**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

IGNACIO GRANJA BARROSO

**Bases Moleculares da Absorção de Nutrientes,
Tamponamento e Fluxos de Fluídos
no Intestino Médio de *Musca domestica***

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
Orientador

Versão Original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

07/03/2019

IGNACIO GRANJA BARROSO

**Bases Moleculares da Absorção de Nutrientes,
Tamponamento e Fluxos de Fluídos
no Intestino Médio de *Musca domestica***

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo

2019

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter R. Terra por ter me dado a oportunidade de realizar esta pesquisa no Laboratório de Bioquímica de Insetos, pela orientação constante e pela ajuda tanto na pesquisa como nos momentos pessoais mais difíceis. À Dra. Clélia Ferreira pelos conselhos e pelo férreo senso crítico que tem contribuído na minha formação como pesquisador. A ambos pela sua qualidade humana, por serem capazes de tirar o melhor de seus alunos e criar um ambiente de trabalho agradável e propício para o desenvolvimento de nossas competências.

A técnica de laboratório Christiane Cardoso pelas instruções nas análises bioinformáticas, pela ajuda pessoal em cada uma das viagens que tenho realizado para Espanha durante o Doutorado, pelos conselhos tanto profissionais como pessoais e por ter compartilhado como amiga as alegrias e tristezas ao longo destes anos.

Ao técnico de microscopia Dr. Waldir Caldeira pela sua disposição e simpatia que tem feito de nossas colaborações momentos agradáveis e alegres, e ao Prof. Alberto F. Ribeiro pelas orientação geral na temática de biologia celular e pela disponibilização de seu laboratório no Instituto de Biociências da USP.

Ao técnico de laboratório Gilliard de Farias e à auxiliar de laboratório Maria Ivanilde Marcelino pelo desempenho no laboratório, sem o qual este projeto não teria sido possível. Em especial a Maria Ivanilde Marcelino pela compreensão e colaboração nos momentos difíceis.

A Dra. Renata O. Dias pela contribuição na minha instrução como Doutor, pela sua praticidade na hora de orientar nas dúvidas que surgiram na pesquisa, pelo seu perfeccionismo, que tem servido de exemplo, favorecendo o aprimoramento dos resultados e por ter compartilhado momentos divertidos tanto no ambiente acadêmico como fora dele.

A Dra. e amiga Darlene Pena por ter louvado minhas potenciais capacidades como pesquisador, por ter me motivado a entrar no Doutorado e ter me ajudado na preparação da prova de ingresso, por ser amiga nos momentos bons e ruins e ter oferecido sempre sua ajuda sem condição.

A doutoranda Carla S. Santos pela colaboração nas medidas de pH realizadas com microeletrodos, convertendo um trabalho árduo em momentos descontraídos que tem derivado em uma bela amizade e ao companheiro Otto Heringer por ter nos colocado em contato. Ao Prof. Mauro Bertotti pela orientação e disponibilização de seu Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos. Também ao Dr. Felipe J. Fuzita pela colaboração na realização da proteômica sem a qual não teria sido possível realizar a análise.

Aos companheiros e amigos de laboratório Daniela C. Bataglioli, Vitor M. Almeida, Gabriel B. Oliveira, Bárbara B. Nascimento, Felipe Pacheco, Dra. Valquiria P. Souza, Maira A. Frutuoso. Em especial a Dra. Walciane da Silva pelos conselhos no trabalho de bancada, por ter enriquecido meu vocabulário e ter me ensinado ditados de português, ao Dr. André C. Pimentel pelas conversas e dicas sobre pesquisa que tem engrandecido meu conhecimento científico, a companheira Ticiane Damasceno por ter compartilhado tantos momentos pessoais e profissionais, sempre disposta a ajudar os outros, a Felipe A. Otsuka pela boa energia e simpatia que tem trazido tantos momentos divertidos ao laboratório nos últimos anos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado e a FAPESP, INCT-EM e CNPq pelo apoio ao projeto de pesquisa.

Aos meus pais MariCarmen e Angel por todo o amor, incentivo, compreensão, respeito e educação que assentaram as bases da minha personalidade, especialmente ao meu pai que esteve presente nesta etapa da minha vida e apesar da dor provocava pela distância sempre me apoiou. A minha prima Gloria por todo o carinho e suporte

incondicional que até hoje honra ao seu papel como minha madrinha. A minha família, em especial aos meus avôs Benigno, Tomasa e Lorenza e às minhas tias Gloria e Paquita.

A minha amiga irmã Alba e meus grandes amigos Sandra e Raul por ter acompanhado minha caminhada na distância, pelo apoio e a motivação e por ter estado disponíveis sempre que precisei deles. Aos meus amigos Paula, Sol, Daniel e Ana por ter me acolhido nas suas casas quando precisei viajar para Espanha.

Ao Beto pelo carinho e pelo suporte oferecido em todos os sentidos, sempre sem condição. Por ter me mostrado a vida desde outra perspectiva e por ter me segurado e motivado nos momentos mais difíceis do Doutorado.

A Universidade de São Paulo e especialmente ao Instituto de Química pela qualidade de ensino recebido e pela oportunidade de viver esta experiência.

Por último, sou grato ao Brasil por ter me acolhido e a Deus por ter me conduzido até aqui.

RESUMO

Barroso, I. G. **Bases Moleculares da Absorção de Nutrientes, Tamponamento e Fluxos de Fluidos no Intestino Médio de *Musca domestica***. 2019. 116p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O intestino dos insetos representa uma interface pouco protegida dos agentes externos. A identificação dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos fisiológico-digestivos permite encontrar alvos potenciais para o controle de insetos. As moléculas envolvidas na absorção de nutrientes, tamponamento e geração de fluxos de água no intestino médio do inseto-modelo *Musca domestica* (Diptera Cyclorrhapha) foram identificadas. Para isso, foi feita uma análise da expressão gênica ao longo do intestino médio, a identificação e anotação de proteínas por bioinformática, a confirmação da localização apical das proteínas por análise proteômica de membranas microvilares purificadas e a determinação do papel de algumas das proteínas através de experimentos in vivo utilizando diferentes dietas, corantes e inibidores. A acidificação da região média é consequência da atividade anidrase carbônica que gera prótons que são bombeados por uma H^+ V-ATPase apical acompanhados por cloreto transportado por um simporter K^+Cl^- . O K^+ é recuperado por um canal de K^+ e a homeostase dos cátions mantida pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral. O bicarbonato é eliminado basolateralmente em troca por cloreto por um antiporter. A acidificação é regulada diretamente por um antiporter Na^+/H^+ e indiretamente por uma proteína envolvida na homeostase do cobre. O muco protetor da região média é tamponado com bicarbonato gerado por uma anidrase carbônica com âncora de GPI e transportado por um antiporter $Na^+HCO_3^-/H^+Cl^-$. O excesso de ácido é eliminado por um antiporter Na^+/H^+ situado na membrana basolateral. A alcalinização da região posterior ocorre pelo transporte apical de NH_3 que sequestra os prótons luminais gerando amônio, junto à remoção de prótons em simporte com aminoácidos e peptídeos. A acidificação intracelular, consequência da entrada de aminoácidos com prótons, é regulada por uma H^+ V-ATPase basolateral. A geração de fluxos de água é consequência da atividade conjunta de simporters NKCC e KCC ajudados pelas aquaporinas. A inibição dos simporters com inibidores específicos mostrou que o contrafluxo de água está envolvido na reciclagem da enzima tripsina. Por último, o principal lugar de absorção nutrientes no intestino médio é a região posterior, a exceção do cobre que é absorvido na região média.

Palavras-chave: *Musca domestica*, Tamponamento luminal, Fluxos de água, Reciclagem de enzimas, Absorção de nutrientes.

ABSTRACT

Barroso, I. G. **Molecular Bases of Nutrient Absorption, Buffering and Fluid Fluxes in the Midgut of *Musca domestica***. 2019. 116p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The gut of insects is a less protected interphase against external agents. The identification of the molecular mechanisms involved in physiological-digestive processes allows one to find potential targets for insect control. The molecules involved in nutrient absorption, buffering and fluid fluxes in the midgut of the insect-model *M. domestica* (Diptera Cyclorrhapha) were identified. For this, gene expression along the midgut was analyzed; proteins were identified and annotated by bioinformatics; apical localization of proteins was confirmed by proteomics of purified microvillar membranes; the role of proteins was confirmed by in vivo experiments using different diets, dyes and inhibitors. Middle midgut acidification occurs by the action of an apical H^+ V-ATPase with protons coming from carbonic anhydrase activity accompanied by chloride transported with potassium by a K^+Cl^- symporter. Potassium is recovered by a potassium channel, and cation homeostasis maintained by a basolateral Na^+/K^+ -ATPase. Acidification is directly regulated by a Na^+/H^+ antiporter and indirectly by a copper homeostasis protein. Mucus protecting epithelium is neutralized with bicarbonate generated by a GPI-anchored carbonic anhydrase and transported by a $Na^+HCO_3^-/H^+Cl^-$ antiporter. Intracellular acidification is avoided by a basolateral Na^+/H^+ antiporter. Posterior midgut alkalization occurs by the action of an apical ammonia transporter and proton amino acid (and peptide) symporters. Intracellular acid is eliminated by a basolateral H^+ V-ATPase. Fluid fluxes are generated by K^+Cl^- and $Na^+Cl^-Cl^-$ symporters helped by aquaporins. Inhibition of these symporters showed that the countercurrent flux of water allows trypsin recycling. Finally, posterior midgut is the main location of nutrient absorption, except for copper which is absorbed in the middle midgut.

Keywords: *Musca domestica*, luminal buffering, fluid fluxes, enzyme recycling, nutrient absorption.

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido.

AE: Trocador Aniônico ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$).

AQP: Aquaporina.

BIB: Proteína neurogênica Grande Cérebro.

CA: Anidrase Carbônica.

CAT: Transportador de Aminoácidos Catiônicos.

CCC: Cotransportadores Cátion Cloreto.

CPA: Antiporter Cátion/Próton.

CTR: Transportador de Cobre.

DMA: Dimetilamônia.

DRIP: Proteína Integrante de *Drosophila*.

EGLP: Entomogliceroporina.

ENaC: Canal de Sódio Epitelial.

FATP: Proteínas Transportadora de Ácidos Graxos.

GluCl: Canal de Cloreto Ativado por Glutamato.

GLUT: Transportador de Glicose.

HMIT: Transportador de Prótons-Mioinositol.

KAAT: Transportador de aminoácidos acoplado à Potássio.

KCC: Cotransportador Potássio:Cloreto (1:1).

LCFA: Ácidos Graxos de Cadeia Longa.

MfM: Mucinas formadoras de muco.

NAT: Transportador de Aminoácidos acoplado à Sódio.

NDAE: Trocador Aniônico Dirigido por Sódio ($\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-/\text{H}^+:\text{Cl}^-$).

NHA: Antiporter Sódio/Próton.

NHE: Trocador Sódio/Próton.

NKCC: Cotransportador Sódio:Potássio:Cloreto (1:1:2).

NIST: Transportador de açúcar de *Nilaparvata lugens*.

NPC: Niemman-Pick tipo C.

OPT: Transportador de Oligopeptídeos.

OrK: Canal de Potássio Retificador Aberto.

PAT: Transportador de Aminoácidos acoplado à Prótons.

PepT: Transportador de Peptídeos acoplado a prótons.

PRIP: Proteína Integrante de *Pyrocoelia rufa*.

SCRT: Transportador de Sacarose.

SGLT: Transportador Ligado à Glicose e Sódio.

SP: Transportador de açúcar.

SPC: Proteína Transportadora de Esterol.

TRET: Transportador de Trealose.

VLCFA: Ácidos Graxos de Cadeia Muito Longa.

Xyle: D-Xilose-próton symporter de *E. coli*.

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Considerações iniciais	13
1.2. Transporte de membrana.....	15
1.3. Absorção de nutrientes em insetos	16
1.3.1. Absorção de açúcares	16
1.3.2. Absorção de aminoácidos.....	19
1.3.3. Absorção de lipídeos	21
1.3.4. Absorção de micronutrientes	22
1.4. Tamponamento do intestino médio de insetos.....	23
1.5. Região ácida do intestino médio dos Diptera Cyclorrhapha.....	25
1.6. Contrafluxos no intestino médio de insetos.....	27
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Animais	31
3.2. Dissecção de animais	31
3.3. Extração de RNA total.....	31
3.4. Análise do RNA-seq.....	31
3.5. Anotação e análises das sequências de proteínas	32
3.6. Purificação das membranas microvilares do intestino médio.....	33
3.7. Ensaio enzimáticos	34
3.7.1. Aminopeptidase	34
3.7.2. Tripsina	35
3.8. Quantificação de proteína	35
3.9. Proteômica	35
3.10. Fabricação e calibração do microeletrodo de pH.....	37
3.11. Medidas in vivo do pH luminal com microeletrodos	37
3.12. Medidas de pH luminal in vivo com um indicador de pH.....	38
3.13. Medida dos fluxos de água do intestino médio com corante.....	39
3.14. Alteração do perfil de atividade de tripsina	41

3.15. Análise estatística	41
4. Resultados	42
4.1. Análise molecular do tamponamento do intestino médio de <i>M. domestica</i>	42
4.1.1. Valores de pH luminal do intestino médio de larvas de <i>M. domestica</i>	42
4.1.2. Possíveis proteínas envolvidas no tamponamento luminal e na absorção de aminoácidos.....	44
4.1.3. Expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na acidificação, tamponamento do muco protetor e na homeostase do cobre ...	48
4.1.4. Expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na alcalinização primária (P1) e secundária (P2 e P3) e a absorção de aminoácidos.....	49
4.1.5. Expressão de genes que codificam enzimas digestivas, lisozimas e endopeptidases	51
4.1.6. Detecção das proteínas nas membranas microvilares	53
4.1.7. Papel das proteínas no tamponamento luminal a partir de experimentos in vivo utilizando diferentes dietas e inibidores.....	56
4.2. Análise molecular dos fluxos de água no intestino médio de <i>M. domestica</i>	59
4.2.1. Variação da concentração de Azul de Evans ao longo do intestino médio.	59
4.2.2. Possíveis proteínas envolvidas nos fluxos de água.....	61
4.2.3. Dados de expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água.....	62
4.2.4. Detecção das proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água nas membranas microvilares de células do intestino médio	64
4.2.5. Alteração dos fluxos de água com furosemda	64
4.2.6. Fluxos de água associados à reciclagem da enzima tripsina na região posterior do intestino médio.....	65
4.2.7. Inativação de tripsina na região média	68
4.3. Transporte de nutrientes.....	69
4.3.1. Transporte de açúcares	69
4.3.2. Transporte de aminoácidos	70
4.3.3. Transporte de lipídeos	71
4.3.4. Transporte de cobre.....	72
5. Discussão.....	72
5.1. Acidificação da região média	72
5.2. Proteção do epitélio frente ao ácido.....	77

5.3. Alcalinização na fronteira entre a região média e a região posterior.....	79
5.4. Alcalinização da região anterior	82
5.5. Anidrase carbônica e H ⁺ V-ATPase complementares à alcalinização	82
5.6. Transporte de aminoácidos em condições alcalinas.....	83
5.7. Papel da acidificação e alcalinização na digestão de proteínas no intestino médio de larvas de <i>M. domestica</i>	83
5.8. Fluxos de água ao longo do intestino médio de <i>M. domestica</i>	85
5.9. Transportadores e canais envolvidos nos fluxos de água.....	87
5.10. Fluxos de água e tempos de retenção da dieta	92
5.11. Expressão e atividade de tripsina ao longo do intestino médio de <i>M. domestica</i> e sua relação com os fluxos de água	93
5.12. O contrafluxo e a reciclagem de tripsina	94
5.13. Absorção de nutrientes	94
5.13.1. Absorção de açúcares:	95
5.13.2. Absorção de aminoácidos.....	96
5.13.3. Absorção de lipídeos	98
5.13.4. Absorção de cobre.....	98
6. Conclusões.....	99
7. Referências	100
8. Apêndices.....	113

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

A Classe Insecta é uma das mais diversificadas que existe dentro do Reino Animalia, com mais de um milhão de espécies que representam 66% de todos os animais e 82% do Filo Arthropoda. Sua elevada representatividade é o reflexo de seu êxito evolutivo (Zhang, 2011; Gillot, 1995) atribuído a uma série de vantagens para a sobrevivência como o pequeno tamanho, presença de exoesqueleto, metamorfose (em holometábolos), capacidade de voar e a elevada adaptabilidade a diferentes ambientes, dietas e condições extremas (Maranhão, 1977).

Na natureza, os insetos são de vital importância para o equilíbrio dos ecossistemas. Polinizam 80% das plantas existentes no planeta, degradam material orgânico, reciclam nutrientes, servem de alimento para animais superiores e controlam as populações de uma ampla variedade de seres vivos, incluindo outros insetos (Costanza et al., 1997). Desde um ponto de vista antropocêntrico, os insetos são valiosos, porém suas populações devem ser controladas a fim de evitar o prejuízo econômico da agropecuária e da saúde. Por tanto, a pesquisa de insetos tem um grande potencial e elevado interesse para o ser humano (Law et al., 1992).

A Ordem Diptera é a terceira mais numerosa, com um total de espécies estimado em mais de 155000, sendo a família Muscidae de mais de 5000 espécies descritas (Grzywacz et al., 2017). *Musca domestica* é o inseto-modelo que representa à família, sendo a espécie mais importante e melhor conhecida. A mosca domestica habita ambientes úmidos e ricos em matéria orgânica em decomposição, desde as etapas larvais até as adultas. As fêmeas costumam colocar seus ovos no estrume de animais domésticos atraídas pela emanção de amônia. Seus hábitos alimentares fazem com que sejam portadoras de agentes patogênicos como

bactérias, fungos, vírus e parasitas (Khamesipour et al., 2018) que raramente causam alguma doença nas moscas, devido a um sistema imunológico único com produção de substâncias antibacterianas (Meylaers et al., 2004). Porém, podem representar um perigo para saúde humana e a dos animais domésticos, com a transmissão de doenças infecciosas, assim como um elevado custo para saúde pública.

Atualmente existe uma grande demanda de métodos de controle de insetos com menor repercussão para o ambiente e o ser humano. O desenho de novos métodos de controle de insetos se beneficia do conhecimento da fisiologia e bioquímica das diferentes espécies de interesse.

O tubo digestivo constitui uma área relativamente desprotegida do corpo dos insetos (Terra & Ferreira, 1994) e por tanto é um bom candidato para o desenho de ferramentas de controle desses organismos. Transportadores de membrana celular e canais tem sido escolhidos muitas vezes como alvos, devido a existência de tipos exclusivos de insetos (Wolstenholme, 2012; Romero et al., 2000) ou com características diferenciadas (Pimentel et al., 2018), permitindo assim diminuir os efeitos secundários sobre outros animais e o ser humano.

Ao longo de mais de 30 anos, nosso laboratório tem pesquisado a fisiologia e bioquímica digestiva de várias espécies de insetos, relacionando o processo digestivo com padrões filogenéticos e fornecendo informação básica sobre a compartimentalização do sistema digestivo e a distribuição e caracterização das enzimas digestivas (Terra et al., 1988; Terra & Ferreira, 1994; Caldeira et al., 2007; Terra & Ferreira, 2012). Nos últimos anos o laboratório tem se beneficiado dos avanços em genética e bioinformática para o estudo de genomas, transcriptomas e proteomas de insetos. Além disso, tem aprofundado o estudo de proteínas

transportadoras envolvidas em diferentes processos da fisiologia digestiva (Bifano et al., 2010; Moreira et al., 2017; Pimentel et al., 2018).

Apesar dos numerosos trabalhos dedicados ao estudo dos processos fisiológico-digestivos, assim como da fisiologia particular dos transportadores de membrana de insetos, são poucos os que utilizam uma abordagem abrangente, analisando os fenômenos desde a expressão dos genes até a avaliação do papel das proteínas com experimentos *in vivo*.

1.2. Transporte de membrana

O transporte através das membranas celulares é realizado por três grandes grupos de proteínas transmembrana chamados poros, canais e transportadores, capazes de reconhecer e transportar uma ampla variedade de substratos com certa especificidade. A diferença entre eles reside no estado constitutivamente aberto dos poros e aberto ou fechado dos canais em função de uma tampa e constitutivamente fechado dos transportadores. Além disso, o número de moléculas que são transportadas por unidade de tempo diminui de poros para transportadores. Atendendo as características das proteínas transportadoras existem três mecanismos de transporte: transporte facilitado ou difusão facilitada, transporte ativo primário e transporte ativo secundário. No transporte facilitado, os substratos se movimentam a favor do gradiente de concentração, enquanto que no transporte ativo os substratos são transportados contra gradiente de concentração, com um gasto de energia na forma de hidrólise de ATP. Já no transporte ativo secundário, os substratos são transportados em função do gradiente de concentração estabelecido pelo transporte ativo primário (Boron & Boulpaed, 2017).

Os transportadores podem ser classificados de forma geral em função do mecanismo de transporte, o número de substratos que transportam e a direção do transporte. Os uniporters realizam o transporte facilitado e individual de moléculas. As bombas iônicas podem transportar vários íons contra gradiente de concentração por cada molécula de ATP hidrolisada. Simporters e antiporters transportam vários substratos, sendo o transporte contra gradiente de concentração de um substrato favorecido pelo gradiente de concentração iônico estabelecido por uma bomba iônica. A diferença entre eles reside em que os simporters transportam em uma direção, enquanto que os antiporters transportam em direções opostas (Boron & Boulpaed, 2017).

Uma classificação mais específica dos transportadores é feita em função do tipo de substrato transportado. São várias as classificações existentes sendo uma delas o sistema de nomenclatura gênica Solute Carrier (SLC) (www.bioparadigms.org).

1.3. Absorção de nutrientes em insetos

A absorção de macronutrientes e micronutrientes, nas células do intestino médio de insetos, depende de proteínas transportadoras, canais e proteínas formadoras de poros. Simporters e antiporters são localizados preferencialmente na membrana apical, enquanto que uniporters, canais e poros se distribuem entre a membrana apical e principalmente a basolateral.

1.3.1. Absorção de açúcares

Monossacarídeos como a glicose, frutose, manose e galactose são principalmente absorvidos por difusão facilitada pela família GLUT (SLC2) e em

menor medida por transporte ativo secundário acoplado ao gradiente de sódio através de simporters SLGT (Na^+ :Glicose, SLC5).

Os membros da família GLUT são divididos em três Classes de acordo com a similaridade de suas sequências (Mueckler & Thorens, 2013). A análise filogenética e bioinformática das sequências de transportadores de açúcar (SP) de vários insetos mostrou que a maioria dos membros são mais relacionados com a Classe III de mamíferos. O elevado número de membros relacionados à Classe III nas diferentes Ordens sugeriu a expansão gênica desta Classe em insetos (Pimentel et al., 2018; Stock et al., 2013). Essa característica foi relacionada a um provável caráter ancestral da Classe III (Joost & Thorens, 2001). Além disso, os SP de insetos apresentam características de sequência que sugeriram possíveis mudanças na seletividade de substratos em relação aos caracterizados GLUT de mamíferos (Pimentel et al., 2018; Yang et al., 2017). Apesar destas diferenças, em insetos também foram encontrados membros com elevada seletividade pela glicose, como os presentes na Classe I de mamíferos (Kikuta et al., 2010; Price & Gatehouse, 2014; Escher & Rasmuson-Lestander, 1999; Price et al., 2007).

Em geral os transportadores GLUT são uniporters, porém existem simporters que constituem exceções, como GLUT13 de mamíferos (HMIT, H^+ :Mioinositol) (Uldry et al., 2001), Xyle de *E. coli* (H^+ :xilose) (Wisedchaisri et al., 2014), NIST8 de *Nilaparvata lugens* (H^+ :Trealose) (Kikuta et al., 2012) e provavelmente MdSP8 de *M. domestica* (Pimentel et al., 2018).

Os simporters da família SLGT foram caracterizados funcionalmente no intestino médio de *Aphidius ervi* (Caccia et al., 2007) e *Dysdercus peruvianus* (Bifano et al., 2010). Os SGLT transportam açúcares em simporte com sódio ou

potássio. A escolha do íon parece ter relação com o tipo de dieta. Em *D. peruvianus*, esses transportadores também foram envolvidos no transporte de água (Bifano et al., 2010), assim como em mamíferos (Zeuthen, 2010).

Além da função de transporte, alguns transportadores de açúcares (SP) agem como sensores de nutrientes, como por exemplo SGLT1 de mamíferos (Sclafani et al., 2016). A existência de sensores em *M. domestica* foi sugerida pela expressão de SP transcricionalmente modulados por amido, os quais carregam mutações críticas que invalidariam sua atividade transportadora (Pimentel et al., 2018).

Por último, em insetos também encontramos transportadores de dissacarídeos, como a trealose e a sacarose. A trealose constitui o açúcar predominante da hemolinfa dos insetos (Thompson, 2003) e é transportada pelos TRETs. Existe uma ampla variedade de TRETs em insetos, com cinética diferente, dependendo da razão trealose:glicose (Kanamori et al., 2010), os quais podem agir como uniporters ou simporters com prótons (NIST8, Kikuta et al., 2012). A maioria dos TRETs são expressos no corpo gorduroso, onde a trealose é guardada na forma de glicogênio, e na membrana basolateral de tecidos periféricos, como o intestino médio para o fornecimento de energia metabólica. Na membrana apical das células do intestino médio e dos túbulos de Malpighi, os TRETs participam na absorção de trealose proveniente da dieta e na reabsorção da trealose, respectivamente (Pimentel et al., 2018; Kikuta et al., 2012). Por outro lado, a sacarose é o principal alimento dos fitógagos, os quais podem hidrolisar a sacarose em seus componentes primários via β -fructosidases ou absorve-la via SCRT, filogeneticamente relacionado com os transportadores de sacarose de plantas (Vitavska & Wieczorek, 2013).

1.3.2. Absorção de aminoácidos

Diferente da absorção de açúcares, a absorção de aminoácidos e peptídeos na membrana apical das células do intestino médio é realizada principalmente por simporters acoplados ao gradiente decrescente de prótons ou cátions (Na^+ , K^+). Assim como para os simporters de açúcares SGLT, a escolha do cátion parece ter uma relação com a dieta do inseto. No entanto, existem também uniporters de aminoácidos, distribuídos entre as membranas apical e basolateral destinados ao transporte daqueles aminoácidos com uma concentração intracelular ou hemolinfática menor. Os transportadores de aminoácidos apresentam especificidade em relação a cadeia lateral dos aminoácidos que transportam, sendo o conjunto de transportadores expressos o que garante a absorção de todos os aminoácidos essenciais (Boudko, 2012).

Dentre as muitas famílias de transportadores de aminoácidos descritas em insetos, as famílias de simporters PAT (H^+ -AA, SLC36) (Evans et al., 2009) e NAT (Na^+ ou K^+ -AA, SLC6), assim como os uniporters CAT (SLC7) (Boudko, 2012) se destacam por sua elevada diversidade e expressão no intestino médio de insetos. Simporters PAT e NAT podem estar associados com bombas ou antiporters que mantêm o gradiente iônico necessário para o transporte ativo secundário e a estabilidade fisiológica da célula (Anderson & Thwaites, 2005; Harvey et al., 2009).

Transportadores PATs transportam de preferência L-AA pequenos e não carregados como Ala, Gly e Pro, acoplados ao gradiente de prótons gerado por uma H^+ V-ATPase. Alguns PATs são capazes de transportar D-AA (Goberdhan et al., 2005; Pillai & Meredith, 2011; Evans et al., 2009; Thwaites & Anderson, 2011), o que constitui uma vantagem para aqueles insetos que se alimentam de

material em decomposição rico em bactérias como *M. domestica*. Em insetos, da mesma forma que em mamíferos, os PATs são diferencialmente afetados pelo pH extracelular, a maioria com atividades ótimas na faixa de pH 5 - 6 (Evans et al., 2009; Goberdhan et al., 2005). Assim, nas regiões do intestino com valores acima de 6 é necessária a manutenção de um microambiente de pH ácido que mantenha sua atividade ótima (Daniel et al., 1985).

Além das famílias de transportadores de aminoácidos existe uma família de transportadores de peptídeos em simporte com prótons (PepT), com um membro caracterizado em *D. melanogaster*, OPT1 (Roman et al., 1998). OPT1 apresenta uma baixa especificidade, com preferência por dipeptídeos e tripeptídeos de Ala e derivados de Ala. Da mesma forma, que os PATs, a atividade dos PepTs se beneficia da manutenção de um gradiente decrescente de prótons (Watanabe et al., 2005). Além disso, a atividade de ambos tipos de simporters causa acidificação intracelular, que pode ser contornada pela eliminação basolateral de prótons através de antiporters Na^+/H^+ ou a bomba H^+ V-ATPase (Anderson et al., 2004; Anderson & Thwaites, 2005).

Transportadores NATs realizam o transporte de uma ampla variedade de aminoácidos em simporte com Na^+ (ou K^+). São os principais responsáveis pela absorção de aminoácidos essenciais (Trp, Phe, Tyr, Met), divididos em dois grandes grupos, dependendo do espectro de aminoácidos que transportam, amplo ou restrito. Exemplos de espectro restrito são AgNAT6, AgNAT8 (*Anopheles gambiae*) e AeNAT5 (*Aedes aegypti*) com preferência por Trp, Phe e Met, respectivamente (Meleshkevitch et al., 2006; 2009; 2013). Por outro lado, KAAT1 de *Manduca sexta* é um simporter de amplo espectro, com capacidade para o transporte de L-AA neutros em simporte com Na^+ ou K^+ (Vincenti et al.,

2000). Em *M. sexta*, assim como em outros Lepidoptera, o simporte com K^+ constitui uma adaptação a uma dieta rica neste elemento (Boudko, 2012).

De acordo com o tipo de simporte, os NATs, contrariamente aos PepTs e a maioria dos PATs, se beneficiam de um microambiente alcalino mantido por proteínas acessórias, como bombas de prótons e antiporters de cátions e prótons (Harvey et al., 2009). Em *M. sexta*, o elevado pH do intestino médio constitui uma vantagem para a absorção de aminoácidos via KAAT1, o qual apresenta uma elevada taxa de transporte em valores alcalinos (Peres & Bossi, 2000).

Por último, os uniporters CATs transportam preferencialmente aminoácidos básicos (Arg, Lys e His) e assim como alguns membros das famílias PAT (Pillai & Meredith, 2011) e NAT (Boudko, 2012) apresentam a função acessória de sensor de nutrientes, sendo regulados pela dieta e os fatores de crescimento em *Drosophila melanogaster* e *A. aegypti* (Colombani et al., 2003; Attardo et al., 2006).

1.3.3. Absorção de lipídeos

Devido a sua propriedade lipofílica, tanto os monoacilgliceróis como os ácidos graxos podem travessar a membrana celular por difusão simples (Schulthess et al., 1994; Hamilton, 2007). Porém, a entrada dos ácidos graxos na célula, assim como sua ativação para a participação em diversos processos celulares precisa ser regulada (Dourlen et al., 2015).

Os transportadores de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) ou muito longa (VLCFA) são transportados e ativados pela família FATP (SLC27) (Hall et al., 2003; DiRusso et al., 2009). Os FATP identificados em insetos apresentaram maior relação filogenética com FATP4 (Dourlen et al., 2015), a principal isoforma

envolvida na absorção de lipídeos da dieta, expressa na membrana apical dos enterócitos de vertebrados (Anderson & Stahl, 2014). Em *D. melanogaster*, a expressão dos genes *Dmfatp* e seus parálogos, CG30194 e CG3394, foi ampla com especificidade por alguns tecidos, incluindo o intestino médio (DiRusso et al., 2009; Van Den Brink et al., 2018). Além disso, foram caracterizados dois membros FATP expressos no intestino médio das espécies *Bombyx mori* e *Eilema japonica* com capacidade para o transporte de LCFA. No caso de *B. mori*, também foi mostrada a atividade acetil-CoA sintetase, sugerindo a ativação dos LCFA imediatamente após sua absorção.

Diferente de mamíferos, os insetos são incapazes de sintetizar os esteróis necessários para a fluidez das membranas e a síntese de hormônios como a ecdisona. Isso é devido à ausência de uma enzima chave da rota de síntese de esteróis, o que faz necessária sua absorção da dieta. Em insetos existem duas famílias principais de transportadores envolvidos na absorção de esteróis, NPC (SLC65) e SPC2. Dentre as isoformas NPC, NPC1b é a principal responsável pela absorção de esteróis presentes na dieta, devido à sua expressão específica no intestino médio de insetos (Zheng et al., 2018). A elevada expressão de SPC2 no último instar larval foi relacionada ao seu papel na absorção de esterol necessário para produção de ecdisona envolvida no processo de pupação (Gong et al., 2006; Guo et al., 2009).

1.3.4. Absorção de micronutrientes

No intestino médio de insetos, os íons metálicos como o sódio e o potássio são geralmente absorvidos por antiporters Na^+ ou K^+/H^+ e em menor medida por canais específicos (Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013). Outros metais como o ferro, cobre e zinco apresentam transportadores específicos e regulados, localizados

nas membranas apical e basolateral das células intestinais. Nos Diptera Cyclorrhapha, como *D. melanogaster*, estes transportadores estão localizados na região média do intestino médio caracterizada pelo pH ácido (Missirlis et al., 2007).

Em eucariotos, a família CTR (SLC31) é a principal responsável pela absorção de cobre da dieta (Kim et al., 2013). Transportam cobre na forma reduzida (Cu^+) o que implica a ação de redutases de membrana plasmática (Hasset & Kosman, 1995). Nos insetos, assim como nos mamíferos, existem três membros Ctr1 (A,B,C). Ctr1B é o principal transportador envolvido na absorção de cobre na membrana apical das células do intestino médio de larvas de *D. melanogaster* (Balamurugan & Schaffner, 2006). A transferência do cobre para hemolinfa depende de uma P-ATPase chamada de ATP7A localizada na membrana basolateral das células do intestino médio de *D. melanogaster* (Burke et al., 2008).

1.4. Tamponamento do intestino médio de insetos

A variabilidade do pH do intestino médio dos insetos tem sido associada aos seus diferentes hábitos alimentares. Porém, o estudo evolutivo do pH do intestino médio tem mostrado que os descendentes conservam a condição de pH de seus ancestrais, apesar de terem diversificado seus hábitos alimentares. Assim, supõe-se que o pH do intestino médio apresenta maior correlação com a filogenia do que com a dieta (Terra & Ferreira, 1994; Clark, 1999).

Em geral, o intervalo de pH do intestino médio dos insetos se encontra na faixa de 6 - 7,5 unidades. Porém, existem exceções caracterizadas por valores muito elevados, como é o caso dos Lepidoptera (pH 9 - 12), ou muito baixos como o

presente na região média dos Diptera Cyclorrhapha (pH 3,1 - 3,4) (Terra & Ferreira, 1994; Clark, 1999). Alias, o pH pode variar ao longo do intestino médio de valores ácidos na região anterior para neutros ou alcalinos na região posterior como na maioria das famílias de Coleoptera, ou ainda alternar de valores próximos à neutralidade nas regiões anterior e posterior com ácidos na região média, como nos Diptera Cyclorrhapha (Terra & Ferreira, 1994).

Existem vários modelos que visam explicar o elevado pH encontrado no intestino médio dos Lepidoptera (Harvey, 2009). Nestes modelos a anidrase carbônica produz o ácido carbônico que dissocia em bicarbonato e próton. O próton é bombeado por uma H^+ V-ATPase situada na membrana apical das células caliciformes em seguida retirado por um antiporter de H^+/K^+ . Um trocador aniônico (AE) secreta o bicarbonato em troca por cloreto e a seguir o bicarbonato perde um próton, que travessa o epitélio a favor do gradiente eletroquímico, formando-se carbonato luminal e elevando o pH.

Nos Coleoptera, a acidificação da região anterior e alcalinização da região posterior poderia seguir o modelo baseado em dados transcriptômicos de *Tenebrio molitor*. Neste modelo a acidificação é derivada da secreção de NH_4^+ e Cl^- em troca por NH_3 , por enquanto que a alcalinização é causada pela secreção de HCO_3^- em troca por H^+Cl^- (Moreira et al., 2017).

Na família Culicidae (Diptera), a região anterior é levemente mais ácida devido à atividade H^+ V-ATPase. Porém, nos pernilongos alimentados com sangue a atividade da bomba de prótons é inibida e a alcalinização é alcançada pelo transporte de aminoácidos acoplado à prótons (PAT) (Nepomuceno et al., 2017).

1.5. Região ácida do intestino médio dos *Diptera Cyclorrhapha*

A aparição de uma região ácida no tubo digestivo dos vertebrados detritívoros constituiu uma adaptação para a digestão de bactérias presentes na comida em decomposição, utilizando-as como recurso, condição ainda presente na tilápia (Bowen, 1976). Da Ordem *Diptera*, os *Cyclorrhapha* são os únicos insetos que compartilham essa característica com os vertebrados (Vonk & Western, 1984), o que foi atribuído ao fato deles se alimentarem de material orgânico em decomposição, rico em bactérias e fungos. Concretamente, as fêmeas grávidas de *M. domestica* são atraídas pelo odor de amônia do estrume de animais domésticos (Brues, 1946 ; Larraín & Salas, 2008), condição favorável para a ovoposição. Aliás, Levinson (1960) mostrou que as larvas de *M. domestica* podiam se desenvolver, dando lugar a adultos férteis, sendo alimentadas exclusivamente com bactérias.

Espinoza-Fuentes & Terra (1987) mostraram a variação de pH ao longo das três grandes regiões do intestino médio da larva de *M. domestica* com o uso de indicadores de pH administrados na comida. As regiões anterior, média e posterior apresentaram os valores médios 6,1 - 3,1 - 6,8, respectivamente. A região média contém uma lisozima especial e uma catepsina D, ambas com pHs ótimos ácidos, que representariam traços ancestrais dos *Diptera Cyclorrhapha* (Lemos et al., 1993) relacionados com a digestão de bactérias e fungos.

Em 1988, Terra et al. propôs um mecanismo de tamponamento do intestino médio baseado em medidas de atividade de anidrase carbônica e bicarbonato ATPase. Neste modelo inicial, a anidrase carbônica seria responsável pela geração de bicarbonato e prótons. Os prótons seriam transportados para o lúmen da região média por uma bomba igual a de mamíferos (H^+/K^+ -ATPase). Nas regiões anterior e

posterior o bicarbonato seria o responsável pela neutralização do conteúdo luminal, sendo bombeado por uma bicarbonato ATPase.

Posteriormente, Terra & Regel (1995) estudaram a variação do pH luminal através da experimentação in vivo utilizando inibidores na dieta das larvas e mediram a concentração de vários compostos no conteúdo luminal intestinal. Foi confirmado o papel da anidrase carbônica e da bomba Na^+/K^+ na acidificação da região média com o uso de acetolamida e oubaina, respectivamente. Ao mesmo tempo, foram detectados elevados níveis de cloreto nesta região, sugerindo que a acidificação seria por HCl proveniente da célula oxíntica. Por outro lado, as medidas de concentração de bicarbonato, fosfato e amônia ao longo do intestino médio revelaram a baixa concentração dos primeiros e elevada concentração de amônia na região posterior, o que levou a propor a amônia como agente neutralizante. Porém, o uso de alguns inibidores pouco específicos levou a desentendidos sobre bomba responsável pelo bombeio de prótons na região média.

Atualmente são vários os genes identificados como responsáveis pela manutenção da região ácida na espécie próxima, *D. melanogaster*. Overend et al. (2016) avaliaram a relevância de determinados genes a partir de medidas de expressão por RT-PCR, mostrando sua elevada expressão na região ácida. Também avaliaram grosseiramente o papel desses genes na acidificação com o uso de indivíduos nocautes e indicadores de pH. Dessa maneira foram identificados como responsáveis pela acidificação os genes de duas subunidades α da H^+ V-ATPase, o simporter KCC, o antiporter $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, um canal de cloreto (indefinido), o canal de potássio Slowpoke e a anidrase carbônica 1.

1.6. Contrafluxos no intestino médio de insetos

A existência de um fluxo contrário ao fluxo do alimento no intestino médio de insetos foi sugerida pela primeira vez por Wigglesworth (1933). A partir de experimentos realizados com corantes concluiu que o fluído secretado na região posterior do intestino médio de larvas de mosquito é absorvido nos cecos, localizados na região anterior. Treherne (1959) deu um passo a mais e mostrou em gafanhoto que os cecos não são só o lugar de absorção de água, como também de aminoácidos. Mas foi somente em Berridge (1970) que o contrafluxo adquire um sentido fisiológico na absorção de nutrientes. Berridge (1970) propôs que a digestão acontece ao longo do intestino médio, sendo os produtos da digestão acumulados na região posterior e dirigidos por um contrafluxo para a região anterior para sua absorção. Porém, nenhum desses autores apresentaram medidas quantitativas dos fluxos.

A primeira medida quantitativa dos fluxos de água foi feita por Dow (1981), quem determinou que os cecos do gafanhoto absorviam água proveniente dos túbulos de Malpighi, formando um contrafluxo que promoveria o movimento dos nutrientes para o lugar de absorção.

Na mesma época, Terra & Ferreira (1981) estabeleceram uma nova relação entre os contrafluxos e a reciclagem de algumas enzimas digestivas como a tripsina. Eles calcularam as taxas de excreção de várias enzimas a partir de medidas de atividade enzimática das fezes da larva *Rhynchosciara americana*, levando em consideração as taxas de recuperação e a estabilidade das enzimas no intestino. Assim observaram que a tripsina presente no espaço endoperitrófico era excretada à uma razão baixa, igual à das enzimas do espaço ectoperitrófico, propondo que a

enzima do espaço endoperitrófico é recuperada para o espaço ectoperitrófico e então levada pelo contrafluxo para sua reciclagem, antes de ser excretada (Fig. 13). Como consequência da reciclagem da enzima, as atividades de tripsina eram maiores na região anterior do que na posterior, porém ficaram iguais na presença de excesso de proteína, resultando no aumento da taxa de excreção. Espinoza-Fuentes et al. (1987) identificaram as regiões do intestino médio de *M. domestica* envolvidas nos fluxos de água e calcularam os volumes de água secretada e absorvida em cada região com o uso de corantes. Assim chegaram a hipótese de que existiria um contrafluxo da região posterior para a região média do intestino médio que seria a responsável pela diminuição da taxa de excreção de tripsina. A partir de esses trabalhos foram vários os autores que sugeriram a existência de contrafluxos de água envolvidos na reciclagem de enzimas em outras Ordens de insetos como Coleoptera (Ferreira et al., 2002; Caldeira et al., 2007), Phasmatodea (Monteiro et al., 2014), Lepidoptera (Bolognesi et al., 2001; Bolognesi et al., 2008) e Orthoptera Ensifera (Biagio et al., 2009).

A difusão simples de água através das membranas celulares, assim como a difusão facilitada via aquaporinas, depende diretamente da diferença de pressão osmótica entre o espaço extracelular (ou hemolinfático) e o intracelular. Em insetos, existem quatro famílias de aquaporinas: DRIP seletiva para água (estrita); PRIP com capacidade para o transporte de ureia e água; EGLP, específicas de holometábolos (Finn et al., 2015), que também podem transportar glicerol. As BIB, específicas de cérebro, não transportam água (Tatsumi et al., 2009). Porém, a água também pode ser transportada contra gradiente osmótico por simporters (Zeuthen, 2010). Os simporters NKCC e KCC da família CCC (SLC12) são expressos em uma ampla variedade de tecidos envolvidos no balanço hídrico, incluindo o intestino médio de

insetos (Sun et al., 2010; Gillen et al., 2006; Piermarini et al., 2017; Rodan et al., 2012). Alguns de seus homólogos em mamíferos foram caracterizados e mostraram a capacidade para o cotransporte de água e íons (Zeuthen, 2010). Em mamíferos existem duas isoformas de NKCC diferenciadas pela expressão e localização subcelular. NKCC1 é a isoforma ubíqua e geralmente encontrada na membrana basolateral, porém NKCC2 apresenta uma expressão apical e específica na alça ascendente de Henle do néfron. NKCCs e KCCs são diferencialmente ativados, NKCCs por encolhimento celular e baixa concentração intracelular de cloreto e os KCCs por inchaço celular e elevada concentração de cloreto intracelular. Ambos são eletroneutros acoplados ao gradiente eletroquímico de Na^+ e K^+ , respectivamente, mantido pela Na^+/K^+ -ATPase. Já que a bomba recupera os cations cotransportados pelos simporters, é o transporte de cloreto o responsável pelo efeito nos fluxos de água. Além disso, são afetados pela osmolaridade do meio extracelular, sendo os NKCC ativados por hiperosmolaridade e inibidos por hiposmolaridade e o contrário para os KCC. De essa maneira, NKCCs e KCCs, mantêm e regulam o volume celular e a concentração intracelular de cloreto. Portanto, independentemente de sua localização celular, apical ou basolateral, NKCCs injetam água e cloreto dentro da célula e os KCCs secretam água e cloreto para o espaço extracelular. Os inibidores furosemida e bumetanida inibem ambos simporters, porém a bumetanida é mais específica de NKCCs ($<K_i$) (Gamba, 2005; Arroyo et al., 2013).

Um modelo de trabalho sobre os fluxos de água foi proposto para *T. molitor*, baseado nos dados de expressão da análise RNA-seq do intestino médio. Neste modelo a água é secretada por um KCC expresso na região posterior do intestino médio e absorvida na região anterior por um NKCC (Moreira et al., 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar as moléculas responsáveis pela absorção de nutrientes, tamponamento e fluxos de fluidos em *M. domestica*.

2.2 Objetivos específicos

- a. Identificar no transcriptoma moléculas potencialmente responsáveis pela absorção de nutrientes, tamponamento e fluxos de fluídos.
- b. Purificar as membranas microvilares intestinais, analisar por proteômica seus componentes e relacionar com os dados transcriptômicos.
- c. Identificar o papel das proteínas através de experimentos in vivo utilizando diferentes inibidores, corantes e dietas.
- d. Propor a partir dos dados do transcriptoma, proteoma de membranas microvilares e experimentação in vivo, modelos para o mecanismo molecular dos fenômenos de absorção de nutrientes, tamponamento e fluxos de fluídos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

A criação das larvas de *M. domestica* (Diptera, Cyclorrhapha) foi feita em uma mistura fermentada de ração de porco comercial e casca de arroz (1:2) (Targa & Peres, 1979). Para a realização de experimentos foram utilizadas larvas no terceiro instar de desenvolvimento.

3.2. Dissecção de animais

As larvas de *M. domestica* foram imobilizadas no gelo e dissecadas na lupa em solução salina de NaCl 150 mM. Foi retirado o intestino médio junto com o conteúdo luminal e dividido em várias seções dependendo do objetivo do experimento (Fig. Suplementar 1).

3.3. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de sete seções do intestino médio, duas para a região anterior (A1, A2), duas para a região média (M1, M2), três para a região posterior (P1, P2, P3) (Fig. Suplementar 1A) e da carcaça, que representa a larva sem o intestino médio. A extração foi feita em triplicata, com seis larvas por replicata, utilizando o RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme as instruções do fabricante.

3.4. Análise do RNA-seq

O sequenciamento do RNA mensageiro foi realizado utilizando o equipamento HiSeq 2500 de Illumina, gerando um arquivo bruto de reads SRA (Short Read Archive). A análise dos reads foi realizada pelo método de montagem guiada por referência, no qual os reads são alinhados com o genoma de *M. domestica*. Os

dados de expressão gênica foram normalizados em unidades de transcritos por milhão de transcritos (TPM) (Dias et al., 2018).

3.5. Anotação e análises das sequências de proteínas

A seleção de proteínas hipoteticamente envolvidas na absorção de nutrientes e micronutrientes, tamponamento intestinal, fluxos de água, assim como determinadas enzimas relacionadas foi feita a partir da recopilção de informação existente na literatura de vertebrados e insetos. A identificação das sequências de proteínas foi realizada utilizando como isca sequências de proteínas anotadas na base de dados UniProtKB/Swiss-Prot (preferentemente da Ordem Diptera) e fazendo Blast (Altschul et al., 1990) contra o genoma de *M. domestica*. Como resultado do uso de proteínas provenientes de outras espécies, em alguns casos de vertebrados, algumas sequências relacionadas poderiam não ser identificadas. Por isso, as sequências de *M. domestica* resultantes do primeiro Blast foram utilizadas como isca para uma segunda rodada de Blast contra o genoma de *M. domestica*, de forma a identificar todas as sequências possíveis.

Com o intuito de simplificar a análise computacional das sequências proteicas, a expressão dos genes que codificam para o mesmo tipo de proteína (ex.: lisozima) foi utilizada para discriminar aquelas proteínas com menor relevância na fisiologia intestinal. Dessa maneira, genes cuja expressão máxima em qualquer uma das seções do intestino médio foi menor a 5% da expressão máxima do gene mais expresso foram eliminados, assim como, aqueles cuja expressão na carcaça foi pelo menos dez vezes superior ao da seção mais expressa do intestino médio, salvo raras exceções.

A anotação das sequências de proteínas foi feita utilizando a ferramenta online InterProScan 5 Software (Jones et al., 2014) junto a uma curagem manual em busca de domínios, motivos e aminoácidos específicos e conservados. Para isso, as sequências de *M. domestica* foram alinhadas com sequências anotadas da base de dados UniProtKB/Swiss-Prot utilizando MAFFT (Katoh et al., 2017) através de Jalview 2 (Waterhouse et al., 2009).

A predição de peptídeo sinal; número de domínios transmembrana; assinaturas de sequência; sítios potenciais de N-Glicosilação; O-Glicosilação; fosforilação; âncoras de GPI e ligações dissulfeto foi feita com as ferramentas online SignalP 4.0 Server (Petersen et al., 2011); TMHMM (Krogh et al., 2001) e Phobius (Käll et al., 2007); ScanPROSITE (de Castro et al., 2006); NetNGly 1.0 Server (Gupta et al., 2004); NetOGly 4.0 Server (Steentoft et al., 2013); NetPhos (Blom et al., 2004); PredGPI (Pierleoni et al., 2008) e DiANNA (Ferrè & Clote, 2005), respectivamente.

A relação de ortologia entre as proteínas de *M. domestica* e outros insetos (especialmente Diptera) foi predita utilizando a ferramenta InParanoid 8 (Sonnhammer & Östlund, 2015). Foram consideradas como proteínas ortólogas aquelas com um score $\geq 0,95$ (Tabela Suplementar 1).

3.6. Purificação das membranas microvilares do intestino médio

A purificação de membranas microvilares foi feita em triplicata com cem larvas por replicata de acordo com Jordão et al. (1995). As larvas foram lavadas com água destilada e alimentadas em um bequer com gel de amido de milho insolúvel 10% por 100-120 min. Em seguida, foram dissecadas, dividindo o intestino médio em nove seções, três para a região anterior (A1, A2, A3), duas para a região média (M1, M2)

e quatro para a região posterior (P1, P2, P3, P4) (Fig. Suplementar 1B). As seções foram suspendidas em 1 mL de solução de manitol 286 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl pH 7.1 2 mM e sonicadas no gelo em um sonicador Digital Branson a potência 30% por dois ciclos de 15 s com um intervalo de 45 s. Uma amostra do sonificado inicial foi coletada e etiquetada como Homogeneizado (H). Em sequência, foi adicionado ao sonificado restante um volume de solução de $MgCl_2$ 24 mM e deixado em repouso por 10 min no gelo. Após os 10 min, a amostra foi centrifugada a 3000 g 4°C por 10 min e foi retirado o sobrenadante sendo o sedimento resuspendido em uma solução de NaCl 10 mM, Tris-HCl 2 mM pH 7,4 e etiquetado como P1, correspondente a maioria das membranas celulares menos as microvilosidades. O sobrenadante de P1 foi submetido a outro ciclo de centrifugação a 25000 g 4°C por 30 min e o sedimento resultante, correspondente às microvilosidades, foi etiquetado como MV e resuspendido na mesma solução. Dois terços do volume de MV foram utilizados para o tratamento com solução hiperosmótica de Tris-HCl 1 M pH 7 no gelo por 1 h, sendo vortexado a 1800 rpm por 15 s a cada 15 min. Na sequência, um volume de água milliQ a 4°C foi adicionado, favorecendo assim a separação do citoesqueleto das membranas microvilares. Por último, o sedimento contendo as membranas microvilares (MMV) foi obtido por centrifugação a 25000 g 4°C por 30 min. O sobrenadante final foi guardado e o sedimento ressuspendido na solução de NaCl 10 mM, Tris-HCl 2 mM pH 7,4.

3.7. Ensaios enzimáticos

3.7.1. Aminopeptidase

O ensaio de atividade aminopeptidase foi feito para todas as frações celulares da purificação de membranas microvilares H, P1, MV, MMV, segundo Erlanger et al. (1961). Volumes na proporção 1:1 de amostra e solução de leucina p-nitroanilida

(LpNA) 2,5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 foram adicionados em placas de 96 poços colocadas em um leitor de placa Spectra Max M2 (Molecular Devices) a 30°C com leituras periódicas a 410 nm.

3.7.2. *Tripsina*

O substrato para atividade de tripsina, carbobenzo-L-arginina-7-amino-4-metilcumarina (Z-R-MCA), foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) e diluído até 100 mM com Tris-HCl pH 7,1. O ensaio de atividade de tripsina foi feito em placas de fluorescência de fundo branco utilizando volumes na proporção 1:1 de amostra e Z-R-MCA 10 μ M. A hidrólise do substrato foi monitorada por fluorescência (λ_{ex} 350 nm e λ_{em} 460 nm) a 30°C em um leitor de placa Spectra Max M2 (Molecular Devices) por pelo menos seis períodos de tempo diferentes.

3.8. *Quantificação de proteína*

A quantificação de proteína para a determinação da atividade específica de aminopeptidase foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), utilizando ovoalbumina para a curva padrão.

3.9. *Proteômica*

As proteínas de amostras de membranas microvilares das diferentes seções do intestino médio de *M. domestica* (Fig. Suplementar 1B) foram digeridas por duas técnicas diferentes, em gel e em solução.

Digestão em gel: Foram utilizadas amostras de 40 μ g de proteína de cada seção e submetidas a SDS-PAGE. As colunas do gel foram cortadas manualmente em bandas de 2 mm, desidratadas em 100 μ L de acetonitrila por 20 min a temperatura ambiente, reduzidas com ditioneitol 10 mM por 30 min e alquiladas no escuro com iodoacetamida 20 mM por 45 min, tudo a temperatura ambiente. O

excesso de reagente de cada passo foi removido e o gel foi desidratado em 100 μ L de acetonitrila. A continuação, foram adicionados a cada banda 7 μ L de uma solução de tripsina (5 ng/ μ L) e após 5 min, foram adicionados 50 μ L de bicarbonato de amônio 25 mM e incubado a 37°C por 15 h. Os peptídeos resultantes da digestão foram recuperados do sobrenadante em dois ciclos de 30 min com 50 μ L e 100 μ L de acetonitrila, respectivamente. As bandas de cada amostra foram combinadas em três grupos diferentes de 10 bandas cada um começando pela parte de cima do gel.

Digestão em solução: Foram utilizadas amostras de 15 μ g de proteína de cada seção e digeridas utilizando o detergente RapiGest™ SF (Waters), conforme as instruções do fabricante.

As amostras de peptídeos foram secadas e resuspendidas separadamente em ácido fórmico 0,1 % (v/v) com acetonitrila 2 % (v/v) e utilizadas para corridas diferentes de LC-MS/MS em LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo) (Pimentel et al., 2017). A identificação de proteínas foi feita utilizando a ferramenta Mascot (Matrix Science) com uma base de dados produto da mistura de dados do transcriptoma de *M. domestica* do nosso laboratório e o genoma de *M. domestica* (ncbi), com uma margem de erro de 0,1 Da para MS1 e MS2. Outros parâmetros de busca variáveis considerados foram a oxidação de metioninas e a falta de clivagem pela tripsina. Os resultados da identificação foram recopilados como um único experimento para cada amostra em Scaffold 4 (Searle, 2010) e a análise quantitativa foi feita com unidades de fator de abundância espectral normalizado (Florens et al., 2006). Os resultados se consideraram positivos para aquelas proteínas com pelo menos dois peptídeos sequenciados com uma taxa de descoberta falsa de 0,1 %.

3.10. Fabricação e calibração do microeletrodo de pH

A superfície de um microeletrodo de platina foi modificada com a eletrodeposição de uma camada de oxido de irídio (Santos et al., 2016). As curvas de calibração foram elaboradas medindo os potenciais elétricos de um circuito aberto submergindo o microeletrodo em solução de Ringer (NaCl 128 mM, KCl 1,3 mM, CaCl_2 18 mM, $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ 2,3 mM) em quatro valores de pH entre 2 e 10. A calibração do microeletrodo foi feita antes e depois dos experimentos com o intuito de detectar qualquer mudança na resposta do microeletrodo. Na caracterização do microeletrodo foi obtido um plote típico de calibração com resposta SuperNernstian (Santos et al., 2016).

3.11. Medidas *in vivo* do pH luminal com microeletrodos

Para cada uma das condições em que foram realizadas as medidas de pH do intestino médio de larvas de *M. domestica* foram utilizadas 30 larvas. Dois grupos controle foram larvas comendo dieta (item 3.1) e larvas comendo gel de amido de milho insolúvel 10% elaborado com água MilliQ. Nos experimentos, foram adicionados diferentes componentes ao gel de amido 10%: proteína de leite parcialmente hidrolisada 1 % ; ovoalbumina 1 % ; amiloride 1 mM ; glibenclamida 1 mM ; dimetilamônia (DMA) 10 e 100mM; imidazol 10 e 100 mM. As larvas foram colocadas em um bequer de 100 mL contendo o gel e mantidas no escuro por 120 - 240 m a 25°C a exceção daquelas comendo dieta que foram diretamente dissecadas. As medidas de pH foram feitas sempre com intestinos médios de larvas recentemente dissecadas. Para evitar na medida do possível a alteração do pH luminal, as larvas foram brevemente imobilizadas no gelo e dissecadas em solução de Ringer (NaCl 128 mM, KCl 1,3 mM, CaCl_2 18 mM, $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ 2,3 mM) pH 6,5 correspondente ao pH da hemolinfa de *M. domestica* (Buck, 1953). Os intestinos

médios foram esticados com ajuda de pinças e colocados sobre uma lamina com a superfície coberta por um gel de agarose 0,5 % de 2 mm de altura elaborado com solução de Ringer pH 6,5. O gel de agarose permitiu manter o tecido úmido, retardando o processo de deterioração, assim como serviu de meio semilíquido apto para colocar o eletrodo de referência necessário para a determinação do pH. Sempre que foi necessário o tecido foi umedecido superficialmente com solução de Ringer.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um Autolab PGSTAT128 bipotentiostat/galvanostat (Ecochemie, Holanda) e um Sensolytics (Sensolytics, Alemanha) SECM (micromanipulador de precisão elevada) acoplado a um microscópio invertido (Zeiss, Alemanha). O microeletrodo foi colocado no micromanipulador do equipamento SECM e o microscópio invertido e a câmera CCD foram utilizadas para acertar o lugar de inserção do microeletrodo para a determinação do pH. De forma geral o próprio eletrodo foi capaz de perfurar o epitélio intestinal, mas naqueles casos em que não foi possível, foi utilizada uma agulha de insulina antes da inserção do eletrodo. As medidas de pH foram feitas inserindo o eletrodo dentro do lúmen (Fig. 1) em diferentes posições ao longo do intestino médio, normalmente no meio de cada seção (Fig. Suplementar 1B), a exceção das medidas com DMA e imidazol nas quais o eletrodo foi inserido na fronteira entre as seções M2 e P1 (seta Fig. Suplementar 1C). As medidas controle foram obtidas inserindo o microeletrodo no gel de agarose. Antes de cada medida de pH teve um tempo de estabilização do microeletrodo que variou entre 2 - 5 min.

3.12. Medidas de pH luminal in vivo com um indicador de pH

Para localizar a região ácida do intestino médio e detectar o efeito de inibidores de proteínas hipoteticamente envolvidas nos processos de acidificação e

alcalinização foi utilizado o indicador de pH Vermelho Congo o qual varia de azul para vermelho no intervalo de pH 3,0 e 5,2. Já que um dos transportadores analisados com inibidores (KCC) é afetado pela osmolaridade do meio extracelular (Kahle et al., 2010), os experimentos foram realizados em três osmolaridades diferentes, utilizando 10 larvas para cada um. As larvas foram colocadas em bequers contendo gel de agarose 1% com vermelho Congo 0,025 %, preparados com solução salina de NaCl-KCl 150 mOsm (hipotônica); 350 mOsm (isotônica); ou 1500 mOsm (hipertônica) mais um dos seguintes inibidores:

- bafilomicina A1 de *Streptomyces griseus* 400 nM solubilizada em metanol.
- oubaina 1 μ M; 10 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 1 mM solubilizada em água MilliQ à 90°C.
- furosemida 10 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 1 mM solubilizada em metanol.

Os resultados dos experimentos foram classificados dependendo da alteração da cor do Vermelho Congo para cada uma das larvas de cada grupo. A avaliação foi feita no olho e determinados quatro níveis de inibição: 0= azul; 1= azul avermelhado; 2= vermelho azulado; 3= vermelho. Uma vez assinado um nível para cada larva do grupo foi feita a média dos valores de cada grupo.

3.13. Medida dos fluxos de água do intestino médio com corante

O corante Azul de Evans não é absorvível no intestino médio das larvas e, por esse motivo, a medida de água secretada ou absorvida ao longo do intestino médio pode ser inferida a partir da alteração da concentração do corante presente no gel com o qual são alimentadas as larvas. Grupos de 10 larvas foram alimentadas por

100 - 120 min com gel de agarose 1 % com Azul de Evans 0,05 % (w/v) em água MilliQ. Após dissecadas o intestino médio foi dividido em duas seções para a região anterior (A1, A2), uma para a região média (M) e quatro para a região posterior (P1, P2, P3, P4) (Fig. 7). As seções foram colocadas em tubos contendo NaOH 0,1 M e mantidas no gelo. Em seguida foram homogeneizadas em um Potter-Elvehjem (20 movimentos) e clarificadas por centrifugação a 8000 g 4°C por 10 min. A absorbância dos sobrenadantes foram medidas em um espectrofotômetro Ultrospec 2100 *pro* (Amersham Biosciences) a 610 nm.

Para determinar a alteração dos fluxos de água na ausência/presença de sal e de sal + drogas as larvas foram alimentadas com gel de agarose 1 % Azul de Evans 0,05 % em solução salina de NaCl-KCl de 150 mOsm (hipotônica) e 1500 mOsm (hipertônica) com ou sem furosemida 100 µM, previamente solubilizado em metanol. Nos controles foi adicionado um volume igual de metanol sem a droga. O processamento das amostras foi realizado como descrito no parágrafo anterior, porém o intestino médio foi dividido nas três grandes regiões morfológicas, anterior, média e posterior (A, M, P) (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

O cálculo dos microlitros secretados ou absorvidos nas diferentes seções do intestino médio foi feito a partir das mudanças na absorção do Azul de Evans, levando em consideração o volume de cada seção (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). Como ponto inicial foi considerada a medida de absorbância do gel com Azul de Evans 0,05 %, a partir do qual foi calculada a quantidade de microlitros secretados na região anterior. Em sequência, a absorbância da região média foi comparada com a da região anterior e calculados os microlitros secretados/absorvidos na região média e de igual forma para a região posterior.

3.14. Alteração do perfil de atividade de tripsina

A alteração do perfil de atividade de tripsina ao longo do intestino médio e do intestino posterior de larvas de *M. domestica* foi determinada em condições hipotônicas (150 mOsm) e hipertônicas (1500 mOsm) de solução salina NaCl-KCl na presença e ausência de furosemida e bumetanida. O intestino médio foi dividido da mesma forma que na purificação de membranas microvilares (Fig. Suplementar 1B) e foi adicionado o intestino posterior como seção final. As seções foram homogeneizadas em água MilliQ 4°C, utilizando um Potter-Elvehjem (20 movimentos) e centrifugadas a 10000g 4°C por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e junto com os sedimentos foram armazenados à -20°C.

A atividade de tripsina foi expressa em % de atividade/animal (μ U/Animal), para isso foram somadas as atividades de tripsina de todas as seções e consideradas como 100 %, a partir da qual foi calculada a porcentagem de atividade de cada seção.

3.15. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o método de análise de variância One Way ANOVA de forma a identificar aqueles resultados significativamente diferentes com uma $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise molecular do tamponamento do intestino médio de *M. domestica*

4.1.1. Valores de pH luminal do intestino médio de larvas de *M. domestica*

A localização dos principais lugares onde ocorre a acidificação e alcalinização assim como a detecção de variações de pH ao longo do intestino médio de larvas de *M. domestica* serve de base para a busca das proteínas que possam estar

Figura 1. A inserção do microeletrodo foi monitorada com duas câmeras. A) Imagem captada com a câmera CCD. B) Imagem captada com o microscópio invertido.

envolvidas na manutenção do pH luminal. Para identificar de forma precisa as diferenças de pH foram realizadas medidas in vivo com microeletrodos, inserindo-o no lúmen de dez seções ao longo do intestino médio de larvas de *M. domestica* (Fig. 1 e Fig. 2).

As larvas alimentadas com dieta apresentaram valores de pH do proventrículo e região anterior (seções A1, A2) ao redor de 6,7 unidades, o que representa um aumento de pH em relação ao pH da comida, com valores entre 5-5,5 unidades. A partir da seção A3 até M2 foi detectado um gradiente de acidificação ($p < 0,05$), diminuindo aproximadamente 2 unidades de pH. Entre a região média (M2) e a região posterior (P1), acontece a alcalinização do conteúdo luminal, aumentando

Figura 2. Seções em que foi dividido o intestino médio de *M. domestica* para a purificação de membranas microvilares, proteômica e determinação do pH luminal com microeletrodo. As larvas foram alimentadas com gel de agarose 1 % suplementado com Vermelho Congo 0,025 %. O Vermelho Congo auxilia na visualização das grandes mudanças de pH ao longo do intestino médio da larva, variando de cor de azul 3,0 - 5,2 vermelho. Assim, identificamos um provável gradiente acidificação entre A3 e M2 assim como uma alcalinização abrupta em P1.

Tabela 1. pH luminal das diferentes seções do intestino médio de larvas de *M. domestica* alimentadas com diferentes dietas.

Comida	Seções do intestino médio									
	Pro	A1	A2	A3	M1	M2	P1	P2	P3	P4
Dieta	6,71 ± 0,12	6,59 ± 0,05	6,77 ± 0,21	6,17 ± 0,06*	5,68 ± 0,14*	4,45 ± 0,15*	6,68 ± 0,03*	7,53 ± 0,09*	7,47 ± 0,10	5,37 ± 0,02*
Amido	n.d.	5,34 ± 0,09	5,62 ± 0,07	5,23 ± 0,04*	4,29 ± 0,08*	2,49 ± 0,13*	5,53 ± 0,26*	6,18 ± 0,21	6,44 ± 0,09	5,56 ± 0,32*
PHL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,54 ± 0,24	7,24 ± 0,25*	7,87 ± 0,35	8,02 ± 0,27	7,73 ± 0,33
Ovalbumina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,82 ± 0,14	5,33 ± 0,09*	5,89 ± 0,10*	6,17 ± 0,24	5,3 ± 0,17*

Os valores correspondem às médias e SEM de medidas realizadas em 8 larvas. * Valores significativamente diferentes dos da seção anterior ($p < 0,05$). Pro: Proventrículo; A: Anterior; M: Média; P: Posterior; PHL: Proteínas hidrolisada; n.d.: não determinado.

mais de 2 unidades de pH ($p < 0,05$). O pH continuou aumentando ao redor de 1 unidade em P2 ($p < 0,05$), mantendo-se em P3 e caindo por volta de 2 unidades em P4 ($p < 0,05$). O perfil de pH determinado nas larvas alimentadas com gel de amido foi similar ao das larvas alimentadas com ração, porém com valores de pH menores ($p < 0,05$) para todas as seções exceto P4. Apesar das semelhanças, foram encontradas diferenças entre os dois perfis. As larvas alimentadas com gel de amido não apresentaram nenhum aumento de pH na região anterior, comparado com o pH do gel (5,5 unidades), nem foi detectado um aumento de pH significativo na seção P2 (Tabela 1). Estas diferenças sugerem que o gel de amido carece de determinadas substâncias, presentes na ração, que são capazes de modificar o pH luminal.

4.1.2. Possíveis proteínas envolvidas no tamponamento luminal e na absorção de aminoácidos.

A seleção de proteínas hipoteticamente envolvidas na manutenção do pH luminal foi feita considerando as medidas de pH ao longo do intestino médio (Tabela 1) junto aos dados de expressão dos genes e a informação bibliográfica referente às proteínas. Aquelas proteínas cujos genes foram mais expressos em M1 e M2 foram considerados como envolvidos na acidificação e aquelas mais expressos em P1, como envolvidos na alcalinização. Um total de trinta e nove proteínas foram selecionadas, muitas delas com ortólogas já caracterizadas em outras espécies da Ordem Diptera (Tabela Suplementar 1). As sequências das proteínas foi analisada por bioinformática como descrito no Materiais e Métodos, confirmando a presença das características necessárias para a sua atividade. Porém algumas requerem alguns comentários adicionais.

H^+ V-ATPase: Esta enzima bombeia prótons nos diferentes compartimentos celulares utilizando como fonte de energia o ATP. O complexo está formado por 14 subunidades (Forgac, 2007) com perfil de expressão idêntico, exceto a subunidade a, que apresentou um perfil diferente dependendo da isoforma (Fig. 3). Esta

Figura 3. Heatmap de expressão das diferentes subunidades da MdH^+ V-ATPase no intestino médio de *M. domestica*.

subunidade faz parte do domínio V_o envolvido no transporte de prótons e determina o grau de montagem dos domínios V_o e V_1 e o acoplamento de prótons à hidrólise do ATP (Kawasaki-Nishi et al., 2001b). Igualmente a vertebrados, a subunidade a de *M. domestica* apresenta 4 isoformas, que diferem principalmente em características de sequência envolvidas no tráfego e na atividade do complexo (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Por tanto, dependendo da isoforma, podem existir diferenças na capacidade de acidificação (Kawasaki-Nishi et al., 2001c), o que pode estar relacionado ao desempenho de diferentes funções fisiológicas.

Transportador de amônio tipo Rhesus (Rh): A análise comparada das sequências do transportador Rh de *M. domestica* e *Aedes albopictus* sugeriu que MdRh poderia apresentar baixa afinidade por amônio e elevada para amônia (Wu et

al., 2010). Além disso, o papel hipotético de MdRh na alcalinização coincidiria com o de um transportador de amônia, capaz de sequestrar os prótons formando amônio e elevando assim o pH do intestino médio.

Anidrase carbônica (CA): Todas as anidrases carbônicas expressas no intestino médio foram preditas tipo alfa. MdCA1 foi a única com uma provável âncora de GPI (N261, 99,1%), como foi mostrado na ortóloga de *A. aegypti* (AaCA10) (Seron et al., 2004). Por outro lado, a existência de resíduos carregados nas extremidades N-terminal das MdCAs e nas C-terminais dos antiporters de bicarbonato, sugere uma possível interação proteína-proteína que permita aprimorar o transporte de bicarbonato (Vince et al., 2000; Alvarez et al., 2003).

Canais de cloreto ativados por glutamato (GluCl): Este tipo de canais se encontram de forma exclusiva em invertebrados (Wolstenholme, 2012). Em *M. domestica* foram várias as isoformas neuronais estudadas (Kita et al., 2014), porém MdGluCl apresentou características de sequência diferentes das neuronais, porém conservadas em relação às formas expressas no intestino médio de *D. melanogaster* e *A. aegypti* (Overend et al., 2016; Meyers et al., 2015). Esses resultados sugerem que as formas intestinais poderiam ter diferentes propriedades das expressas no sistema nervoso.

Antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependente de K^+ (NCKX): Este tipo de antiporter é normalmente inibido por amiloride (Kleyman & Cragoe, 1988), assim como alguns trocadores Na^+/H^+ (NHE), o que impediria a utilização do amiloride para avaliar a função do NHE. Porém, nenhum MdNCKX apresentou o motivo de sensibilidade a amiloride (Slepkov et al., 2007).

Transportadores de aminoácidos acoplados a prótons (PAT): O genoma de *M. domestica* contém dez genes que codificam PATs, porém só 8 desses genes foram detectados na análise RNAseq do intestino médio. Os genes MdPAT1-MdPAT2 e MdPAT4-MdPAT8 se encontram próximos no mesmo replicon, sugerindo a existência de duas duplicações recentes. As sequências primárias apresentaram 30-45% de identidade e elevada similaridade nas regiões transmembrana, sendo menor para as extremidades N-terminais. O domínio transmembrana envolvido no transporte de aminoácidos, assim como o resíduo H55 (nº de PAT1 humano) envolvido na ligação ao próton (Metzner et al., 2008) foram conservados em todas as sequências, sugerindo que todos os MdPATs sejam simporters ativos. MdPAT4 e MdPAT8 foram os mais relacionados filogeneticamente com seus homólogos em mamíferos MdPAT1-4 e ambos apresentaram a mutação G80A (nº de PAT1 humano), que sugere uma menor afinidade pelo substrato (Bröer et al., 2008). Além disso, foi encontrado um motivo de ligação de quinase (RFxV/I) e um potencial sítio de fosforilação por PKC em S251 em MdPAT4, sugerindo que MdPAT4 poderia ser regulado por quinases. Por último, três MdPATs apresentaram ortólogos caracterizados de *D. melanogaster* (Tabela Suplementar 1).

Antiporter Na^+/H^+ (NHA): MdNHA1 apresentou uma proteína ortóloga em duas espécies relacionadas, *D. melanogaster* e *A. aegypti* (Tabela Suplementar 1), porém estas proteínas diferem no mecanismo de transporte. DmNHA1 e AeNHA1 foram caracterizados como simporter de $\text{H}^+:\text{Cl}^-$ e antiporter Na^+/H^+ , respectivamente, sendo DmNHA1 uma exceção dentro da família NHA (Chintapalli et al., 2015). Apesar da elevada similaridade entre os perfis de pH intestinal e a maior identidade entre os NHA de *D. melanogaster* e *M. domestica*, foi considerada a função conservada (antiporter Na^+/H^+) para MdNHA1.

Trocadores Na^+/H^+ (NHE): Dentre os NHE expressos no intestino médio de *M. domestica* só MdNHE8 apresentou o motivo de ligação de amiloride com o resíduo de Leu conservado que determina sua inibição por amiloride (Slepkov et al., 2007).

Proteína de resistência a multidrogas (MRP): A proteína ortóloga de MdMRP1 em *D. melanogaster* foi relacionada com a homeostase do cobre ao transportar metaloproteínas (Yepiskoposyan et al., 2006).

4.1.3. Expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na acidificação, tamponamento do muco protetor e na homeostase do cobre

A Tabela 2 apresenta um conjunto de genes com maior expressão na região média e que, por tanto, codificariam proteínas hipoteticamente envolvidas nos processos de acidificação, proteção do epitélio frente ao ácido e homeostase do cobre. Na seção mais ácida, M2, os genes mais expressos codificam duas anidrases carbônicas *MdCA2* e *MdCA3*, a proteína de resistência a multidrogas *MdMRP1*, as subunidades *a1* e *a2* da *MdH⁺ V-ATPase* e o trocador de Na^+/H^+ *MdNHE3*. *MdH⁺ V-ATPase a2* também apresentou elevada expressão na carcaça. Na seção M1 os genes mais expressos foram os da anidrase carbônica *MdCA1*, o canal de potássio *MdOrk1* e o transportador de bicarbonato *MdNDAE1*, o último também com expressão elevada em P3. O canal de cloreto ativado por glutamato, *MdGluCl* apresentou uma expressão elevada e homogênea em M1, M2 e P1. Como exceções à regra, foram incluídos na tabela o trocador Na^+/H^+ *MdNHE8* e as subunidades da *MdNa⁺/K⁺-ATPase*, devido aos resultados dos experimentos com os inibidores amiloride e oubaina, respectivamente (Tabelas 7 e 8). Também foram incluídos devido ao seu papel na acidificação em *D. melanogaster*, o simporter *MdKCC* e o antiporter *MdAE1* (Overend et al., 2016).

Tabela 2. Expressão dos genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na acidificação e processos associados..

Atividade	Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
			A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
Anidrase Carbônica	<i>MdCA1</i>	XP_005179491.2	30,45	44,92	134,12	28,15	29,24	0,68	2,44	10,8
	<i>MdCA2</i>	XP_005185535.2	1,12	1,09	404,17	1160,19	129,04	3,25	4,13	75,6
	<i>MdCA3</i>	XP_005176456.1	49,01	37,61	117,97	287,87	61,08	10,69	22,59	46,66
Bomba H ⁺	<i>MdH⁺ V-ATPase a1</i>	XP_005182551.1	0,34	1,98	687,63	995,39	1,47	0,13	0,57	0,08
	<i>MdH⁺ V-ATPase a2</i>	XP_005182534.1	54,39	21,65	65,61	403,11	141,1	55,19	77,41	354,4
Ant. Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	<i>MdAE1</i>	XP_011291449.1	6,22	5,61	101,75	37,53	0,94	7,77	82,75	2,9
Canal de Cl ⁻	<i>MdGluCl</i>	XP_005189297.1	39,69	17,52	389,22	330,17	320,75	2,62	0,73	33,98
Simp. K ⁺ :Cl ⁻	<i>MdKCC</i>	XP_005176500.1	0,12	0,03	3,84	6,3	0,51	7,28	14,29	1,88
Bomba 3Na ⁺ /2K ⁺	<i>Na⁺/K⁺ -ATPase α</i>	XP_005185745.1	7,57	7,66	15,59	13,99	11,56	9,39	15,31	32,74
	<i>Na⁺/K⁺ -ATPase β1</i>	XP_011295287.1	4,48	7,32	15,59	15,63	9,04	5,96	8,44	18,58
Canal de K ⁺	<i>MdOrk1</i>	XP_005185594.2	0,7	1,56	23,52	10,88	0,61	0,17	0,84	3,85
Ant. Na ⁺ :HCO ₃ ⁻ /H ⁺ :Cl ⁻	<i>MdNDAE1</i>	XP_005191710.3	1,78	3,73	31,74	8,87	5,29	21,14	35,41	5,26
Ant. Na ⁺ /H ⁺	<i>MdNHE3</i>	XP_005174925.2	11,75	8,19	5,12	30,79	14,5	0,31	0,34	14,08
Ant. Na ⁺ /H ⁺	<i>MdNHE8</i>	XP_005178440.1	3,18	2,7	7,62	9,08	5,61	6,34	11,87	2,25
Transp. de proteína-Cu	<i>MdMRP1</i>	XP_005176101.1	9,67	15,39	10,19	408,76	69,08	24,27	13,4	6,85

Dados de expressão obtidos a partir da análise RNA-seq das diferentes seções do intestino médio de *M. domestica* como representado na Figura Suplementar 1A. Os genes são expressos em unidades de transcritos por milhão (TPM) e a expressão de cada gene é exposta em destaque com diferentes tons de cinza de forma que seja facilmente identificável em quais seções o gene é mais expresso. A variação (SEM) entre as três replicatas biológicas foi entre 5-20% da média de TPM para cada gene e secção do intestino médio. A: Anterior; M: Média; P: Posterior; C: Carcaça, correspondente à larva sem o intestino médio; Ant: Antiporter; Simp: Simporter; Transp: Transporter.

4.1.4. Expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na alcalinização primária (P1) e secundária (P2 e P3) e a absorção de aminoácidos

O primeiro e principal evento de alcalinização acontece na fronteira entre as seções M2 da região média e P1 da região posterior, chamado de alcalinização primária. Os genes mais expressos nesta região foram considerados hipoteticamente envolvidos (Tabela 3). O simporter de aminoácidos e prótons *MdPAT4* e o transportador de amônia *MdRh* são mais expressos na fronteira

Tabela 3. Dados de expressão dos genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na alcalinização primária.

Atividade	Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
			A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
Transp. NH ₃	<i>MdRh</i>	XP_005182297.1	0,57	0,75	12,29	67,75	74,48	4,35	0,88	75,43
Simp. H ⁺ :AA	<i>MdPAT4</i>	XP_011295206.1	14,82	4,67	18,98	89,22	137,71	30,74	0,05	0,45
	<i>MdPAT5</i>	XP_005184711.2	0,05	0,08	0,03	0	66,79	62,35	30,8	8,61
Simp. H ⁺ :Peptídeo	<i>MdPep1</i>	XP_005182725.1	64,4	149,41	47,58	64,23	372,88	556,38	447,85	8,55
Simp. H ⁺ :Cl ⁻	<i>MdNHA1</i>	XP_005187728.1	7,89	16,55	1,99	0,09	63,04	52,25	3,76	19,14
Bomba H ⁺	<i>MdH⁺ V-ATPase a4</i>	XP_005182101.1	1,18	1,58	3,36	4,65	3,91	7,25	7,33	1,82

Abreviaturas e outros detalhes como descrito na Tabela 2.

M2 - P1, embora *MdRh* também é expresso na carcaça. Os transportadores *MdPAT5*, o simporter de peptídeos e prótons *MdPepT1* e o antiporter Na⁺/H⁺ *MdNHA1* são mais expressos em P1, P2 e P3. Na Tabela 1 foi detectado um aumento de pH significativo em P2 que é mantido em P3 nas larvas comendo dieta, o que foi chamado de alcalinização secundária e os genes hipoteticamente envolvidos nesse processo foram reunidos na Tabela 4. *MdPAT6 - 8* assim como *MdH⁺ V-ATPase a4* foram mais expressos na região posterior, principalmente em

Tabela 4. Dados de expressão dos genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas na alcalinização secundária e na absorção de aminoácidos em P3.

Atividade	Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
			A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
Simp. H ⁺ :AA	<i>MdPAT6</i>	XP_005185482.1	9,72	25,25	26,29	8,96	19,3	24,19	37,7	0,38
	<i>MdPAT7</i>	XP_005191979.1	2,71	2,17	8,11	8,12	4,49	7,67	17,03	5,27
	<i>MdPAT8</i>	XP_005176190.1	0,28	0,04	0,07	0,35	0,19	0,76	4,33	2,59
Simp. Na ⁺ :AA	<i>MdNAT1</i>	XP_011294562.1	8,81	0	0	0	0	0,03	1,02	2,48
	<i>MdNAT2</i>	XP_011291459.1	9,01	0,04	0,02	0	0,02	0,12	293,06	27,05
	<i>MdNAT3</i>	XP_005188545.1	2,27	0,05	0,06	0,03	0,53	6,29	85,37	15,41
	<i>MdNAT4</i>	XP_005181003.1	0,02	0	0,02	0	0,14	11,77	61,81	16,35
Bomba H ⁺	<i>MdH⁺ V-ATPase a3</i>	XP_005178444.1	72,23	207,05	347,36	17,06	186,63	269,9	610,33	36,7

Abreviaturas e outros detalhes como descrito na Tabela 2.

P3. Por último, aqueles genes hipoteticamente relacionados com a absorção de aminoácidos, independentemente do fenômeno de alcalinização, foram os da família de simporters de aminoácidos e sódio (*MdNAT*), a subunidade $\alpha 3$ da *MdH⁺ V-ATPase* (Tabela 4) e *MdNHE8* (Tabela 2).

4.1.5. Expressão de genes que codificam enzimas digestivas, lisozimas e endopeptidases

As lisozimas dos Diptera Cyclorrhapha podem ser diferenciadas em muitos casos apenas pelo peptídeo sinal e como resultado do processo de maturação dar lugar a enzimas idênticas. Isso é possível devido ao fenômeno evolutivo de expansão gênica detectado em *Drosophila* (Daffre et al., 1994) e inferido em *M. domestica*. Como consequência, na análise bioinformática das sequências de lisozimas, algumas das proteínas caracterizadas pelo nosso laboratório (*MdL1* e *MdL2*, Cançado et al., 2007; Cançado et al., 2008) apresentaram 100% de identidade com um conjunto de sequências de *M. domestica* registradas na base de dados NCBI. *MdL1* e *MdL2* foram principalmente expressos em A2 e M1, respectivamente, embora a primeira também foi bem expressa em A1e M1 (Tabela 5).

Dois tipos de catepsinas D foram relatadas, as de função lisossomal e as de função digestiva. As catepsinas D digestivas são de ação luminal (secretadas) e caracterizadas por apresentar uma sequência primária diferente das lisossomais, com ausência da alça de prolina (Padilha et al., 2009). Como esperado, os genes que codificam catepsinas D de função lisossomal apresentaram maior expressão na carcaça (*MdCAD1*), enquanto que aqueles que codificam formas digestivas apresentaram maior expressão no intestino médio. O resto das catepsinas D carecem da alça de prolina e por tanto são consideradas digestivas. Exceto

Tabela 5. Dados de expressão de enzimas direta ou indiretamente envolvidas na digestão ácida e alcalina de proteínas.

Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
		A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
<i>MdCAD1</i>	NP_001273807.1	9,79	12,03	24,3	4,6	39,58	77,88	65,6	279,24
<i>MdCAD2</i>	NP_001295996.1	26,84	1908,19	13656,52	187,75	5,99	0,97	5,18	0,63
<i>MdCAD3</i>	NP_001295998.1	2725,51	7851,68	3553,57	49,47	906,78	128,8	29,44	2,22
<i>MdCAD4</i>	XP_005189517.1	2414,25	8318,54	11190,28	139,46	20,72	16,4	32,64	1,52
<i>MdCAD5</i>	NP_001295998.1	1452,07	5429,79	8487,49	154,29	227,59	37,31	15,92	1,31
<i>MdCAD6</i>	NP_001295998.1	727,22	3059,63	5785,54	107,08	64,5	10,36	8,37	0,57
<i>MdCAD7</i>	XP_005187125.1	8,3	9,93	2498,97	6194,42	79,86	0,9	2,83	0,53
<i>MdCAD8</i>	XP_005187123.1	0,82	1,71	1340,89	5878,52	18,28	0,56	0,78	0,27
<i>MdCAD9</i>	XP_005189520.1	0,66	1,45	1119,9	1645,57	2,94	0,25	0,32	0,09
<i>MdCAD10</i>	XP_005187122.1	0,61	0,99	695,13	1045,1	1,96	0,06	0,16	0,04
<i>MdL1</i>	XP_019891658.1	82397,9	145668,5	106172,8	1277,8	364,06	474,88	565,26	1328,96
<i>MdL2</i>	XP_011290482.1	0,4	61,56	2498,64	413,39	2,17	0,1	0,63	0,35
<i>MdL3</i>	XP_019893141.1	26610,7	44152,6	33861,4	418,37	109,1	146,77	177	561,92
	XP_019893140.1								
<i>MdL4</i>	XP_005185835.1	10279,48	15891,01	11789,81	150,74	35,58	54,44	61,91	170,91
	XP_005185836.1								
<i>MdL5</i>	XP_005185827.1	58979,8	101931,8	74715	881,52	267,52	358,84	410,37	943,62
<i>MdL6</i>	XP_005185366.1	0,7	312,96	3888,76	739,44	5,01	0,5	2,52	0,22
<i>MdL7</i>	XP_011290487.1	0,68	143,15	3600,35	1448,91	7,51	0,63	2,37	0,13
<i>MdL8</i>	XP_005178472.1	0,32	45,15	1895,49	718,28	4,23	0,92	0,85	0,12
<i>MdL9</i>	XP_005178468.1	0	42,77	1744,56	316,59	1,19	0	0,72	0,11
<i>MdL10</i>	XP_019890621.1	0,25	36,62	1608,68	859,29	4,86	0,19	0,58	0,11
<i>MdL11</i>	XP_011290483.1	0,13	34,2	1230,21	488,39	1,62	0,16	0,65	0,24
<i>MdL12</i>	XP_005185375.1	0,14	34,46	694,88	253,63	0,99	0	0,47	0,12
<i>MdTripsina</i>	Todas	15708,97	42070,81	33188,01	25710,46	42204,92	11184,28	22298,11	211,74
<i>MdQuimotripsina</i>	Todas	85249,88	106744,79	17630,99	42208,97	90723,1	61549,95	18333,26	3289,53

CAD: catepsina D; L: lisozima. A lisozima caracterizada MdL1 apresentou 100% de identidade com proteínas codificadas pelos genes *MdL1*, *MdL3*, e *MdL5*. Outra lisozima caracterizada MdL2 apresentou 95.52% de identidade com proteínas codificadas pelos genes *MdL2*, *MdL10* e *MdL11*. Outros detalhes como descrito na Tabela 2.

MdCAD3, que apresentou maior expressão em A2, a maioria das catepsinas D foram mais expressas na região média. *MdCAD2,4-6* foram mais expressos em M1,

enquanto que sendo *MdCAD7-10* foram mais expressos em M2 (Tabela 5).

A expressão de genes que codificam serina peptidases foi dividida em dois conjuntos, tripsinas e quimotripsinas. Ambas famílias de serina peptidases foram mais expressas em A2 e P1 (Tabela 5).

4.1.6. Detecção das proteínas nas membranas microvilares

A atividade específica do marcador de membrana microvilar, aminopeptidase, foi utilizada para avaliar a qualidade das amostras resultantes da purificação de membranas microvilares do intestino médio de *M. domestica*. A Fig. 4 mostra como a medida que as membranas microvilares são isoladas do resto de membranas e conteúdo celular (MV), assim como do citoesqueleto (MMV), a atividade específica de aminopeptidase aumenta ($p < 0,05$). Estas variações de atividade específica são devidas as diferenças na razão área de microvilosidades/célula/citoesqueleto.

Figura 4. Atividade específica de aminopeptidase de três frações celulares: Homogeneizado (H), Microvilosidades (MV) e Membranas Microvilares (MMV) resultantes do processo de purificação de membranas microvilares realizado para nove seções do intestino médio de larvas de *M. domestica*. Os dados correspondem as médias $\pm$ S.E.M, $n=3$.

O rendimento da purificação para cada uma das seções do intestino médio foi entre 14% e 35%, valores equiparáveis aos descritos anteriormente no nosso laboratório (Jordão et al., 1995). A contaminação das amostras de membrana microvilar por proteínas presentes na membrana basolateral foi insignificante pois como as demais membranas, elas se agregaram com íons de magnésio (Terra et al., 2006), o que foi confirmado pela medida de atividade de marcadores enzimáticos de membrana basolateral (Jordão et al., 1995; Capella et al., 1997).

A ausência de contaminação por membrana basolateral foi checada buscando fatores conservados de polaridade de membrana basolateral como Scribbel, Disc large e Lethal giant larvae (Assémat et al., 2008). Nenhum deles foi encontrado na análise proteômica apesar de alguns deles serem bastante expressos (MdLgl) (Tabela 6).

Tabela 6. Dados de expressão de fatores de polaridade de membrana basolateral e canal de potássio Slowpoke.

Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
		A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
<i>MdScrib</i>	XP_011290204.1	1,88	1,09	3,73	7,04	3,81	6,26	9,4	3,72
<i>MdDlg</i>	XP_011296013.1	1,2	0,85	1,76	3,39	1,21	1,93	4,04	3,8
<i>MdLgl</i>	XP_005180338.1	7,02	5,95	17,88	29,1	14,22	26,08	60,71	5,72
<i>MdSlowpoke</i>	XP_011291912.1	0	0	0	0,19	0,07	0	0	0,03

Detalhes como descrito na Tabela 2.

A Tabela 7 mostra o conjunto de proteínas encontradas na análise proteômica das membranas microvilares. Um total de quinze proteínas foram encontradas, o que sugere que sua localização é na região apical das células do intestino médio. Sete proteínas foram encontradas em uma única região: MdNAT1 em A1, MdH⁺ V-ATPase a1 e MdCA1 em M1+M2, MdRh em P1+P2 e MdKCC, MdPAT e MdNAT3 em P3+P4. Quatro proteínas foram encontradas em duas regiões: MdNHE3 em A1 e A2+A3, MdNDAE1 em M1+M2 e P3+P4, MdNHA1 em A2+A3 e P1+P2 e a subunidade β1 da MdNa⁺/K⁺-ATPase em A1 e M1+M2. Por último, duas subunidades da MdH⁺ V-ATPase, a2 e a3, a subunidade α da MdNa⁺/K⁺-ATPase e o simporter de peptídeos com prótons (MdPepT1) foram detectadas ao longo do intestino médio. As seções do intestino médio onde foram encontradas as proteínas

Tabela 7. Proteínas hipoteticamente associadas à manutenção do pH luminal detectadas na análise proteômica de membranas microvilares.

Nome	Número de Acesso	A1	A2 + A3	M1 + M2	P1 + P2	P3 + P4
MdCA1	XP_005179491.2	0	0	0,072	0	0
MdH ⁺ V-ATPase a1	XP_005182551.1	0	0	0,735	0	0
MdH ⁺ V-ATPase a2	XP_005182534.1	0,380	0,028	0,282	0,053	0,049
MdH ⁺ V-ATPase a3	XP_005178444.1	0,324	0,199	0,131	0,054	0,229
MdKCC	XP_005176500.1	0	0	0	0	0,012
MdNHE3	XP_005174925.2	0,049	0,015	0	0	0
MdNDAE1	XP_005191710.3	0	0	0,016	0	0,012
MdRh	XP_005182297.1	0	0	0	0,064	0
MdNHA1	XP_005187728.1	0	0,033	0	0,021	0
MdPAT	XP_005185482.1	0	0	0	0	0,059
MdPepT1	XP_005182725.1	0,321	1,112	0,285	1,050	0,694
MdNAT1	XP_011294562.1	0,041	0	0	0	0
MdNAT3	XP_005188545.1	0	0	0	0	0,020
MdNa ⁺ /K ⁺ -ATPase α	XP_005185745.1	0,539	0,135	0,087	0,028	0,039
MdNa ⁺ /K ⁺ -ATPase β1	XP_005190319.1	0,078	0	0,058	0	0

Dados expressados em porcentagem de fator de abundância espectral normalizado.

apresentam uma boa correspondência com aquelas seções onde os genes que codificam para essas proteínas apresentaram maior expressão (Comparar Tabela 6 com Tabelas 2, 3, 4).

A presença de MdNa^+/K^+ -ATPase na região apical das células foi inesperada porém, existem outros Diptera que também apresentam a bomba localizada na membrana apical do intestino médio (Patrick et al., 2006; Okech et al., 2008; Onken et al., 2009).

4.1.7. Papel das proteínas no tamponamento luminal a partir de experimentos in vivo utilizando diferentes dietas e inibidores

O papel de uma seleção de proteínas nos processos de acidificação da região média e alcalinização da região posterior foi checado com inibidores e dietas diferentes. A alteração da função da proteína na presença do inibidor foi detectada

Figura 5. Larvas de *M. domestica* alimentadas com gel de agarose 1% contendo Vermelho Congo 0,05%. A região média (ácida) apresenta uma cor azul intensa.

pela variação de cor do indicador de pH Vermelho Congo (vermelho 3,0 - 5,2 azul) presente no gel de agarose com o qual foram alimentadas as larvas (Fig. 5).

A Tabela 8 mostra os resultados de inibição da MdH^+ V-ATPase, MdNa^+/K^+ -ATPase e MdKCC com os inibidores bafilomicina A1, oubaina e furosemida, respectivamente, em três condições de osmolaridade diferente. A osmolaridade do meio influenciou na inibição das proteínas sendo a condição hiperosmótica a de maior efeito para MdH^+ V-ATPase e MdKCC e a hiposmótica para MdNa^+/K^+ -ATPase. Assim, o papel relevante das três proteínas na acidificação foi confirmado (Fig. 6).

Tabela 8. Efeito de inibição da acidificação do intestino médio de larvas de *M. domestica* com diferentes inibidores e osmolaridades.

Osmolaridade	Bafilomicina A1	Oubaina					Furosemida				
	400 nM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	1 mM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM	1 mM
Hipotônico (150 mOsm)	1,0	0,8	0,7	2,1	2,1	2,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,9
Isotônico (350 mOsm)	0,9	0,2	0,3	0,6	0,6	1,1	0,1	0,0	0,1	0,5	0,6
Hipertônico (1500 mOsm)	2,0	0,0	0,2	0,3	1,0	0,8	0,2	0,2	0,4	1,0	2,2

Larvas de *M. domestica* foram alimentadas com gel de agarose 1% preparado em três condições de osmolaridade diferentes, contendo Vermelho Congo 0.025% e um inibidor (bafilomicina A1: H⁺ V-ATPase; ouabaina: Na⁺/K⁺-ATPase; furosemida: KCC). Os resultados foram classificados em quatro níveis de inibição em função da variação de cor do indicado Vermelho Congo. A Figura X mostra resultados de inibição padrão e como os números foram associados à variação de cor. Os dados correspondem às médias de 10 larvas.

Para aquelas proteínas cujo efeito de inibição é menor e a alteração do pH luminal não pode ser detectada pelo indicador de pH (Vermelho Congo), o pH foi medido com um microeletrodo. As proteínas candidatas a estar envolvidas no

Figura 6 . Efeito dos inibidores na acidificação da região média do intestino médio de larvas de *M. domestica* alimentadas com gel de agarose 1% contendo Vermelho Congo 0.025% (azul 3.0-5.2 vermelho). Para cada uma das condições de inibição, os controles foram situados na parte de cima. Os resultados mostram a alteração do processo de acidificação na presença de inibidores para as proteínas MdH⁺ V-ATPase (bafilomicina A1), MdNa⁺/K⁺-ATPase (ouabaina) e MdKCC (furosemida).

processo de alcalinização foram o transportador de amônia MdRh, devido a elevada concentração de amônia detectada no lúmen (Terra & Regel, 1995) e os transportadores

de aminoácidos e peptídeos (PAT e PepT) em simporte com prótons que diminuem a concentração luminal de prótons. Os genes que codificam essas proteínas foram altamente expressos na seção P1 e MdPepT1 e MdRh foram detectados nas membranas microvilares por proteômica. O papel do transportador MdRh foi testado utilizando dois inibidores de transportadores de amônio, dimetilamônia (DMA) e imidazol (Wacker et al., 2014), em duas concentrações diferentes. O DMA na concentração de 10 mM diminuiu a alcalinização em P1 porém, na mesma concentração, o imidazol não teve nenhum efeito. Ambos os inibidores aboliram a alcalinização na concentração de 100 mM (Tabela 9). Os resultados concordaram com o maior efeito do DMA frente ao imidazol na inibição dos transportadores de amônio relatado por Wacker et al. (2014).

Tabela 9. Efeito dos inibidores e da proteína hidrolisada no pH luminal na fronteira entre a região média e posterior do intestino médio.

Transportador inibido	Componente	Seções do Intestino Médio		
		M2	P1	Δ pH P1-M2
Nenhum	Nenhum	2,49 $\pm$ 0,13	5,53 $\pm$ 0,26	3,03 $\pm$ 0,45
Transp. NH ₃ (MdRh)	DMA (10mM)	2,72 $\pm$ 0,24	4,55 $\pm$ 0,11	1,83 $\pm$ 0,26
	DMA (100mM)	3,42 $\pm$ 0,09	3,12 $\pm$ 0,07	- 0,30 $\pm$ 0,06
	Imidazol (10 mM)	2,61 $\pm$ 0,29	5,11 $\pm$ 0,42	2,51 $\pm$ 0,23
	Imidazol (100 mM)	3,55 $\pm$ 0,14	3,49 $\pm$ 0,09	- 0,05 $\pm$ 0,12
Simp. H ⁺ :AA (MdPATs)	PHL	2,54 $\pm$ 0,24	7,24 $\pm$ 0,25	4,47 $\pm$ 0,41
Simp. H ⁺ :Peptídeo (MdPepT1)				
Ant. Na ⁺ /H ⁺ (MdNHE8)	Amilorida	1,86 $\pm$ 0,11	n.d.	n.d.
Transp. Proteína-Cu (MdMRP1)	Glibenclamida	3,51 $\pm$ 0,06	n.d.	n.d.

Dados correspondentes às médias e SEM de medidas de pH realizadas em 5 larvas. Transp.: transportador; Simp.: simporter; Ant.: antiporter; DMA: dimetil amônia; PHL: proteína hidrolisada; n.d.: não determinado.

O papel dos simporter de aminoácidos e peptídeos na alcalinização da região posterior do intestino médio foi testado alimentando as larvas com gel de amido contendo 1% de proteína parcialmente hidrolisada. Comparado com o controle,

formado por larvas alimentadas com gel de amido, o aumento de pH em P1 foi 1,47 unidades para mais e se manteve aumentado até P4. Por outro lado, a ovoalbumina não se mostrou capaz de aumentar o pH em P1 porém, similar ao controle formado por larvas alimentadas com dieta, teve um aumento significativo de pH em P2 ($p < 0,05$) que se manteve em P3 (Comparar Tabelas 1 e 9).

O transportador de proteínas ligadas a cobre MdMRP1 foi o único transportador da família de proteínas de resistência a multidrogas (MRP) com elevada expressão em M2 e baixa expressão no resto das seções do intestino médio (Tabela 2). A ausência nas membranas microvilares sugeriu sua localização na membrana basolateral. A Tabela 9 mostra como o inibidor geral de proteínas MRP, glibenclamida, causa um aumento de uma unidade de pH na seção M2, o que sugeriu que MdMRP1 poderia estar envolvido de forma indireta na acidificação.

O trocador MdNHE8 foi o único da família CPA que apresentou o motivo que determina a sensibilidade a amiloride. Embora o gene que codifica o antiporter foi mais expresso na região posterior e não foi encontrado na análise proteômica de membranas microvilares, a administração de amiloride causou uma diminuição do pH na região média ($p < 0,05$) (Tabela 9), que sugeriu um papel regulador da acidificação na região média. Contudo, na região posterior, não foi detectada nenhuma mudança de pH, sugerindo que o transportador poderia ter diferentes funções dependendo da região do intestino médio.

4.2. Análise molecular dos fluxos de água no intestino médio de M. domestica

4.2.1. Variação da concentração de Azul de Evans ao longo do intestino médio.

Espinoza-Fuentes & Terra (1987) alimentaram larvas com gel de amido contendo o corante não absorvível Azul de Evans. A partir de medidas de absorbância do conteúdo luminal concluíram que as regiões anterior e posterior estavam envolvidas na secreção e a média na absorção de fluídos. Porém, ao se tratar de grandes regiões do intestino médio, principalmente a posterior, cabia a possibilidade de existir variações nos fluxos de água entre as seções. Por isso, as regiões anterior e posterior foram divididas em duas e quatro seções, respectivamente. A Fig. 7 mostra como foi feita a divisão do intestino e sugere, pela variação da intensidade do corante Azul de Evans, que a secreção de água

Figura 7. Intestino médio da larva de *M. domestica* alimentada com gel de agarose 1% complementado com Azul de Evans 0,05 %. As seções A1 e A2, P1, P3 e P4 sugerem secreção de água pela diluição do corante, enquanto que as seções M e P2 sugerem absorção de água, resultando na concentração do corante quando comparado com a seção anterior. A seta indica a região de constrição entre as regiões média e posterior.

Tabela 10. Fluxos de água ao longo do intestino médio da larva de *M. domestica*.

Secções	Fluxos de água (µL)	
A1	1,01 ± 0,17	Secretados
A2	1,19 ± 0,13	Secretados
M	0,81 ± 0,17	Absorvidos
P1	0,82 ± 0,25	Secretados
P2	1,10 ± 0,16	Absorvidos
P3	0,46 ± 0,13	Secretados
P4	1,35 ± 0,34	Secretados

Dados correspondentes às médias e SEM de catorze experimentos independentes realizados com dez larvas cada um. A: Anterior; M: Média; P: Posterior.

acontece nas seções A1, A2, P1, P3 e P4, enquanto que a absorção ocorre nas seções M e P2.

Considerando os volumes das diferentes seções do intestino médio e as medidas de absorbância do corante Azul de

Evans no conteúdo luminal foram calculados os volumes secretados e absorvidos

em cada uma das seções. A Tabela 10 mostra o fenômeno de fluxos de água como sugerido pela Fig. 7. O total de água secretada na região anterior e posterior foi $2.20 \pm 0.30 \mu\text{L}$ e $1.53 \pm 0.88 \mu\text{L}$, respectivamente, e a água absorvida na região média foi $0.81 \pm 0.17 \mu\text{L}$.

4.2.2. Possíveis proteínas envolvidas nos fluxos de água.

Além dos poros de água, chamados aquaporinas, envolvidos na difusão passiva de água, são vários os transportadores tanto de nutrientes como de íons que transportam água de forma ativa ou geram uma diferença de potencial osmótico que favorece a difusão passiva de água através das membranas celulares (Zeuthen, 2010). A família de transportadores CCC é exemplo de simporters de íons que cotransportam grandes quantidades de água em cada ciclo de transporte (Hamann et al., 2010) e, portanto, considerados como hipoteticamente envolvidos nos fluxos de água do intestino médio.

Dentre os membros da família CCC encontrados no genoma de *M. domestica* foram considerados aqueles cujo papel no transporte de água já foi mostrado em vertebrados. Dois membros NKCC e um membro KCC foram anotados a partir da análise Interpro, porém o algoritmo não foi capaz de distinguir entre ambas isoformas NKCC. Para isso foi feita uma curagem das sequências de ambas proteínas e comparada com a de vertebrados, chegando à conclusão de que MdNKCC1 e MdNKCC2 apresentaram diferenças similares as de vertebrados como: maior tamanho de MdNKCC1 (100 resíduos) e a presença de dois sítios de ligação de quinase e um de fosfatase em MdNKCC1 e apenas um de quinase em MdNKCC2 (Gamba, 2005). Além disso, MdNKCC2 apresentou mutações em aminoácidos envolvidos no transporte de íons e na afinidade ao inibidor bumetanida (Somasekharan et al., 2012; Hartmann & Nothwang, 2015). Essas mutações foram

compartilhadas com AeCCC3 e especialmente AeCCC2 de *A. aegypti* (Piermarini et al., 2017) e sugerem que MdNKCC2 apresentaria propriedades diferentes de MdNKCC1. Diferente de vertebrados, em que existem 4 genes que codificam simporters KCC, o gene MdKCC é único e codifica quatro isoformas com identidade >94%. A exceção de MdKCC3 que carece do sítio de ligação de quinase e fosfatase, as isoformas MdKCC poderiam ser reguladas por fosforilação.

As aquaporinas de insetos podem ser classificadas em três famílias em função das moléculas que transportam: seletivas (estritas) para água (DRIP), água e ureia (PRIP) e água, ureia e glicerol (EGLP), a última é específica de holometábolos (Finn et al., 2015). A análise filogenética das aquaporinas expressas no intestino médio de *M. domestica* mostrou que pertencem a alguma dessas três famílias. Na análise bioinformática foram achados os motivos conservados das sequências e confirmada a predição da análise filogenética. A exceção de MdEGLP1 e 3, todas as MdAQP apresentaram o motivo NPA (Asn-Pro-Ala), que evita o salto de prótons entre as moléculas de água transportadas (Ilán et al., 2004). Por outro lado, todas as MdEGLPs tiveram mutado o resíduo H180 (numeração de AQP1 de *H. sapiens*) que faz parte do motivo ar/R envolvido na seletividade para água das AQPs estritas. A mutação desse resíduo é suficiente para converter uma AQP estrita em uma entomogliceroporina (EGLP) (Finn et al., 2015).

4.2.3. *Dados de expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água*

A partir dos dados de absorção e secreção de água mostrados na Tabela 10 e os dados de expressão dos genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água (Tabela 11) é possível estabelecer uma relação inicial entre quais as proteínas podem estar envolvidas na secreção e quais na absorção

de água. O simporter MdNKCC1 foi pouco expresso na seção A1 enquanto que MdNKCC2 apresentou uma elevada expressão em M1 e em menor medida em P2. Já MdKCC foi expresso tanto na região média como na região posterior, sendo esta última a de maior expressão. Esses dados parecem indicar que MdNKCC1 e MdNKCC2 estariam envolvidos na secreção e absorção de água, respectivamente,

Tabela 11. Dados de expressão de genes que codificam proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água.

				Expressão (TPM)							
Actividade	Nome	Número de acesso		A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
Simporters	Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻	MdNKCC1	XP_011296631.1	2,25	0,05	0,06	0,02	0,03	0,03	0,08	0,93
	Na ⁺ :K ⁺ :2Cl ⁻	MdNKCC2	XP_005184852.1	0,51	12,57	289,55	7,14	0,99	38,92	9,69	38,15
	K ⁺ :Cl ⁻	MdKCC1	XP_005176500.1								
		MdKCC2	XP_005176502.1								
		MdKCC3	XP_005176503.1	0,12	0,03	3,84	6,3	0,51	7,28	14,29	1,88
		MdKCC4	XP_005176505.1								
Canais	AQP Água	MdDRIP1	XP_005179649.2	47,35	12,86	47,89	69,86	167,35	359,18	322,3	47,47
		MdDRIP2	XP_005186069.1	0	0	0,51	0	0	0	0	0
	Água Ureia	MdPRIP1a	XP_005186076.1								
		MdPRIP1b	XP_005186075.1	0,07	0,01	0,01	0,04	4,08	4,54	1,56	9,98
	EGLP Água Ureia Glicerol	MdEGLP1a	XP_011292304.1	112,4	151,02	69,94	27,86	25,12	39,02	73,65	221,15
		MdEGLP1b	XP_005183000.1								
		MdEGLP2	XP_005184624.1	20,66	2,25	3,71	0,18	0,06	0,95	2,06	21,14
	MdEGLP3	XP_005183004.2	14,61	9,78	0,2	0,27	0,39	0,1	3,13	1,09	

O gene MdNKCC codifica quatro isoformas MdNKCC1-4, o que não permite relacionar a expressão do gene com as isoformas de maneira individual. De igual forma acontece com MdPRIP e MdEGLP1. Detalhes como descrito na Tabela 2.

enquanto que MdKCC poderia estar envolvido em ambos processos.

As aquaporinas expressas no intestino médio apresentaram um perfil diferente dependendo da família. MdDRIP1 foi a aquaporina com maior expressão, sendo expressa ao longo do intestino médio, principalmente na região posterior, porém a isoforma MdDRIP2 apresentou uma expressão muito baixa, exclusivamente em M1. MdPRIP1 foi pouco expressa especificamente na região posterior. De forma geral, as MdEGLP foram mais expressas na região anterior, sendo MdEGLP1 a mais expressa, com expressão elevada também em P3.

4.2.4. Detecção das proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água nas membranas microvilares de células do intestino médio

Os simporters NKCC e KCC respondem a mudanças de tonicidade celular, sendo os NKCC ativados por encolhimento celular e os KCC por inchaço celular o que se traduz na entrada ou saída de água da célula por parte dos NKCC ou KCC, respectivamente. Por tanto, a identificação das proteínas na membrana apical permite elaborar um modelo molecular de transporte de água das células do intestino médio. Os simporters, MdNKCC2 e MdKCC foram detectados na análise proteômica de membranas microvilares nas regiões A2+A3-M1+M2 e P3+P4, respectivamente. Por outro lado, só a família de aquaporinas seletivas para água foram identificadas na membrana apical das células das regiões A1 e P1+P2 para MdDRIP1 e P1+P2 para MdDRIP2 (Tabela 12). A detecção de MdDRIP2 na análise proteômica sugeriu que a expressão do gene não foi detectada no RNAseq do intestino médio.

Tabela 12. Proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água detectadas na análise proteômica de membranas microvilares do intestino médio de *M. domestica*.

Nome	Número de Acesso	A1	A2 + A3	M1 + M2	P1 + P2	P3 + P4
MdNKCC2	XP_005184852.1	0	0,022	0,017	0	0
MdKCC	XP_005176500.1	0	0	0	0	0,013
	XP_005176502.1					
	XP_005176503.1					
	XP_005176505.1					
MdDRIP1	XP_005179649.2	0,097	0	0	0,059	0
MdDRIP2	XP_005186069.1	0	0	0	0,117	0

Dados expressos em porcentagem de fator de abundância espectral normalizado. No caso de MdKCC não é possível relacionar os dados da proteômica com o peptídeo identificado por proteômica, devido à elevada identidade das isoformas (>94%).

4.2.5. Alteração dos fluxos de água com furosemida

O inibidor geral de NKCCs e KCCs, furosemida, é frequentemente utilizado para caracterizar a contribuição dos simporters nos processos fisiológicos (Hartmann & Nothwang, 2015). Ele age como inibidor competitivo do sítio de ligação do cloreto, último íon a se ligar ao simporter, o que faz o inibidor ineficaz na ausência de sais.

Além disso, ambos os simporters são afetados pela osmolaridade do meio extracelular, sendo os NKCC ativados por hiperosmolaridade e inibidos por hiposmolaridade e o contrario para KCC (Kahle et al., 2010). Por esse motivo, os experimentos de inibição com furosemida foram realizados em duas condições de osmolaridade diferentes. Na presença de sais ocorreu uma menor secreção de água na região anterior, porém sem afetar as regiões média e posterior. Quando adicionada a furosemida no meio, a secreção da região anterior, na condição hiposmótica, aumentou até níveis de secreção similares aos medidos na ausência de sais. Já as regiões média e posterior parecem apresentar fluxos de água

Tabela 13. Fluxos de água na presença de sais com e sem furosemida.

Adição	Regiões do Intestino Médio		
	Anterior	Media	Posterior
Nenhuma (Control) ^a	2,20 ± 0,30 (S)	0,81 ± 0,17 (A)	1,53 ± 0,88 (S)
150 mOsm sal	0,79 ± 0,17 (S)	0,74 ± 0,20 (A)	1,71 ± 0,46 (S)
150 mOsm sal + furosemida	2,00 ± 0,42 (S)	0,30 ± 0,41 (S)	1,63 ± 1,27 (A)
1500 mOsm sal	0,96 ± 0,24 (S)	0,66 ± 0,21 (A)	1,57 ± 0,44 (S)
1500 mOsm sal + furosemida	1,50 ± 0,32 (S)	0,75 ± 0,45 (S)	0,59 ± 0,77 (A)

^a Dados calculados a partir dos dados da Tabela 1. Dados apresentados como medias e SEM de sete experimentos independentes realizados com dez larvas cada um. A: Absorvido; S: Secretado.

contrários aos do controle, porém se considerarmos o desvio dos dados, parece que os fluxos de água teriam sido inibidos por completo (Tabela 13).

4.2.6. Fluxos de água associados à reciclagem da enzima tripsina na região posterior do intestino médio

Uma vez que a inibição com furosemida de MdNKCCs e MdKCCs resultou na alteração dos fluxos de água do intestino médio, sugerindo que eles seriam os responsáveis pela geração dos fluxos de água, foi testado o efeito de inibição dos fluxos de água na reciclagem de enzimas como sugerido por Espinoza-Fuentes & Terra (1987). Já que os simporters são inversamente afetados pela osmolaridade do

meio extracelular (Kahle et al., 2010) e na condição hiposmótica a furosemida resultou em um aumento da secreção na região anterior não detectado na condição hiperosmótica, a furosemida foi utilizada nas duas condições de osmolaridade com o intuito de diferenciar a contribuição de cada tipo de simporters na reciclagem de tripsina.

A Fig. 8 mostra o efeito da furosemida no perfil de atividade de tripsina ao longo do intestino médio de *M. domestica*. Nas duas condições de osmolaridade,

Figura 8. Porcentagem da atividade de tripsina total (intestino médio + posterior) de cada uma das seções do intestino médio, na ausência (Controle) ou presença de furosemida (A,B) ou Bumetanida (C,D). Os experimentos foram realizados em duas condições de osmolaridade diferentes, hiposmótica (A,C) e hiperosmótica (B,D). * Dados significativamente diferentes do controle para cada seção. Os dados correspondem a cinco experimentos independentes realizados com dez larvas cada um.

a atividade de tripsina foi maior na região posterior do que na anterior e média de acordo com estudos prévios realizados no nosso laboratório (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Bolognesi et al., 2001). Na região posterior, o pico de atividade foi na seção P2, diminuindo progressivamente até praticamente se extinguir no intestino

Figura 9. Porcentagem da atividade de tripsina total (intestino médio + posterior) do intestino posterior, na ausência e presença de furosemida (A) e bumetanida (B) em condições hiposmóticas e hiperosmóticas. * Dados significativamente diferentes do controle para cada seção. Os dados correspondem a cinco experimentos independentes realizados com dez larvas cada um.

posterior. O perfil de tripsina foi mais afetado na condição hiperosmótica do que na hiposmótica. Embora o número de seções afetadas foi o mesmo nas duas condições de osmolaridade, as seções afetadas foram diferentes. O aumento da atividade de tripsina na seção P4 e no intestino posterior (Figura 9) na presença de furosemida sugere que os fluxos de água gerados pelos simporters MdKCC e MdNKCCs estariam envolvidos na reciclagem de enzimas.

Os simporters NKCC e KCC além de serem inibidos por furosemida apresentam inibição por bumetanida, sendo mais específica de simporters NKCC (Gamba, 2005). Uma vez que a concentração utilizada de furosemida (100 μ M) seria capaz de inibir ambos simporters, a bumetanida foi utilizada em uma concentração (25 μ M) inferior ao IC50 dos simporters KCC de vertebrados (Gamba, 2005), com o intuito de distinguir a contribuição de cada tipo de simporter ao fenômeno dos fluxos de água. Como esperado da inibição de um único tipo de simporter (NKCC), a bumetanida mostrou um efeito menor que o da furosemida e, como essa, o efeito foi maior na condição hiperosmótica. Na condição hiposmótica apenas a primeira

metade do intestino médio foi afetada. Por último, a atividade de tripsina no intestino posterior na presença de bumetanida foi menor que no caso da furosemida (Fig. 9).

4.2.7. Inativação de tripsina na região média

A região média é caracterizada por uma atividade de tripsina muito baixa comparada com a atividade da região anterior e ainda mais com a região posterior, o que sugere algum mecanismo de inativação da enzima nesta região. Espinoza-Fuentes & Terra (1987) mostraram que não existe perda de atividade de tripsina na região ácida ao ensaiar a enzima no pH ácido (3,5). Porém, considerando esses dados, nos medimos a atividade de tripsina do homogeneizado proveniente da região anterior em três condições: pH 7,1; 3,1 e 3,1 com um quantidade proporcional

Figura 10. Atividade de tripsina por animal do homogeneizado da região anterior em três condições diferentes, pH 7,1; 3,1 e 3,1 com uma proporção (1:1, v:v) de homogeneizado da região média. Na presença da região média a atividade de tripsina da região anterior cai ao redor de 42%. Os dados correspondem a cinco experimentos realizados com 10 larvas cada um.

de homogeneizado da região média (v:v). Na Fig. 10 podemos observar que na presença do homogeneizado da região média (pH 3.1) a atividade de tripsina do homogeneizado da região anterior diminui por volta de 42%, o que sugere que

algum componente presente na região média é responsável pela perda de atividade de tripsina.

4.3. Transporte de nutrientes

O transporte de macronutrientes nas larvas de *M. domestica* ocorre ao longo do intestino médio, principalmente na região posterior onde se concentram a maioria dos transportadores com expressões mais elevadas. Porém, existem diferenças entre o transporte de açúcares, aminoácidos e lipídeos.

4.3.1. Transporte de açúcares

Nove transportadores de açúcares (SP) foram identificados na análise RNAseq do intestino médio de *M. domestica*. O conjunto de SP formou dois grupos marcados de expressão, MdSP1, MdSP2 e MdSP3 foram mais expressos na região média sendo MdSP1 o gene mais expresso de todos os SP. O resto de MdSP (4 – 9) foram mais expressos na região posterior, principalmente em P3, a exceção de MdSP7, que apresentou uma expressão elevada tanto na região média como na região posterior (Pimentel et al., 2018; Tabela Suplementar 3).

Todos os MdSP, menos MdSP4 e MdSP7, foram encontrados na análise proteômica de membranas microvilares (Tabela Suplementar 3), o que sugeriu que MdSP4 e MdSP7 poderiam apresentar localização intracelular ou basolateral (Pimentel et al., 2018).

O transportador de sacarose, MdSCRT, foi o único com um perfil de expressão baixo ao longo do intestino médio, com maior expressão na região anterior, porém com elevada expressão na carcaça, o que sugere que a sacarose poderia ser absorvida no intestino anterior (parte da carcaça) antes de chegar no intestino médio (Tabela 14).

4.3.2. Transporte de aminoácidos

O transporte de aminoácidos no intestino médio de *M. domestica* é realizado por três grandes famílias de transportadores os MdPATs, MdNATs e MdCATs.

No geral os simporters com prótons (MdPATs) apresentaram uma expressão específica para uma das seções do intestino médio (Tabela 3, 4 e 14). MdPAT6 foi o único com um perfil de expressão mais ou menos homogêneo ao longo do intestino médio, enquanto que MdPAT4 e MdPAT5 foram os mais expressos. Na análise proteômica das membranas microvilares, os MdPATs só foram achados no final da região posterior (P3+P4), sendo impossível distinguir a isoforma encontrada.

A maioria dos simporters com sódio (MdNATs) foram expressos na última seção da região posterior (P3), menos MdNAT1 que apresentou uma expressão

Tabela 14. Dados de expressão de genes que codificam transportadores de nutrientes.

Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							
		A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	C
<i>MdSCRT</i>	XP_005188570.1	1,2	2,89	0,15	0,15	0,63	0,13	0,98	22,55
<i>MdPAT1</i>	XP_005176193.1	23,63	1,49	6,06	3,16	1,63	1,46	0,38	5,74
<i>MdPAT2</i>	XP_005176196.1	0,1	4,52	4,45	0	0	0	1,91	2,62
<i>MdPAT3</i>	XP_011291844.1	17,51	0,57	13,03	32,15	1,25	1	2,84	4,68
<i>MdCAT1</i>	XP_005179240.1	23,06	57,85	54,63	18,28	65,28	142,32	387,03	10,73
<i>MdCAT2</i>	XP_011296395.1	2,28	3,06	6,19	0,9	2,78	5,34	10,76	3,07
<i>MdFATP1</i>	XP_005181313.1	13,99	30,58	46,69	25,82	51,93	85,47	58,53	24,34
<i>MdFATP2</i>	XP_005192170.1	4,69	7,79	15,07	14,9	13,1	35,53	22,93	5,07
<i>MdNPC1</i>	XP_011290675.1	13,61	37,41	11,55	0,7	41,32	190,23	126,78	1,01
<i>MdSPC2</i>	XP_005192102.1	186,03	484,22	436,46	499,81	667,1	2169,74	2626,22	129,76
<i>MdCtr1</i>	XP_005176686.1	8,4	8,46	19,03	69,95	35,44	30,62	34,69	12,17
<i>MdATP7A</i>	XP_005188899.1	3,16	2,25	14,21	36,69	4,05	6,05	9,96	6,13

Detalhes como descrito na Tabela 2.

baixa e específica em A1. Dentre os MdNATs, as isoformas 1 e 3 foram encontradas nas membranas microvilares de células das seções A1 e P3+P4, respectivamente.

Os uniporters de aminoácidos (MdCATs) foram expressos ao longo do intestino médio, com maior expressão na região posterior, principalmente P3 (Tabela

14). A expressão na seção mais ácida (M2) foi significativamente menor tanto para MdCAT1 como MdCAT2. O mais expresso, MdCAT1, foi encontrado nas membranas microvilares nas regiões A2+A3 e P3+P4 (Tabela 15).

4.3.3. Transporte de lipídeos

A principal diferença na expressão dos transportadores de ácidos graxos (MdFATP) comparado com a de açúcares ou aminoácidos é que a maior expressão na região posterior foi na seção P2 e não P3, embora ambos apresentaram uma expressão ao longo do intestino médio (Tabela 14). A isoforma mais expressa, MdFATP1, foi encontrada nas membranas microvilares de todas as seções do intestino médio principalmente P3+P4 (Tabela 15).

Tabela 15. Proteínas envolvidas na absorção de aminoácidos, ácidos graxos e esteróis encontradas na análise proteômica de membranas microvilares.

Nome	Número de Acesso	A1	A2 + A3	M1 + M2	P1 + P2	P3 + P4
MdCAT1	XP_005179240.1	0	0,034	0	0	0,067
MdFATP1	XP_005181313.1	0,032	0,017	0,015	0,043	0,098
MdNPC1	XP_011290675.1	0,023	0,018	0	0,026	0,063
MdSPC2	XP_005192102.1	0	0,035	0,017	0,017	0,035

Dados expressos em porcentagem de fator de abundância espectral normalizado.

Dois transportadores de esteróis foram expressos ao longo do intestino médio com maior expressão em P2 e P3. MdSPC2 foi o mais expresso enquanto que MdNPC1 apresentou expressão muito baixa em M2 (Tabela 14). Ambos transportadores foram encontrados nas membranas microvilares de todas as seções do intestino médio, exceto M1+M2 e A1 para MdNPC1 e MdSPC2, respectivamente (Tabela 15). A ausência dos transportadores de esteróis nestas regiões coincidiu com aquelas seções de menor expressão.

4.3.4. Transporte de cobre

Os genes de duas proteínas envolvidas na absorção de cobre, MdCtr1 e MdATP7A, foram expressos ao longo do intestino médio principalmente na região média, seção M2 (Tabela 14). Porém, nenhuma delas foi encontrada na análise proteômica das membranas microvilares.

5. Discussão

5.1. Acidificação da região média

Na região media do intestino médio de *M. domestica* foram encontrados dois tipos de células principais e diferenciadas, as células oxínticas (células de cobre), similares às células parietais do estômago de vertebrados responsáveis pela produção do ácido e as células intersticiais dispostas entre as células oxínticas em uma sequência de células oxíntica - intersticial (Terra et al., 1988; Dubreuil, 2004).

A acidificação de compartimentos extracelulares, como é o caso do lúmen da região média, requer o fornecimento constante de prótons levado a cabo pelas anidrase carbônicas. Segundo os dados de expressão, MdCA2 e MdCA3, seriam as responsáveis por essa função. Além disso, MdCA2 poderia apresentar o papel principal na acidificação já que as proteínas ortólogas em outras espécies da Ordem Diptera foram caracterizadas como as de maior atividade (Tabela Suplementar 1). Os prótons gerados devem ser rapidamente bombeados para fora da célula para evitar a acidificação intracelular que levaria à morte celular das células oxínticas. Essa função é realizada pelas H^+ V-ATPases. A presença de bombas na forma de partículas eletrodensas nas membranas microvilares das células oxínticas já tinha sido mostrada por Terra et al. (1988). Visto que as subunidades *a* tem um papel determinante na atividade do complexo H^+ V-ATPase, a isoforma MdH⁺ V-ATPase

a1 teria um papel específico na acidificação da região média, devido a sua maior expressão e presença nas membranas microvilares dessa região. A proteína ortóloga em *D. melanogaster* de MdH^+ V-ATPase a2 também foi envolvida na acidificação da região média, porém sua elevada expressão na carcaça, assim como sua presença nas membranas microvilares ao longo do intestino médio, sugere que em *M. domestica* ela poderia apresentar funções complementares à acidificação.

Assim como os prótons, o bicarbonato precisa ser excretado da célula para evitar o aumento do pH intracelular. O antiporter MdAE1 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), geralmente localizado na membrana basolateral das células, transportaria o bicarbonato para hemolinfa em troca por cloreto, como foi descrito para seu ortólogo em *A. gambiae* (Piermarini et al., 2010).

A região média apresentou uma elevada concentração de cloreto, sugerindo que o ácido clorídrico seria o responsável pelo pH ácido (Terra & Regel, 1995). A entrada basolateral de cloreto na célula dependeria de canais de cloreto ativados por glutamato (MdGluCl), com elevada expressão na região média e ausentes nas membranas microvilares, como mostrado para seu homólogo em *A. gambiae* (Meyers et al., 2015). A diminuição da acidificação na presença de furosemida sugere que a saída apical do cloreto resultaria da atividade regulada por fosforilação do simporter MdKCC, de acordo com os resultados mostrados para o ortólogo em *D. melanogaster* (Overend et al., 2016). Esta hipótese é análoga a fisiologia do estômago de humanos, onde o simporter KCC4 transporta o cloreto que acompanha os prótons bombeados pela H^+/K^+ V-ATPase (Fujii et al., 2011), ambas proteínas situadas na membrana apical das células parietais. Embora em *M. domestica* não foi achado o MdKCC na membrana apical da região média, os resultados da experimentação in vivo, assim como a presença do simporter na região posterior

sugerem que sua ausência seja o resultado das dificuldades técnicas da purificação de membranas microvilares e da proteômica.

Em humanos, o potássio transportado pelo simporter KCC4 é recuperado pela H^+/K^+ V-ATPase energizando, assim, o transporte ativo secundário do simporter. Contudo, em *M. domestica* não existe uma H^+/K^+ V-ATPase, mas sim uma H^+ V-ATPase, implicando na recuperação do potássio por outro mecanismo. Overend et al. (2016) mostrou a existência de um canal de potássio (Slowpoke) altamente expresso na região média de larvas de *D. melanogaster*, cujo nocaute diminui significativamente a acidificação. No entanto, o ortólogo em *M. domestica* apresentou uma expressão muito baixa (Tabela 6), sem um perfil de expressão específico da região média. Por outro lado, o canal de potássio MdOrk1 teve uma expressão similar a DmSlowpoke, porém suas sequências não puderam ser comparadas, devido à ausência do número de acesso do canal de potássio de *D. melanogaster*. Por tanto, baseado no perfil de expressão de MdOrk1, sua similaridade com o de DmSlowpoke e a necessidade de recuperação do potássio secretado por MdKCC, a hipótese proposta foi que MdOrk1 e DmSlowpoke são o mesmo canal e que estaria envolvido na acidificação, ao recuperar o potássio transportado pelo MdKCC. Neste modelo de trabalho, o potássio transportado pelo MdKCC aumentaria sua concentração extracelular em relação a intracelular, gerando uma condição de hiperpolaridade que favoreceria a entrada de potássio pelo canal MdOrk1 (Goldstein et al., 1996). De novo, a hipótese é análoga a fisiologia do estômago de humanos, onde o canal de potássio (Kir 4.1) situado na membrana apical das células parietais recupera o excesso de potássio que não pode ser recuperado pela H^+/K^+ V-ATPase (Fujita et al., 2002). Além disso, nosso modelo de trabalho concorda com os resultados de nocaute realizados em larvas de

D. melanogaster para os genes da subunidade α da H^+ V-ATPase (Vha100-2 e Vha100-4), simporter KCC (*kazachoc*), antiporter Cl^-/HCO_3^- (CG8177), canal de Cl^- (CG11340), canal de K^+ (*Slowpoke*) e a anidrase carbônica (CAH1) de Overend et al. (2016).

Além da furosemida, a oubainina (Na^+/K^+ -ATPase), a amilorida (NHE8) e a glibenclamida (MRP) alteraram o pH luminal da região média.

A presença da Na^+/K^+ -ATPase nas membranas microvilares da região média foi inesperada. Embora, *M. domestica* não representaria uma exceção entre os Diptera (Okech et al., 2008), perante a falta de mais provas de sua possível localização apical (imunolocalização) foi adotada uma decisão conservadora, situando a bomba na membrana basolateral. Assim, os resultados de inibição da bomba iônica com oubaina seriam o reflexo de uma alteração dos mecanismos de transporte secundário da célula oxíntica.

MdNHE8 foi o único antiporter Na^+/H^+ com um motivo de sensibilidade à amilorida na sequência primária da proteína. A diminuição do pH na região média na presença de amilorida sugere que MdNHE8 estaria situado na membrana apical, transportando prótons para dentro da célula a favor do gradiente em troca por sódio intracelular. Por tanto, seu papel seria o de regular a acidificação da região média como a proteína ortóloga em *A. aegypti* (AeNHE8) regula a acidificação luminal nos túbulos de Malpighi (Kang' ethe et al., 2007). O fato de não ter sido encontrado nas membranas microvilares foi atribuído às dificuldades técnicas da purificação de membranas microvilares e da proteômica.

Por último, o inibidor geral de proteínas de resistência a multidroga (MRP), glibenclamida, causou um aumento do pH na região média. Dentre as MRP

expressas no intestino médio, MdMRP1 apresentou a maior expressão específica da seção mais ácida (M2) e não foi detectada nas membranas microvilares, sugerindo sua localização basolateral. Estudos realizados em *D. melanogaster* sugeriram que a proteína ortóloga de MdMRP1 estaria envolvida na homeostase do cobre transportando metaloconjugados (Yepiskoposyan et al., 2006). Já que a captação de cobre é beneficiada por um ambiente extracelular ácido (Zimnicka et al., 2011) e o aumento de cobre intracelular é tóxico, o aumento do pH na presença de glibenclamida pode estar refletindo uma regulação indireta da acidificação através de proteínas envolvidas na homeostase do cobre. Isso concorda com a diminuição da acidificação causado pela administração de uma dieta rica em cobre em larvas de *D. melanogaster* (McNulty et al., 2001).

A região média dos Cyclorrhapha e o estômago de vertebrados são considerados um possível caso de convergência evolutiva. Aliás, as células parietais e oxínticas, responsáveis pela secreção do ácido, são um claro exemplo de analogia baseado na função e nas características morfológicas de ambas células. Em vertebrados, as células parietais estão situadas em invaginações chamadas de glândulas gástricas junto as células mucosas do colo. Por cima delas se encontram mais células mucosas superficiais. O muco cobre o epitélio gástrico e o protege da digestão proteolítica por pepsinas, assim como do ácido ao ser neutralizado com bicarbonato (Allen & Flemström, 2005). A saída do ácido através da camada de muco é possível devido a pressão hidrostática desenvolvida em uma área pequena constituída pela abertura das glândulas gástricas, expelindo assim os prótons e os íons de cloreto para o lúmen do estômago (Boron & Boulpaep, 2017).

A partir dos dados de expressão, da proteômica de membranas microvilares e da experimentação in vivo, foi elaborado um modelo de trabalho, fisiológico-

molecular da acidificação e tamponamento do muco protetor, no qual as proteínas foram distribuídas entre os dois principais tipos celulares, células oxínticas e intersticiais (Fig. 11).

As células oxínticas apresentam compridas invaginações apicais com estreitas aberturas ao lúmen análogas as aberturas das glândulas gástricas. Na superfície citoplasmática das invaginações se situariam as bombas de prótons (Terra et al., 1988) que, junto com MdKCC, seriam responsáveis pela produção do ácido clorídrico. Junto com o K^+Cl^- os simporter KCC cotransportariam água (Zeuthen, 2010), gerando a pressão hidrostática, no interior da invaginação, necessária para propulsar o ácido através da camada de muco.

5.2. Proteção do epitélio frente ao ácido

A presença de muco tem sido descrita na maioria de metazoários, porém a secreção de mucinas formadoras de muco foram descritas pela primeira vez no intestino médio de *D. melanogaster* por Syed et al. (2008). Posteriormente, Buchon et al. (2013) mostraram a presença luminal de muco ao longo do intestino médio de *D. melanogaster*. Recentemente, Dias et al. (2018) mostraram que a expressão de mucinas é superior na região média, principalmente de MdMfm1, sugerindo que este tipo de mucina teria um papel relevante na região ácida, provavelmente atribuído a proteção frente ao ácido. Além disso, sugeriram que a camada de muco seria neutralizada por bicarbonato, assim como acontece em vertebrados. Já que em *M. domestica* não foram descritas células mucosas como as de vertebrados e as células intersticiais se dispõem entre as células oxínticas cobrindo a maior parte da superfície apical, exceto uma pequena abertura (Terra et al., 1988; Dubreuil, 2004), a hipótese proposta é que as mucinas seriam secretadas pelas células intersticiais, as quais seriam responsáveis pela neutralização com bicarbonato. Os dados de

expressão e da proteômica de membranas microvilares apoiam esta hipótese ao serem encontradas uma anidrase carbônica com uma âncora de GPI (MdCA1) e o antiporter $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-/\text{H}^+:\text{Cl}^-$ exchanger (MdNDAE1) na

Figura 11. Modelo de acidificação pelas células oxínticas (CO) e tamponamento do muco protetor pelas células intersticiais (CI). Sob a ação da $\text{MdH}^+ \text{V-ATPase a1}$ (e a2), os prótons são bombeados nos canalículos das células oxínticas junto com cloreto secretado pelo MdKCC . Os prótons provêm da atividade anidrase carbônica de MdCA2 e MdCA3 , enquanto que o potássio e o cloreto entram na célula via $\text{MdNa}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ e MdGluCl . MdAE1 elimina o HCO_3^- originado pelas anidrase carbônicas em troca por cloreto evitando a alcalinização intracelular e contribuindo à acidificação. O potássio secretado pelo MdKCC é recuperado pelo canal de potássio MdOrK1 . O antiporter MdNHE8 , sensível à amilorida, regula a acidificação ao transportar parte dos prótons a favor do gradiente em troca por sódio. Junto com potássio e cloreto o MdKCC secreta água no interior do canalículo gerando uma pressão hidrostática que propulsa o ácido através da camada de muco até o lúmen. Nas células intersticiais a anidrase carbônica MdCA1 ligada à membrana por uma âncora de GPI gera bicarbonato que é cotransportado com sódio pelo MdNDAE1 , neutralizando assim a camada de muco protetor. O ácido transportado por MdNDAE1 para dentro da célula é eliminado pelo MdNHE3 , insensível à amilorida, situado na membrana basolateral acoplada a atividade da $\text{MdNa}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$.

seção M1. Ambas proteínas apresentam resíduos conservados nas regiões N e C-terminais, respectivamente, que sugerem a interação proteína-proteína, aumentando assim a eficácia do transporte de bicarbonato (Alvarez et al., 2003). MdCA1 e

MdNDAE1 estariam situados na membrana apical das células intersticiais e seriam os responsáveis pela geração e transporte de bicarbonato, respectivamente, que neutralizaria o muco. MdNDAE1 secreta o bicarbonato junto com sódio em troca por ácido, ácido que precisaria ser eliminado para evitar a diminuição do pH intracelular. O antiporter Na^+/H^+ , MdNHE3, insensível à amiloride, seria o responsável pela saída de prótons basolateral acoplado ao gradiente de Na^+ estabelecido pela Na^+/K^+ -ATPase, assim como seu ortólogo AeNHE3 de *A. aegypti* (Pullikuth et al., 2006).

5.3. Alcalinização na fronteira entre a região média e a região posterior

Terra & Regel (1995) sugeriram que a alcalinização da região posterior do intestino médio seria mediada por amônia, devido à sua elevada concentração no conteúdo luminal. A partir dos dados reunidos do transcriptoma e da proteômica de membranas microvilares, foi sugerido como responsável pela alcalinização na fronteira entre a região média e a posterior o transportador de amônia MdRh e posteriormente confirmado pela diminuição do pH nessa região na presença dos inibidores de transportadores de amônia (DMA e imidazol). A amônia provavelmente provem da hemolinfa, caracterizada por apresentar uma elevada concentração nos Diptera (Terra et al., 1973; Borash et al., 1998; Marshall & Wood, 1990), entrando na célula por difusão simples. Em *M. domestica* a amônia constituiria não só um tampão como uma forma de excreção do nitrogênio, produto do metabolismo de proteínas do qual se caracteriza a região posterior do intestino médio.

Os simporters de aminoácidos com prótons, MdPAT4 e MdPAT5, apresentaram uma elevada expressão em P1, porém não foram encontrados nas membranas microvilares nessa seção. Por outra parte, a administração de proteína hidrolisada provocou um aumento significativo do pH na seção P1 sugerindo a contribuição desses transportadores à alcalinização da região posterior. Os

transportadores PAT podem ser encontrados em vesículas intracelulares e serem transferidos para membrana apical em resposta a um estímulo (Thwaites & Anderson, 2011). O fato de não terem aparecido na análise proteômica das membranas microvilares pode ser devido ao fato das larvas de *M. domestica* utilizadas para a análise transcriptômica serem alimentadas com gel de amido carente de proteínas. Outra possibilidade é que sua presença na membranas microvilares tenha sido mascarada pela elevada expressão de outras proteínas como MdPepT1, também envolvidas na alcalinização da região posterior.

Na maioria dos PATs, a capacidade de transporte é maior em valores de pH ao redor de 5 como é o caso de PAT1, 2 de humano e CG1139 de *D. melanogaster*, ortóloga de MdPAT5 (Boll et al., 2003; Goberdhan et al., 2005; Tabela Suplementar 1). Porém, o pH do intestino humano, onde PAT1 é expresso, apresenta um valor próximo a 7, o que determinaria uma menor eficiência de transporte do simporter (Boll et al., 2003; Chen et al., 2003). Para contornar essa situação o antiporter NHE3 repõe os prótons cotransportados por PAT1, mantendo assim um microambiente ácido que potencie a atividade do simporter (Daniel et al., 1985). Na região posterior do intestino médio de *M. domestica* encontramos uma situação aparentemente similar, com um pH 7,5 e a presença nas membranas microvilares das seções P1+P2 do antiporter MdNHA1, que agiria como o NHE3 humano, mantendo o microambiente ácido que potencie a atividade de MdPATs e MdPepT1 (Anderson et al., 2004).

O gene MdPepT1 apresentou elevada expressão na região posterior do intestino médio e foi encontrado nas membranas microvilares. Ao mesmo tempo, a expressão de tripsinas e quimotripsinas foi muito elevada nas seções P1 e P2. Portanto, como consequência da ação proteolítica das serina peptidases sobre as

proteínas se gerariam peptídeos que seriam cotransportados junto com prótons pelo MdPepT1, aumentando assim o pH nessa região, como sugerido pelo aumento significativo de pH detectado entre P1 e P2 na presença de ovoalbumina. Aliás, esse aumento não foi detectado na presença de proteína hidrolisada, o que sugere que seria consequência da digestão de proteínas.

Figura 12. Modelo de alcalinização da região posterior do intestino médio. A alcalinização no começo da região posterior (seção P1) ocorre pelo transporte de amônia, proveniente da hemolinfa, através do MdRh que sequestra os prótons provenientes da região média formando amônio. A esse mecanismo soma-se o cotransporte de aminoácidos e peptídeos pelos MdPAT e MdPepT1, respectivamente. O antiporter MdNHA1 mantém o microambiente ácido que promove o transporte de aminoácidos e peptídeos, disponibilizando os prótons no lúmen em troca por sódio. O excesso de ácido é eliminado pela membrana basolateral através da $\text{MdH}^+ \text{V-ATPase a4}$ e o antiporter MdNHE3 , acoplado ao gradiente de sódio da $\text{MdNa}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$, energizando a alcalinização. No extremo distal da região posterior (P3), a absorção de aminoácidos pelos simporter MdNAT depende da cooperação da $\text{MdH}^+ \text{V-ATPase a3}$, não envolvida na acidificação, e o antiporter MdNHE8 , representando uma via catiónica. O excesso de sódio cotransportado pelos MdNATs é eliminado pela $\text{MdNa}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ situada na membrana basolateral.

5.4. Alcalinização da região anterior

As larvas alimentadas com dieta apresentaram um aumento de pH na região anterior comparado com o pH do alimento. Nessa região, outras isoformas de MdPAT (Tabela 14) e o simporter MdPepT1 foram expressos. Além disso, MdPepT1 também foi achado nas membranas microvilares, o que sugere que o simporte com prótons de aminoácidos e peptídeos presentes na dieta poderia ter aumentado o pH da região anterior, aumento que não foi detectado no caso de larvas alimentadas com gel de amido. Considerando que a expressão e atividade de tripsinas é superior em A2 do que em A1, o aumento de pH em A1 poderia estar mais relacionado a moléculas livres do que a produtos da digestão proteolítica.

5.5. Anidrase carbônica e H^+ V-ATPase complementares à alcalinização

O cotransporte de aminoácidos e peptídeos junto com prótons leva a uma elevada acidificação intracelular (Chen et al., 2003). Esta acidificação pode ser controlada em parte pela reposição dos prótons pelo antiporter MdNHA1, porém uma grande parte precisa ser eliminada basolateralmente. Nesse caso a MdH^+ V-ATPase a4 apresentou uma boa expressão na região posterior e não foi encontrada nas membranas microvilares, o que sugeriu sua localização basolateral. A participação de uma H^+ V-ATPase basolateral na alcalinização do intestino médio já foi descrita em duas espécies de Diptera, *A. aegypti* e *A. gambiae* (Patrick et al., 2006; Okech et al., 2008; Onken & Moffett, 2009). Por outro lado, na seção P1, onde acontece o principal evento de alcalinização, a expressão de anidrases carbônicas MdCA2,3 foi também elevada. MdCA2,3 controlariam a acidificação intracelular provocada pela entrada de aminoácidos e peptídeos ao reagir os prótons cotransportados com o bicarbonato intracelular gerando CO_2 e H_2O .

5.6. Transporte de aminoácidos em condições alcalinas

Os simporters NATs cotransportam aminoácidos neutros junto com sódio com eficiência máxima em condições de pH alcalinas (Boudko, 2012). Porém, a maioria das isoformas de MdNATs foram mais expressas na seção P3, que inclui a seção P4 moderadamente ácida (Tabela 1 e Figura Suplementar 1), o que suporia uma menor eficácia de transporte. De forma similar aos simporters MdPATs e MdPepT1, esta condição pode ser revertida pela geração de um microambiente alcalino ao combinar vários transportadores. O nocaute da proteína ortóloga de MdH⁺ V-ATPase a3 em *D. melanogaster* não afetou à acidificação (Overend et al., 2016; Tabela Suplementar 1), o que sugere que MdH⁺ V-ATPase a3 poderia estar envolvida na manutenção do gradiente de prótons necessário para o transporte ativo secundário de nutrientes e íons na membrana apical das células do intestino médio. Por tanto, o transporte de aminoácidos em simporte com sódio pelos MdNATs poderia estar acoplado ao bombeio de prótons pela MdH⁺ V-ATPase a3 e a troca dos prótons por íons de sódio pelos antiporters MdNHE3 e MdNHE8 nas regiões anterior e posterior, respectivamente, como foi proposto por outros autores (Patrick et al., 2006; Harvey et al., 2009; Rheault et al., 2007; Okech et al., 2008; Meleshkevitch et al., 2006). Como resultado do simporte de aminoácidos com sódio, o excesso intracelular de cátion seria eliminado em parte pelos antiporters MdNHE3 e MdNHE8 e grande parte pela MdNa⁺/K⁺-ATPase basolateral.

5.7. Papel da acidificação e alcalinização na digestão de proteínas no intestino médio de larvas de *M. domestica*

As larvas de *M. domestica* se alimentam principalmente de esterco de animais domésticos (Brues, 1946; Larraín & Salas, 2008) rico em bactérias e fungos e pobre em nutrientes livres. No processo da digestão, as proteínas remanescentes

encontradas no esterco dos animais domésticos são digeridas por tripsinas e quimotripsinas expressas em A1 e A2, gerando aminoácidos e peptídeos que são absorvidos pelos MdPATs e MdPepT1 na região anterior do intestino médio.

Os genes que codificam lisozimas apresentaram dois grupos de expressão, aqueles mais expressos em A1, A2 e M1 (MdL1, MdL3 e MdL5) e os mais expressos em M1 e M2 (MdL2 e MdL6-12). No entanto, as lisozimas de *M. domestica* só são ativas no pH ácido (pH ótimo $\approx 3,8$), por tanto na região média (Lemos et al., 1993; Cançado et al., 2008). Uma vez que as bactérias e fungos entram na região média do intestino médio, as paredes celulares são quebradas pela efeito do ácido e ação das lisozimas que apresentam também elevada atividade quitinase (Lemos et al., 1993). Então, o conteúdo proteico é hidrolisado pelas catepsinas D (MdCAD2 e MdCAD3) cujos genes são mais expressos em M1 e A2, respectivamente. De novo, embora MdCAD3 seja mais expresso em A2, as catepsinas apresentam de forma geral um pH ótimo baixo (Padilha et al., 2009), o que sugere que atuam principalmente na região média do intestino médio. Provavelmente, estas catepsinas são as responsáveis pela degradação das tripsinas da região anterior do intestino médio.

A digestão das proteínas bacterianas e fúngicas é completada na região posterior pelas tripsinas e quimotripsinas no pH neutro, resultando na liberação de aminoácidos e peptídeos de cadeia longa. Os peptídeos são ainda digeridos pelas exopeptidases e dipeptidases como a aminopeptidase, que apresenta um perfil de atividade decrescente ao longo da região posterior. Como resultado dessa digestão são liberados aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos que podem ser absorvidos pelos MdPATs e MdPepT1, respectivamente. A absorção de aminoácidos se finaliza na última seção do intestino posterior (P3) em simporte com sódio pelos MdNATs.

5.8. Fluxos de água ao longo do intestino médio de *M. domestica*

A partir de estudos realizados com dois corantes, um absorvível, Vermelho Congo, injetado na hemolinfa e um não absorvível, Azul de Evans, administrado via oral, foi determinado que as regiões anterior e posterior do intestino médio são secretoras, enquanto que a região média é absortiva. Além disso, foram feitas medidas de atividade enzimática de várias enzimas nas três grandes regiões do intestino médio e no intestino posterior, mostrando que a atividade de algumas enzimas, entre elas tripsina, diminuía muito no intestino posterior o que levou a se hipotetizar que existiria um contrafluxo de água ectoperitrófico da região posterior para região média que permitiria a reciclagem de enzimas, evitando assim sua excreção (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

Nesta hipótese, o contrafluxo estaria determinado pela secreção de água no fim da região posterior até o primeiro terço da região média, o que atualmente é chamado de seção P4 e M1 respectivamente (Fig. 1; Espinoza-Fuentes & Terra, 1987), constituindo uma grande distância a ser percorrida e por tanto com um elevado custo energético. Por outro lado, o intestino médio das larvas dos *Cyclorrhapha* apresenta uma região de constrição situada entre as regiões média e posterior (Richards et al., 2015), as quais se diferenciam por várias unidades de pH luminal (Tabela 1), o que poderia interferir no fluxo de água entre ambas regiões. Esses motivos levaram ao questionamento da hipótese inicial e a decisão de dividir as regiões do intestino médio em seções, de forma que se pudesse identificar possíveis diferenças nos processos de secreção e absorção dentro das grandes regiões morfológicas.

Os resultados mostraram que a região posterior é caracterizada pela secreção líquida de 1,53 μL , sendo a água secretada nas seções P1, P3 e

principalmente P4. Inesperadamente, a seção P2 foi caracterizada pela absorção de água, o que levou a uma nova hipótese na qual o contrafluxo de água ocorreria entre as seções P4 e P2, dessa maneira reduzindo o custo energético do transporte de água, ao se tratar de uma distância menor, e evitando o passo de água através da região de constrição. A divisão da região anterior em duas seções mostrou que ambas estão envolvidas na secreção de água e a região média na absorção de água, como foi mostrado anteriormente (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). Por tanto, a água secretada na região anterior é absorvida na região média e, por outro lado, a

Figura 13. A água é secretada na região anterior do intestino médio (A1, A2) e absorvida na região média (M). Na região posterior, a água é secretada em P1, P3, e P4 e absorvida em P2. Como resultado da secreção em P3+P4 e a absorção em P2 forma-se um contrafluxo de água.

água secretada nas extremidades da região posterior é absorvida no meio da região posterior (Fig. 13). Esses resultados concordam com a determinação dos sítios de secreção da enzima tripsina, onde a distribuição da atividade da enzima ao longo do intestino médio só pode ser observada se o sítio de absorção se encontrar na região posterior, em lugar da região média (Bolognesi et al., 2008).

Embora os dados referentes aos volumes de água secretados e absorvidos nas três grandes regiões morfológicas diferem dos calculados por (Espinoza-

Fuentes & Terra, 1987), a razão de μL secretados/ μL absorvidos apresentou uma diferença de $\approx 10\%$, sugerindo que essas diferenças são o resultado das diferentes condições de experimentação utilizadas.

5.9. Transportadores e canais envolvidos nos fluxos de água

O estudo da fisiologia dos transportadores NKCC e KCC de vertebrados, especialmente humanos, mostrou que, salvo raras exceções, o simporter NKCC1 constitui a isoforma basolateral, enquanto que NKCC2 constitui a isoforma apical, sendo as isoformas KCC (1-4) encontradas em ambas as membranas. Além disso, simporters NKCC são ativados por encolhimento celular, baixa concentração de cloreto intracelular e hiperosmolaridade extracelular, enquanto que os KCC são ativados por inchaço celular, elevada concentração intracelular de cloreto e hiposmolaridade extracelular (Arroyo et al., 2013). A localização basolateral nas células dos túbulos de Malpighi do NKCC1 de *D. melanogaster* foi confirmada (Rodan et al., 2012). Na região anterior do intestino médio a isoforma MdNKCC1 foi expressa em A1, porém está ausente nas membranas microvilares, sugerindo sua localização basolateral como seu ortólogo DmNKCC1. Na região apical da mesma seção foi localizada a aquaporina estrita MdDRIP1, que permitiria o transporte de água transcelular (da hemolinfa para o lúmen do intestino médio) (Fig. 14).

A secreção de água por difusão passiva através de MdDRIP1 requer uma diferença de pressão osmótica entre o espaço intracelular e o espaço extracelular que pode ser gerada pela concentração diferencial de íons. Duas possíveis proteínas poderiam estar envolvidas na saída de íons para o lúmen, o canal de sódio epitelial, MdENaC, e o antiporter MdNHE3, ambos expressos na seção A1, sendo o segundo encontrado nas membranas microvilares. A cooperação entre NKCC1 e ENaC e NHE3 no fluxo transcelular de água nas glândulas salivares de mamíferos

foi mostrada por Evans et al. (2000). A possível participação do canal de sódio, assim como o antiporter Na^+/H^+ na região anterior, poderia explicar a diminuição da secreção de água na presença de sais comparado com ausência de sais. O sódio intracelular sairia a favor do gradiente eletroquímico promovendo a saída de água na ausência de sais. Porém, não seria esse o caso do potássio, já que não foi detectada a expressão de nenhum canal de potássio na região anterior.

O aumento da secreção de água na região anterior (condição hiposmótica) na presença de furosemida foi inesperado. Uma possibilidade seria que o inibidor não foi capaz de atravessar a membrana celular, afetando só aqueles transportadores localizados na membrana apical, presentes na região média e posterior, cujos fluxos de água foram afetados.

Outro dado que gerou incerteza foi a baixa expressão de MdNKCC1 e sua relação com o elevado volume de água secretado em A1. É possível que MdNKCC1 apresente uma baixa taxa de renovação ou que a secreção em A1 provenha não só da região anterior como das glândulas salivares como sugerido por Espinoza-Fuentes & Terra, (1987).

Simporters análogos de MdNKCC2 em outros Diptera e Lepidoptera são expressos em diferentes tecidos envolvidos no balanço de água como o intestino médio (Sun et al., 2010; Gillen et al., 2006; Piermarini et al., 2017). Porém, só em *M. domestica* foram identificadas as seções do intestino médio onde a isoforma é mais expressa (M1 e P2), as quais coincidiram com as seções envolvidas na absorção de água. Assim como em vertebrados e outros insetos como *M. sexta* (Gillen et al., 2006), MdNKCC2 foi encontrada na membrana apical de células da região média. Surpreendentemente, o simporter foi também detectado nas membranas

microvilares de uma região de baixa expressão (A2+A3) caracterizada pela secreção de água. Considerando que simporters NKCC transportam íons e água para dentro da célula, MdNKCC2 só poderia estar envolvido na absorção de água. Contudo, é possível que existam outros transportadores envolvidos na secreção em A2+A3 e como consequência da ação conjunta com MdNKCC2 resulte na secreção de água.

Como tínhamos visto anteriormente na região média predominam dois tipos celulares diferenciados, as células oxínticas e as intersticiais. As células intersticiais foram caracterizadas por apresentar compridas e estreitas invaginações basais com grandes mitocôndrias aderidas. Terra et al. (1988) associaram essas características com um possível papel na absorção de água (Pease, 1956), visto a semelhança com as células do túbulo proximal do néfron de vertebrados (Maunsbach & Christensen, 2011). De maneira análoga, as células do túbulo proximal de vertebrados, MdNKCC2 poderia estar envolvido na absorção apical de íons e água nas células intersticiais da região média acoplado ao gradiente de sódio estabelecido pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral.

O gene KCC de insetos como *M. domestica* e *D. melanogaster* codifica 4 isoformas (Tabela 11; Sun et al., 2010) com uma função hipoteticamente conservada, porém com uma atividade, localização e regulação provavelmente diferentes, assim como acontece com as quatro isoformas de vertebrados codificadas por quatro genes diferentes (Arroyo et al., 2013). Na análise proteômica de membranas microvilares não foi possível identificar uma isoforma específica de MdKCC, devido à sua elevada identidade. Alias não foi possível detectar MdKCC na região média, onde sua expressão também é representativa. Na região média uma das isoformas de MdKCC estaria situada na membrana basolateral das células intersticiais acoplada ao gradiente de potássio da Na^+/K^+ -ATPase em analogia com

a forma humana KCC3b situada na membrana basolateral das células do túbulo proximal do néfron (Mercado et al., 2005). Dessa maneira, a absorção de água na região média resultaria da ação conjunta de MdNKCC2 apical e MdKCC basolateral que agiriam alternativamente. MdNKCC2 transportaria íons e água para dentro da célula, o que levaria a um aumento da concentração de cloreto e ao inchaço celular, ativando MdKCC, o qual secretaria íons e água para hemolinfa. A Na^+/K^+ -ATPase seria a responsável por manter os gradientes dos cátions necessários para o transporte de cloreto e a água. De acordo com esta hipótese, na presença de furosemida a absorção de água na região média diminuiu significativamente.

Na seção P2, o fenômeno de absorção aconteceria assim como em M1 já que as expressões de transportadores são similares.

Terra et al. (1988) caracterizaram as células da região posterior do intestino médio como apresentando grandes e amplas invaginações basolaterais, característica que foi relacionada à secreção de água. Esta característica foi mais marcante na seção P4, cujo fluxo de secreção foi maior e onde foi detectado MdKCC na membrana microvilar. De acordo com os dados morfológicos, fisiológicos e moleculares, MdKCC seria o responsável pela secreção de água na região posterior.

A seção P1 também apresentou secreção de água, porém nenhum transportador com capacidade para o transporte de água foi expresso nessa seção. Uma possível explicação seria que água sairia por difusão facilitada através das aquaporinas estritas MdDRIP1,2 localizadas nas membranas microvillares das células de P1+P2. A saída de água poderia estar energizada pela elevada osmolaridade do conteúdo proveniente da região média, rico em HCl, assim como, a baixa osmolaridade intracelular das células de P1, resultado da produção de água

pela anidrase carbônica perante a entrada de prótons cotransportados com nutrientes (MdPAT e MdPepT1).

A inibição com furosemida mostrou que os simporters NKCC e KCC estão envolvidos na geração dos fluxos de água (ao menos em parte) e que o contrafluxo de P3+P4 para P2 potencializaria a reciclagem de enzimas como a tripsina. Por outro lado, o inibidor específico de NKCCs, bumetanida, mostrou que o contrafluxo depende de ambos tipos de simporters, como sugerido pela menor taxa de excreção

Figura 14. Modelo molecular simplificado dos mecanismos envolvidos nos fluxos de água. A secreção de água em A1 seria causada pela atividade de MdNKCC1 basolateral ajudado pelas aquaporina seletiva para água MdDRIP1. Na região média (M) a água seria absorvida por MdNKCC2 na membrana apical e MdKCC situado na membrana basolateral. Na região posterior, a água produto da atividade anidrase carbônica de P1 sairia através das aquaporinas MdDRIP1,2 localizadas na membrana apical promovida pela diferença de potencial osmótico. A absorção de água em P2 seria como na região média. Por último, a secreção de água em P3+P4 ocorreria através da isoforma apical MdKCC ajudada pela aquaporina MdEGLP1 localizada na membrana basolateral. Os fluxos de água ocorreriam da região anterior para a região média e, na região posterior, de P1 e P3+P4 para P2. A água secretada em P3+P4 seria absorvida em P2 formando assim um contrafluxo de água que favorece a reciclagem de enzimas.

de tripsina comparada com a da furosemida. Porém, se consideramos que a condição hiperosmótica inibe os MdKCC e que a bumetanida foi usada em uma concentração inferior ao IC50 dos KCC de vertebrados, o maior efeito na condição hiperosmótica com bumetanida poderia ser o reflexo da inibição conjunta de MdNKCC2 pelo inibidor e MdKCC pela osmolaridade. Ao mesmo tempo, poderia explicar porque na condição hiposmótica que ativa os MdKCC não houve alteração do gradiente de tripsina na região posterior do intestino médio. Por tanto, cabe a possibilidade de que a contribuição de MdKCC no contrafluxo de água seja superior a de MdNKCC2. Outra possibilidade baseada na análise bioinformática das sequência de MdNKCC2 poderia ser a falta de eficácia do inibidor como resultado da presença de mutações em resíduos envolvidos na ligação ao inibidor.

5.10. Fluxos de água e tempos de retenção da dieta

As grandes regiões morfológicas do intestino médio das larvas de *M. domestica* apresentaram tempos de retenção de dieta variáveis sem relação direta com seus comprimentos (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Fig. 1), porém com uma possível relação com a digestão-absorção e os fluxos de água. Na região anterior, os carboidratos e proteínas presentes no esterco que protegem as paredes celulares das bactérias são digeridos pela ação da amilase (Pimentel et al., 2018), tripsinas e quimotripsinas, respectivamente, deixando as bactérias desprotegidas. O número de transportadores envolvidos na absorção de nutrientes como açúcares (Pimentel et al., 2018), aminoácidos (Tabelas 3,4 e Tabela Suplementar 2) e lipídeos (Tabela Suplementar 2) é muito menor comparado com a expressão na região média e posterior, o que sugere que na região anterior a absorção inicial de nutrientes é menor, talvez relacionada com o baixo conteúdo de nutrientes livres na comidas das larvas. Na região anterior as bactérias desprotegidas junto com as enzimas são

conduzidas para a região média pela secreção de água na região anterior e absorção de água na região média com um tempo de retenção de 10 min. Na região média ocorre a digestão ácida sob a ação das lisozimas e as catepsinas D, rompendo as bactérias e liberando nutrientes que são absorvidos pelos transportadores, consideravelmente mais expressos, ao mesmo tempo que acontece a absorção de água pelo MdNKCC2. O tempo de retenção da comida na região média é de 25 min o que não tem relação com seu comprimento (ao redor de 1/3 da região anterior, Fig. 1) e sim com o processo de digestão ácida e absorção de nutrientes. A digestão ácida é separada da digestão alcalina por uma região de constrição (Richards et al., 2015). A digestão alcalina acontece na região posterior, sendo o principal lugar da digestão dos polímeros e a absorção de nutrientes, sugerido pela elevada expressão de transportadores nesta região. A digestão assim como a absorção de nutrientes se beneficiaria do contrafluxo de água resultando em um tempo de retenção de 59 min.

5.11. Expressão e atividade de tripsina ao longo do intestino médio de M. domestica e sua relação com os fluxos de água

Várias famílias gênicas de tripsina são expressas ao longo do intestino médio de *M. domestica*, assim como em *D. melanogaster* (Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013). Estas famílias formam dois grupos de expressão principais, um na primeira metade do intestino médio e outro na segunda metade. A diminuição da atividade de tripsina no homogeneizado da região anterior ao ser misturado com o homogeneizado da região média no pH ácido sugeriu que algum componente da região média estaria inativando as tripsinas da região anterior. Uma possível explicação seria a degradação das tripsinas pela catepsina D de elevada expressão na região média e pH ótimo 3,5 (Padilha et al., 2009). Além disso, a digestão ácida é separada da

digestão alcalina da região posterior por uma região de constrição (Richards et al., 2015), constituindo dois grupos de tripsinas funcional e anatomicamente separados. Este modelo parece estar correlacionado com os fluxos de água já que as tripsinas secretadas na região anterior seriam conduzidas até a região média pelo fluxo de água, estabelecido pela secreção de água na região anterior e a absorção na região média, sendo assim digeridas pela catepsina D. Enquanto que as tripsinas da região posterior seriam recicladas.

5.12. O contrafluxo e a reciclagem de tripsina

A expressão total de tripsinas na região posterior apresentou uma proporção 4:2:1 para as seções P1:P3:P2. Porém, quando medida a atividade de tripsina por seções do intestino médio, o pico de atividade foi detectado em P2, diminuindo até o intestino posterior. Este perfil de atividade sugere que a secreção de tripsina acontece nas seções de maior expressão P1 e P3, sendo as tripsinas de P3 dirigidas pelo contrafluxo de água de P3+P4 para P2. O aumento da excreção de tripsina como resultado da inibição dos simporters envolvidos na geração do contrafluxo sugere que o fluxo de água de P3+P4 para P2 permite a reciclagem de enzimas evitando sua excreção.

5.13. Absorção de nutrientes

A absorção de nutrientes se refere à captação do conteúdo luminal através do epitélio intestinal até a hemolinfa. A maior parte da absorção é transcelular e portanto requer transportadores distribuídos entre as membranas celulares apical e basolateral e deve ser regulado devido ao seu impacto na homeostase energética.

O principal alimento das larvas de *M. domestica* é o esterco dos animais domésticos (Larraín & Salas, 2008), junto à outras formas de matéria orgânica em

decomposição. Este tipo de alimento apresenta duas características principais, o baixo conteúdo em nutrientes livres e elevado conteúdo de bactérias e fungos. Por isso, a aquisição de nutrientes nas larvas de *M. domestica* depende principalmente da digestão dos microrganismos. Esta característica parece estar relacionada com a expressão de transportadores de nutrientes e os tempos de retenção de comida no intestino médio. Na região anterior onde o tempo de retenção da comida é de 10 min a expressão e presença de transportadores é menor do que na região média onde acontece a digestão ácida dos microrganismos, aumentando o tempo de retenção até os 25 min, e ainda menor que na região posterior onde se concentram as maiores atividades de enzimas digestivas e o tempo de retenção alcança os 59 min (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). O final do intestino médio é caracterizado, de forma geral, por apresentar as maiores expressões e presença de transportadores na membrana apical das células.

5.13.1. Absorção de açúcares:

A absorção de açúcares acontece majoritariamente por difusão facilitada através de nove transportadores de açúcar (SP) com uma provável baixa seletividade pela glicose. Dois transportadores, MdSP4 e MdSP5, carregam mutações que sugeriram a ausência de atividade transportadora e uma provável função de receptores envolvidos na regulação da transcrição de outros SP em função da disponibilidade de açúcares. A absorção de trealose proveniente da digestão de fungos ocorre no fim do intestino posterior, provavelmente realizada em simporte com prótons por MdSP8 (Pimentel et al., 2018).

Na região média foram encontrados três genes com elevada expressão que formam um cluster gênico (MdSP1-3), o que poderia estar relacionado ao ambiente

ácido e a diferente origem embrionária das células desta região (Pimentel et al., 2018).

Em função dos valores de expressão e presença/ausência dos SP nas membranas microvilares das células do intestino médio, a maior parte da absorção de açúcares é realizada por MdSP1-3, MdSP6 e MdSP9, principalmente na região média (M2) e na região posterior (P3). MdSP1, 4, 7 e 9 são modulados pela ingestão de amido, além disso, MdSP4 e MdSP5 poderiam agir como sensores de açúcar situados na membrana apical e basolateral, respectivamente. MdSP7 seria o responsável pela transferência dos açúcares para hemolinfa (Pimentel et al., 2018).

5.13.2. Absorção de aminoácidos

A absorção de aminoácidos é realizada principalmente em simporte com prótons (MdPATs) ou sódio (MdNATs) e via uniporters (MdCATs). Segundo os valores de expressão dos MdPATs, o simporte de aminoácidos com prótons ocorre ao longo do intestino médio de maneira seção-específica. Isso poderia estar relacionado com as variações de pH luminal detectadas ao longo do intestino e a diferente suscetibilidade dos PATs ao pH extracelular (Thwaites & Anderson, 2011). A maior expressão de MdPATs se encontra no começo da região posterior com MdPAT4 e 5 como principais simporters, o que estaria relacionado com a alcalinização da região posterior. A ausência de MdPATs nas membranas microvilares da maior parte do intestino médio poderia estar relacionado ao fato dos PATs transitar entre as membranas intracelulares e a membrana apical em resposta a estímulos (Fan & Goberdhan, 2018) e às larvas utilizadas para a análise RNA-seq serem alimentadas com gel de amido sem proteínas.

Simporters PATs podem funcionar como sensores de aminoácidos ou "transceptors" (Fan & Goberdhan, 2018). Em função da relação de ortologia com a proteína Pathetic de *D. melanogaster* (Tabela Suplementar 1; Lin et al., 2015), MdPAT3 poderia apresentar uma elevada afinidade e baixa capacidade de transporte, agindo como um "transceptor" que regula o crescimento celular normal *in vivo*. Isso poderia explicar sua elevada expressão na seção A1 e M2 coincidindo com a entrada de aminoácidos livres presentes na dieta e a liberação de aminoácidos durante a digestão ácida.

A absorção de aminoácidos em simporte com sódio ocorre no começo e principalmente no final do intestino médio (A1 e P3+P4, respectivamente) pelos MdNATs, sendo o principal simporter MdNAT3. Os MdNATs diferente dos MdPATs que transportam pequenos aminoácidos não ramificados (Ala, Pro, Gly), são os principais responsáveis pela absorção de aminoácidos essenciais (Thwaites & Anderson, 2011; Boudko, 2012). O elevado número de MdNATs no final do intestino médio poderia estar relacionado com a presença de MdNATs de amplo e reduzido espectro cuja expressão pode ser regulada de forma a atender as necessidades fisiológicas de aminoácidos essenciais. MdNATs assim como MdPATs são capazes de transportar D-isômeros (Thwaites & Anderson, 2011; Boudko, 2012) o que constitui uma vantagem no caso dos Cyclorrhapha como *M. domestica* que se alimentam de bactérias.

Por último, a absorção de aminoácidos por difusão facilitada ocorre na região anterior e final da posterior pelos MdCATs, principalmente MdCAT1 na membrana apical e provavelmente por MdCAT2 na basolateral. Uniporters CATs transportariam preferencialmente aminoácidos básicos e poderiam agir como sensores de aminoácidos em *M. domestica* (Boudko, 2012).

5.13.3. Absorção de lipídeos

O transporte de ácidos graxos ocorre ao longo do intestino médio de *M. domestica* através dos MdFATP, principalmente na região posterior (P3+P4) e na região anterior o que poderia estar relacionado com a absorção de moléculas derivadas da digestão pelas lisozimas e moléculas livres presentes na comida. O mais expresso, MdFATP1, captaria ácidos graxos na membrana apical das células do intestino médio, enquanto que MdFATP2, ausente nas membranas microvilares, transferiria os ácidos graxos para a hemolinfa através da membrana basolateral.

Como os MdFATP, os transportadores de esteróis estão presentes ao longo do intestino, principalmente MdSPC2. Sua elevada representatividade estaria relacionada com a incapacidade para a síntese de esteróis em insetos e sua necessidade para a produção de ecdisona envolvida na muda e na pupação (Zheng et al., 2018; Gong et al., 2006; Guo et al., 2009).

5.13.4. Absorção de cobre

Por último, duas proteínas envolvidas na homeostase do cobre (MdCtr1B e MdATP7A) foram expressas principalmente na região média, o que poderia estar relacionado ao fato da absorção de cobre se beneficiar de um ambiente ácido (Zimnicka et al., 2011) e à presença de células de cobre (oxínticas) nesta região (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Dubreuil, 2004). Apesar do transportador de cobre MdCtr1B não ter sido achado nas membranas microvilares da região média, sua localização apical já foi identificada em *D. melanogaster*. Portanto, MdCTR1B seria o responsável pela captação de cobre da dieta na membrana apical de células da região média (provavelmente células oxínticas), enquanto que DmATP7A regularia a transferência de cobre celular para hemolinfa.

6. Conclusões

Os insetos da Ordem Cyclorrhapha são os únicos, além dos vertebrados, que apresentam um intestino médio caracterizado pela presença de uma região média ácida. O estudo molecular da acidificação da região média e alcalinização da região posterior do intestino médio de *M. domestica* mostra a existência de sistemas fisiológicos similares aos encontrados em vertebrados que apoiam a hipótese de convergência evolutiva. Como resultado desse estudo foram propostos modelos fisiológicos de trabalho dos processos de tamponamento intestinal, assim como, dos fluxos de água baseados na expressão de genes, presença ou ausência de transportadores nas membranas microvilares de células do intestino médio e os resultados da experimentação in vivo com diferentes dietas, corantes e inibidores. O tamponamento do intestino médio foi relacionado à digestão de proteínas e absorção de aminoácidos, assim como, foi identificado o mecanismo molecular para o tamponamento do muco protetor do ácido na região média do intestino médio. A identificação dos simporters envolvidos na geração de fluxos de água serviu para a confirmação do papel do contrafluxo de água na reciclagem de enzimas como a tripsina. Por último, foi feita uma análise sucinta da absorção de nutrientes ao longo do intestino médio das larvas de *M. domestica*, como início para a elaboração de um modelo fisiológico global futuro.

7. Referências

- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 288, C1–C19. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2004>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez, B. V., Loisel, F.B., Supuran, C.T., Schwartz, G.J., Casey, J.R., 2003. Direct Extracellular Interaction between Carbonic Anhydrase IV and the Human NBC1 Sodium/Bicarbonate Co-Transporter. *Biochemistry* 42, 12321–12329. <https://doi.org/10.1021/bi0353124>
- Anderson, C.M., Stahl, A., 2014. SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol. Aspects Med.* 34, 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.010>
- Anderson, C.M.H., Grenade, D.S., Boll, M., Foltz, M., Wake, K.A., Kennedy, D.J., Munck, L.K., Miyauchi, S., Taylor, P.M., Campbell, F.C., Munck, B.G., Daniel, H., Ganapathy, V., Thwaites, D.T., 2004. H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* 127, 1410–1422. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.017>
- Anderson, C.M.H., Thwaites, D.T., 2005. Indirect regulation of the intestinal H⁺-coupled amino acid transporter hPAT1 (SLC36A1). *J. Cell. Physiol.* 204, 604–613. <https://doi.org/10.1002/jcp.20337>
- Arroyo, J.P., Kahle, K.T., Gamba, G., 2013. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.002>
- Assémat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., Massey-Harroche, D., 2008. Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 614–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.029>
- Attardo, G.M., Hansen, I.A., Shiao, S.-H., Raikhel, A.S., 2006. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. *J. Exp. Biol.* 209, 3071–3078. <https://doi.org/10.1242/jeb.02349>
- Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.001>
- Biagio, F.P., Tamaki, F.K., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2009. Digestive morphophysiology of *Gryllobates sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Insect Physiol.* 55, 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.08.015>
- Bifano, T.D., Alegria, T.G.P., Terra, W.R., 2010. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior midgut. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 157, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.05.014>
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., 2004. Prediction of

- post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Daniel, H., 2003. A cluster of proton/amino acid transporter genes in the human and mouse genomes. *Genomics* 82, 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00099-5)
- Bolognesi, R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., 2001. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 62–75. <https://doi.org/10.1002/arch.1037>
- Bolognesi, R., Terra, W.R., Ferreira, C., 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency Theoretical and experimental models 54, 1413–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.002>
- Borash, D.J., Gibbs, A.G., Joshi, A., Mueller, L.D., 1998. A Genetic Polymorphism Maintained by Natural Selection in a Temporally Varying Environment. *Am. Nat.* 151, 148–156. <https://doi.org/10.1086/286108>
- Boron, W.F., Boulpaed, E.L., 2017. *Medical Physiology*, 3rd Edn. ed. Elsevier, Philadelphia.
- Boudko, D.Y., 2012. Molecular basis of essential amino acid transport from studies of insect nutrient amino acid transporters of the SLC6 family (NAT-SLC6). *J. Insect Physiol.* 58, 433–449. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.018>
- Bowen, S.H., 1976. Mechanism for digestion of detrital bacteria by the cichlid fish *Sarotherodon mossambicus* (Peters). *Nature* 260, 137–138. <https://doi.org/10.1038/260170a0>
- Bröer, S., Bailey, C.G., Kowalczyk, S., Ng, C., Vanslambrouck, J.M., Rodgers, H., Auray-Blais, C., Cavanaugh, J.A., Bröer, A., Rasko, J.E.J., 2008. Iminoglycinuria and hyperglycinuria are discrete human phenotypes resulting from complex mutations in proline and glycine transporters. *J. Clin. Invest.* 118, 3881–3892. <https://doi.org/10.1172/JCI36625>
- Brues, C.T., 1946. *Insect dietary*. Harvard University Press, Cambridge.
- Buchon, N., Osman, D., David, F.P.A., Fang, H.Y., Boquete, J., Deplancke, B., 2013. Resource Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *CellReports* 3, 1725–1738. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001>
- Buck, J.B., 1953. Physical properties and chemical composition of insect blood. Ed. *Insect Physiology*, John Wiley, New York, NY.
- Burke, R., Commons, E., Camakaris, J., 2008. Expression and localisation of the essential copper transporter DmATP7 in *Drosophila* neuronal and intestinal tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1850–1860. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.021>
- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., Eguileor, M. De, Pennacchio, F., Giordana, B., 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphis ervi* , Hymenoptera) and mammals 2284–2291. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00847.2006>.
- Caldeira, W., Dias, A.B., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2007. Digestive Enzyme Compartmentalization and Recycling and Sites of Absorption and Secretion Along the Midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) Larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 64,

- 1–18. <https://doi.org/10.1002/arch>.
- Cançado, F.C., Effio, P.C., Terra, W.R., Marana, S.R., 2008. Cloning, purification and comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* larvae. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 41, 969–977. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008001100005>
- Cançado, F.C., Valério, A.A., Marana, S.R., Barbosa, J.A.R.G., 2007. The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. *J. Struct. Biol.* 160, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.008>
- Chen, Z., Kennedy, D.J., Wake, K.A., Zhuang, L., Ganapathy, V., Thwaites, D.T., 2003. Structure, tissue expression pattern, and function of the amino acid transporter rat PAT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00648-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00648-X)
- Chintapalli, V.R., Kato, A., Henderson, L., Hirata, T., Woods, D.J., Overend, G., Davies, S.A., Romero, M.F., Dow, J.A.T., 2015. Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11720–11725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508031112>
- Clark, T.M., 1999. Evolution and adaptative significance of larval midgut alkalization in the insects superorder Mecopterida 25, 1945–1960.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., Leopold, P., 2003. A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* 114, 739–749. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00713-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00713-X)
- Costanza, R., J, R.A., Groot, R. De, Farberll, S., Grassot, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., Neilltt, R.V.O., J, J.P.J., Raskin, R.G., Suttonllll, P., Belt, M. Van Den, 1997. The value of the world ' s ecosystem services and natural capital 387, 253–260.
- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., Hultmark, D., 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.* 242, 152–162. <https://doi.org/Doi 10.1007/Bf00391008>
- Daniel, H., Neugebauer, B., Kratz, A., G., R., 1985. Localization of acid microclimate along intestinal villi of rat jejunum. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*
- de Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* 34, 362–365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Dias, R.O., Cardoso, C., Pimentel, A.C., Damasceno, T.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 2018. The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin domains in the insect midgut. *Insect Mol. Biol.* 27, 46–60. <https://doi.org/10.1111/imb.12340>
- DiRusso, C.C., Darwis, D., Obermeyer, T., Black, P.N., 2009. Functional Domains of the Fatty Acid Transport Proteins: Studies Using Protein Chimeras. *Biomechim Biophys Acta* 1781, 135–143. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Dourlen, P., Sujkowski, A., Wessells, R., Mollereau, B., 2015. Fatty acid transport proteins in disease: New insights from invertebrate models. *Prog. Lipid Res.* 60, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.08.001>
- Dow, J.A.T., 1981. Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *J. Insect Physiol.* 27, 579–585.

- Dubreuil, R.R., 2004. Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.07.004>
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1999.00095.x>
- Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1987. Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.* 17, 819–827. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90016-3)
- Espinoza-Fuentes, F.P., Terra, W.R., 1987. Physiological adaptations for digesting bacteria - water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 17, 809–817.
- Evans, A.M., Aimanova, K.G., Gill, S.S., 2009. Characterization of a blood-meal-responsive proton-dependent amino acid transporter in the disease vector, *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 212, 3263–3271. <https://doi.org/10.1242/jeb.029553>
- Evans, R.L., Park, K., Turner, R.J., Watson, G.E., Nguyen, H., Dennett, M.R., Hand, A.R., Flagella, M., Shull, G.E., Melvin, J.E., 2000. Severe Impairment of Salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ Cotransporter (NKCC1)-deficient Mice 275, 26720–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003753200>
- Fan, S.-J., Goberdhan, D.C.I., 2018. PATs and SNATs: Amino Acid Sensors in Disguise 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00640>
- Ferrè, F., Clote, P., 2005. DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res.* 33, 230–232. <https://doi.org/10.1093/nar/gki412>
- Ferreira, A.H.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., 2002. Secretion of β -glycosidase by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae 48, 113–118.
- Ferreira, L.I.A., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 1997. Cytoskeleton Removal and Characterization of the Microvillar Membranes Isolated from Two Midgut Regions of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) 27, 793–801. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00061-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00061-1)
- Finn, R.N., Chauvigné, F., Stavang, J.A., Belles, X., Cerdà, J., 2015. Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement. *Nat. Commun.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms8814>
- Florens, L., Carozza, M.J., Swanson, S.K., Fournier, M., Coleman, M.K., Workman, J.L., Washburn, M.P., 2006. Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods* 40, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.028>
- Forgac, M., 2007. Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>
- Fujii, T., Fujita, K., Takeguchi, N., Sakai, H., 2011. Cellular physiology of channels and transporters in gastrointestinal tracts function of K⁺–Cl⁻ Cotransporters in the acid

- secretory mechanism of gastric parietal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 810–812.
- Fujita, A., Horio, Y., Higashi, K., Mouri, T., Hata, F., Takeguchi, N., Kurachi, Y., 2002. Specific localization of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, at the apical membrane of rat gastric parietal cells; its possible involvement in K⁺ recycling for the H⁺ – K⁺ -pump. *J. Physiol.* 540.1, 85–92. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013439>
- Gamba, G., 2005. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol. Rev.* 85, 423–493. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2004>
- Gillen, C.M., Blair, C.R., Heilman, N.R., Somple, M., Stulberg, M., Thombre, R., Watson, N., Gillen, K.M., Itagaki, H., 2006. The cation-chloride cotransporter, masBSC, is widely expressed in *Manduca sexta* tissues. *J. Insect Physiol.* 52, 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.02.010>
- Gillot, C., 1995. *Entomology*, 2nd Edn. ed. Springer, New York, NY.
- Goberdhan, D.C.I., Meredith, D.C., Boyd, R., Wilson, C., 2005. PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* 132, 2365–2375. <https://doi.org/10.1242/dev.01821>
- Goldstein, S.A.N., Price, L.A., Rosenthal, D.N., Pausch, M.H., 1996. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13256–13261. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13256>
- Gong, J., Hou, Y., Zha, X.F., Lu, C., Zhu, Y., Xia, Q.Y., 2006. Molecular cloning and characterization of *Bombyx mori* sterol carrier protein x/sterol carrier protein 2 (SCPx/SCP2) gene. *DNA Seq. - J. DNA Seq. Mapp.* 17, 326–333. <https://doi.org/10.1080/10425170600886706>
- Grzywacz, A., Ogiela, J., Tofilski, A., 2017. Identification of Muscidae (Diptera) of medico-legal importance by means of wing measurements 116, 1495–1504. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5426-x>
- Guo, X.R., Zheng, S.C., Liu, L., Feng, Q.L., 2009. The sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase (SCPx) is involved in cholesterol uptake in the midgut of *Spodoptera litura*: Gene cloning, expression, localization and functional analyses. *BMC Mol. Biol.* 10, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-102>
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *Pacific Symp. Biocomput.* 7, 310–322.
- Hall, A.M., Smith, A.J., Bernlohr, D.A., 2003. Characterization of the Acyl-CoA Synthetase Activity of Purified Murine Fatty Acid Transport Protein 1. *J. Biol. Chem.* 278, 43008–43013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306575200>
- Hamann, S., Herrera-Perez, J.J., Zeuthen, T., Alvarez-Leefmans, F.J., 2010. Cotransport of water by the Na⁺-K⁺-2Cl cotransporter NKCC1 in mammalian epithelial cells. *J. Physiol.* 588, 4089–4101. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194738>
- Hamilton, J.A., 2007. New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 77, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.020>
- Hartmann, A.-M., Nothwang, H.G., 2015. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00470>

- Harvey, W.R., 2009. Voltage coupling of primary H⁺ V-ATPases to secondary Na⁺ - or K⁺ - dependent transporters. *J. Exp. Biol.* 212, 1620–1629. <https://doi.org/10.1242/jeb.031534>
- Harvey, W.R., Boudko, D.Y., Rheault, M.R., Okech, B.A., 2009. NHE(VNAT): an H⁺ V-ATPase electrically coupled to a Na⁺:nutrient amino acid transporter (NAT) forms an Na⁺/H⁺ exchanger (NHE). *J. Exp. Biol.* 212, 347–357. <https://doi.org/10.1242/jeb.026047>
- Hasset, R., Kosman, D.J., 1995. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 128–134.
- Ilan, B., Tajkhorshid, E., Schulten, K., Voth, G.A., 2004. The Mechanism of Proton Exclusion in Aquaporin Channels. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 55, 223–228. <https://doi.org/10.1002/prot.20038>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.Y., Lopez, R., Hunter, S., 2014. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30, 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Joost, H.-G., Thorens, B., 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (Review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 247–256. <https://doi.org/10.1080/09687680110090456>
- Jordão, B.P., Terra, W.R., Ferreira, C., 1995. Chemical determinations in microvillar membranes purified from brush-borders isolated from the larval midgut of one coleoptera and two diptera species. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 417–426. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00073-8](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00073-8)
- Kahle, K.T., Rinehart, J., Lifton, R.P., 2010. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 1150–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.009>
- Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L., 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35, 429–432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>
- Kanamori, Y., Saito, A., Hagiwara-komoda, Y., Tanaka, D., Mitsumasu, K., Kikuta, S., Watanabe, M., Cornette, R., Kikawada, T., Okuda, T., 2010. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.006>
- Kang'ethe, W., Aimanova, K.G., Pullikuth, A.K., Gill, S.S., 2007. NHE8 mediates amiloride sensitive Na⁺/H⁺ exchange across mosquito Malpighian tubules and catalyzes Na⁺ And K⁺ transport in reconstituted proteoliposomes. *Am J Physiol Ren. Physiol* 70112, 00487.2005. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00487.2005>
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 1–7. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M., Stevens, T.H., 2001a. The Amino-

- terminal Domain of the Vacuolar Proton-translocating ATPase α Subunit Controls Targeting and in Vivo Dissociation, and the Carboxyl-terminal Domain Affects Coupling of Proton Transport and ATP Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 276, 47411–47420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108310200>
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M., 2001b. Arg-735 of the 100-kDa subunit α of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12397–402. <https://doi.org/10.1073/pnas.221291798>
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M., 2001c. Yeast V-ATPase Complexes Containing Different Isoforms of the 100-kDa α -subunit Differ in Coupling Efficiency and in Vivo Dissociation. *J. Biol. Chem.* 276, 17941–17948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010790200>
- Khamesipour, F., Lankarani, K.B., Honarvar, B., Kwenti, T.E., 2018. A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L .). *BMC Public Health* 18, 1049.
- Kikuta, S., Hagiwara-Komoda, Y., Noda, H., Kikawada, T., 2012. A novel member of the trehalose transporter family functions as an H⁺-dependent trehalose transporter in the reabsorption of trehalose in Malpighian tubules. *Front. Physiol.* 3, 290. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00290>
- Kikuta, S., Kikawada, T., Hagiwara-Komoda, Y., Nakashima, N., Noda, H., 2010. Sugar transporter genes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: A facilitated glucose/fructose transporter. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.008>
- Kim, H., Wu, X., Lee, J., 2013. SLC31 (CTR) family of copper transporters in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 34, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.003>
- Kita, T., Ozoe, F., Ozoe, Y., 2014. Expression pattern and function of alternative splice variants of glutamate-gated chloride channel in the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.004>
- Kleyman, T.R., Cragoe, E.J., 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* 105, 1–21. <https://doi.org/10.1007/BF01871102>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Larraín, P.S., Salas, C.F., 2008. House fly (*Musca domestica* L .) (Diptera: Muscidae) development in different types of manure 68, 192–197.
- Law, J.H., Ribeiro, J.M.C., Wells, M.A., 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 87–111.
- Lemaitre, B., Miguel-Aliaga, I., 2013. The Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Genet.* 47, 377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133343>
- Lemos, F.J.A., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1993. A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 533–541. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90062-W](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90062-W)
- Levinson, Z.H., 1960. Food of Housefly Larvae. *Nature* 188, 427–428. <https://doi.org/doi:10.1038/188427a0>
- Lin, W.Y., Williams, C., Yan, C., Koledachkina, T., Luedke, K., Dalton, J., Bloomsburg, S.,

- Morrison, N., Duncan, K.E., Kim, C.C., Parrish, J.Z., 2015. The SLC36 transporter pathetic is required for extreme dendrite growth in *Drosophila* sensory neurons. *Genes Dev.* 29, 1120–1135. <https://doi.org/10.1101/gad.259119.115>
- Maranhão, Z.C., 1977. *Entomologia Geral*, 2nd Edn. ed. Nobel, São Paulo.
- Marshall, A.T., Wood, R.W., 1990. Ionic and osmotic regulation by larvae of the sheep blowfly *Lucilia curpina*. *J. Insect Physiol.* 36, 635–639.
- Maunsbach, A.B., Christensen, E.I., 2011. Functional ultrastructure of the proximal tubule, in: *Handbook of Physiology~Renal Physiology*. pp. 41–107.
- McNulty, M., Puljung, M., Jefford, G., Dubreuil, R.R., 2001. Evidence that a copper-metallothionein complex is responsible for fluorescence in acid-secreting cells of the *Drosophila* stomach. *Cell Tissue Res.* 304, 383–389. <https://doi.org/10.1007/s004410100371>
- Meleshkevitch, E. a, Assis-Nascimento, P., Popova, L.B., Miller, M.M., Kohn, A.B., Phung, E.N., Mandal, A., Harvey, W.R., Boudko, D.Y., 2006. Molecular characterization of the first aromatic nutrient transporter from the sodium neurotransmitter symporter family. *J. Exp. Biol.* 209, 3183–98. <https://doi.org/10.1242/jeb.02374>
- Meleshkevitch, E.A., Robinson, M., Popova, L.B., Miller, M.M., Harvey, W.R., Boudko, D.Y., 2009. Cloning and functional expression of the first eukaryotic Na⁺-tryptophan symporter, AgNAT6. *J. Exp. Biol.* 212, 1559–1567. <https://doi.org/10.1242/jeb.027383>
- Meleshkevitch, E.A., Voronov, D.A., Miller, M.M., Penneda, M., Fox, J.M., Metzler, R., Boudko, D.Y., 2013. A novel eukaryotic Na⁺ Methionine selective symporter is essential for mosquito development 43, 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.05.008.A>
- Mercado, A., Vázquez, N., Song, L., Cortés, R., Enck, A.H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G., Mount, D.B., 2005. NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter 289, 1246–1261. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00464.2004>.
- Metzner, L., Natho, K., Zebisch, K., Dorn, M., Bosse-Doenecke, E., Ganapathy, V., Brandsch, M., 2008. Mutational analysis of histidine residues in the human proton-coupled amino acid transporter PAT1. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 1042–1050. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2007.12.026>
- Meyers, J.I., Gray, M., Foy, B.D., 2015. Mosquitocidal properties of IgG targeting the glutamate-gated chloride channel in three mosquito disease vectors (Diptera: Culicidae). *J. Exp. Biol.* 218, 1487–1495. <https://doi.org/10.1242/jeb.118596>
- Meylaers, K., Clynen, E., Daloze, D., DeLoof, A., Schoofs, L., 2004. Identification of 1-lysophosphatidylethanolamine (C 16 : 1) as an antimicrobial compound in the housefly , *Musca domestica* 34, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.001>
- Missirlis, F., Kosmidis, S., Brody, T., Mavrikakis, M., Holmberg, S., Odenwald, W.F., Skoulakis, E.M.C., Rouault, T.A., 2007. Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics* 177, 89–100. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075150>
- Monteiro, E.C., Tamaki, F.K., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2014. Arthropod Structure & Development The digestive system of the “ stick bug ” *Cladomorphus phyllinus* (Phasmida , Phasmatidae): A morphological , physiological and biochemical analysis. *Arthropod Struct. Dev.* 43, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2013.11.005>
- Moreira, N.R., Cardoso, C., Dias, R.O., Ferreira, C., Terra, W.R., 2017. A physiologically-

- oriented transcriptomic analysis of the midgut of *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.* 99, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.03.009>
- Mueckler, M., Thorens, B., 2013. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol Asp. Med* 34, 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>.
- Nepomuceno, D.B., Santos, V.C., Araújo, R.N., Pereira, M.H., Sant'Anna, M.R., Moreira, L.A., Gontijo, N.F., 2017. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions 220, 3355–3362. <https://doi.org/10.1242/jeb.158956>
- Okech, B.A., Boudko, D.Y., Linser, P.J., Harvey, W.R., 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 211, 957–968. <https://doi.org/10.1242/jeb.012021>
- Okech, B.A., Boudko, D.Y., Linser, P.J., Harvey, W.R., 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 211, 957–968. <https://doi.org/10.1242/jeb.012021>
- Onken, H., Moffett, D.F., 2009. Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalization in the anterior midgut of larval mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 212, 373–377. <https://doi.org/10.1242/jeb.023580>
- Onken, H., Patel, M., Javoroncov, M., Izeirovski, S., Moffett, S.B., Moffett, D.F., 2009. Strong Alkalization in the Anterior Midgut of Larval Yellow Fever Mosquitoes (*Aedes aegypti*): Involvement of Luminal Na⁺/K⁺ - ATPase. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 311, 155–161. <https://doi.org/10.1002/jez.512.Strong>
- Overend, G., Luo, Y., Henderson, L., Douglas, A.E., Davies, S.A., Dow, J.A.T., 2016. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27242>
- Padilha, M.H.P., Pimentel, A.C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 782–791. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.003>
- Patrick, M.L., Aimanova, K., Sanders, H.R., Gill, S.S., 2006. P-type Na⁺/K⁺-ATPase and V-type H⁺-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 209, 4638–4651. <https://doi.org/10.1242/jeb.02551>
- Pease, D.C., 1956. Infolded basal plasma membranes found in epithelia noted for their water Transport. *J Biophys. Biochem Cytol* 2, 203–208.
- Peres, A., Bossi, E., 2000. Effects of pH on the uncoupled, coupled and pre-steady-state currents at the amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 525, 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00083.x>
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pierleoni, A., Martelli, P., Casadio, R., 2008. PredGPI: A GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>
- Piermarini, P.M., Akuma, D.C., Crow, J.C., Jamil, T.L., Kerkhoff, W.G., Viel, K.C.M.F., Gillen, C.M., 2017. Differential expression of putative sodium-dependent cation-chloride cotransporters in *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 214, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.09.007>

- Piermarini, P.M., Grogan, L.F., Lau, K., Wang, L., Beyenbach, K.W., 2010. A SLC4-like anion exchanger from renal tubules of the mosquito (*Aedes aegypti*): evidence for a novel role of stellate cells in diuretic fluid secretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R642-60. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00729.2009>
- Pillai, M.S., Meredith, D., 2011. SLC36A4 (hPAT4) is a high affinity amino acid transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 2455–2460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172403>
- Pimentel, A.C., Barroso, I.G., Ferreira, J.M.J., Dias, R.O., Ferreira, C., Terra, W.R., 2018. Molecular machinery of starch digestion and glucose absorption along the midgut of *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* 109. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.009>
- Pimentel, A.C., Fuzita, F.J., Palmisano, G., Ferreira, C., Terra, W.R., 2017. Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Role of cathepsins D in the midgut of *Dysdercus peruvianus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 204, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.11.004>
- Price, D.R.G., Gatehouse, J.A., 2014. Genome-wide annotation and functional identification of aphid GLUT-like sugar transporters. *BMC Genomics* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-647>
- Price, D.R.G., Karley, A.J., Ashford, D.A., Isaacs, H. V., Pownall, M.E., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A., Douglas, A.E., 2007. Molecular characterisation of a candidate gut sucrase in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.12.005>
- Pullikuth, A.K., Aimanova, K., Kang'ethe, W., Sanders, H.R., Gill, S.S., 2006. Molecular characterization of sodium/proton exchanger 3 (NHE3) from the yellow fever vector, *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 209, 3529–3544. <https://doi.org/10.1242/jeb.02419>
- Rheault, M.R., Okech, B.A., Keen, S.B.W., Miller, M.M., Meleshkevitch, E.A., Linser, P.J., Boudko, D.Y., Harvey, W.R., 2007. Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na⁺/H⁺ antiporter (NHA) from a metazoan, *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 210, 3848–3861. <https://doi.org/10.1242/jeb.007872>
- Richards, C.D., Warr, C.G., Burke, R., 2015. A role for dZIP89B in *Drosophila* dietary zinc uptake reveals additional complexity in the zinc absorption process. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 69, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.004>
- Rodan, A.R., Baum, M., Huang, C.-L., 2012. The *Drosophila* NKCC Ncc69 is required for normal renal tubule function. *Am. J. Physiol. Physiol.* 303, C883–C894. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00201.2012>
- Roman, G., Meller, V., Wu, K.H., Davis, R.L., 1998. The opt1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am. Physiol. Soc.* 857–869.
- Romero, M.F., Henry, D., Nelson, S., Harte, P.J., Dillon, A.K., Sciortino, C.M., 2000. Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *J. Biol. Chem.* 275, 24552–24559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003476200>
- Santos, C.S., Lima, A.S., Battistel, D., Daniele, S., Bertotti, M., 2016. Fabrication and Use of Dual-function Iridium Oxide Coated Gold SECM Tips. An Application to pH Monitoring above a Copper Electrode Surface during Nitrate Reduction. *Electroanalysis* 28, 1441–1447. <https://doi.org/10.1002/elan.201501082>
- Schulthess, G., Lipka, G., Compassi, S., Boffelli, D., Weber, F.E., Paltauf, F., Hauser, H.,

1994. Absorption of Monoacylglycerols by Small Intestinal Brush Border Membrane. *Biochemistry* 33, 4500–4508. <https://doi.org/10.1021/bi00181a009>
- Sclafani, A., Koepsell, H., Ackroff, K., 2016. SGLT1 sugar transporter/sensor is required for post-oral glucose appetition. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 310, R631–R639. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00432.2015>
- Searle, B.C., 2010. Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* 10, 1265–1269. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900437>
- Seron, T.J., Hill, J., Linser, P.J., 2004. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. *J. Exp. Biol.* 207, 4559–4572. <https://doi.org/10.1242/jeb.01287>
- Slepkov, E.R., Rainey, J.K., Sykes, B.D., Fliegel, L., 2007. Structural and functional analysis of the Na⁺ + H⁺ exchanger. *Biochem. J.* 401, 623–633. <https://doi.org/10.1042/BJ20061062>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Somasekharan, S., Tanis, J., Forbush, B., 2012. Loop diuretic and ion-binding residues revealed by scanning mutagenesis of transmembrane helix 3 (TM3) of Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* 287, 17308–17317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356014>
- Sonnhammer, E.L.L., Östlund, G., 2015. InParanoid 8: Orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Res.* 43, D234–D239. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1203>
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.B.G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Lavery, S.B., Clausen, H., 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32, 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>
- Stock, M., Gretscher, R.R., Groth, M., Eiserloh, S., Boland, W., Burse, A., 2013. Putative sugar transporters of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*: Their phylogeny and role for nutrient supply in larval defensive glands. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084461>
- Sun, Q., Tian, E., Turner, R.J., Ten Hagen, K.G., 2010. Developmental and functional studies of the SLC12 gene family members from *Drosophila melanogaster*. *Am. J. Physiol. Physiol.* 298, C26–C37. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00376.2009>
- Syed, Z.A., Härd, T., Uv, A., van Dijk-Härd, I.F., 2008. A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. *PLoS One* 3, e3041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003041>
- Targa, H.J., Peres, C.A., 1979. Radiation-induced dominant lethal mutations in oocytes of *Musca domestica*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 63, 153–160. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(79\)90112-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(79)90112-X)
- Tatsumi, K., Tsuji, S., Miwa, H., Morisaku, T., Nuriya, M., Orihara, M., Kaneko, K., Okano, H., Yasui, M., 2009. *Drosophila* big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. *FEBS Lett.* 583, 2077–2082. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.035>

- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C., 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* 78, 255–269. <https://doi.org/S0001-37652006000200007>
- Terra, W.R., De Bianchi, A.G., Gambarini, A.G., Lara, F.J.S., 1973. Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly, *Rhynchosciara americana*. *J. Insect Physiol.* 19, 2097–2106. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(73\)90124-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(73)90124-8)
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1988. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): Ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *J. Insect Physiol.* 34, 463–472. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(88\)90187-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90187-4)
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. *Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X>
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B - Biochem. Mol. Biol.* 109, 1–62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1981. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. *J. Insect Physiol.* 27, 325–331.
- Terra, W.R., Regel, R., 1995. pH buffering in *Musca domestica* midguts. *Comp. Biochem. Physiol.* 112, 559–564. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02028-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02028-4)
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar, *Advances in Insect Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(03\)31004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31004-5)
- Thwaites, D.T., Anderson, C.M.H., 2011. The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1802–1816. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01438.x>
- Treherne, J.E., 1959. Amino acid absorption in the locust (*Schistocerca gregaria* forsk.). *J. Exp. Biol.* 36, 533–545.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M., Thorens, B., 2001. Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 20, 4467–4477. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4467>
- Van Den Brink, D.M., Cubizolle, A., Chatelain, G., Davoust, N., Girard, V., Johansen, S., Napoletano, F., Dourlen, P., Guillou, L., Angebault-Prouteau, C., Bernoud-Hubac, N., Guichardant, M., Brabet, P., Mollereau, B., 2018. Physiological and pathological roles of FATP-mediated lipid droplets in *Drosophila* and mice retina. *PLOS Genet.* 14, e1007627. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007627>
- Vince, J.W., Carlsson, U., Reithmeier, R.A.F., 2000. Localization of the Cl⁻ / HCO₃⁻ - Anion Exchanger Binding Site to the Amino-Terminal Region of Carbonic Anhydrase II † 13344–13349.
- Vincenti, S., Castagna, M., Peres, A., Sacchi, V.F., 2000. Substrate selectivity and pH dependence of KAAT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* 174, 213–224. <https://doi.org/10.1007/s002320001046>
- Vitavska, O., Wieczorek, H., 2013. The SLC45 gene family of putative sugar transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 655–660. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.014>

- Vonk, H.J., Western, J.R.H., 1984. Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion. Academic Press, New York.
- Wacker, T., Garcia-Celma, J.J., Lewe, P., Andrade, S.L.A., 2014. Direct observation of electrogenic NH₄⁺ transport in ammonium transport (Amt) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9995–10000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406409111>
- Watanabe, C., Kato, Y., Ito, S., Kubo, Y., Sai, Y., Tsuji, A., 2005. Na⁺ + H⁺ + Exchanger 3 Affects Transport Property of H⁺ +/ Oligopeptide Transporter 1 20, 443–451. <https://doi.org/10.2133/dmpk.20.443>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wigglesworth, V.B., 1933. The function of the anal gills of the mosquito larva. *J. Exp. Biol.* 10, 16–26.
- Wisedchaisri, G., Park, M.S., Iadanza, M.G., Zheng, H., Gonen, T., 2014. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nat. Commun.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5521>
- Wolstenholme, A.J., 2012. Glutamate-gated chloride channels. *J. Biol. Chem.* 287, 40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>
- Wu, Y., Zheng, X., Zhang, M., He, A., Li, Z., Zhan, X., 2010. Cloning and functional expression of Rh50-like glycoprotein, a putative ammonia channel, in *Aedes albopictus* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 56, 1599–1610. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.021>
- Yang, Z., Xia, J., Pan, H., Gong, C., Xie, W., Guo, Z., Zheng, H., Yang, X., Yang, F., Wu, Q., Wang, S., Zhang, Y., 2017. Genome-wide characterization and expression profiling of sugar transporter family in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Front. Physiol.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00322>
- Yepiskoposyan, H., Egli, D., Fergestad, T., Selvaraj, A., Treiber, C., Multhaup, G., Georgiev, O., Schaffner, W., 2006. Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Res.* 34, 4866–4877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl606>
- Zeuthen, T., 2010. Water-transporting proteins. *J. Membr. Biol.* 234, 57–73. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9216-y>
- Zhang, Z., 2011. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, 7–12.
- Zheng, J.C., Sun, S.L., Yue, X.R., Liu, T.X., Jing, X., 2018. Phylogeny and evolution of the cholesterol transporter NPC1 in insects. *J. Insect Physiol.* 107, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.04.007>
- Zimnicka, A.M., Ivy, K., Kaplan, J.H., 2011. Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C588–C599. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00054.2010>

8. Apêndices

Figura Suplementar 1. Divisão do intestino médio de *M. domestica*. A) RNAseq. B) Purificação de membranas microvilares, proteômica, medidas de pH com eletrodos, análise do perfil de tripsina. C) Análise dos fluxos de água. A seta indica a região de constrição entre a região média e a região posterior.

Tabela Suplementar 1. Ortólogos caracterizados de proteínas hipoteticamente envolvidas no tamponamento e os modelos associados ao tamponamento em outros Diptera.

<i>M. domestica</i>	Inseto	Nome	Número de acesso	Identidade	Autor
	<i>A. aegypti</i>	AaCA9	AAEL004930	66%	Dixon et al. 2017
MdCA2	<i>A. gambiae</i>	AgCA9	ABF66618	68%	Smith et al. 2007
	<i>D. melanogaster</i>	CAH1	NP_523561	80%	Syrjänen et al. 2013
MdH ⁺ V-ATPase a1		Vha100-4	NP_650720.1	67%	
MdH ⁺ V-ATPase a2	<i>D. melanogaster</i>	Vha100-2	NP_650722.1	86%	Overend et al. 2016
MdH ⁺ V-ATPase a3		Vha100-5	NP_609515.1	67%	
MdGluCl	<i>D. melanogaster</i>	CG11340	NP_651861.1	56%	Overend et al. 2016
MdKCC	<i>D. melanogaster</i>	kazachoc	NP_001286794.1	84%	Overend et al. 2016
MdNHE3		AeNHE3	XP_001653402.1	70%	Pullikuth et al. 2006
	<i>A. aegypti</i>				Kang'ethe et al. 2007
MdNHE8		AeNHE8	XP_001649290.1	78%	Piermarini et al. 2009
MdAE1	<i>A. aegypti</i>	AeAE	ACH67478.1	71%	Piermarini et al. 2010
MdNDAE1	<i>D. melanogaster</i>	NDAE1	NP_523501.1	80%	Romero et al. 2000
MdRh	<i>A. albopictus</i>	AaIRh50	ACX71870.1	59%	Wu et al. 2010
	<i>A. gambiae</i>	AgNHA1	XP_320946.3	68%	Rheault et al. 2007
MdNHA1	<i>D. melanogaster</i>	NHA1	NP_723224.2	75%	Xiang et al. 2012 Chintapalli et al. 2015
MdPAT5	<i>D. melanogaster</i>	CG1139	NP_647686.1	74%	Goberdhan et al. 2005
MdPepT1	<i>D. melanogaster</i>	CG2930	NP_001284845.1	69%	Roman et al. 1998
MdNAT2	<i>D. melanogaster</i>	DmNAT1	AAY56384	70%	
MdNAT3	<i>D. melanogaster</i>	DmNAT5	ABY84801.1	68%	Miller et al. 2009
MdOrk1	<i>D. melanogaster</i>	Ork1	NP_511112.1	59%	Goldstein et al. 1996
MdMRP1	<i>D. melanogaster</i>	CG10505	NP_611571.2	64%	Yepiskoposyan et al. 2006

Os ortólogos foram identificados utilizando InParanoid8 como descrito no Material e Métodos.

Tabela Suplementar 2. Melhores hits de proteínas hipoteticamente envolvidas nos fluxos de água.

<i>M. domestica</i>	Inseto	Nome	Número de acesso	Identidade	Referências
MdNKCC1	<i>D. melanogaster</i>	CG4357; Ncc69;	NP_001261756.1	81%	Sun et al. 2010
		DmNKCC1			Rodan et al., 2012
	<i>A. aegypti</i>	aeNKCC1	XP_021709422.1	70%	Piermarini et al., 2017
MdNKCC2	<i>D. melanogaster</i>	CG31547; Ncc83;	NP_730938.1	72%	Sun et al. 2010
		DmNKCC2			Rodan et al., 2012
	<i>A. aegypti</i>	aeCCC2	XP_001654082.2	58%	Piermarini et al., 2017
		aeCCC3	XP_001654083.2	54%	
	<i>M. sexta</i>	masBSC	AAA75600.1	57%	Guillen et al., 2006
MdKCC1	<i>D. melanogaster</i>	CG5594A, B, C, D; DmKCC	NP_001286794.1	84%	Sun et al. 2010
MdKCC2			NP_001286795.1	83%	
MdKCC3			NP_001286794.1	84%	
MdKCC4			NP_726378.1	84%	
MdDRIP1	<i>D. melanogaster</i>	Aquaporina DRIP	NP_523697.1	74%	Finn et al., 2015
MdDRIP2				72%	
MdPRIP1		Aquaporina PRIP	NP_725052.1	79%	
MdPRIP2				84%	
MdEGLP1a		EGLP4A	NP_611813.1	66%	
MdEGLP1b		EGLP4E	NP_00124648.2	65%	
MdEGLP2		EGLP2A	NP_611811.3	57%	
MdEGLP3		EGLP4A	NP_611813.1	49%	

As proteínas relacionadas em outros insetos foram identificadas através da análise InParanoid 8 como descrito no Material e Métodos.

Tabela Suplementar 3. Dados de expressão de genes que codificam transportadores de açúcar.

Nome	Número de Acesso	Expressão (TPM)							C
		A1	A2	M1	M2	P1	P2	P3	
MdSP1	XP_005186693.2	120.2	175.59	715.48	507.94	194.34	124.1	148.25	12.55
MdSP2	XP_005186692.1	1.58	0.83	106.49	236.38	5.97	1.01	3.18	0.93
MdSP3	XP_005186691.1	21.57	36.68	83.57	163.35	97.73	11.91	1.28	0.1
MdSP4	XP_005188849.1	20.33	23.56	32.32	36.98	90.77	79.76	65.95	1.17
MdSP5	XP_005188848.2	42.31	68.89	160.48	190.34	234.34	393.02	582.87	21.07
MdSP6	XP_005186709.1	49.86	91.07	170.49	85.88	199.16	246.84	447.88	20.53
MdSP7	XP_005186707.1	39.59	61.34	246.9	304.58	121.76	155.9	311.18	11.97
MdSP8	XP_005183299.1	27.64	45.7	43.49	54.46	112.73	225.63	287.86	29.36
MdSP9	XP_011293829.1	20.82	27.48	60.28	22.7	56.36	97.37	181.08	4.23

Detalhes como descrito na Tabela 2. Dados publicados em "Pimentel et al. 2018"

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Ignacio Granja Barroso

Madrid, España, 10/12/1981

EDUCAÇÃO

2014 - 2019, Doutorado em andamento em Bioquímica.

Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ - USP), São Paulo, Brasil.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Orientador: Walter Ribeiro Terra.

2006 - 2013 Licenciatura en Biología.

Facultad de Biología - Universidad de Alcalá de Henares (UAH), Alcalá de Henares, España

2003 - 2005 Escuela de Técnicos Especialistas de Laboratorio

Fundación Severo Ochoa - Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, España

PUBLICAÇÕES

Pimentel A. C., **Barroso I. G.**, Ferreira J. M. J., Dias R. O., Ferreira C., Terra W. R. 2018. Molecular machinery of starch digestion and glucose absorption along the midgut of *Musca domestica*. J Insect Physiol. 109, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.009>

Terra W. R., **Barroso I. G.**, Dias R. O., Ferreira C. 2019. Molecular Physiology of Insect Midgut. Adv Insect Physiol. In Press, Corrected Proof. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2019.01.004>

Barroso I. G., Dias R. O., Ferreira C., Terra W. R. 2017. Molecular Bases of Nutrient Absorption, Fluid Fluxes and Buffering in the Midgut of *Musca domestica*. 46th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ)

Barroso I. G., Santos C. S., Fuzita F. J., Bertotti M., Ferreira C., Terra W. R. 2018. Acidification and Alkalization along the Larval Midgut of *Musca domestica*: a Molecular View. 20th European Congress of Entomology (ECE).