente,

impedido a sua excreção. O contrafluxo foi descrito nas ordens principais dos insetos, com a exceção dos Hemiptera (percevejos), cujos intestinos são organizados de forma diferente dos demais insetos (Terra, 2001; Ferreira & Terra, 2012). Mais recentemente, um modelo teórico foi desenvolvido para calcular a distribuição intestinal de enzimas causada pelo contrafluxo (Bolognesi et al., 2008).

Apesar desses avanços, os eventos moleculares subjacentes ao contrafluxo permanecem desconhecidos. Isto é, não são conhecidas as moléculas envolvidas no processo de absorção e secreção de fluidos causadores do contrafluxo. Como veremos a seguir, os resultados obtidos nessa tese permitiram formular um modelo para explicar esses eventos em termos moleculares.

Bifano et al. (2010) mostrou *in vivo*, utilizando percevejos do gênero *Dysdercus peruvianus*, que os transportadores de açúcar transportam junto com os açúcares grande quantidade de água. Os dados de Bifano et al. (2010), juntamente com os registros da literatura referentes a vertebrados que revisaram, deixaram claro que os transportadores de açúcare, principalmente os transportadores do tipo SGLT, são os mais importantes transportadores de água, embora esse transporte também possa ocorrer associado a íons. Baseando-se neste dados da literatura podemos considerar os tranportadores de açúcar de *T.molitor* como sendo os principais responsáveis pela absorção de água no intestino médio.

Outra proteína sabidamente envolvida com o transporte de água são as **aquaporinas**. Das 3 sequências de aquaporinas encontradas em *T.molitor*, dados de RT-PCR (fig. 63) mostram que 2 delas são expressas apenas nas regiões média e posterior do intestino médio e também nos túbulos de Malpighi, como ilustrado na figura 117. Assim, a secreção de água ocorreria na região posterior com a ajuda das aquaporinas.

As aquaporinas são canais que transportam água qua para se movimentar precisa da ocorrência de gradientes osmóticos, formados de regra por íons. Os **cotransportadores de K^+/Cl^-** são transportadores candidatos para servirem ao propósito de contribuírem para a formação dos gradientes necessários. Esse transportador poderia ter uma localização basolateral, permitindo transportar potássio e cloreto a partir da hemolinfa para dentro da célula. Outros transportadores já

mencionados, e a serem mencionados à frente, auxiliam o movimento dos solutos para fora da célula através da sua superfície apical. O resultado final é que os solutos a partir da hemolinfa, particularmente cloreto e potássio, devem ser secretados para o lúmen das células, aumentando a concentração luminal de solutos e fazendo a água ser secretada por osmose através das aquaporinas. A expressão desses cotransportadores restrita a parte posterior do intestino médio concorda com a evidência que temos dessa região ser secretora de água.

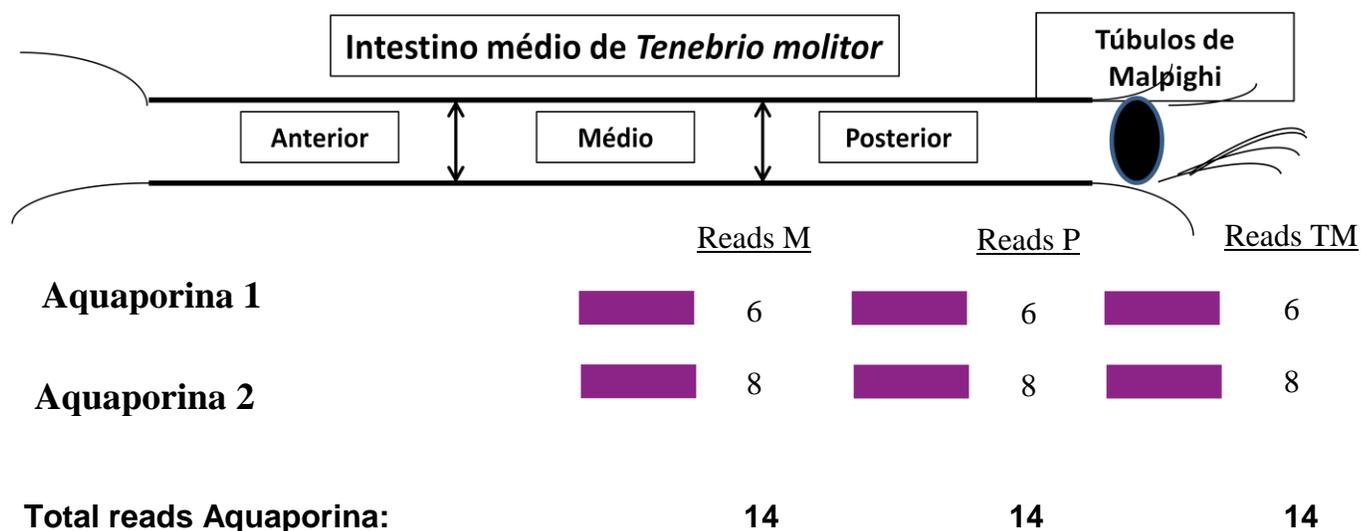


Figura 117: Distribuição das sequências de aquaporinas. O número de reads foi obtido através do pirossequenciamento do cDNA extraído do intestino médio de *T. molitor* e os mesmos foram distribuídos igualmente entre as diferentes regiões onde foi detectado presença de expressão do transportador. Esta distribuição igualitária foi feita porque não podemos diferenciar as expressões somente pelo RT-PCR que é qualitativo. O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões.

A absorção de água (junto com glicose) ao longo de todo o intestino médio, enquanto que a secreção de água ocorreria apenas nos dois terços finais do intestino médio com o auxílio de aquaporinas complementado por transportadores de íons, teria como consequência a absorção líquida de água na região anterior e uma secreção líquida no final do intestino médio. Isso esclarece qual a base molecular para a ocorrência do contrafluxo intestinal evidenciado por experimentos fisiológicos.

A figura 118 abaixo resume este quadro de informações a respeito da absorção de açúcar ao longo do intestino médio, juntamente com a absorção de água e a

secreção de água nas regiões média e posterior, demonstrado pela presença de aquaporinas, evidentemente mais expressas nas regiões citadas acima.

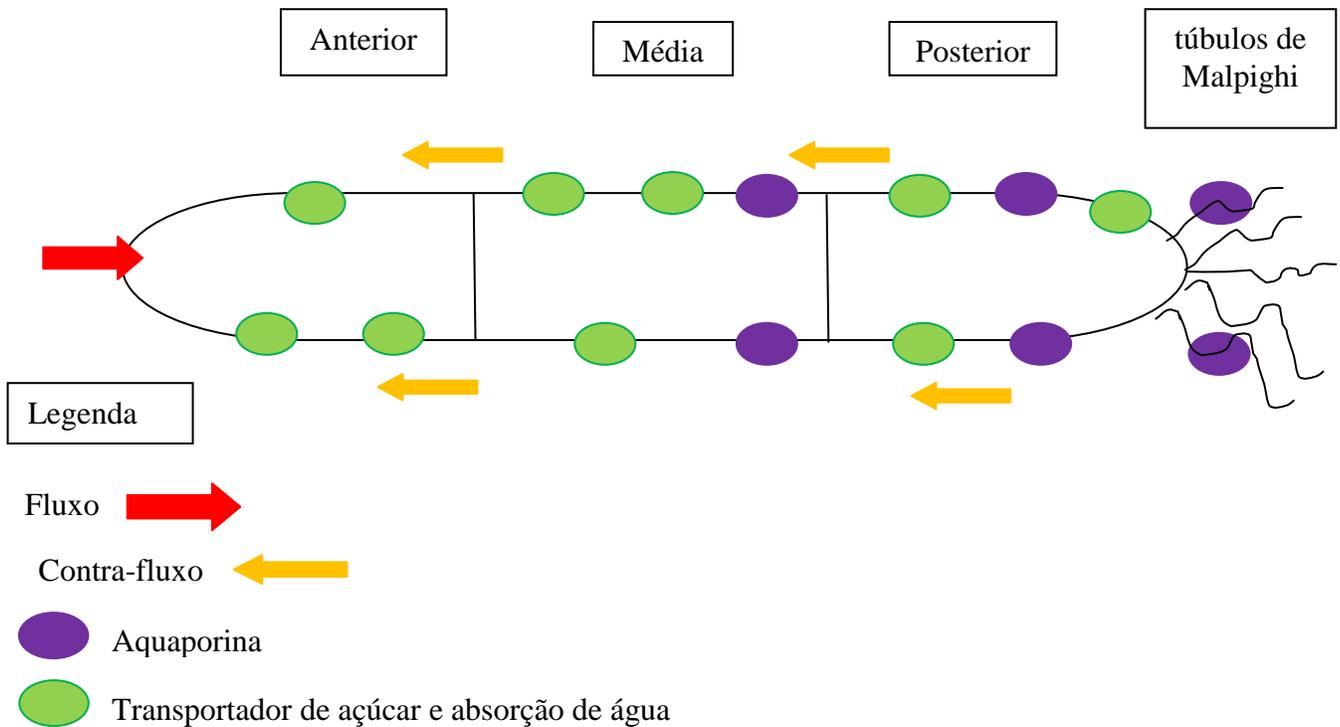


Figura 118: Resumo da localização dos transportadores presumivelmente envolvidos na geração de contrafluxo intestinal de *Tenebrio molitor*. A legenda resume os códigos mostrados na figura. O total de reads foi feito com a soma dos reads nas diferentes regiões.

5.2.6. Comentários finais

Essa tese é pioneira em demonstrar a ocorrência de α -manosidases digestivas derivadas de formas lisossômicas e na identificação de sua família dentre as glicosidases.

Essa tese é pioneira também em apresentar dados significativos em relação a 3 aspectos da fisiologia digestiva de insetos: sítios intestinais de absorção de nutrientes, mecanismo de tamponamento intestinal luminal em besouros e mecanismo molecular causador do contrafluxo intestinal.

Embora existam dados anteriores a respeito de transportadores de aminoácidos e de açúcares (revistos na Introdução), é a primeira vez que um número grande de transportadores é tratado de forma conjunta e são identificados os seus sítios de

expressão. Isso permitiu concluir que o intestino médio de *T. molitor* absorve aminoácidos e açúcares em toda a sua extensão.

Apesar da importância de se conhecer os mecanismos de tamponamento luminal intestinal, pois podem ser alvos para sistemas inovadores de controle de insetos, apenas em moscas (Terra & Regel, 1995) e lagartas (Dow, 1992) o mecanismo de tamponamento é conhecido com algum detalhe. Aqui, pela primeira vez, é feita uma proposta de como seria o tamponamento luminal em um besouro, que é membro do grupo mais numeroso dos insetos.

Finalmente, também pela primeira vez, é proposto um mecanismo molecular para explicar o contrafluxo luminal.

Naturalmente, todas essas propostas devem ser vistas como modelos a serem comprovados por experimentos complementares. Experimentos esses exemplificados pela supressão de expressão de proteínas propostas como relevantes para aos processos descritos, seguido pela avaliação das consequências fisiológicas.

6.Referências bibliográficas

- Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem.* 1998 Jul 10;273(28):17689-95.
- Adang MJ, Spence KD Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni.* *Cell Tissue Res.* 1981;218(1):141-7.
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., et al. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651–1656.
- Adams, M. D, M. Dubnick, A. R. Kerlavage, R. Moreno, J.M. Kelley, T.R Utterback, J.W. Nagle, C. Fields, and J. Craig Venter. 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355: 632-634.
- Agre, P., 2006. The aquaporin water channels. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 5–13.
- Altschul, S.F., Lipman, D.J., 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 5509 - 5513.
- Andersen, J.F. *et al.* (2007) An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). *BMC Genomics*, 8, 102.
- Arakane Yasuyuki*, Charles A. Specht b, Karl J. Kramer a,c, Subbaratnam Muthukrishnan Richard W. Beeman Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2008) 959–962.
- Arca, B. *et al.* (2007) An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 107–127.
- Assumpcao, T.C. *et al.* (2008) An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38, 213–232.
- Ashford D.A, Smith WA, Douglas A.E. 2000. Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* 46,335–342.

- Aurrand-Lions, M., Galland, F., Bazin, H., Zakharyev, V.M., Imhof, B.A., Naquet, P. Immunity (1996). Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing.
- Aumüller, G; Wilhelm, B; Seitz, J 1999. Apocrine secretion—fact or artifact? *Annals of Anatomy*, 181, pp. 437–446.
- Baines, D.M., 1978. Observations on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria migratoroides* (R. and F.) nymphs. *Acrida* 7, 11–21.
- Barry, M.K., Triplett, A.A., Christensen, A.C. (1999). A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29 (4): 319-327.
- BÉDIKOU, E. M, AHI, A. P., KONÉ, F. M., GONNETY, J. T., FAULET, B. M., KOUAMÉ, L. P., NIAMKÉ, S. L. Biochemical properties of extracellular α -mannosidases from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. *Bulletin of Insectology* **62** (1): 75-84, 2009.
- Bédikou, M.; Ahi, P.; Koné, M.; Faulet, B.; Gonnety, J.; Kouamé, P.; Niamké, S. Purification and characterization of a novel thermoacidophilic and thermostable α -mannosidase from the digestive fluid of oil palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Journal European Journal of Entomology* 2009 Vol. 106 No. 2 pp. 185-191
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. Wheeler, D. L., 2000. GENBANK. *Nucl. Acids Res.* 28, 15-18.
- Behr M, Hoch M. Identification of the novel evolutionary conserved obstructor multigene family in invertebrates. *FEBS Lett.* 2005 Dec 19;579(30):6827-33. Epub 2005 Nov 28. Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.
- Berdan, R.C., Lees-Miller, J. P., Caveney, S., 1985. Lack of cell communication in an epithelium: ultrastructure and electrophysiology of the midgut epithelium of the larval mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of Ultrastructural Research* 90, 55-70.
- Berezuk, M.A., Schroer, T.A 2007. Dynactin Enhances the Processivity of Kinesin-2. *Traffic* 8, 124-129.

- Beyenbach, K.W, 2003. Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3845-3856.
- Beyenbach, K.W., Wieczorek, H., 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology* 209, 577–589.
- Bifano, Thaís D; Alegria, Thiago G.P. ; Terra, Walter R. 2010. Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior midgut. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology* (Cessou em 1999. Cont. Comparative Biochemistry and Physiology. Biochemis, v. 157, p. 1-9.
- Bilder D., Li M., Perrimon N. 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289:113–116. *Biochem.* 174: 423–436.
- Bloom JS, Khan Z, Kruglyak L, Singh M & Caudy AA 2009. Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. *BMC Genomics* 10: 221.
- Boguski, M., Lowe, T.,& Tolstoshev, C.(1993). dbEST-database for expressed sequencetags. *Nature Genet.*, 4, 332-333.
- Bolger, M. B., Haworth, I. S., Yeung, A. K., Ann, D., von Grafenstein, H., Hamm-Alvarez, S., Okamoto, C. T., Kim, K.-J., Basu, S. K., Wu, S. and Lee, V. H. L. (1998), Structure, function, and molecular modeling approaches to the study of the intestinal dipeptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.*, 87: 1286–1291. doi: 10.1021/js980090u.
- Bolognesi R., Ribeiro A. F., Terra W. R. and Ferreira C. (2001) The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophic membrane and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 62-75.
- BOLOGNESI, R; TERRA, W. R ; FERREIRA, C. . Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, p. 1413-1422, 2008.
- BONE, G. J. (1944). Le rapport Na: K dans le liquide coelomique des insectes. *Ann. Soc. zool. Belg.* 75. 123-32.

- Boron W.F, Fong P, Hediger MA, Boulpaep EL, Romero M.F, 1997.
- Boron, W.F e Boulpaep, E.L (2005). Medical Physiology, update edition, Elsevier sounders
- Botka, CW; Wittig, TW; Graul, RC; Nielsen, CU; Higaka, K; Amidon, GL; Sadée, W. (2000) Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci*, **2** (2): E16. [PMID:[11741232](#)]
- Burnham CE, Amlal H, Wang Z, Shull GE, Soleimani M. Charles E. Burnham‡, Hassane Amlal‡, Zhaohui Wang‡, Gary E. Shull‡§, and Manoocher Soleimani‡¶THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY . Vol. 272, No. 31, Issue of August 1, pp. 19111–19114, 1997.
- Büki A, Okonkwo DO, Wang KKW, and Povlishock JT. (2000). Cytochrome c Release and Caspase Activation in Traumatic Axonal Injury. *Journal of Neuroscience*. 20(8): 2825-2834.PMID 10751434. Retrieved on January 24, 2007.
- Caccia, S., Leonard, M.G., Casartelli, M., Grimaldi, A., De Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B., 2005. Nutrient absorption by *Aphidius ervi* larvae. *J. Insect Physiol.*, 51, 1183-1192.
- Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon K.H Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008 Oct;38(10):950-8. Epub 2008 Aug 8.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan; 37
- Carvalho, M.C.C.G., Silva, D.C.G. (2010). Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rual*, Santa Maria, vol 40,735-744.
- Castillo MR and Babson JR. (1998). Ca²⁺-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. *Neuroscience*. 86(4): 1133-1144. PMID 9697120. Retrieved on January 24, 2007.
- Chapman R.F (1985). The insects Structure and function. Cambridge university press, 3^a ed., 770 p.

- Chen, M.E., Holmes, S.P., Pietrantonio, P.V., 2006. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imponent fire ant, *solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Archs. Insect. Biochem. Physiol.* 62, 55-72.
- CHRISTENSEN, H. N. Interorgan amino acid nutrition. *Physiol. Rev.* 62: 1193–1233, 1982.
- CHRISTENSEN, H. N. Role of amino acid transport and counter-transport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 43–77, 1990.
- Clotilde Teiling, (2011). Comprehensive transcriptome analysis with the Genome Sequencer FLX System. *Nature methods* V-VII.
- Coe, N. R. & Bernlohr, D. A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1391:287-306.
- Coe, N. R., Simpson, M. A. & Bernlohr, D. A. (1999) Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid. Res.* 40:967-972
- Cooper, G.M and Hausman, R.E. 2004 *The Cell: A Molecular Approach*, Fifth. The composition of cells; cell metabolism.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2007). *A Célula - Uma Abordagem Molecular* .
- Crailsheim, K., 1988. Intestinal transport of sugars in the honeubee (*Apis mellifera*). *J. Insect. Physiol.*, 34, 839-845.
- Cristofolletti P.T., Ribeiro A.F., Terra W.R. 2001. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47, 143-155.
- Cristofolletti P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbe, Y. and Terra, W.R. (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 49: 11-24.
- Daniel, H; Kottra, G. (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.*, 447 (5): 610-8. [PMID:[12905028](#)]
- Davidson, A.L.; E. Dassa; C. Orelle; and J. Chen. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72(2), 317-364.

- De Feijter, J.A; Benjamins, J; Veer, F. A. 1978. Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers.*; 17: 1759-72.
- Deacon Sean W, Serpinskaya Anna S, Vaughan Patricia S, Fanarraga Monica Lopez, Vernos Isabelle, Vaughan Kevin T, Gelfand Vladimir I (2003). "Dynactin is required for bidirectional organelle transport". *The Journal of Cell Biology* 160 (3): 297–301. doi:10.1083/jcb.200210066. PMID 12551954. PMC 2172679. <http://jcb.org/cgi/content/full/160/3/297>.
- Devine PL, McKenzie IF. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays*. 1992 Sep;14(9):619-25. Review.
- Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, McHugh CA, Donnelly-Doman M, Carucci DJ, Yates JR 3rd, Jacobs-Lorena M. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochem Mol Biol*. 2009 Feb;39(2):125-34. Epub 2008 Nov 11.
- Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM . Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J*. 1980 Nov 1;191(2):649-51.
- Drake, L.L., Boudko, D.Y., Marinotti, O., Carpenter, V.K., Dawe, A.L., Hansen, I.A., 2010. The aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One* 5, e15578.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8817–8822 (2003).
- Dunn, P.E, 1988. Humoral Immunity in Insects. *Biscience* Vol 40. N° 10.; 738 of 738-744.
- DUTZLER A, CAMPBELL EB, CADENE M, CHAIT BT, AND MACKINNON R. 3.0 Å X-ray structure of a CLC chloride channel reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. In press.
- Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T and Vallee, R.B. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *The Journal of Cell*

- Biology, 132, 617-633."Entrez Gene: VCL vinculin". <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7414> acessado em dezembro de 2009.
- Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J Insect Physiol.* 2000 Sep 1;46(9):1313-1320.
- Elvin CM, Vuocolo T, Pearson RD, East IJ, Riding GA, Eisemann CH, Tellam RL. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. cDNA and deduced amino acid sequences. *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):8925-35.
- Emanuelsson, O. *et al.* (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.*, 2, 953–971.
- Escher, S.A., Rasmuson-Lestander, A., 1999. The drosophila glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*, 130, 95-103.
- Ewing, B., Green, P., (1998a). Base-calling of automated Sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L.D., Wendi, M.C., Green, P., 1998b. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy Assessment *Genome Res.* 1998 8: 175-185.
- Fasman, G.D. 1976. Handbook of biochemistry: Section A proteins, volume III. CRC 3th edition. 656p.
- Featherstone, DE; Davis WS, Dubreuil RR, Broadie K (2001). "Drosophila alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release". *Journal of Neuroscience* 21 (12): 4215–4224. PMID 11404407. <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/21/12/4215>. Retrieved 2007-02-11.
- Ferreira C. and Terra W.R. (1980) Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B: 467-473.

- Ferreira C., Bellinello G.L., Ribeiro A. F., terra W.R. (1990). Digestive enzymes, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect. Biochem.* 20, 839-847.
- Ferreira C., Capella A.N., Sitnik R., Terra W.R. (1994). Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 299-313
- Ferreira A.H.P., Cristofolletti P.T., Lorenzini D.M., Guerra L.O., Paiva P.B., Briones M.R.S., Terra W.R., Ferreira C. (2007). Identification of midgut microvillar proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* by cDNA library screenings with antibodies. *J. Insect physiol.* 53, 1112-1124.
- Ferreira A.H., Cristofolletti P.T., Pimenta D.C., Ribeiro A. F., Terra W.R., Ferreira C. (2008). Structure, processing and midgut secretion of putative peritrophic membrane ancillary protein (PMAP) from *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 38, 233-243.
- Ferreira, Clélia ; Terra, Walter R. . Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilber L.I. (Org.). *Insect molecular biology and Biochemistry.* 1 ed. Londres: Academic Press-Elsevier, 2012, v. 1, p. 365-418.
- Francis S. Collins, et al 1998. New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science* 282, 682.
- Fujimoto, J; Reis, E.A.O; Petri, D.F.S. 2002. Formation of polysaccharides and protein multilayers. *Química nova.* 25: 757-761.
- Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F. & Garvey, W. T. (2002) The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 165:259-269.
- Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves & J.D. Vendramim. 1988. *Manual de entomologia agrícola.* São Paulo, CERES, 649p.
- Gateff E. 1978. The genetics and epigenetics of neoplasms in *Drosophila*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 53:123–168.
- Gateff E., Schneiderman H. A. 1969. Neoplasms in mutant and cultured wild-tupe tissues of *Drosophila*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31:365–397.

- Geer L. Y., Domrachev M., Lipman D.J and Bryant S.H (2002). CDART: Pprotein homology by domain Architecture. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20894, USA. 12:1619–1623.
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW (1991). "Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein". *The Journal of Cell Biology* 115 (6): 1639–1650. doi:10.1083/jcb.115.6.1639. PMID 1836789. PMC 2289205. <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/115/6/1639>.
- Giordana, B., Milani, A., Grimaldi, A., Farneti, R., Casartelli, M., Ambrosecchio, M.R., Digilio, M.C., Leonardi, M.G., Eguileor, M., Pennacchio, F., 2003. Absorption of sugars and amino acids by the epidermis of *Aphidius ervi* larvae. *J. of Insect Physiol.* 49, 1115-1124.
- Goffeau, A.; B. de Hertogh; and P.V. Baret. 2004. ABC Transporters. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Vol. 1, 1-5.
- Goldmann, W.H., Ingber, D.E. (2001). Intact vinculin protein is Required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-Dependent Lamellipodia Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290: 749-755.
- Gonzalez D.S. and Jordan I.K. (2000) The α -mannosidases: phylogeny and adaptive diversification. *Mol. Biol. Evol.* 17: 292-300.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8, 195-202.
- Gorman, M.J., Andreeva, O.V. and Paskewitz, S.M. (2000) Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene* 251: 9–17.
- Goto, S.G., Philip, B.N., Teets, N.M., Kawarasaki, Y., Lee Jr., R.E., Denlinger, D.L., 2011. Functional characterization of an aquaporin in the antarctic midge *Belgica antarctica*. *Journal of Insect Physiology* 57, 1106–1114.
- Graf, R; Raikhel, A.S; Brown, M.R ; Lea, A.O; Briegel, H , 1986. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell and Tissue Research*, 245, pp. 19–27.

- Guo,Y;. Ribeiro, J.M.C Anderson, J.M and Bour, S. 2009. dCAS: a desktop application for cDNA sequence annotation. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*. Vol. 25 no. 9, pages 1195–1196.
- Grimmond, S., Van Hateren, N., Siggers, P., Arkell, R., Larder, R., Soares, M.B., de Fatima Bonaldo, M., Smith, L., Tymowska-Lalanne, Z., Wells, C., Greenfield, A. Hum. Mol. Genet. (2000). Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development.
- Haas M (October 1994). "The Na-K-Cl cotransporters". *Am. J. Physiol.* 267 (4 Pt 1): C869–85.
- Halestrap AP, Meredith D (2004). "The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond". *Pflugers Arch.* **447** (5): 619–28
- Hames, B.D., Rickwood, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins. 2 ed. New York: Oxford University Press. 383 p.
- Hammarlund, M; Davis WS, Jorgensen EM (2000). "Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure". *Journal of Cell Biology* (The Rockefeller University Press) 149 (4): 931–942. doi:10.1083/jcb.149.4.931. PMID 10811832. <http://www.jcb.org/cgi/content/full/149/4/931>. Retrieved 2007-02-11.
- Hanein, D., Matsudaira, P., and D. J. DeRosier (1997) *The Journal of Cell Biology* 139:387-396. <http://www.jcb.org/cgi/reprint/139/2/387>.
- Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.
- Harper M S, Hopkins T L (1997) Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell* 29: 463-475.
- Harvey, W.R., Okech, B.A., Linser, P.J., Becnel, J.J., Ahearn, G.A., Sterling, K.M., 2010. H⁺ V-ATPase-energized transporters in brush border membrane vesicles from whole larvae of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 56, 1377–1389.
- HEDIGER MA, COADY MJ, IKEDA TD AND WRIGHT EM. 1987. Expression, cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* 330: 379– 381.

- Helledie, T., Antonius, M., Sorensen, R. V., Hertzelt, A. V., Bernlohr, D. A., Kolvraa, S., Kristiansen, K. & Mandrup, S. (2000) Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J. Lipid Res.* 41:1740-1751
- Hegedus D, Erlandson M., Gillott C and Toprak U (2009). Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: characterization, cDNA cloning and expressed sequence tag analysis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53:30–47.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol.* 2009;54:285-302.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- Henrissat, B. & Romeu, A. (1995) Families, superfamilies and subfamilies of glucosyl hydrolases. *Biochem, J.* 311, 350-351.
- Henrissat, B. (1998). Glycosidase families. *Biochem Soc Trans.* May;26(2):153-6. Review.
- Herrera-Ruiz, D; Knipp, GT. (2003) Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters. *J Pharm Sci*, **92** (4): 691-714. [PMID:[12661057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12661057/)]
- Higgins, D. e Sharp, P. (1988) Clustal: um pacote para a realização alinhamento de sequências múltiplas em um *Gene* microcomputador., 73, 237-244.
- Hinton JC, Hautefort I, Eriksson S, Thompson A & Rhen M 2004. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol* 7: 277–282.
- Hoglund, P. J.; Nordstrom, K. J. V.; Schioth, H. B.; Fredriksson, R. (2010). "The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species". *Molecular Biology and Evolution* 28 (4): 1531–1541.

- Holleran, E.A, MK Tokito, S Karki and EL Holzbaur. (1996) Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *The Journal of Cell Biology*, 135, 1815-1829.
- Holleran, E.A, LA Ligon, M Tokito, MC Stankewich, JS Morrow and E.L. F. Holzbaur (2000) β III Spectrin Binds to the Arp1 Subunit of Dynactin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36598-36605.
- Huang,X. and Madan,A. (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9, 868–877.
- Huang. H: Xiurong, Y. 2003. Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry. Eng. Aspects*. 226: 77-86.
- Huber, R.E., and R.D. Mathison (1976). Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose on honey bees (*Apis mellifera*). *Can. J. Biochem.* 54,153-164.
- Humola, J. Eletromagnetic theory of surface plasmons. 2006. In: *Surface Plasmon resonance based sensors*. 1st ed. New York: Springer-Verlag. P, 3-44.
- Hyman, E.D. 1988. A new method of sequencing DNA. *Anal.*
- [Http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/producao-agricola-da-safra-20132014-ameacada-por-pragas](http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/producao-agricola-da-safra-20132014-ameacada-por-pragas) acessado em agosto de 2013.
- Huh GY, Glantz SB, Je S, Morrow JS, and Kim JH. (2001). Calpain proteolysis of alphaspectrin in the normal adult human brain. *Neuroscience Letters*. 316(1): 41-44. PMID 11720774. Retrieved on January 24, 2007.
- Ivanov, B. *Thin liquid films: fundamentals and applications*. 1988; CRC, 1st Edition Press USA.
- Jasrapuria S, Arakane Y, Osman G, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S. Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010 Mar;40(3):214-27. Epub 2010 Feb 6.
- Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM, Neefjes J. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol*. 176:459-71. PMID: 17283181.

- Jolly, C. A., Murphy, E. J. & Schroeder, F. (1998) Differential influence of rat liver fatty acid binding protein isoforms on phospholipid fatty acid composition: phosphatidic acid biosynthesis and phospholipid fatty acid remodeling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1390:258-268.
- Jones PM, George AM (Mar 2004). "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research". *Cell Mol Life Sci.* 61 (6): 682–99. doi:10.1007/s00018-003-3336-9. PMID 15052411.
- Joost, H.G., Bell GI, Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schumann, A., Seino, S and Thorens, B., 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American journal of physiol* 282. E974-E976.
- Jordão B.P., Terra W.R., Ribeiro A.F., Lehane M.J., Ferreira C. (1996). Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 337-346.
- JORDÃO, B. P, CAPELLA, A. N.; TERRA, W. R; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. Nature of The anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *Journal of Inorganic Biochemistry JCR*, v. 45, p. 29-37, 1999.
- Jung, L. S; Shumaker-Parry, J. S; Campbell, C. T; Yee, S. S; Gelb, M.H. 2000. Quantification of tight binding to surface-immobilized phospholipid vesicles using surface Plasmon resonance: binding constant of phospholipase A2. *Journal of American chemical society.* 122: 4177-4184.
- Karouzou MV, Spyropoulos Y, Iconomidou VA, Cornman RS, Hamodrakas SJ, Willis JH *Drosophila* cuticular proteins with the R&R Consensus: annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007 Aug;37(8):754-60. Epub 2007 Mar 19.
- Kataoka, N., Miyake, S., Azuma, M., 2009a. Aquaporin and aquaglyceroporin in silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology* 18, 303–314.

- Kataoka, N., Miyake, S., Azuma, M., 2009b. Molecular characterization of aquaporin and aquaglyceroporin in the alimentary canal of *Grapholita molesta* (the oriental fruit moth) – comparison with *Bombyx mori* aquaporins. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 78, 81–90.
- Kawart Z., Karaveg K., Moremen K.W and Jarvis D.L. (2001) Insect cells encode a class II α -mannosidase with unique properties. *J. Biol. Chem.* 276: 16335-16340.
- KELLETT GL. 2001. The facilitate component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 531: 585– 595.
- Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Fujita, M., S´nigórska, K., Watanabe, M., Okuda, T., 2008. Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 514–520.
- Kikuta S, Kikawada T, Hagiwara-Komoda Y, Nakashima N, Noda. H. Sugar transporter genes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: A facilitated glucose/fructose transporter. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010 Nov;40(11):805-13. Epub 2010 Aug 10.
- Kimura, S (1983). Genetics of insect hemolymph alpha-mannosidase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Genet.* Aug;21(7-8):713-24.
- King, S.J e Schroer,T.A., 1999. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology* 2, 20 - 24.
- Kitajima, E.W., 1975. A peculiar type of glycocalyx on the microvilli of the midgut epithelial cells of the thrips *Frankliniella* sp. (thysanoptera, thripidae). *Cytobiology* 11, 299-303.
- Koefoed, B.M., Zerahn, K., 1982. Transport of sodium and potassium across the isolated midgut of the larvae of *Tenebrio molitor* related to the fine structure of the epithelium. *Journal of Experimental Biology* 98, 459-463.
- Koefoed, B.M., Zerahn, K., 1982. Transport of sodium and potassium across the isolated midgut of the larvae of *Tenebrio molitor* related to the fine structure of the epithelium. *Journal of Experimental Biology* 98, 459–463.
- Kopito, R.R, 1990. Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int Rev Cytol.* ;123:177-99.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides.. *Insect Biochem Mol Biol.* 1997 Nov;27(11):887-900. Review

- Kretschmann, E & Raether, H. Radioactive decay of nonradioactive surface plasmon excited by light. *Zeitschrift Naturforschung*. 1968; 23A: 2135-2136.
- Krupp G. 2005. Stringent RNA quality control using the Agilent 2100 bioanalyzer. Agilent Technologies.
- Ladokhin, A.S (2000). Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry*. R.A Meyers (ed) pp 5762-5779.
- Lane N.J., Harrison J.B (1979). An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J. of cell science*, 39, 355-372.
- Law John H. *, Jose M. C. Ribeiro + , and Michael A. Wells*. BIOCHEMICAL INSIGHTS DERIVED FROM INSECT DIVERSITY. *Annu. Rev. Biochem.* 1992. 61 ;87-111
- Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):515-23. Epub 2009 Jul 17.
- Lehane M.J.1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 25-50.
- Li WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM (June 2006). "Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells". *Plant Cell Environ.* 29 (6): 1122–37
- Liu, K., Tsujimoto, H., Cha, S.-J., Agre, P., Rasgon, J.L., 2011. Aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* during blood feeding and humidity adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6062–6066.
- MACALLUM, A. B. (1910). Inorganic components of blood and their relation to the sea. *PTOC. Roy. Soc. B*, 8a, 602-24.
- Macleon, D; Jones, J.D.G; Studholme, D.J. 2009. Application of “next-generation” sequencing technologies to microbial genetics. *Nature reviews Microbiology*, London, V.7, P.287-296.
- Manual de Alternativas Ecológicas para Prevenção e Controle da Pragas e Doenças", Ines Claudete Burg & Paulo Henrique Mayer (organizadores), Paraná: Assessorar, 1999. 7ª edição.
- Mardis, *Trends in Genetics*, v. 24, n.3, 2007.

- Margulies, M. *et al.* 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380
- Mast SW, Moremen KW. Family 47 alpha-mannosidases in N-glycan processing. *Methods Enzymol.* 2006;415:31-46.
- Mathew, L.G., Campbell, E.M., Yool, A.J., Fabrick, J.A., 2011. Identification and characterization of functional aquaporin water channel protein from alimentary tract of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 178–190.
- Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., Parker, R. A., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G. S. & Linton, M. F. (2001) Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat. Med.* 7:699-705
- Matsubara, K. and K. Okubo. 1993. cDNA analysis in the human genome project. *Gene* 135: 265-274.
- Medzon, E.L; Gedies, A. 1971. Substitution of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) for bicarbonate in protein-free animal cell culture medium: application to vaccinia virus quantitation and fluorogenic acetylerase assay in living LM cells. *Canadian Journal of Microbiology.*; 17: 651-3.
- Moreira, N.R. 2008. α -manosidases intestinais de *Tenebrio molitor.*, apresentada ao instituto de química da universidade de São Paulo (USP).Dissertação de mestrado.
- Moremen, K.W., Lal, A, Schutzbach, J.S, Forsee, W.T., Neame, P.J (1994). Isolation and expression of murine and rabbit cDNAs encoding an alpha 1,2-mannosidase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* Apr 1;269(13):9872-81.
- Moremen, K.W, Trimble, R.B, Herscovics, A. (1994). Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology.* Apr;4(2):113-25.
- Morton, R.E., Evans, T.A., (1992). Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical biochemistry* 204, 332-334.
- Moskalyk LA, Oo MM, Jacobs-Lorena M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 1996 Nov;5(4):261-8.

- Mueckler M, 1994. Facilitative glucose transporters. *European journal of Biochemistry* 219. 713-725.
- Muresan,V., M Stankewich, W Steffen, JS Morrow, E. L.F Holzbaur and BJ Schnapp Dynactin-Dependent, Dynein-Driven Vesicle Transport in the Absence of Membrane Proteins *Molecular Cell*, 7, 173-183.
- Neumuller R. A., Knoblich J. A. 2009. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23:2675–2699.
- Newstead, S; Drew, D; Cameron, AD; Postis, VL; Xia, X; Fowler, PW; Ingram, JC; Carpenter, EP; Sansom, MS; McPherson, MJ; *et al.* (2011) Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J.*, 30 (2): 417-26. [PMID:21131908]
- Nishimoto, M., Kubota, M., Tisujii, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., Chiba, S .2001. Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α -glucosidase III. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* Vol. 65 (2001) , No. 7 pp.1610-1616.
- Noboru, M, 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861-2873.
- Numao S, He S, Evjen G, Howard S, Tollersrud OK, Withers SG. Identification of Asp197 as the catalytic nucleophile in the family 38 alpha-mannosidase from bovine kidney lysosomes. *FEBS Lett.* 2000 Nov 10;484(3):175-8.
- Numao S, Kuntz DA, Withers SG, Rose DR. Insights into the mechanism of *Drosophila melanogaster* Golgi alpha-mannosidase II through the structural analysis of covalent reaction intermediates. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):48074-83. Epub 2003 Sep 5.
- Ohshiro T., Yagami T., Zhang C., Matsuzaki F. 2000. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 408:593–596.
- Ojika, K., Mitake, S., Kamiya, T., Kosuge, N., and Taiji, M. (1994) *Brain Res. Dev. Brain Res.* 79, 1–9
- Okubo, K., N, Hori. R. Matoba, T. Niiyama, A. Fukushima, Y. Kojima, and K. Matsubara. 1992. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genet.* 2: 173-179.
- Otto, A. Excitation of nonradioactive surface plasma waves in silver by silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift Physik.* 1968; 216: 398-410.

- Pascual, I., Berjón, A., Lostao, M.P., Barber.A., 2008. Transport of D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem Physiol. B.*, 143, 20-26.
- Pauchet, Yannick † Alexander Muck, ‡ Alesˇ Svatosˇ, ‡ David G. Heckel, †,* and Susanne Preiss. Mapping the Larval Midgut Lumen Proteome of *Helicoverpa armigera*, a Generalist Herbivorous Insect. *Journal of Proteome Research* 2008, 7, 1629–1639
1629 Published on Web 03/04/2008.
- Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF (July 1996). "Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform". *J. Biol. Chem.* 271 (27): 16245–52.
- Peng, X; Zha, W; He, R; Lu, T; Zhu, L; Han, B; He, G. 2011. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect molecular biology*. Volume 20, Issue 6, pages 745–762.
- Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):31751-4.
- Philip, B.N., Kiss, A.J., Lee Jr., R.E., 2011. The protective role of aquaporins in the freeze-tolerant insect *Eurosta solidaginis*: functional characterization and tissue abundance of EsAQP1. *Journal of Experimental Biology* 214, 848–857.
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F., and Rosbash, M. (1994) *Neuron* 12, 35–49.
- Pfadt, R. E. *Fundamentals of applied entomology*. 4 ed. New York: Macmillan, 1978. 742 p.
- Peters W. (1992) *Peritrophic membranes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ponte-Sucre, A (editor) (2009). *ABC Transporters in Microorganisms*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-49-3.
- Price, D.R.G., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A., 2007. Functional expression and characterization of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brow planthopper). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 11, 1138-1148.
- Price, D.R.G., Karleya, A.J., Ashforda, D.A., Isaacs, H.V., Pownalla, M.E., Wilkinsonb, H.S., Gatehouseb, J.A., Douglasa, A.E. 2006. Molecular characterisation of a

- candidate gut sucrase in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* Volume 37, Issue 4, April 2007, Pages 307-317.
- PULLIKUTH AK, FILIPPOV V AND GILL SS. 2003. Phylogeny and cloning of ion transporters in mosquitoes. *J Exp Biol* 206: 3857– 3868.
- Race JE, Makhlouf FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ (December 1999). "Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter". *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 1): C1210–9.
- Ramos, A., Mahowald, A., Jacobs-Lorena, M., 1994. Peritrophic matrix of the black fly *Simulium vittatum*: formation, structure and analysis of its protein components. *J. Exp. Zool.* 268, 269–281.
- Ramos, C.R., Abreu, P.A., Nascimento, A.L. & Ho, P.L. (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian J Med Biol Res*, 37, 1103-1109.
- Rebers JE, Riddiford LM. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J Mol Biol.* 1988 Sep 20;203(2):411-23.
- Reynolds, S.E., Bellward, K., 1989. Water balance in *Manduca sexta* caterpillars: water recycling from the rectum. *Journal of Experimental Biology* 141, 33–45.
- Reynolds, S.E., Nottingham, S.F., Stephens, A.E., 1985. Food and water economy and its relation to growth in fifth-instar larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 31, 119–127.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (January 1999). "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation". *Nature* 397 (6716): 251–5.
- ROCHE 454 SEQUENCING. System features for GS FLX Titanium series. (November 24, 2008). Disponível em: <<http://www.454.com/products-solutions/system-features.asp>>. Acesso em: 5 jun. 2009.
- Romano, A; Barca, A; Kottra, G; Daniel, H; Storelli, C; Verri, T. (2010) Functional expression of SLC15 peptide transporters in rat thyroid follicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 315 (1-2): 174-81. [PMID:[19913073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913073/)]

- Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. . *Nature*. 1997 May 22;387(6631):409-13.
- Rost-Roszkowska MM. 2008. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* L. (Orthoptera, Gryllidae) during degeneration and regeneration. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 151-158.
- Rudd, S., 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant. Sci.* 8, 321–329.
- Ruppert, E.E. & D.R. Barnes. 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. São Paulo, Rocca, 6^a ed., 1029 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos C.D., Ribeiro A.F. and Terra W.R. (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool.* 64, 490-500.
- Sakata, K; Yamashita, T; Maeda, M; Moriyama, Y; Shimada, S; Tohyama, M. (2001) Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem. J.*, **356** (Pt 1): 53-60. [PMID:11336635].
- Sakura H, Bond C, Warren-Perry M, Horsley S, Kearney L, Tucker S, Adelman J, Turner R, Ashcroft FM. Characterization and variation of a human inwardly-rectifying-K-channel gene(KCNJ6): a putative ATP-sensitive K-channel subunit. *FEBS Lett.* 1995 Jun 26;367(2):193-7. PMID: 7796919 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Sass. M, 2008. Autophagy research on insects. *Autophagy* 4:3, 265-267.
- Schafer, D. A, SR Gill, JA Cooper, JE Heuser and TA Schroer, Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *The Journal of Cell Biology*, 126, 403-412.
- Scheepers, A., Joost, H.-G., Schürmann, A., 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J. Parenter. Nutr.* 28, 364–371.

- Seshasayee AS, Bertone P, Fraser GM & Luscombe NM 2006. Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol* 9: 511–519.
- Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Shimshek, D. R., Meyers, D. S., Morgan, M., Parker, R. A. & Hotamisligil, G. S. (1999) Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in *aP2^{-/-}* mice. *Diabetes* 48:1987-1994.
- Schorderet S., Pearson R.D., Vuocolo T., Eisemann C., Riding G.A. and Tellam R.L. (1998) cDNA and deduced amino acid sequences of a peritrophic membrane glycoprotein, "Peritrophin-48", from the larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28: 99-111.
- Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW (1991). "Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein". *The Journal of Cell Biology* 115 (6): 1639–1650. doi:10.1083/jcb.115.6.1639. PMID 1836789. PMC 2289205. <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/115/6/1639>.
- Schroer Trina A (November 2004). "Annual Review of Cell and Developmental Biology". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 759–779. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623
- Schumaker, T.T.S.Cristofolletti, P.T.; Terra,W.R. (1993). Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae [Cellobiase, Maltase] *Animal physiology – Nutrition*. v. 24(1) p. 3-17.
- Shakesby, A.J., Wallace, I.S., Isaacs, H.V., Pritchard, J., Roberts, D.M., Douglas, A.E., 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 1–10.
- Shen Z., Jacobs-Lorena M. 1998.A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem.* 273,17665-70.
- Shi X, Chamanklah M, Visal-Shah S, Hemmingsen SM, Erlandson M et al. 2004. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of *mamestra*

- configurata* intestinal mucin and a novel peritrophic containing 19 chitin-binding domains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1101-15.
- Si, Z., Cayabyab, M., and Sodroski, J. (2001) Envelope glycoprotein determinants of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2P 3.2) derived by passage in monkeys. *J. Virol.*, 75, 4208–4218.
- Siegrified, B.D., Waterfield, N., French-constant, R.H., 2005. Expressed sequence tags from *Diabrotica virgifera* midgut identify a coleopteran cadherin and a diversity of cathepsins. *Insect. Mol. Biol.* 14, (2), 137- 143.
- Silva C.P. and Terra W.R. (1994) Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 493-505.
- Silva C. P., Silva J.R., Vasconcelos F.F., Petretski, M.D.A., DaMatta R.A., Ribeiro A.F., Terra W.R. 2004. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthr. Struct. Develop.* 33, 139-148
- Silva C.P., Terra W.R. 1995. An alpha-glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus-peruvianus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae) midgut cells - purification and properties. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 487-494.
- Simpson RM, Newcomb RD, Gatehouse HS, Crowhurst RN, Chagné D, Gatehouse LN, Markwick NP, Beuning LL, Murray C, Marshall SD, Yauk YK, Nain B, Wang YY, Gleave AP, Christeller JT.. Expressed sequence tags from the midgut of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Mol Biol.* 2007 Dec;16(6):675-90
- Suderman RJ, Dittmer NT, Kanost MR, Kramer KJ. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006 Apr;36(4):353-65. Epub 2006 Jan 19.
- Shen Z and Jacobs-Lorena M (1998) Evolution of Chitin-Binding Proteins in Invertebrates. *Journal of molecular evolution.* Vol 48, n 3: 341-347.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of

- protein using bichinchonic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76-85. TANO, M.S.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. *Brazilian Archives Biology Technology*, v.43, n.4, p.425-430, 2000.
- Sorek, R and Cossart, P. 2010. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *NATuRe RevleWS Genetics*, volume 11, p 9-16.
- Sorlier, P; Hartmann, D.J; Denuziere, A; Viton, C; Domard, 2003. A. Preparation and development of anti-chitosan antibodies. *Journal of Biochemical Materials Research part A.* 3: 766-774.
- Suraniti, E; Tumolo. T; Baptista, M.S; Livanche, T; Calemczuk, R. Construction of hibrid bilayer membrane (HBM) biochips and chacacterization os the cooperative binding between cytochrome c and HBM. *Langmuir.* 2007; 23: 6835-42.
- Suzuki M, Morita T, Iwamoto T (January 2006). "Diversity of Cl⁻ Channels". *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (1): 12–24
- Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N (2002). "Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription". *Mol. Cell. Biol.* 22 (14): 5114–27. doi:10.1128/MCB.22.14.5114-5127.2002. PMID 12077340.
- TAKATA K. 1996. Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J Electron Microsc* 45: 275– 284.
- Treherne, J.E., 1957. Glucose absorption in the cockroach. *J. Exp. Biol.*, 34, 478-485.
- Treherne, J.E.,1958. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust *Schistocerca gragaria*. *J. Exp. Biol.*, 159, 1-20.
- Tellam R.L., Wijffels G. and Willadsen P. (1999) Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29: 87-101.
- Tellam R.L., Vuocolo T., Eisemann C., Briscoe S., Riding G., Elvin C. and Pearson R. (2003) Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33: 239-252.
- Terra, W. R. (1988). Physiology and Biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 21, p. 675-734

- Terra W.R., Cristofolletti P.T. 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 725-730.
- Terra W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
- TERRA, W. R; FERREIRA, C; BASTOS, F.1985. Phylogenetic considerations of insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, v. 15, p. 443-449. Thomas D. Otto, *Patogen Genomics*
- Terra, W., Ferreira, C., Jordao, B. and Dillon, R., 1996. Digestive enzymes. In: Lehane, M. and Billingsley, P.I., Editors, 1996. *Biology of the insect midgut*, Chapman & Hall, London, pp. 153–186.
- Terra W.R. (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47-61.
- Terra W.R. and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62.
- Terra W.R. e Ferreira C. (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert LI, Iatrou K and Gill SS (Eds). *Comprehensive Molecular Insect Science*, Oxford: Elsevier 4, 171-224.
- Terra, W.R and C. Ferreira. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1994), pp. 1–62.
- TERRA, W. R; FERREIRA, C.; BIANCHI, A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology*, v. 25, p. 487-494, 1979.
- THOMAS J. JENTSCH, VALENTIN STEIN, FRANK WEINREICH, AND ANSELM A. ZDEBIK, (2002). Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol Rev* 82: 503–568, 2002; 10.1152/physrev.00029.2001.
- Toprak U, Baldwin D, Erlandson M, Gillott C, Hou X, Coutu C, Hegedus DD. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Mol Biol.* 2008 Sep;17(5):573-85.
- Treherne, J.E., 1957. Glucose absorption in the cockroach. *J. Exp. Biol.* 34, 478–485.

- Treherne, J.E., 1958. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.* 35, 297–306.
- Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S (February 1997). "ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction". *Trends Biochem. Sci.* 22 (2): 53–8. doi:10.1016/S0968-0004(96)10071-2. PMID 9048483.
- Tumolo, T. C. M. C.; Desenvolvimento de biosensors de membranas e caracterização da interação entre citocromo c e bicamadas híbridas por ressonância plasmônica de superfície. 2008. Tese (Doutorado em ciências biológicas (bioquímica))-Universidade de São Paulo. Orientador: Maurício da Silva Baptista.
- Turunen, S., Crailsheim, K., 1996. Lipid and sugar absorption. In Lehane, M.J., Billingsley, P.F., (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London, pp. 293-320.
- Wan. Z; Gerstein. M and Snyder. M; 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews*. Vol 10, p. 57-63.
- Wang P. and Granados R.R. (1997 a) Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin. *J. Biol. Chem.* 272: 16663-16669.
- Wang, P. and Granados, R. R. (1997 b) An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 94: 6977-6982.
- Wang P, Granados RR. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects *Insect Biochem Mol Biol.* 2000 Feb;30(2):135-43.
- Wang P. and Granados R.R. (2001) Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 110-118.
- Weisiger, R. A (2002). "Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two distinct steps in intracellular transport of their ligands". *Mol. Cell. Biochem.* 239 (1-2): 35–43. doi:10.1023/A:1020550405578. PMID 12479566.
- Wells A.L., Lin A.W., Chen L.-Q., Safer D., Cain S.M., Hasson T., Carragher B.O., Milligan R.A., Sweeney H.L. *Nature* 401:505-508 (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards [PubMed: 10519557].

- Wigglesworth V.B. (1930). The formation of the peritrophic membrane in insects with special reference to the larvae of mosquitoes. *Quart. J. micr., Sci.*, 73, 593-616.
- Wigglesworth, V.B. *The Principles of Insect Physiology* (7th edn) Methuen, London (1972).
- Willis JH.. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010 Mar;40(3):189-204. Epub 2010 Feb 18.
- Wijffels G, Eisemann C, Riding G, Person R, Jones A, et al. 2001. A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix: cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. *J.Biol. Chem.* 276: 15527-36.
- Wilcox, A.S., A.S. Khan, J.A. Hopkins, and J.M.Sikela. 1991. Use of 3' untranslated sequences of human cDNAs for rapid chromosome assignment and conversion to STSs: Implications for an expression map of the genome. *Nucleic acids Res.* 19: 1837-1843.
- Winnebeck, E.C.; Millar, C.D.; Warman, G.R. 2009. Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science: Vol. 10 | Article 159.*
- Wolfum, C., Borrmann, C. M., Borchers, T. & Spener, F. (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:2323-2328.
- Wright, E.M., 2001. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.*, 280, F10-F18.
- Wright, E.M., Turk, E., 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pfluegers Arch.* 447, 510–518.
- van den Elsen JM, Kuntz DA, Rose DR. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.* 2001 Jun 15;20(12):3008-17.
- Van den Steen P, Rudd PM, Proost P, Martens E, Paemen L, Küster B, van Damme J, Dwek RA, Opdenakker G. Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 27;1425(3):587-98
- Van Vliet, AH 2010. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol Lett* 302, p.1–7.

- Venancio TM, Cristofolletti PT, Ferreira C, Verjovski-Almeida S, Terra WR. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol Biol*. 2009 Feb;18(1):33-44. Epub 2008 Nov 28.
- Venter, J.,C; Adams, M, D.; 1993. Sequences Characteristic of human gene transcription product.
- Venter et al., 2001 and authors Human Genome Project (HGP). The sequence of human genome. *Science*, New York, V.291, p.1304-1352.
- Verkman, A.S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science* 118, 3225–3232.
- Verkman, A.S., 2009. Aquaporins: translating bench research to human disease. *Journal of Experimental Biology* 212, 1707–1715.
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S (February 1998). "Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2". *J. Cell Biol*. 140 (4): 885–95. doi:10.1083/jcb.140.4.885. PMID 9472040.
- Yuan Z, Tie A, Tarnopolsky M, Bakovic M (2007). "Genomic organization, promoter activity, and expression of the human choline transporter-like protein 1.". *Physiol. Genomics* 26 (1): 76–90. doi:10.1152/physiolgenomics.00107.2005. PMID 16609143.
- Zimmerman, A. W. & Veerkamp, J. H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci*. 59:1096-1116
- Zimoch L. and Merzendorfer H. (2002) Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res*. 308: 287-297.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Nathália Ramalho Moreira

Local e data de nascimento: Muriaé, 16/12/1982

EDUCAÇÃO

2002-2006: Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa-MG.

2006-2008: Mestrado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP.

2008-2013: Doutorado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação científica Iniciação científica no Projeto: “Resposta Bioquímica e Fisiológica de Lagarta da Soja (*Anticarsia gemmatalis*) durante o mecanismo de interação Planta-Inseto”. Período: Abril de 2005 a abril de 2007. Universidade Federal de Viçosa – Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular. Orientadora: Prof.^a Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Bolsista de Mestrado CNPq- 2006-2008. Projeto: α -manosidases intestinais da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera).

Orientador: Walter R. Terra

Bolsista de doutorado FAPESP, 2008-2012. Projeto: Fisiologia molecular intestinal de *Tenebrio molitor*.

Orientador: Walter R. Terra

Ocupação atual: Instrutora de práticas profissionais avançadas na área de nanotecnologia no Senai-SP.

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS

- Autores: Maria do Carmo Q. Fialho; Walter R.Terra; Nathália R. Moreira; José C. Zanuncio e José Eduardo Serrão com artigo intitulado: Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) in Arthropods structure & Development 42 (2013) 277-285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.asd.2013.03.002>.

- Autores: Maria do Carmo Q. Fialho; Walter R.Terra; Nathália R. Moreira; José C. Zanuncio e José Eduardo Serrão com artigo intitulado: Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of insect Physiology 58 (2012) 850-856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.009>.