

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

BÁRBARA BACELAR NASCIMENTO

**Análise do transcriptoma intestinal do Hemiptera
Dysdercus peruvianus orientada fisiologicamente**

Versão corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

07/05/2019

BÁRBARA BACELAR NASCIMENTO

**Análise do transcriptoma intestinal do Hemiptera
Dysdercus peruvianus orientada fisiologicamente**

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo
2019

Aos meus pais e ao meu irmão Thales

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo por terem me proporcionado a oportunidade de estudar nessa instituição.

Ao Professor Dr. Walter Terra, por toda a orientação e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Bioquímica de Insetos. Agradeço também a sua enorme facilidade e paciência para ensinar. Isso foi fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

A professora Clélia Terra, pela orientação.

Aos técnicos de laboratório Christiane Cardoso, Gilliard Faria e a auxiliar de laboratório Maria Ivanilde Marcelino, por propiciarem um ambiente agradável para o trabalho, além de tornar a pesquisa possível com o trabalho realizado por vocês.

Aos companheiros de laboratório, Renata O. Dias, Vitor M. Almeida, Felipe A. Otsuka, Felipe J. Fuzita, Ignacio G. Barroso, Maíra A. Frutuoso, Ticiane Damasceno, por sempre tornarem o ambiente agradável e pela disposição em ajudar. Em especial ao Rafael A. Chagas, pelo companheirismo, amizade e boas conversas.

Aos meus pais pelo apoio que sempre demonstraram na busca de meus sonhos, na mudança de cidade e no ingresso em uma nova Universidade. Além de todo o carinho, amor, suporte e dedicação que sempre tiveram comigo.

Ao meu irmão, que mesmo longe, se faz presente. Obrigada por tantas palavras carinhosas e engraçadas em todas as ligações.

Ao Bruno, por ter feito a jornada em São Paulo mais fácil e prazerosa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de Mestrado e a FAPESP, INCT-EM, CAPES e CNPq pelo apoio à pesquisa.

RESUMO

Nascimento, B. B. **Análise do transcriptoma intestinal do Hemiptera *Dysdercus peruvianus* orientada fisiologicamente**. 2019. 68p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As espécies de insetos do gênero *Dysdercus* são conhecidas por causar prejuízos à agricultura. O estudo do funcionamento da fisiologia do intestino de insetos desse gênero pode levar à identificação de possíveis alvos moleculares para proposta de novos métodos de controle de insetos. Neste trabalho, foram identificados e localizados sítios de expressão das sequências de enzimas digestivas principais e também de transportadores potencialmente envolvidos na absorção de nutrientes, íons e água ao longo do intestino, a partir de dados transcriptômicos. Para isso foi feita uma identificação e anotação de proteínas por bioinformática a partir do transcriptoma de *D. peruvianus* e foi analisada a expressão gênica dessas proteínas ao longo do intestino médio. Foram identificados transportadores e enzimas envolvidos no processo de digestão e a expressão diferencial desses foi determinada e analisada. O ensaio com as enzimas α -galactosidase e α -N-acetil-D-galactosaminidase demonstrou que ambas enzimas estão presentes no inseto, sendo que a primeira é mais expressa no intestino e a segunda é típica de carcaça, permitindo a identificação de suas sequências. A análise das enzimas envolvidas na formação de diacilglicerol mostrou que provavelmente a via mais utilizada consiste na acilação do monoacilglicerol a diacilglicerol, para ser levado a lipoforina circulante na hemolinfa. Os dados resultaram na elaboração de modelo de organização de processo digestivo e absorptivo no intestino de *D. peruvianus*.

Palavras-chave: *Dysdercus peruvianus*, análise de transcriptoma, absorção de nutrientes.

ABSTRACT

Nascimento, B. B. **Physiologically-oriented Hemiptera *Dysdercus peruvianus* midgut transcriptoma analysis**. 2019. 68p. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Insect species of the genus *Dysdercus* are known to cause damage to agriculture. The study of the functioning of insect midgut physiology of this genus can lead to the identification of possible molecular targets for the proposal of new methods of insect control. In this work, expression sites of the sequences of the main digestive enzymes and of transporters potentially involved in the absorption of nutrients, ions and water along the intestine were identified and located from transcriptomic data. For this, a bioinformatics identification and annotation of proteins was made from the transcriptome of *D. peruvianus* and the gene expression of these proteins were analyzed along the middle gut. Transporters and enzymes involved in the digestion process were identified and the differential expression of these was determined and analyzed. The enzymatic assay of α -galactosidase and α -N-acetyl-D-galactosaminidase demonstrated that both enzymes are present in the insect, the former being more expressed in the midgut and the second is typical of carcass, allowing the identification of their sequences. Analysis of the enzymes involved in the formation of diacylglycerol showed that the most commonly used pathway is probably the acylation of monoacylglycerol to diacylglycerol, to be taken to circulating lipoforin in hemolymph. The data resulted in the elaboration of a model of the organization of digestive and absorptive process in the midgut of *D. peruvianus*.

Keywords: *Dysdercus peruvianus*, transcriptome analysis, nutrient absorption.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: Aminoácido.

AE: Trocador Aniônico (Cl⁻/HCO₃⁻).

Aq: Aquaporina.

BIB: Proteína Neurogênica Grande de Cérebro

CA: Anidrase Carbônica.

CAT: Transportador de Aminoácidos Catiônicos.

CCC: Cotransportadores Cátion Cloreto.

DRIP: Proteína Integrante de *Drosophila*.

EGLP: Entomogliceroporina.

FA: Ácido graxo

FATP: Proteínas Transportadora de Ácidos Graxos Longos.

GLUT: Transportador de Glicose.

KCC: Cotransportador Potássio:Cloreto (1:2).

LR: Receptor de Lipoforina.

NAAT: Transportador de Aminoácidos acoplado à Sódio.

NKA: Sódio/Potássio ATPase.

NHE: Trocador Sódio/Próton.

NKCC: Cotransportador

Sódio:Potássio:Cloreto (1:1:2).

PAT: Transportador de Aminoácidos acoplado à Prótons.

PRIP: Proteína Integrante de *Pyrocoelia rufa*.

SP: Transportador de açúcar.

TRET: Transportador de Trealose.

XylIE: D-Xilose-próton simporter de *E. coli*.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1 <i>Dysdercurs peruvianus</i>	8
1.2 Enzimas digestivas e sítios de absorção no intestino de <i>D. peruvianus</i>	9
1.3 Características moleculares a serem usadas na identificação das enzimas digestivas.....	12
1.4 Transporte através de membrana	14
1.4.1 Transportadores de peptídeos e aminoácidos	15
1.4.2 Transportadores de carboidratos	17
1.4.3 Transportador de lipídeos	18
1.4.4 Transportadores de íons.....	18
1.4.5 Canais.....	20
1.4.6 Aquaporina.....	22
1.4.7 Bombas.....	23
1.5 Sequenciamento.....	23
2. Objetivos	25
3. Metodologia	26
4. Resultados	30
4.1 Enzimas	30
4.2 Transportadores de aminoácidos e peptídeos.....	39
4.3 Transportadores de carboidratos	41
4.4 Transporte de lipídios e enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos.....	44
4.5 Transporte de água e íons.....	47
5. Discussão	56
5.1 Organização do processo digestivo em <i>D. peruvianus</i>	56
5.2 Modelo do processo absorptivo no intestino de <i>D. peruvianus</i>	56
6. Conclusão	59
Bibliografia	60
Apêndice	

1. Introdução

1.1. *Dysdercus peruvianus*

De todo o reino animal, o táxon Insecta é o mais presente, representando 66% de todas as espécies descritas, sendo o grupo que obtve melhor sucesso durante a evolução (Zhang, 2011). Seu sucesso evolutivo é atribuído a sua enorme diversidade e capacidade de adaptação a diversos ambientes, desenvolvimento de asas, desenvolvimento da metamorfose, grande repertório químico composto por feromônios e secreções tóxicas de defesa (Grimald et. al., 2005).

A ordem hemiptera é a mais diversa dentre os insetos não-holometábolos. Ela se divide em Homoptera, que se alimentam de seiva vegetal e são divididos em duas subordens, Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) e Sternorrhyncha (pulgões e cochonilhas); e Heteroptera (percevejos), que são adaptados a diferentes dietas (Goodchild, 1966).

As espécies do gênero *Dysdercus* da ordem Hemiptera são conhecidas por causar prejuízos à agricultura. Eles são praga da cultura de algodão pois sugam os frutos jovens e sementes, causando retardamento do fruto, além de depositar seus dejetos nas fibras do algodão, manchando-as, diminuindo seu valor comercial (Pereira et al., 2006).

O intestino de *D. peruvianus* é dividido em quatro seções, V1, V2, V3 e V4, conforme mostrado na Figura 1. Porém, hoje no laboratório se trabalha com apenas três divisões, sendo V3 e V4 considerados apenas como V3 (Silva e Terra, 1994).

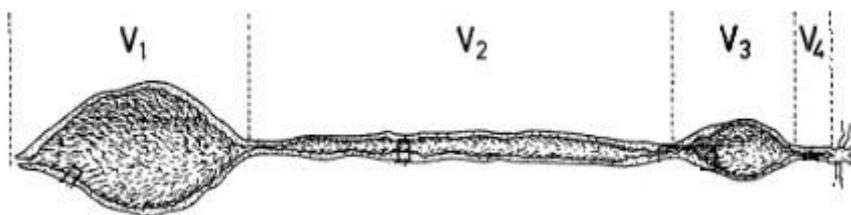


Figura 1 - Esquema do intestino médio de *D. peruvianus* (Silva and Terra, 1994)

As células intestinais de *D. Peruvianus* possuem uma membrana que reveste as microvilosidades como se fossem dedos de luva (Figura 2). Essa membrana é chamada de membrana perimicrovilar e é formada quando vesículas com duas membranas originadas de setor de golgi com duas membranas fundem-se no topo da célula. A membrana externa une-se à membrana microvilar e a interna à membrana perimicrovilar (Silva et al., 1995). As membranas perimicrovillares possuem uma enzima marcadora (α -glicosidase, Silva et al., 1996) que foi caracterizada, purificada e um anticorpo gerado contra ela mostrou a presença de enzimas imunologicamente semelhantes nas membranas perimicrovillares (ou análogas) de todos os insetos das ordens Hemiptera e Thysanoptera (Silva et al., 2004).

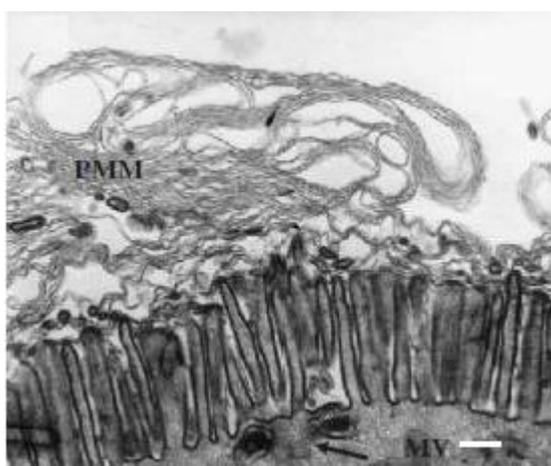


Figura 2 - Membranas perimicrovilar e microvilar de células intestinais em *D. Peruvianus* (Silva and Terra, 1996)

1.2. Enzimas digestivas e sítios de absorção no intestino de *D. Peruvianus*

Uma série de enzimas digestivas foram ensaiadas em *D. Peruvianus*

anteriormente. Elas estão listadas na Tabela 1. Os resultados para α -galactosidase foram retirados de Silva and Terra (1997) e de Silva and Terra (1994) para as outras enzimas.

Tabela 1 - Atividades enzimáticas (% total) ao longo do intestino de *D. peruvianus*

Enzima	V1	V2	V3
Aminopeptidase	60,4	27,7	10
Amilase	48,4	29,8	21,5
α -Galactosidase	67	24,2	8,4
β -Glicosidase	42,1	33,2	24,3
α -Glicosidase	65,9	28,5	4,8
α -Manosidase	58	35,5	6,5
Cisteína endopeptidase	25,5	47,8	25,6

Uma α -glicosidase ligada a membrana perimicrovilar foi purificada e caracterizada (Silva and Terra, 1995), assim como uma aminopeptidase (Costa et al., 2011) e uma α -galactosidase (Silva and Terra, 1997). Contudo, nenhuma dessas enzimas teve a sua sequência primária definida.

Alimentando insetos com soluções de glicose ou leucina e um corante não absorvível (azul de Evans) e a seguir acompanhando a concentração do corante (para medir absorção de água) e a razão glicose/corante e leucina/corante para medir a absorção desses compostos, verificou-se que a maior parte da água e açúcar é absorvida em V1 e a absorção de leucina é majoritária em V2 e V3 (Silva and Terra, 1994). Nenhuma molécula transportadora de nutrientes, íons ou água foi identificada no intestino de *D. Peruvianus*, exceto um transportador de açúcar do tipo GLUT e fragmento supostamente pertencente a SGLT que foram supostos estarem relacionados, respectivamente, com um transporte de açúcar inibível por floreína e florezina.

1.3. Características moleculares a serem usadas na identificação das enzimas digestivas

Amilases (EC3.2.1.1) são enzimas que hidrolisam ligações internas em α -(1-4)-D-glicosídeos em polissacarídeos (amido ou glicogênio) e caracterizam-se por possuir além dos grupos catalíticos, sítios ligantes de íons cálcio e cloreto e pertencem à família GH13.

α -glicosidases são enzimas que realizam a hidrólise de α -1,4-glucanas a partir do terminal não redutor de resíduos de α -D-glicose, liberando α -D-glicose. As α -glicosidases de insetos (EC 3.2.1.20) hidrolisam também ligações entre os resíduos de sacarose e frequentemente também α -1,6. Dessa forma elas podem terminar a degradação de amido (ou glicogênio) iniciadas pela amilase. α -glicosidases de insetos pertencem à família GH13, como as amilases, e são diferentes daquelas de mamíferos que pertencem à família GH31. Como elas não têm assinaturas próprias, a sua pesquisa requer usar a assinatura das amilases e a seguir por alinhamento separá-las das amilases, já que elas não tem os motivos ligantes completos de cálcio e cloreto.

β -Glicosidases fazem a hidrólise de terminal não-redutor de resíduos D-glucosídeos, liberando β -glucose. Elas pertencem a grande família das glicosil hidrolases 1 e possuem a assinatura F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA]-x-[GSTA](2)-[FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA] (PROSITE - <https://prosite.expasy.org>).

α -Manosidases são enzimas que promovem a hidrólise de um resíduo α -D-manose de terminal não redutor de α -D-manosídeos (Expasy Enzymes - <https://enzyme.expasy.org/>). Essas enzimas são classificadas em duas classes, de acordo com sua localização celular e seu pH ótimo: manosidases da classe I são

encontrados no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático, hidrolizam ligação de manose α -1,2 e pertencem a família 47 das glicosil hidrolases; já as manosidases da classe II são encontradas no lisossomo e citosol, hidrolisam ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6, e pertencem a família 38 das glicosil hidrolases (Paciotti et al., 2017).

Existem alguns relatos de manosidases de insetos que são atuantes na digestão (Silva and Terra, 1994; Terra et al., 1998; Foster and Roberts, 1997; Bedikou et al., 2009).

α -N-acetil-D-galactosaminidases (NAGA) são enzimas que clivam o terminal não redutor α (1-3) de cadeias formadas por resíduos de N-acetilgalactosamina (Expasy Enzymes - <https://enzyme.expasy.org/>). As **α -galactosidases** hidrolisam o terminal não redutor de resíduos de α -D-galactoses de α -D-galactosídeos. Elas também podem hidrolisar α -D-fucosídeos, porém com menor eficiência (Expasy Enzymes - <https://enzyme.expasy.org/>). Ambas enzimas são pertencentes à mesma família e possuem a mesma assinatura, G-[LIVMFY]-x(2)-[LIVMFY]-x-[LIVM]-D-[DF]-x(1,2)-W-x(3,7)-[RV]-[DNSF], sendo D140 e D201 (referência em Q90744 – *Gallus gallus*) pertencentes ao sítio catalítico (PROSITE - <https://prosite.expasy.org/>). Devido a isso, diferenciar essas enzimas apenas pela sequência primária é difícil e isso foi demonstrado por Kulik, et al. (2010), que se baseou no genoma do fungo *Aspergillus niger*. Neste genoma, cinco genes haviam sido atribuídos anteriormente a codificação de α -galactosidases, porém, ao expressar esses genes, foi descoberto que dois deles codificavam α -N-acetilgalactosaminidases.

Anidrase carbônica e trealose-6-fosfato sintase fosfatase não são enzimas digestivas, mas são importantes para os propósitos deste trabalho e por isso são apresentadas aqui. Anidrase carbônicas (CA) promovem a hidratação de um dióxido

de carbono a um ácido carbônico, que espontaneamente se dissocia em hidrogenocarbonato e cátion em pH neutro. A assinatura da α -CA é S-E-[HN]-x-[LIVM]-x(4)-[FYH]-x(2)-E-[LIVMGA]-H-[LIVMFA](2) (PROSITE). Existem seis famílias dessa enzima e todas são metaloenzimas, sendo o Zn^{2+} o metal mais comumente utilizado (Emameh et al., 2016). Trealose-6-fosfato sintase fosfatase promove a união de uma UDP-D-glicose com D-glicose-6-fosfato, formando trealose-6-fosfato. Essa mesma enzima em insetos possui também atividade fosfatase, removendo o fosfato da trealose por hidrólise, formando a trealose. Em mamíferos, essas duas atividades são realizadas por duas enzimas diferentes (EC: 3.1.3.12 e EC: 2.4.1.15), porém em insetos, com exceção a ordem Diptera, existe apenas uma enzima que exerce as duas funções: sintase e fosfatase (Dias et al., em preparação).

Lipases promovem a hidrólise de triacilgliceróis a diacilglicerol mais carboxilato. A reação pode proceder até a hidrólise total em ácidos graxos e glicerol. Possuem a assinatura [LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC], sendo S pertencente ao sítio catalítico.

O metabolismo de ácidos graxos em insetos é feito de forma diferente que de vertebrados. A lipoforina é a proteína transportadora de lipídeos em insetos e o lipídeo predominante é o diacilglicerol (DAG). De forma geral, insetos ingerem triacilgliceróis (TAG) como maior fonte de lipídeos. Estes precisam ser convertidos a diacilgliceróis para serem enviados a uma lipoforina circulante na hemolinfa através de um receptor de lipoforina. Existem dois modelos que propõem o funcionamento desse sistema: a completa hidrólise de TAG a glicerol e ácidos graxos por meio de lipases ou a formação de ácidos graxos e monoacilglicerol (MAG). A formação de DAG poderia ser feita pela acilação de MAG ou pela

síntese de novo pela via ácido fosfatídico utilizando os ácidos graxos como substrato (Arrese et al., 2001). A figura a seguir ilustra essas duas possibilidades.

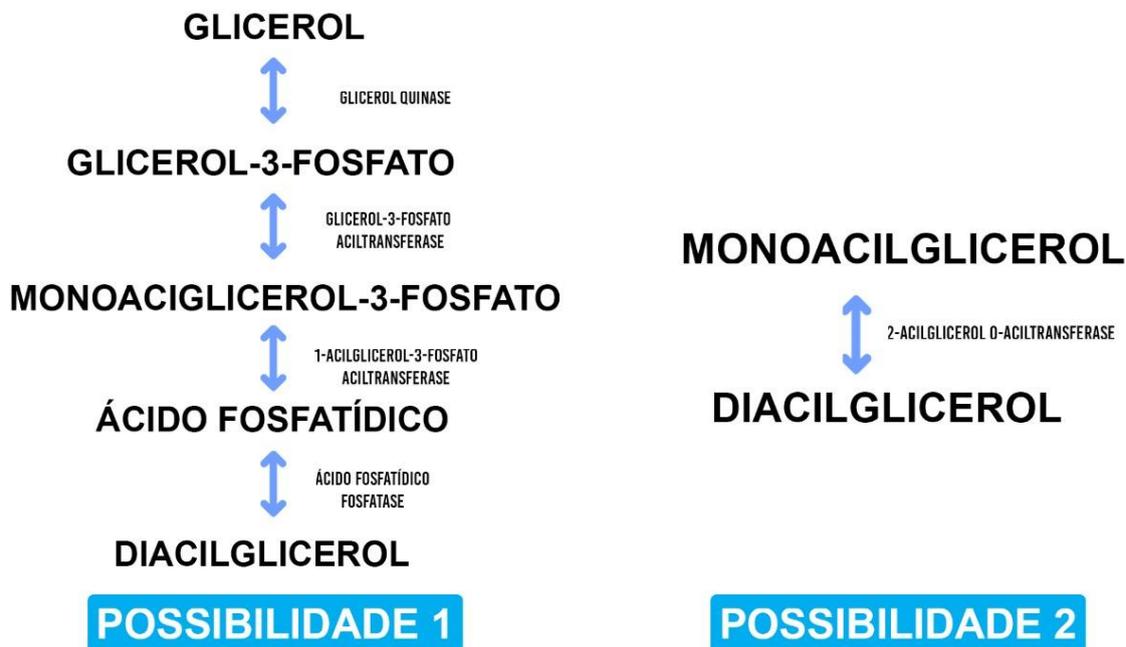


Figura 3 - Possibilidades de formação de diacilglicerol

1.4. Transporte através de membranas

O transporte através de membranas ocorre por proteínas do tipo canal e transportadoras, sendo que todas elas transportam solutos de um lado da membrana ao outro. As proteínas transportadoras ligam o soluto a ser transportado, passam por modificações conformacionais e entregam o soluto no outro lado membrana. Já as proteínas de canal ligam-se mais fracamente ao soluto e formam poros que permitem a passagem do soluto específico de forma não saturável (Alberts et al., 2015).

Em relação as proteínas transportadoras, existem três tipos de transporte: ativo primário, ativo secundário e passivo. No transporte ativo primário, ocorre gasto de ATP para que uma molécula seja transportada. No transporte ativo

secundário, o transporte de substrato ocorre mediante a formação de um gradiente por um transporte ativo primário. No transporte passivo, a passagem de substratos ocorre a favor do gradiente eletroquímico, sem gasto de ATP (Alberts et al., 2015). Classificações mais específicas são feitas em função dos substratos e uma boa referência para isso é o Banco de Dados de Transportadores TCDB – Transporter Classification Database (www.tcdb.org).

1.4.1. Transportador de aminoácidos e peptídeos

Transportadores de peptídeos (PEPT) funcionam como um simportador de próton/peptídeo e podem transportar praticamente todos os di- e tri-peptídeos possíveis (Daniel, 2004). De forma geral, estes transportadores possuem baixa afinidade pela cadeia lateral de aminoácidos e em eucariotos, existe, aparentemente, apenas um sistema transportador de peptídeos. Existe um motivo conservado de fosforilação na subfamília 1 [(S,T)X₂](D,E) e a assinatura das proteínas FYXXINXGSL da família PTR (peptide transporters emerge) também é encontrado (Steiner et al., 1995).

Transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) transportam L-aminoácidos catiônicos de maneira independente de Na⁺ e de pH, transportando principalmente L-arginina, L-ornitina, L-histidina e L-lisina. Essas proteínas geralmente possuem 12-14 regiões transmembrana (Closs et al., 2006).

Transportadores de aminoácidos acoplados a próton (PAT) transportam pequenos aminoácidos zwitteriônicos como glicina, L/D-prolina, D-cisteína, L/D-alanina, além de transportar neurotransmissores, como GABA e análogos (Anderson et al., 2004) (Alexander et al., 2015).

Segundo Miller et al (2008), **transportadores de aminoácidos**

dependentes de Na⁺ (NAAT) foram encontrados no epitélio absorptivo do canal alimentar de humanos e insetos, sugerindo papel primário na absorção de aminoácidos. Possui estequiometria sódio:aminoácido de 1:1 e transporta preferencialmente fenilalanina e metionina, além de outros aminoácidos neutros. Possui um possível sítio de glicosilação localizado entre a terceira e quarta região transmembrana. Tendo como referência NAT1 de *D. melanogaster*, os motivos G54LG e F312FS, e o resíduo S417 estão envolvidos na ligação e translocação do substrato.

1.4.2. Transportadores de carboidratos

Transportadores de glicose (GLUT) transportam principalmente glicose, mas também outros açúcares de forma passiva. Existem 14 famílias de GLUT em humanos, cada um transporta diferentes substratos e possuem diferentes particularidades (Alexander et al., 2015). Os GLUT de insetos possuem muitas similaridades com os GLUT de humanos, possuindo vários resíduos conservados, conforme mostrados na tabela a seguir, que contém um representante para cada classe.

Tabela 2 - Resíduos importantes em GLUT

Transportador	Resíduo	Função	Referência
GLUT 1	F72, G75, G76, G79, S80, S66, R126, E146, K256, R333	Estrutural	Olsowski et al., 2000 Wang et al., 2000
	M96, S106, G111, V165, T310	Transporte	Mueckler and Makepeace, 1997 Mueckler and Makepeace, 2004 Klepper et al., 2001
	V166, G167, A171, Q172, Q161LS	Estrutural, afinidade do transporte	Mueckler and Makepeace, 1999
	A275, L278, L280, S285, F291, Y292, Q279, Q282Q283	Estrutural, Transporte	Kasahara and Kasahara, 1998
	G286, N288, F379, E380, G382, P383, G384, P385, M420		Hruz and Mueckler, 1999
	I386, F389, I369, V370, I372, A377, N411, N415, F422		Olsowski et al., 2000 Hashiramoto et al., 1992
	G91	Ponto de ancoragem citoplasmática	Klepper et al., 2001
	GLUT4	Y134, Y293	Transporte
R92, R333R334, E146, R153, E329, E393, R400		Estrutural/Pontes salinas	Schürmann et al., 1997
GLUT 5	Y32, H387, A396, H419, S392, E337, Y383, I296, R98	Estrutural, Ligação, Pontes salinas	Nomura et al., 2015
	R408, E401, R159, R341		
XylE	Q175, E222, S223, G340	Transporte, Estrutural	Sun et al., 2012

Transportadores de trealose (TRET) fazem o transporte do açúcar trealose e também de outros solutos. A trealose é sintetizada principalmente no corpo gorduroso dos insetos e é o principal açúcar presente na hemolinfa. A troca de trealose entre corpo gorduroso e outros tecidos ocorre para manter níveis de trealose na hemolinfa e é feita por transportadores de trealose (Kanamori et al., 2010).

Existem vários resíduos conservados nos TRETs que são também conservados em algumas classes de GLUTs, como um resíduo de G presente em cada um dos domínios transmembrana 1, 4, 5, 7, 8 e 10 são encontrados na família GLUT/SLCA2 e nos TRETs (Kanamori et al., 2010). Todos os TRETs analisados

por Kanamori et al. (2010) apresentaram possível sítio de N-glicosilação (N-X-T/S) no loop1. O resíduo W e o motivo QLS conservado em GLUT/SLC2A envolvidos na seleção do substrato e transporte também foram encontrados em todos os TRETs analisados. Isso mostra que os TRETs possuem sequência primária e, possivelmente, secundária ou terciária parecida com os GLUTs.

1.4.3. Transportador de lipídeos

Transportadores de ácidos graxos longos (FATP) auxiliam na captação de ácidos graxos longos, principalmente quando estes estão em grandes concentrações. Predições transmembrana utilizando a sequência primária de aminoácidos são difíceis para essa proteína, pois ela possui alto conteúdo hidrofóbico visto que precisa interagir com ácidos graxos. A sequência primária é muito similar em toda a família de FATP (Stahl, 2004). Essas proteínas contêm uma região equivalente aos resíduos de aminoácidos 246-557 em FATP1 de *Mus musculus*, que contêm três regiões bem conservadas. Também existe uma pequena região Y-I-Y/F-T-S-G-T-T-G que é sítio de ligação a AMP, o que também é encontrado em várias outras proteínas como acil-CoA sintetase e ligases de coenzima A (Hirsch et al., 1998).

1.4.4. Transportadores de íons

Trocadores Na^+/H^+ (NHE) funcionam na estequiometria 1:1 e são ditos envolvidos em manutenção do pH intracelular e volume celular. Em mamíferos são conhecidas nove isoformas, nomeadas de NHE1-9 (Guffey et al., 2015). Esses transportadores são movidos por gradiente eletroquímico e não utiliza ATP. Em condições fisiológicas normais, o gradiente de Na^+ é realizado pela Na^+/K^+ -ATPase e a presença de muito H^+ no citoplasma age como modificador alostérico do transportador (Wakabayashi et al., 1997).

Em termos de estrutura, Slepko et al. (2007) diz que os NHEs normalmente

possuem 12 regiões transmembrana e existem vários resíduos requeridos para transporte do íon, inibição do ligante e/ou expressão ou alvo do trocador já descritos que estão resumidos na tabela a seguir. A tabela 2 mostra os resíduos, mutações feitas e o efeito dessas mutações. Alguns inibidores utilizados são EIPA (5-N-etil-N-isopropilamilorida), HOE 694 (3-metilsulforil-4-piperidinobenziol guanidina metanossulfato) e MPA (2-trimetilamônio-etilmetanotiosulfonato de bromo).

Tabela 3 - Resíduos importantes em NHE (Slepkov et al., 2007)

Aminoácido	Mutação	Efeito da mutação
G148	G - A	Aumenta K_i para EIPA
P153/154	P - S/P - F	Aumenta K_i para EIPA e diminui o transporte
F161/162	F - C/F - S	Aumenta K_i para MPA e amiloride, diminui o transporte
L163	L - F, A, R, T	Aumenta K_i para MPA, amiloride e HOE 694, elimina o transporte de Na^+/H^+
P167/168	P - G, A, C	Diminui o transporte de Na^+/H^+ , a expressão e a ligação a membrana plasmática
G174	G - S, D	Aumenta K_i para amiloride e HOE 694
R180	R - C	Tratamento com MTSET diminui a atividade
Q181	Q - C	Tratamento com MTSET diminui a atividade
E262	E - N	Elimina o transporte de Na^+/H^+
D267	D - N	Elimina o transporte de Na^+/H^+
H349	H - G, L	Aumenta K_i para amiloride
E346	E - N	Aumenta K_i para HOE 694 e EIPA, diminui o transporte
G352	G - A, S, N	Aumenta K_i para EIPA, diminui o transporte
E391	E - Q	Diminui o transporte de Na^+/H^+
R440	R - C, L, H, N, E, K	Desloca a dependência do pH para o lado ácido
Y454	T - C	Retida no retículo endoplasmático
G455/456	G - A, N, S, R	Desloca a dependência do pH para o lado alcalino
R458	R - C	Retida no retículo endoplasmático

Cotransportadores de K^+ , Na^+ e Cl^- (NKCC) e cotransportadores de K^+ e Cl^- (KCC) são pertencentes à família CCC (cotransportadores de cloreto e cátion) e são transportadores passivos. Existem dois tipos de NKCC, NKCC1 e NKCC2. O NKCC1 é maior, possui N-terminal bastante divergente entre as diferentes espécies e possui ao menos um sítio de fosforilação nessa região e, geralmente, é composto por 12 regiões transmembrana. O NKCC2 está envolvido na homeostase em

mamíferos e tem estrutura muito semelhante ao NKCC1 (Russel, 2000).

Existem quatro tipos de KCC, denominados KCC 1-4, que permitem a passagem de Cl^- e K^+ na estequiometria de 2:1. Eles estão envolvidos no controle de volume celular. Todas as isoformas compartilham de algumas características estruturais, tais como domínio N-terminal e C-terminal citoplasmáticos, porém há diferença entre as afinidades por seus substratos e também na resposta de controle ao volume celular (Lauf and Adragna, 2000).

Trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) funcionam em ação conjunta com a enzima anidrase carbônica. A enzima faz a hidratação do gás carbônico e esse sai da célula pelo auxílio do trocador e entra um cloreto, na estequiometria 1 HCO_3^- : 1 Cl^- (Alexander et al., 2015). Os AEs também podem transportar OH^- e H^+ no lugar de Cl^- e o AE1 pode transportar SO_2^- , porém em uma taxa bem menor (Romero et al., 2013).

Em humanos, AE1 possui um sítio de ligação à anidrase carbônica. Esse sítio, D887ADD é parcialmente conservado em mamíferos (Vince e Reithmeier, 2000).

Foi descrito por Foller et al. (2017) que o motivo AAVIFIYFAA não está presente em indivíduos portadores de ovalocitose, portanto esse motivo deve ser importante para o funcionamento do transportador. Este motivo foi encontrado nas sequências analisadas.

1.4.5. Canais

Canais de sódio fazem a mediação do transporte de sódio e são inibidos por amiloride. Estudos de mutações sítio-dirigida feitas por Sheng et al. (2000) no canal de sódio αEnaC1 de camundongos mostraram que a substituição do resíduo L575C

(leucina para cisteína) causou diferença na constante de inibição por amiloride. Cinco mutantes feitos demonstraram ser importantes para a seletividade do cátion, são eles: S580C, W582C, L584C, F586C e S592C. Além disso, os mutantes G587C e S589C permitiram a passagem de K^+ , indicando que mais de um resíduo está envolvido na seletividade do íon.

Zelle et al. (2013) mostram que os canais de sódio do tipo Degenerin/Epithelial (DEG/EnaC) de *Drosophila melanogaster* possuem diversas características em comum com diferentes espécies, como duas regiões transmembrana, um loop rico em cisteínas e um resíduo denominado “deg”, na qual sua mutação leva a abertura constitutiva do canal em alguns canais. Apesar disso, a sequência primária é muito variada entre espécies.

Canais de potássio fazem a mediação de potássio entre espaço intra e extracelular. São proteínas alostéricas que mudam de conformação (aberta e fechada) em resposta a estímulos externos. Existem vários tipos de canais de potássio, podendo ser do tipo que muda de conformação por ação de um ligante ou por voltagem, e pode ainda, ter dois ou seis segmentos transmembrana. Sendo assim, há muitas diferenças na sequência primária de aminoácidos entre esses canais e entre as diferentes espécies, além dos mecanismos para abertura e fechamento do canal serem diferentes. Mesmo assim, Jiang et al. (2002) sugere em seu artigo que há alguns resíduos conservados no filtro de seleção, que para o canal de potássio ativado por cálcio de *Methanothermobacter thermautotrophicus* é TVGYGD e a dobradiça do portão é feita por uma glicina (G83 no mesmo organismo).

Canais de cloreto permitem a difusão passiva de íons cloro a favor de um gradiente eletroquímico. São encontrados em células procarióticas e eucarióticas e,

na maioria dos casos, sua função é ainda desconhecida. Os canais contêm duas subunidades idênticas e cada subunidade possui 18 α -hélices e tem topologia complexa. O filtro de seletividade é bem conservado, com os resíduos G106SGIP, G146(K/R)EGP e G335XFXP e Y445, com referência em *Escherichia coli*, participantes do filtro de seleção (Dutzler et al., 2002).

1.4.6. Aquaporina

Proteínas canal de água são divididas em três subfamílias: aquaporinas, aquagliceroporinas ou facilitadoras de glicerol e superaquaporinas. Todas as aquaporinas possuem como assinatura dois motivos NPA. As aquaporinas permitem a passagem apenas de moléculas de água. As aquagliceroporinas permitem a difusão de água e pequenas moléculas não carregadas, principalmente glicerol e possuem, um ácido aspártico ao final do segundo motivo NPA, o que aumenta o poro para permitir a passagem de outras moléculas. As superaquaporinas são aquelas que se diferenciam na sequência de aminoácidos em torno dos motivos NPA e que não se classificam nas duas famílias anteriores (Benga, 2012).

As aquaporinas de insetos já foram muito bem estudadas e possuem uma classificação um pouco diferente, sugerida por Finn et al. (2015). Isso ocorre porque as aquagliceroporinas não são encontradas em insetos holometábolos, embora estes tenham a capacidade de transportar glicerol. O que acontece é que o filtro de seleção normalmente composto por quatro argininas, é diferente nas aquagliceroporinas e não condiz com a sequência das aquaporinas de insetos. Estudos propuseram classificação em: Drip (*Drosophila* intrisec proteins) que transportam água, Prip (*Pyrocoelia rufa* integral proteins) que transportam água e ureia, Bib (big brain protein) que permite a passagem de água e cátions, Aqp12 que são as proteínas de insetos relacionadas à aquaporina 12 de vertebrados (atualmente

classificada como superaquaporina), e Eglp (entomogliceroporinas) que transportam glicerol e água, e são específicas para hexápodes.

1.4.7. Bombas

H⁺ ATPases fazem o bombeamento de prótons para fora da célula com gasto de ATP, gerando um gradiente eletroquímico e pode estar envolvido na manutenção do pH. São compostas de dois complexos: V1 (subunidades A-H) que contem o domínio catalítico que hidrolisa ATP, e V0 (subunidades a, c, c',c'',d) que forma o poro da membrana (Forgac, 2007).

A **bomba de sódio/potássio** promove a troca de sódio para fora da célula e potássio para dentro na estequiometria de 3 Na⁺: 2 K⁺, com gasto de ATP. Ela é composta por duas subunidades, α e β , sendo que a primeira possui dez regiões transmembrana. A subunidade β possui um motivo YYPYY que está envolvido na ligação com a subunidade α e, os resíduos Y40 e Y44 interagem com a região transmembrana 7 da subunidade α e são bem conservados (Shinoda et al., 2009).

1.5 Sequenciamento

O princípio do sequenciamento se baseia no método de Sanger, que foi desenvolvido por Frederick Sanger em 1977. Para isso, ele se utilizou da reação da polimerase em cadeia com modificações. Foi adicionado didesoxinucleotídeos (dd(A/T/G/C)TP) marcados radioativamente, que, ao serem adicionados pela polimerase, encerra o polímero de DNA, gerando fragmentos de diversos tamanhos. Ao final da reação, corre-se um gel de DNA e se faz a leitura do gel de cima para baixo, os menores fragmentos ficam na parte de baixo do gel e os maiores em cima. O gel deve ser grande o suficiente para separar os fragmentos com diferença de um nucleotídeo (Zaha et al., 2014).

Hoje em dia o processo foi melhorado e automatizado. Não se utiliza mais nucleotídeos radiativos, mas sim com marcadores fluorescentes. Cada ddNTP é marcado com um composto que emite fluorescência em comprimento de onda diferente. Assim, a reação é feita e aplicada em gel (placa ou capilar), os fragmentos são separados, um feixe de laser incide excitando os marcadores e a detecção é feita com auxílios de programas de computador, que montam a sequência (Zaha et al., 2014).

Mais recente ainda, usam-se tecnologias inovadoras chamadas sequenciamento de nova geração. Como exemplo, citam-se as tecnologias 454 e Illumina, ambas usadas nesse trabalho. A plataforma 454 foi a primeira a ser comercializada e se baseia na detecção por pirosequenciamento. Ao adicionar uma base, ATP é liberado e será convertido em pirofosfato pela enzima sulfúrilase. Esse por sua vez, será utilizado para oxidar a luciferina pela luciferase, emitindo luz, que é captado por uma câmera acoplada ao sistema (Carvalho e Silva, 2010).

Já o sequenciamento Illumina se utiliza de marcadores com diferentes fluoróforos e a inovação é na clonagem, o PCR é feito em fase sólida. Primeiramente é feita a ligação de adaptadores a “beads” e ocorrem ciclos de PCR, formando clusters de alta densidade, de forma que o sinal luminoso gerado é detectável pelo computador. Após a incorporação de cada nucleotídeo, a leitura é realizada (Carvalho e Silva, 2010).

As leituras feitas pela plataforma 454 possuem tamanhos de aproximadamente 700 pares de bases, porém as leituras apresentam problemas em regiões homopoliméricas. As leituras feitas pela plataforma Illumina possuem tamanho variáveis, podendo ser de 30 até 250 pares de bases. Elas não apresentam problemas com regiões homopoliméricas, porém tem problemas em regiões com

alto conteúdo GC. Dessa forma, ao juntar o sequenciamento feito pelas duas plataformas, consegue-se obter um maior número de leituras e os erros são minimizados.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral a proposição de um modelo de funcionamento do processo absorptivo de nutrientes no intestino em *D. peruvianus*, através de RNAseq. Especificamente:

- Identificar e localizar os sítios de expressão das sequências das enzimas digestivas principais, principalmente daquelas já estudadas enzimologicamente.
- Identificar e localizar os sítios de expressão dos principais transportadores potencialmente responsáveis pela absorção de nutrientes, íons e água ao longo do intestino a partir dos dados transcritômicos.
- Propor modelo funcional do processo digestivo e absorptivo de *D. peruvianus*.

3. Metodologia

Animais

Cultivo de insetos *Dysdercus peruvianus* são mantidas no laboratório desde 1990. Os insetos ficam mantidos em frascos plásticos, forrados com areia e tampados com pedaços de tecido de algodão presos por elásticos. Os insetos são alimentados com sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) previamente congeladas para eliminar contaminações por organismos. O acesso à água e a comida é livre.

As colônias são mantidas sob umidade relativa de 50-70%, a temperatura de 24 ± 2 °C e em condições de iluminação por 14 horas e escuro por 10 horas.

Dissecção de insetos e preparo de amostra

Fêmeas adultas de *D. peruvianus* foram imobilizadas em gelo e dissecadas com solução de cloreto de sódio 215 mM para separar o intestino médio da carcaça. Após a remoção do intestino, ele é dividido em três seções (V1, V2 e V3) e tudo aquilo que restou é dito carcaça.

Cada lote de ventrículos foi homogeneizado em água MiliQ com o auxílio de homogeneizador Potter-Elvehjem. A carcaça foi homogeneizada em homogeneizador do tipo Skymesen Ta-02. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos à 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante utilizado para ensaio de atividades enzimáticas. Foram adicionados inibidores de proteases E-64 (1 µM), pepstatina A (1 µM) e Bestatina (5 µM) a cada preparação pronta.

Análise de bioinformática

Os transcritomas das três seções intestinais (V1, V2 e V3) e carcaça (corpo

inteiro, exceto o intestino médio) já estavam disponíveis no laboratório (Pimentel, 2017). Para essas análises foram utilizados dez insetos adultos para cada triplicata biológica, os quais foram mantidos em laboratório, alimentados em sementes de algodão e com amplo acesso a água. O RNA total para cada triplicata biológica foi extraído utilizando-se o protocolo Trizol® e tratado com DNase I (Invitrogen). O RNA total extraído foi enviado para sequenciamento em equipamento HiSeq 2500 (Illumina), usando a estratégia de pair-end (2x100pb), no Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

A montagem do transcriptoma e as análises de expressão foram conduzidas conforme descrito em Dias et al (2018). Nessa estratégia, as leituras provenientes do sequenciamento (em média 18.950.390 leituras por amostra) foram filtradas para a remoção de regiões de baixa qualidade e adaptadores, usando o software FASTX toolkit v 0.0.14 (Gordon and Hannon, 2010). Após a filtragem, essas leituras foram então utilizadas para a montagem dos transcritos utilizando-se uma combinação de montagens provenientes de dois softwares e com múltiplos tamanhos de k-mer (k) para cada: SOAPdenovo-Trans v. 1.03 (k de 21 a 91 em incrementos de 5; Xie et al., 2014) e ABySS v. 1.9.0 (k de 20 a 50 em incrementos de 5; Simpson et al., 2009). Os transcritos obtidos pelas duas estratégias foram então agrupados usando-se o software CAP3 (Huang e Madan, 1999) e tiveram sua sequência proteica predita utilizando-se o software FrameDP v. 1.2.2 (Gouzy et al., 2009).

As análises de expressão foram conduzidas conforme descrito em Dias et al. (2018). Nessa estratégia, as leituras obtidas e filtradas conforme descrito acima foram alinhadas ao transcriptoma de referência montado, utilizando-se o software Bowtie2 v. 2.2.4 (Langmead and Salzberg, 2012). O número de leituras por

transcrito foi obtido utilizando-se o software SAMtools v. 0.1.19 (Li et al., 2009). Os valores de expressão foram então normalizados usando a estimativa de transcrito por milhão (TPM; Wagner et al., 2012). Um heatmap com a distância estimada entre as amostras pelo método de Poisson, o qual foi gerado usando o pacote Bioconductor (linguagem R) é apresentado na seção resultados.

Com todas as sequências de aminoácidos de transportadores e enzimas obtidas, estas foram alinhadas contra sequências referência obtidas do UniProt (www.uniprot.org) utilizando Clustal (www.clustal.org) e foram procurados manualmente aminoácidos, motivos e/ou assinaturas conservados a fim de se obter maior grau de confiança para dizer se determina sequência codifica determinado transportador. Em alguns casos foi necessário verificar a presença de regiões transmembrana, que foi feito utilizando o servidor TMHMM v. 2.0 Server. Árvores foram feitas utilizando sequências bem estudadas, quando possível, e são obtidas do banco de dados de proteínas UniProt (www.uniprot.org) ou National Center for Biotechnology Information (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) e foi utilizado o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (Tamura et al., 2013). As árvores foram feitas utilizando o algoritmo Maximum Likelihood, bootstrap 1000.

Com o intuito de simplificar a análise das sequências proteicas, a expressão dos genes codificantes para o mesmo tipo de proteína foi usada para distinguir aquelas com menor relevância na fisiologia intestinal. Assim, genes cuja expressão em todas as seções do intestino e carcaça foi menor que 5% da expressão máxima do mesmo tipo de gene mais expresso foram eliminados.

Ensaio enzimáticos

O ensaio da enzima α -N-acetilgalactosaminidase foi feita a 30°C em solução

contendo tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0 e 25 μ mol de substrato p-nitrofenil N-acetil- α -D-galactosamino. A reação foi parada adicionando-se solução de alcalinização (2 mL de SDS 10%, 10 mL de tampão carbonato-bicarbonato e 8 mL de água bidestilada). Foi feita a leitura a 410 nm em leitor de placas Elx8000 Biotek.

O ensaio da enzima α -galactosidase foi feita a 30 °C em solução contendo tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0 e 5 mM de substrato p-nitrofenil α -D-galactosídeo. A reação foi parada adicionando-se solução de alcalinização (2 mL de SDS 10%, 10 mL de tampão carbonato-bicarbonato e 8 mL de água bidestilada). Foi feita a leitura a 410 nm em leitor de placas Elx8000 Biotek.

4. Resultados

No intuito de avaliar a distância estimada entre as amostras, carcaça e seções do intestino, foi feito um heatmap, que é mostrado a seguir. A partir dessa análise, pode-se perceber que os desvios padrões entre as amostras estão bons. Também é possível perceber que V1 e V2 se parecem mais entre si do que com V3, o que faz sentido fisiologicamente, já que V1 e V2 são localizados em sequência no tubo digestivo. Desvios de cada sequência estudada se encontram no Apêndice 1.

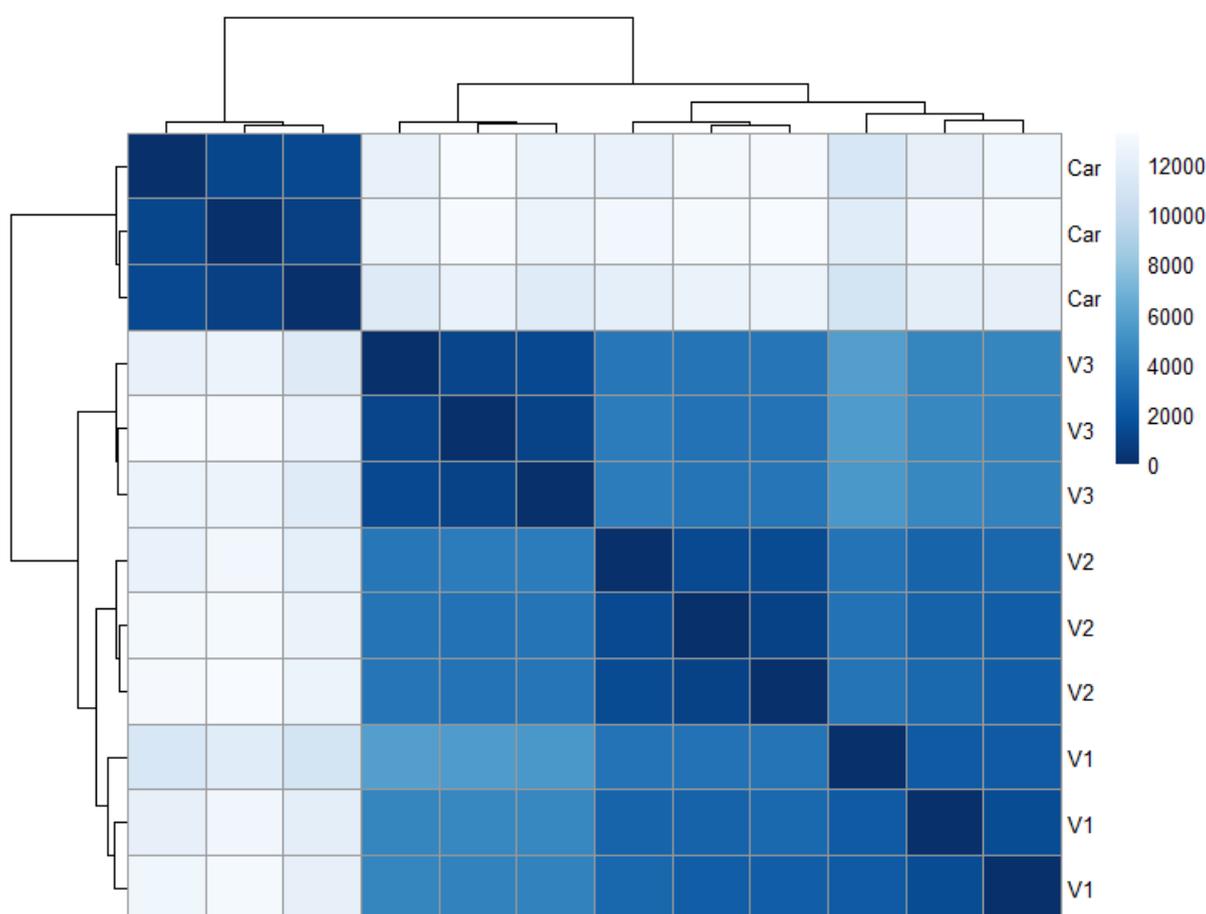


Figura 4 - Distância entre amostras de *D. peruvianus*

4.1. Enzimas

Amilases e α -glicosidases possuem os mesmo resíduos catalíticos, porém o ácido glutâmico aparece em posição diferente e as α -glicosidases que carecem de

um dos ligantes de cálcio característico das amilases. O alinhamento das sequências de amilases (3) e α -glicosidasas (2) de *D. peruvianus* com sequências autênticas de amilases e α -glicosidasas de insetos (Figura 5) mostra claramente as sequências que correspondem a amilase e quais a α -glicosidasas. Os resíduos catalíticos estão em preto (notar a diferença de alinhamento Glu catalítico) e a falta de uma His ligante de cálcio (em cinza) nas α -glicosidasas.

	172	236	246	280	338	357	426																			
SP P81641 AMYB DROME	VVF	NHMAAD - GVR	-----	NC	ELVGL	----	RDLNQRVDAAKHMWP	IVQ	EV	ID	---	GGEA	ISKSEY	TGV	FVDNH	DNQ										
SP P08144 AMYA DROME	VVF	NHMAAD - GVR	-----	NC	ELVGL	----	RDLNQRVDAAKHMWP	IVQ	EV	ID	---	GGEA	ISKSEY	TGV	FVDNH	DNQ										
SP P56634 AMY TENMO	AV	INHMTGM - NVR	-----	NC	ELVGL	----	RDLNQRVDAAKHMSP	IVQ	EV	ID	---	GGEA	ISKNEY	TGV	FVDNH	DNQ										
SP O76264 AMR DROYA	VLL	NHMSGDFDVQ	-----	QC	ELVGL	----	KDLDRVDAAKHMAS	IVQ	EV	ID	---	GHETV	SRDEY	KDT	FVDNH	DNQ										
SP Q9BN01 AMYB DROYA	VVF	NHMAAD - GVR	-----	NC	ELVGL	----	RDLNQRVDAAKHMWP	IVQ	EV	ID	---	GGEA	ISKSEY	TGV	FVDNH	DNQ										
SP Q97396 AMY PHACE	AV	FNHMSAT - SIR	-----	NC	WLSGL	----	PDLDRVDAAKHMWP	IVQ	EV	ID	---	GGGV	SKNEY	TGV	IDNH	DNQ										
XP 024218855.1	VVF	NHMTANLPIR	-----	NC	ELVGL	----	HDLNQRVDAAKHM	DPFYQ	EV	AG	---	DDDV	IKPHEY	TSV	FDNH	DTQ										
XP 014271054.1	VVF	NHMSANQPIR	-----	VC	ELVGL	----	HDLNQRVDAAKHM	EPFYQ	EV	IMS	---	DGDV	IMPKEY	TGV	IDNH	DTQ										
Dp 317.1	VLL	NHMSAD - NIR	-----	QC	ELVGL	----	HDLNQRVDAAKH	VWP	IVQ	EV	ID	---	GGGI	-RYEY	TPV	FVDNH	DNQ									
Dp 11308.1	VVF	NHMAAK - GVR	-----	NC	QLVGL	----	PDLDRVDAAKHM	WP	IVQ	EV	ID	---	GTEP	IKKGEY	TGV	IDNH	DTQ									
SP Q17058 MAL1 APIME	FVP	NHTSDQHEERQ	----	AY	LHQFAPEQ	DLN	RYR	DA	LPY	ICEK	FRD	VLD	----	KHML	I	EAY	TNWV	PGNH	DQL							
SP P07191 MAL2 DROME	FVP	NHTSDEVKRRQ	----	QY	LHQFQV	KQ	PD	NFR	DA	VPH	I	EEWR	EFLD	----	DSRV	LLA	EAY	SSWV	VGNH	DTN						
SP P07192 MAL3 DROME	FVP	NHTSDECDQRQ	----	AY	LHQFHA	KQ	PD	NFR	DA	VPHV	YEA	FRD	VE	----	DDR	VLLT	EAY	SPWV	FGNH	DQS						
SP P13080 MALT AEDAE	FVP	NHTSDQHEERQ	----	EF	YLHQF	LKEQ	PD	NFR	DA	V	P	Y	LEQWR	AVLD	----	RTR	I	MMT	EY	TSW	LGNH	DNN				
SP P07190 MAL1 DROME	FVP	NHSSSTENEVRQ	----	QY	LHQFA	I	Q	AD	NFR	DA	V	P	Y	LEQWR	ELVD	----	DKR	L	M	T	EAY	TSW	LGNH	DNK		
TR Q1PQK2 Q1PQK2 CULQU	F	IPNHSSDQHEARG	----	EY	LHQFT	PQ	PD	NFR	DA	I	NHMF	ENWR	DQMD	----	RT	I	I	L	M	T	EAY	SSWV	AGSH	DHS		
TR A0A2H8T 28 A0A2H8T 28 9HEMI	FVP	NHTSDEHEQRG	----	QY	LHQFDP	KQ	PD	NFR	DA	V	P	Y	LEQWR	AVLD	----	KTR	V	M	I	T	EAY	TSW	IGNH	DQP		
Dp 13656.1	FVP	NHTSDKHPERK	----	QY	LHQFGPY	Q	PD	NFR	DA	I	P	F	I	SE	----	QLDD	-M	-YQ	K	F	F	F	F	F	F	
XP 9817.1	MVP	NHSSSEHKQRG	----	QY	LHMFGS	FQ	PD	NFR	DA	V	P	F	LVE	----	TLV	DRV	-	ST	K	L	F	F	F	F	F	
XP 024214220.1	FVP	NHTSTKHKRRK	----	QY	LHTFL	I	E	Q	AD	NFR	DA	V	S	V	I	Y	D	E	F	R	K	T	L	D	----	
XP 024214219.1	FVP	NHTSTKHKRRK	----	QY	LHSFL	V	E	Q	AD	NFR	DA	I	S	W	I	Y	D	E	F	R	K	T	L	D	----	
XP 014282432.1	FVP	NHTSTKHKRRK	----	QY	LHSFL	V	E	Q	AD	NFR	DA	I	S	W	I	Y	D	E	F	R	K	T	L	D	----	
XP 014282431.1	FVP	NHTSTKHKRRK	----	QY	LHSFL	V	E	Q	AD	NFR	DA	I	S	W	I	Y	D	E	F	R	K	T	L	D	----	
XP 014282430.1	FVP	NHTSTKHKRRR	----	QY	LHTFL	V	E	Q	AD	NFR	DA	V	S	W	I	Y	E	E	F	R	K	T	I	D	----	
XP_014282429.1	YVP	NHTSIKHKRRK	----	QY	LHNF	L	V	E	Q	AD	NFR	DA	V	S	W	I	Y	E	E	F	R	K	T	L	D	----

Figura 5 - Alinhamento de α -glicosidasas e amilases

Para confirmar a identidade das enzimas, foi feito também um cladograma, que separou as sequências de α -glicosidasas (ramo superior) daquelas de amilases (ramo inferior) (Figura 6).

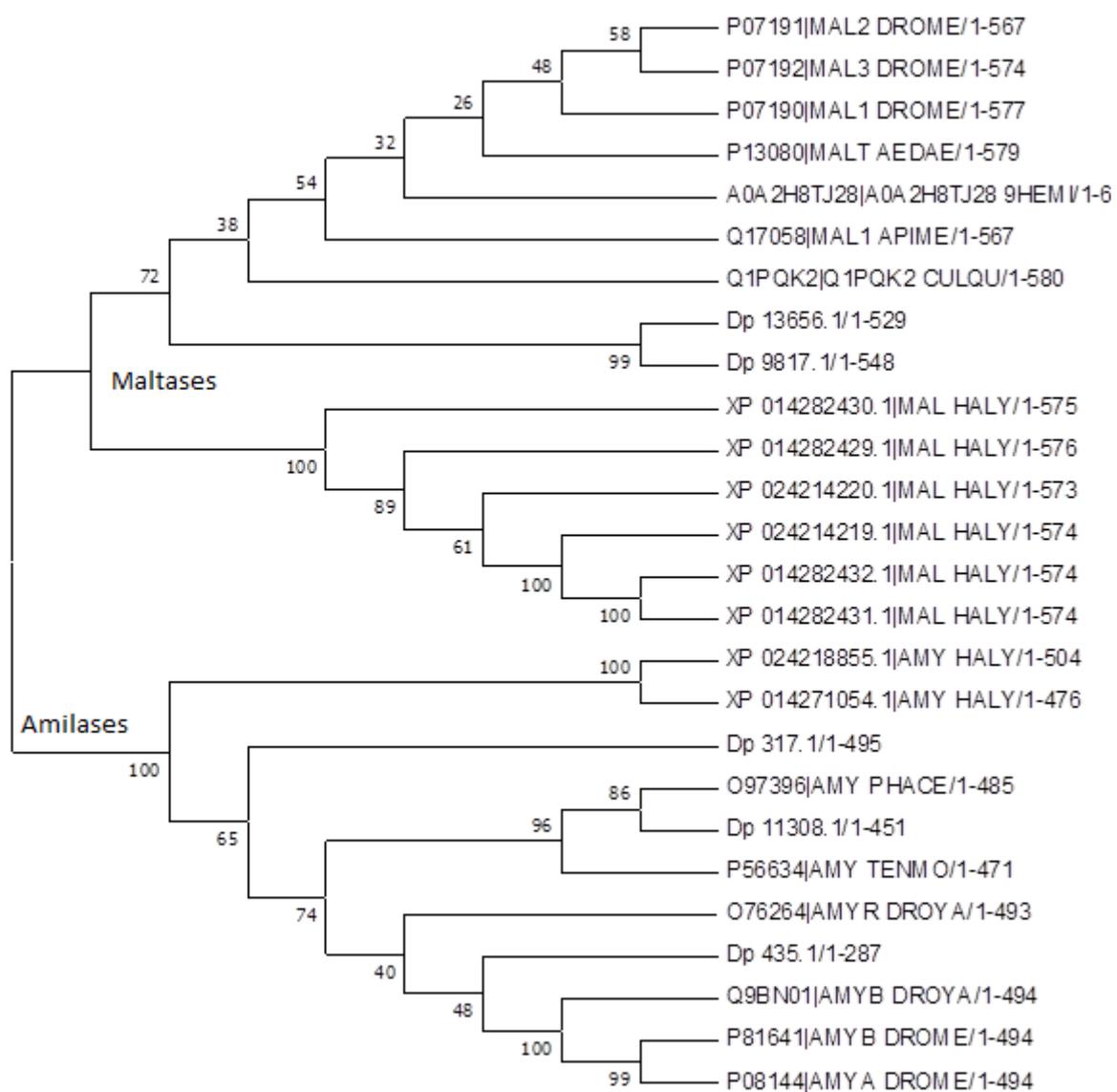


Figura 6 - Separação de amilases e α -glicosidases (AEDA: *Aedes aegypti*, APIME: *Apis mellifera*, CULQU: *Culex quinquefasciatus*, DROYA: *Drosophila yakuba*, DROME: *Drosophila melanogaster* HALY: *Halyomorpha halys*, HEMI: *Melanaphis sacchari*, PHACE: *Phaedon cochleariae*, TENM: *Tenebrio molitor*).

Tabela 4 - Expressão das enzimas

Enzima	Sequência	V1	V2	V3	C
CA subunidade α	Dp_15862.1	17.42	5.07	44.16	26.71
CA subunidade β	Dp_10163.1	4.15	5.62	14.05	10.46
α -Glicosidase	Dp_13656.1	1832.24	205.95	2.03	4.2
	Dp_9817.1	1316.59	517.47	29.21	16.27
Amilase	Dp_317.1	0	0	0	0
	Dp_11308.1	0	0	0	0
Trealose-6-fosfato sintase fosfatase	Dp_6556.1	1	1,16	4,8	14,76
	Dp_13941.1	0.09	0.15	0.12	9.73
Lipases ácidas	Dp_12837.1	1687.17	607.47	12.04	0.76
	Dp_12675.1	843.5	1610.42	225.13	2.52
	Dp_7251.1	2195.61	523.6	88.05	4.87
	Dp_5431.1	111.81	269.46	15.71	56.99
Lipases pancreáticas	Dp_10322.1	573.94	2.86	0.26	5.6
	Dp_7333.1	0.99	1.04	3.47	228.33
	Dp_14537.1	0.23	0.12	0.32	44.66
NAGA/ α -Galactosidase	Dp_12841.1	26.02	47.4	28.7	31.27
	Dp_3149.1	1	0.02	0.93	40.39
α -Manosidase	Dp_13232.1	0.75	0.75	2.31	82.85
	Dp_15738.1	4.85	44.18	0.9	0.46
	Dp_15706.1	0.21	2.01	0.21	52.46
	Dp_2262.1	0.34	0.33	0.92	7.03
	Dp_8704.1	0.97	0.71	2.95	57.03
β -Glicosidase	Dp_11217.1	351.73	552.62	213.25	0.64
	Dp_13317.1	6.66	6.54	20.59	31.45
	Dp_17804.1	100.59	95.89	337.56	68.64
	Dp_4364.1	99.2	13.43	0.47	0.29
	Dp_5943.1	59.95	59.62	215.09	56.92
	Dp_9208.1	291.5	17.1	0.68	0.25

A amilase Dp_435.1 é fragmento muito curto e foi desconsiderada, enquanto a Dp_11308.1, que carece de peptídeo sinal deve ter função diferente de uma verdadeira amilase. Assim, a verdadeira amilase digestiva deve ser a Dp_317.1. Porém ela não foi expressa em nenhuma região do intestino de *D.peruvianus*. Isso não chega a surpreender porque sabe-se que as enzimas desse inseto são induzíveis pelo seu alimento e a semente algodão é carente de amido.

α -Glicosidases são mais expressas em V1 e V2. É sabido por trabalhos

anteriores (Silva and Terra, 1996) que existe uma α -glicosidase que se localiza na membrana perimicrovilar. Porém, nenhuma das sequências encontradas possui regiões transmembrana ou âncoras de GPI preditas. Como a Dp_9817.1 possui peptídeo sinal, é possível que essa seja a enzima secretada (detectada em Silva and Terra, 1994) e a outra, Dp_13656.1, seja a ancorada na membrana perimicrovilar e caracterizada por Silva and Terra (1995). Um caso similar é relatado no trabalho de Price et al. (2007), na qual foi encontrada uma sucrase (α -glicosidase) que foi verificada experimentalmente ser ancorada na membrana, porém ela não possui predições de regiões transmembrana ou âncoras de GPI. Isso sugere que o mecanismo de ancoragem em membranas perimicrovillares pode ser diferente do usual em membranas plasmáticas.

Foram encontradas duas sequências possivelmente codificantes de α -N-acetil-D-galactosaminidase (NAGA) ou α -galactosidasas. É difícil distinguir essas enzimas apenas pela sequência primária. Porém, foram encontrados os sítios catalíticos. Com o intuito de descobrir se este inseto possui as duas enzimas ou apenas uma, foi feito o ensaio enzimático em triplicata dessas enzimas em regiões intestinais e com a carcaça. Os resultados se encontram nas Figuras 7 e 8.

Foi detectada a presença das duas enzimas, sendo a α -N-acetil-D-galactosaminidase mais ativa na carcaça e a α -galactosidase mais expressa no intestino e traços na carcaça. Os dois genes encontrados que codificariam essas enzimas tem a expressão da seguinte forma: Dp_3149.1 tem expressão em todo animal, porém é típica de carcaça, visto que possui baixa expressão no intestino. Já a sequência Dp_12841.1 possui expressão ao longo do intestino e carcaça, porém sua maior expressão está em V2, no intestino. Considerando as atividades enzimáticas e as expressões dos genes encontrados, sugere-se que a enzima α -

galactosidase caracterizada previamente esteja codificada no gene Dp_12841.1 e a enzima α -N-acetil-D-galactosaminidase esteja codificada no gene Dp_3149.1.

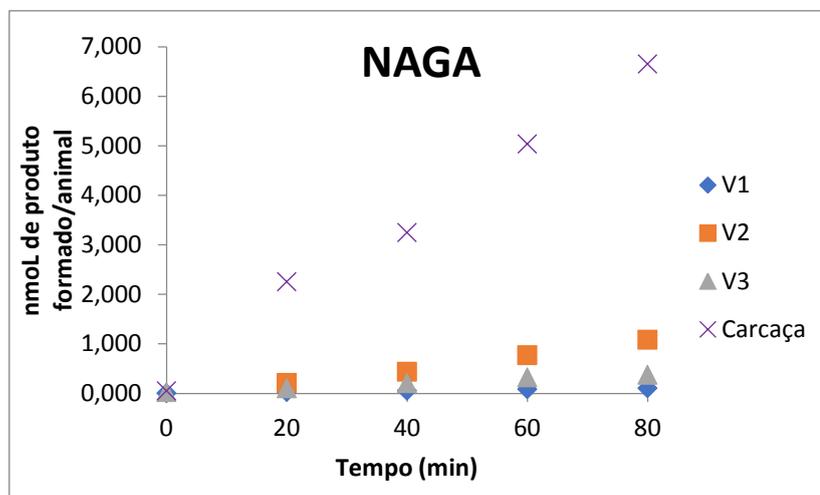


Figura 7 - Ensaio enzimático da NAGA

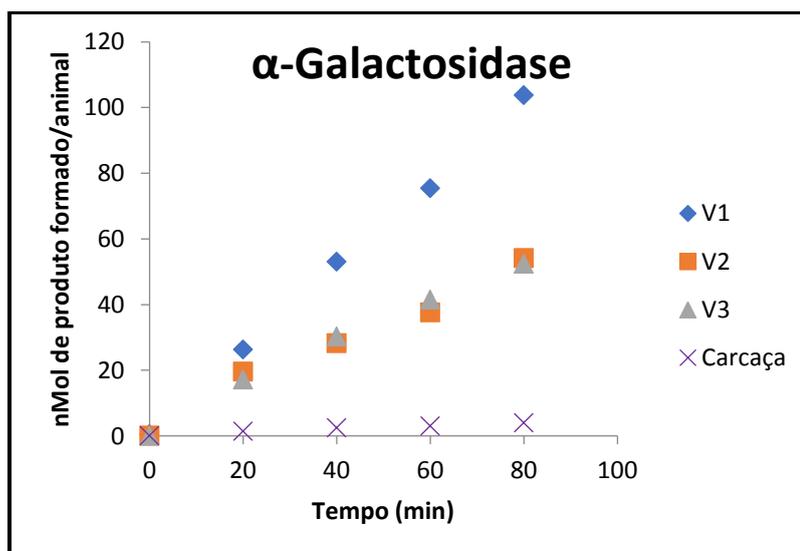


Figura 8 - Ensaio enzimático da galactosidase

Como vimos, a α -glicosidase é muito expressa no animal, principalmente em V1, enquanto a expressão da α -galactosidase é alta em V2. A alta expressão dessas enzimas era esperada, pois o principal carboidrato ingerido por esse animal em sua dieta é o trissacarídeo rafinose, que hidrolisada pela ação de duas enzimas, α -galactosidase e α -glicosidase, gera glicose, frutose e galactose.

Foram encontradas seis sequências de β -glicosidases, todas foram

confirmadas pela presença da assinatura da família das glicosil hidrolases e também foram identificado os resíduos catalíticos.

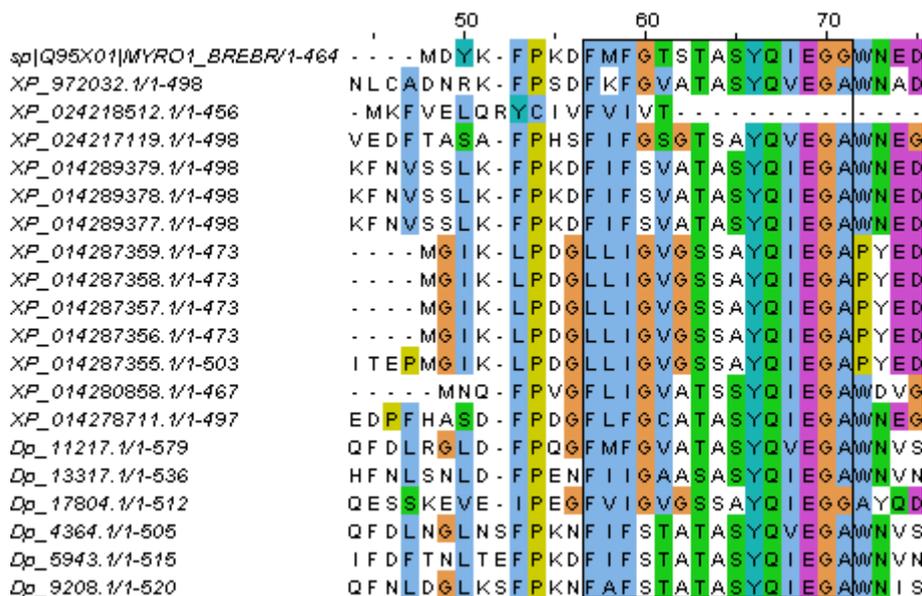


Figura 99 - Assinatura da família das glicosil hidrolases GH1 (no box)

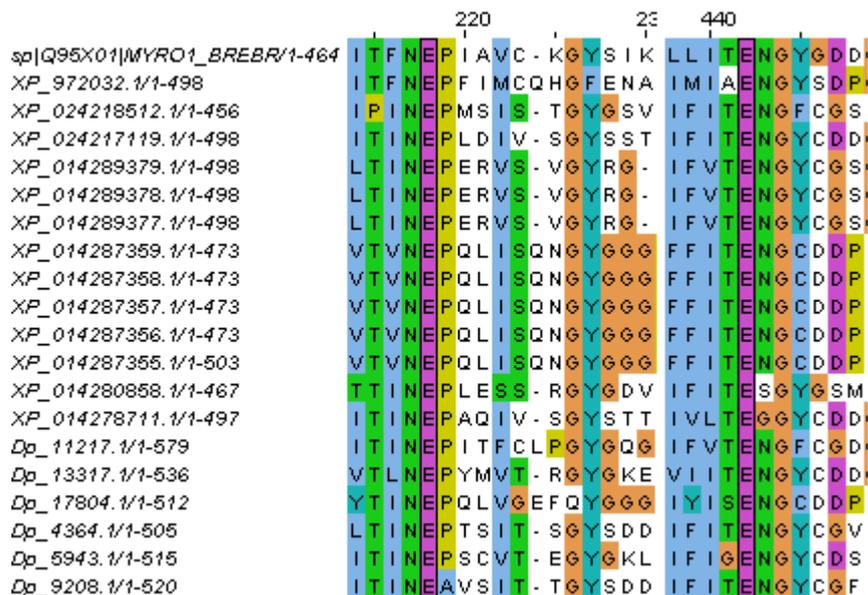


Figura 10 - Resíduos catalíticos das β -glicosidases em boxes

A expressão das β -glicosidases varia ao longo do intestino de *D. peruvianus* (Tabela 4), mas está sempre presente em níveis elevados.

Foram encontradas cinco sequências de manosidases e, para diferenciar se as manosidases encontradas eram de classe I ou II, foi feita uma árvore filogenética

com sequências bem conhecidas. A figura 12 mostra a árvore e foram separadas as manosidades de classe I (ramo inferior) e classe II (ramo superior). As sequências Dp_15738.1, Dp_15706.1 e Dp_13232.1 são pertencentes à classe II e estão, portanto, supostamente localizadas no lisossomo ou são secretadas. Dessas, a única que apresenta peptídeo sinal é a Dp_13232.1. Já as sequências Dp_2262.1 e Dp_8704.1 são pertencentes à classe I e devem estar localizadas no Golgi. Para essas sequências foram preditas regiões transmembrana. Apenas essas duas sequências estavam completas.

Dentre as manosidades pertencentes à classe II, apenas a Dp_15738.1 é típica de intestino e possui maior expressão em V2. As outras são típicas de carcaça. Já as manosidades pertencentes à classe I, ambas possuem expressão ao longo do tubo digestivo, porém são típicas de carcaça.

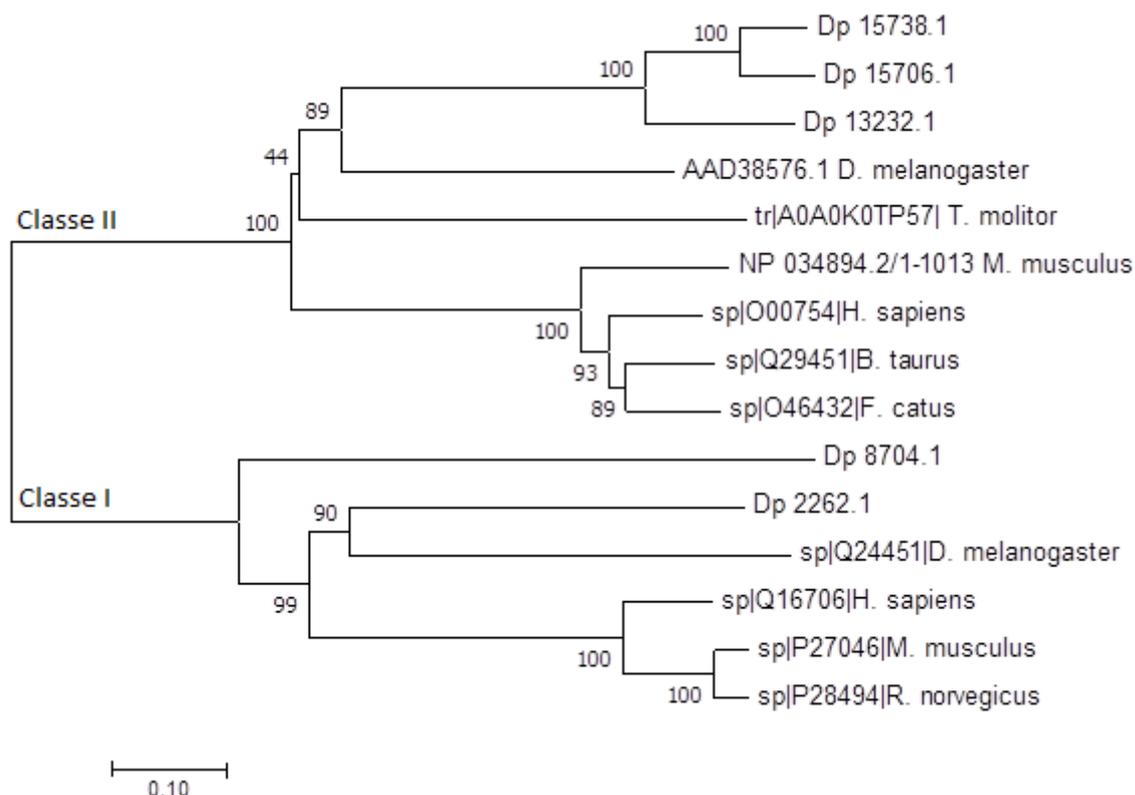


Figura 11 - Separação entre manosidades classe I e II

Foram encontradas quatro sequências de lipases, com alta expressão no intestino. Todas possuem a assinatura dessa família de enzimas. As lipases mais similares as pancreáticas de vertebrados possuem maiores divergências na assinatura, porém todas contêm o resíduo de serina, que faz parte do sítio catalítico (Figura 12). As enzimas foram divididas em lipases ácidas e lipases pancreáticas devido a similaridade com essas enzimas de vertebrados, tratando-se, portanto, apenas de enzimas com características diferentes. No entanto, como se trata de insetos, não se pode atribuir as características das lipases de vertebrados às lipases de inseto.

	230
Dp_12837.1/1-395	E K L Y Y V G H S Q G T
Dp_12675.1/1-365	E Q V Y Y V G H S Q G T
Dp_7251.1/1-444	D S L Y Y V G H S Q G T
Dp_5431.1/1-403	D S L E Y V G H S L G T
sp O46107 LIP1_DROME/1-439	P K L H Y A G H S Q G C
sp O46108 LIP3_DROME/1-394	Q Q V Q Y V G H S Q G T
P07098/1-398	K Q L H Y V G H S Q G T
Dp_10322.1/1-335	K D I H I I G H S L G A
Dp_7333.1/1-536	- Y C H A I G H S L G S
Dp_14537.1/1-302	A S L E I I G F S L G A

Figura 12 - Assinatura das lipases (no box)

A grande quantidade lipases encontradas e sua alta expressão era esperada, pois a alimentação deste inseto é rica em lipídeos. Percebe-se pela tabela de expressão 4 que as lipases são muito expressas em V1, seguida de maior expressão em V2.

Foi encontrada uma sequência de anidrase carbônica subunidade α e uma de subunidade β . A primeira possui a assinatura dessa subunidade. Essa enzima estaria atuando em conjunto ao transportador AE, fazendo a hidratação do CO_2 , levando a formação de HCO_3^- , que é transportado por AE, para manutenção do pH e gradiente eletroquímico celular.

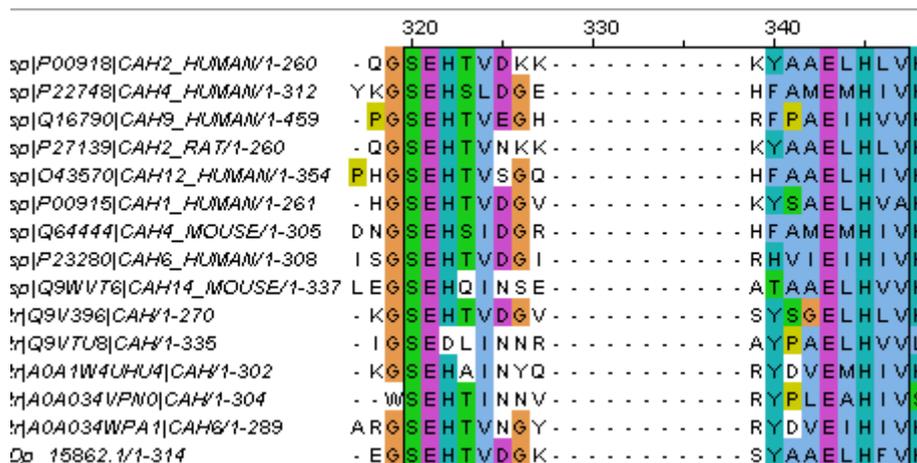


Figura 11 - Assinatura da anidrase carbônica subunidade α (no box)

As duas anidrases carbônicas encontradas possuem expressão ao longo de todo tubo digestivo e carcaça, porém são mais expressas em V3. Já a trealose-6-fosfato sintase fosfatase é típica de carcaça.

4.2. Transportadores de aminoácidos e peptídeos

Foi encontrada uma sequência de transportador de peptídeos – PEPT, Dp_13753.1. A sequência foi alinhada com algumas sequências e foi encontrada a assinatura da família das PTR conforme mostra a figura a seguir. Esse transportador tem expressão em todo o intestino, porém maior expressão em V3.

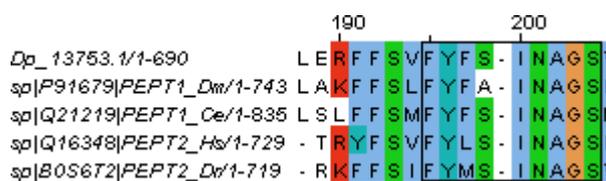


Figura 12 - Assinatura de PTR presente em PEPT (no box)

Cinco sequências de PAT e três sequências de CAT foram validadas por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), já que não possuem assinatura. A expressão é mostrada na Tabela 5. CAT e PAT são expressos em todo o intestino e carcaça, porém com maior expressão no intestino. Desses, duas sequências de CAT possuem maior expressão em V1 e uma possui maior expressão em V3. Isso

também se observa nos PAT, na qual três sequência tem maior expressão em V3 e duas em V1.

Foram encontradas duas sequências de NAAT e, ao alinhar com outras sequências conhecidas desse mesmo transportador, foram encontrados os resíduos envolvidos no sítio de ligação ao substrato, conforme mostrado na figura 15. A expressão se encontra na tabela 5. Das duas sequências encontradas, a Dp_9959.1 é típica de intestino e possui alta expressão em V3, já a Dp_6340.1 possui maior expressão na carcaça.

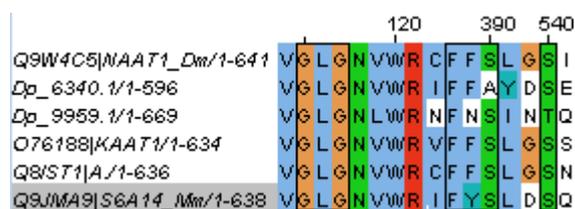


Figura 13 - Resíduos envolvidos na ligação ao substrato do transportador NAAT (em boxes)

Tabela 5 - Expressão dos transportadores de peptídeos e aminoácidos ao longo do intestino e carcaça

Nutriente	Transportador	Sequência	V1	V2	V3	C
Peptídeos	PEPT	Dp_13753.1	81,11	204,95	364,05	36,53
Aminoácidos	CAT	Dp_10617.1	20,96	16,66	87,58	6,3
		Dp_11105.1	28,77	13,54	5,74	4,28
		Dp_3691.1	28,5	2,01	2,02	6,63
	PAT	Dp_5802.1	56,04	21,45	67,6	16,28
		Dp_3503.1	51,93	27,53	2,62	27,7
		Dp_11074.1	45,61	67,79	121,43	102,59
		Dp_9889.1	20,23	40,58	53,04	3,53
		Dp_3671.1	8,03	8,89	47,57	27,36
	NAAT	Dp_6340.1	0,51	0,39	7,9	10,52
Dp_9959.1		38,11	35,36	142,42	5,09	

A expressão destes transportadores mostra que eles são muito expressos em V3 e em V1. Isso quer dizer que as endopeptidases agiriam sobre os polímeros de

aminoácidos, dando tempo de serem hidrolisados completamente até chegarem ao final do intestino, para serem absorvidos. Em V1 existe maior expressão pois a dieta pode conter aminoácidos livres, prontos para serem absorvidos.

4.3. Transportadores de açúcares

Foram encontradas três sequências codificantes de transportadores de glicose e elas foram comparadas com os resíduos com função descrita de acordo com o que foi dito na introdução. Aqui, esses transportadores não foram denominados GLUT porque eles podem ter função diferente dos GLUT de vertebrados, assim são denominados Sugar Porters (SP). Segue a tabela com a comparação dos resíduos.

Tabela 6 - Comparação com resíduos importantes de GLUT1

Resíduo	Dp_9806.1	Dp_7127.1	Dp_8991.1	Resíduo	Dp_9806.1	Dp_7127.1	Dp_8991.1
S66	S	S	S	P385	P	-	S
G91	<u>G</u>	G	G	I386	V	-	I
R126	R	R	R	W388	Y	-	W
E146	E	E	E	F389	F	-	L
K256	S	T	K	N411	N	-	N
Q279	N	Q	M	W412	W	-	W
Q282/283	QQ	QQ	QQ	N415	N	-	T
G286	G	G	G	F422	F	-	F
N288	N	N	N	R92	R	R	R
T310	T	T	T	R334	R	-	K
R333	R	R	R	R153	R	R	R
I369	I	-	I	E393	E	-	E
V370	V	-	V	R400	R	-	R
I372	V	-	V	Q161	P	Q	Q
A377	V	-	V	STSIF	SVSIF	STGLF	STEIF
F379	Y	-	F	Y143	Y	Y	Y
E380	N	-	A	Y293	Y	Y	Y
G382	A	-	G				

Com base na análise, percebe-se que as três sequências são mais similares a família dos GLUT1. Somente a sequência Dp_9806.1, por ter mutações em resíduos

importantes para a estrutura e transporte, pode ter capacidade de transporte de glicose reduzida. A sequência Dp_7127.1 está incompleta, mas o fragmento possui muitos dos resíduos importantes.

Comparando as sequências encontradas com trabalhos anteriores feitos experimentalmente com transportadores de açúcares, chegou-se a conclusão de que a sequência Dp_8991.1 encontrada é provavelmente o transportador de hexose do tipo GLUT encontrado no trabalho de Bifano et al. (2010). Este trabalho também apontou a presença de outro transportador de hexose, do tipo SGLT dependente de K^+ , mas apenas um fragmento foi sequenciado e não foi confirmado no presente trabalho.

Foram encontradas 21 sequências de transportadores de trealose e todas contêm os resíduos de glicina de forma similar aos GLUTs, com exceção de alguns resíduos diferentes (vide Tabela 7). Embora isso não seja suficiente para tornar o transportador não funcional, pode haver modificação na afinidade e estrutura nessas sequências. Somente o resíduo G384 não é bem conservado.

Tabela 7 - Resíduos de glicina importantes em GLUT e que são presentes em TRETs

Sequência	Resíduo						
	GLUT1	G27	G134	G167	G286	G382	G384
6299	G	G	G	G	G	G	G
6334	A	G	G	G	G	G	S
8615.2	G	G	G	G	G	G	G
1480	G	G	G	G	G	G	Q
11899	G	G	G	G	G	G	G
11687	G	G	G	G	G	G	G
12992	G	G	G	G	G	G	G
13151	G	S	G	G	G	G	V
13513	G	G	G	A	G	G	A
13755	G	G	G	G	G	G	G
14868	G	G	G	G	G	G	G
15112	G	G	G	G	G	G	H
20330	G	G	G	G	G	G	F
2321	G	G	G	G	G	G	L
2336	G	G	G	G	G	G	G
3477	G	A	G	G	G	G	M
3658	G	G	A	G	G	G	A
5399	G	G	G	G	G	G	G
15361.2	G	G	G	G	G	G	L
7620	A	G	G	G	G	G	G

A tabela 8 mostra a expressão dos transportadores de monossacarídeos e dos transportadores de trealose. Observe que os transportadores de monossacarídeos são expressos ao longo de todo o intestino, porém a maior expressão se encontra em V3. Assim como nos transportadores de proteínas, haveria tempo para a hidrólise de carboidratos por carboidrases, levando à formação de resíduos de açúcares, que seriam absorvidos em maior quantidade no final do intestino médio.

Foram encontrados muitos genes codificantes de TRETs. Isso era esperado, visto que a busca por esse transportador em insetos da mesma espécie no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) mostra que os Hemipteras possuem muitos genes codificantes de transportadores de trealose. Provavelmente, cada tecido/célula possui um TRET específico pelo fato de a trealose ser o açúcar circulante na

hemolinfa dos insetos.

Tabela 8 - Expressão de transportadores de açúcar ao longo do intestino e carcaça

Nutriente	Transportador	Sequência	V1	V2	V3	C
Açúcares	SP	Dp_7127.1	32,81	24,74	2,49	49,38
		Dp_9806.1	45,44	80,53	895,73	13,91
		Dp_8991.1	70,98	138,56	60,28	27,53
	TRET	Dp_15361.2	0,14	2,38	25,85	12,21
		Dp_3477.1	46,5	100,32	311,38	60,01
		Dp_2480.1	197,68	10,96	27,66	14,67
		Dp_8615.2	1,11	31,05	428,2	27,86
		Dp_11480.1	158,58	50,43	35,12	1,74
		Dp_11691.1	0,83	0,11	12,73	17,55
		Dp_12992.1	10,56	17,81	36,8	18,36
		Dp_13151.1	183,12	145,14	142,4	5,73
		Dp_13513.1	45,45	41,74	107,68	31,13
		Dp_13755.1	54,27	31,64	35,1	9,75
		Dp_13776.1	60,02	113,02	51,57	11,7
		Dp_2321.1	26,9	14,93	42,13	26,42
		Dp_2336.1	23,68	9,55	4,52	0,14
		Dp_2591.1	10,38	14,09	2,22	2,97
		Dp_3658.1	2,77	28,22	31,74	4,43
		Dp_4863.1	13,58	11,26	0,77	0,15
		Dp_6299.1	0,01	0,01	118,15	0,09
		Dp_6334.1	250,28	7,02	2,16	243
		Dp_6717.1	0,75	2,17	4,62	18,35
		Dp_7620.1	0,7	1,34	0,54	81,86
		Dp_7774.1	0,11	1,41	0,07	18,98

4.4. Transporte de lipídeos e enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos

Os transportadores de ácidos graxos foram identificados pela sua assinatura do sítio de ligação ao AMP (figura 16), além de alinharem as regiões conservadas do FATP1 de *M. Musculus* (vide introdução) e que não foi mostrado aqui por serem regiões grandes. Foram encontradas quatro sequências e elas possuem expressão crescente ao longo do intestino, com exceção a Dp_14167.1 que possui maior expressão em V2 e V3. Todas as sequências encontradas possuem expressão em todo intestino e carcaça, sendo que Dp_11037.1 e Dp_13644.1 possuem maior

expressão na carcaça.



Figura 14 - Sítio de ligação ao AMP (no box)

Em relação ao metabolismo de lipídeos, decidiu-se investigar se no hemiptera *D. peruvianus*, uma das vias de formação de diacilgliceróis para transporte na hemolinfa ocorre mais que a outra. Para isso foram analisadas as expressões das enzimas envolvidas em ambas as vias e os resultados são mostrados a seguir.

Tabela 9 - Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, receptores de ácidos graxos e transportadores de ácidos graxos

Porteína	Sequência	V1	V2	V3	Carcaça
Glycerol kinase	Dp_13324.1	21.39	34.31	7.92	13.18
	Dp_13841.1	59.56	120.08	127.9	81.38
	Dp_4217.1	6.11	7.42	21.88	17.78
	Dp_9950.1	48.18	77.34	195.56	61.03
Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase	Dp_9434.1	35.75	38.59	49.9	96.84
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	Dp_11415.1	17.86	13.94	19.4	1.78
	Dp_4363.1	0.96	2.41	2.32	0.84
	Dp_3063.1	6.93	8.26	14.83	10.33
	Dp_12634.1	2.06	1.77	5.09	7.67
Phosphatidate phosphatase	Dp_12881.1	7.54	6.01	7.12	8.23
2-acylglycerol o-acyltransferase 2	Dp_10105.1	41.69	14.76	54.39	22.31
	Dp_10661.1	2.79	3.31	36.26	281.49
	Dp_6173.1	1.07	2.12	0.48	29.26
	Dp_6030.1	0.44	0.25	2.51	236.68
Receptor de lipoforina	Dp_13636.2	41.69	14.76	54.39	22.31
	Dp_1870.1	40.09	30.78	21.02	79.75
Transportadores de ácidos graxos	Dp_11471.1	21.63	44.03	74.89	36.03
	Dp_13644.1	15	26.9	80.53	166.06
	Dp_11037.1	75.18	75.5	146.28	301.78
	Dp_14167.1	78.01	120.52	112.64	64.09

A expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos e formação de diacilglicerol demonstra que elas são, de forma geral, mais expresas na carcaça,

como é esperado pois não se trata de enzimas digestivas. Porém também possuem expressão alta no intestino, podendo participar da formação de diacilglicerol que também ocorre no intestino.

A enzima glicerol quinase é muito expressa, mas ela está envolvida em diferentes vias metabólicas, e não apenas a formação de diacilglicerol, o que explica sua alta expressão. Comparando a expressão das outras enzimas (ver página 14) da via da possibilidade 1 (glicerol-3-fosfato O-aciltransferase, 1-acilglicerol O-aciltransferase fosfatídico fosfatase) com a 2-acilglicerol-o-aciltransferase, a última enzima possui maior expressão, levando a hipótese de que, neste inseto, a possibilidade 2, ou seja, a conversão do monoacilglicerol a diacilglicerol, é a via predominante na formação do diacilglicerol.

4.5. Transporte de água e íons

Os transportadores identificados e suas expressões estão resumidos na tabela 10.

Tabela 10 - Expressão dos transportadores de água e íons

Nutriente	Transportador	Sequência	V1	V2	V3	C
Água	Drip	Dp_4503.1	2,04	1,3	52,46	45,16
	Aquaporina 12	Dp_12265.1	0,97	0,94	7,48	6,26
	Prip	Dp_2773.1	35,28	18,85	16,14	32,18
	Eglp	Dp_9972.1	79,57	82,32	91,71	41,11
		Dp_4273.1	0,4	0,25	1,05	106,41
	Bib	Dp_13083.1	0,06	0,11	0,51	3,98
H ⁺ -ATPase	a	Dp_3651.1	104,82	58,29	143,2	15,04
		Dp_13609.1	45,32	37,55	87,3	89,75
	d	Dp_7107.1	160,48	139,97	318,62	89,78
	e	Dp_13828.2	168,23	158,87	279,39	65,77
	21kDa	Dp_2689.1	135,58	141,62	295,5	65,54
	A	Dp_6419.1	480,1	423,95	665,28	189,41
	B	Dp_11249.1	296,65	259,33	405,62	124,1
	C	Dp_13977.1	68,03	59,98	85,53	21,1
		Dp_2205.1	8,63	6,1	20,22	28,16
	D	Dp_5744.1	140,68	141,08	290,49	79,87
	E	Dp_7077.1	271,53	244,8	425,43	109,98
	F	Dp_15985.2	185,04	158,86	232,41	69,61
	G	Dp_12349.1	340,09	292,34	497,03	183,61
	H	Dp_13482.1	210,15	182,41	318,44	105,6
	S1	Dp_8006.1	70,36	66,54	133,44	32,69
Bomba de sódio potássio	subunidade β	Dp_15521.1	22,89	14,94	47,53	21,86
		Dp_12968.1	14,76	14,15	55,75	46,1
		Dp_4604	0,05	0	0,03	9,64
		Dp_6991	0,25	0,03	0,06	32,36
		Dp_12276	0,32	0,19	1,05	3,69
	subunidade α	Dp_10399.1	25,72	14,24	28,5	86,58
Íons	Canal de potássio	Dp_20360.1	0,08	0,308	1,22	3,1
		Dp_6286.1	0,4	0,13	1,3	2,17
		Dp_13897.1	0,23	0,18	5	7,8
		Dp_15093.1	2,23	1,24	6,33	5,92
		Dp_4395.1	23,59	10,91	18,39	3,67
	Canal de sódio	Dp_13414	0,62	0,56	4,74	0,09
		Dp_10199	1,06	0,59	1,52	44,19
		Dp_5633.1	1,23	0,64	1,53	0,61
	Trocador Na ⁺ /H ⁺	Dp_14977.1	7,78	10,43	10,58	6,4
		Dp_15521.1	22,89	14,94	47,53	21,86
	Canal de cloreto	Dp_14191.1	5,71	4,27	9,21	9,81
	Cotransportador de sódio, potássio e cloreto	Dp_7296.1	9,77	5,3	23,11	2,74
		Dp_13102.1	14,01	10,69	45,79	19,24
	Cotransportador de potássio e cloreto	Dp_9238.1	0,14	0,09	0,18	4,81
Trocador de HCO ³⁻ /Cl ⁻	Dp_4724.1	14,4	1,77	10,19	7,53	

Foram encontradas duas sequências de Trocadores Na^+/H^+ (NHE) e foram analisados os resíduos importantes, conforme descrito na introdução, em comparação com NHE1 de *H. sapiens*. A análise, mostrada na tabela 11, mostra que pode haver diminuição na afinidade por substrato na sequência Dp_14977.1 e possível diminuição no transporte em ambas sequências.

Tabela 11 - Resíduos importantes em NHE

NHE1 human	Dp_14977.1	Dp_15521.1
G148	-	G
P153/154	KA	EE
F161/162	FF	FF
L163	N	L
P167/168	PP	PP
G174	G	G
R180	KA	G (K179)
Q181	Y	N
E262	E	E
D267	D	D
H349	D	H
E346	E	E
G352	G	G
E391	E	E
R440	R	R
Y454	F	F
G455/456	AG	SG
R458	R	R

A bomba de prótons (H^+ -V-ATPase) é composta por várias subunidades e não há assinaturas, dessa forma as sequências foram encontradas por BLAST e foi assinalada apenas uma sequência para as subunidades d, e, 21 kDa, A, B, D, E, F, G, H e S1; e duas sequências para as subunidades a e C. Com exceção a uma das subunidades “a” e uma das subunidades “C”, a maior expressão de todas as subunidades se encontra em V3.

Foram encontradas três sequências codificantes de canais de sódio não

estimulados por voltagem. Elas foram alinhadas com EnaC de *M. Musculus*, para verificar se os resíduos descritos como importantes para a seletividade do cátion por Sheng et al. (2000) eram encontrados, e com EnaC de *D. melanogaster*, para verificar se o loop de cisteína cuja mutação leva a abertura constitutiva do canal conforme descrito por Zelle et al. (2013) seria encontrado.

Foram encontrados conservados o resíduo L575, que em camundongos demonstrou ser importante na inibição por amiloride e, dos resíduos descritos neste animal para seletividade do cátion, apenas L584, S592, G587 e S589 foram encontrados de forma conservada (Sheng et al., 2000), indicando que mais de um resíduo participa da seletividade do íon e que provavelmente há diferenças na sequência primária e estrutural entre os canais de sódio de insetos e humanos. Isso pode ser visto na figura 17. Também foi encontrado o loop rico em cisteína, como descrito para *Musca domestica* (Zelle et al., 2013), que não foi mostrado por ser uma região grande.

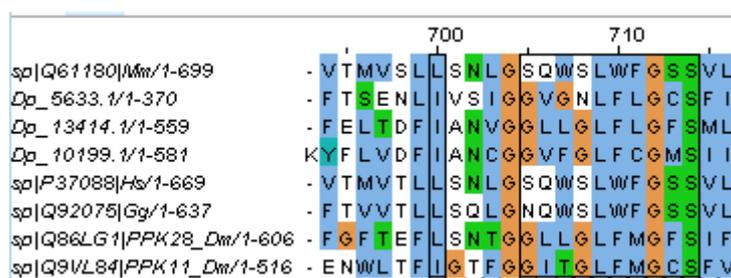


Figura 15 - Resíduos importantes em canais de sódio (em boxes)

Todas as cinco sequências de canais de potássio encontradas possuem a glicina, presente na dobradiça do portão do canal de potássio de *M. thermotrophicus* (Juang et al., 2012) e o filtro de seleção deste organismo diferem apenas no último resíduo, sugerindo que elas podem possuir mecanismo diferente de seleção.

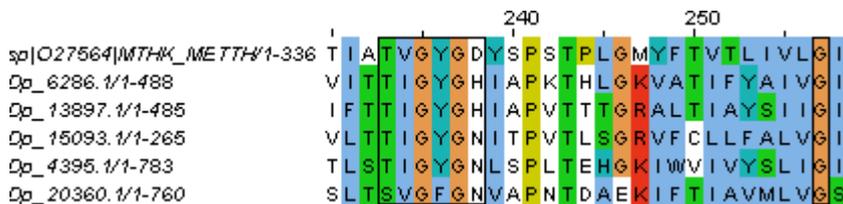


Figura 16 - Resíduos conservados em canais de potássio (em boxes)

A sequência encontrada para o canal de cloreto foi alinhada com várias sequências conhecidas, incluindo a de *E. coli*, e foram encontrados os resíduos envolvidos no filtro de seleção (Dutzler et al., 2002), para confirmar sua identidade (Figura 19).

Foi encontrada apenas uma sequência para AE, e ao alinhar essa sequência com outras já conhecidas, foi encontrado o motivo AAVIFIYFAA (Foller, et al., 2017). O motivo de ligação a anidrase carbônica não é totalmente conservado, indicando que pode não ocorrer ligação ou que esse motivo seja exclusivo de humanos, já que houve diferenças em todos os organismos analisados (figura 20).

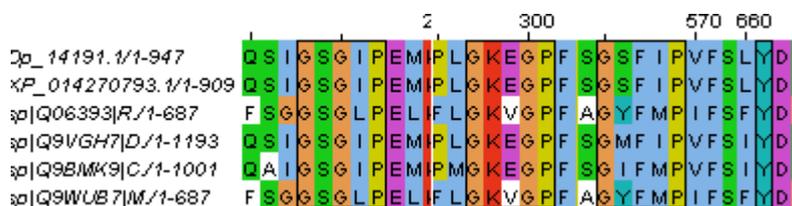


Figura 19 – Resíduos do filtro de seleção em canais de cloreto (em boxes)

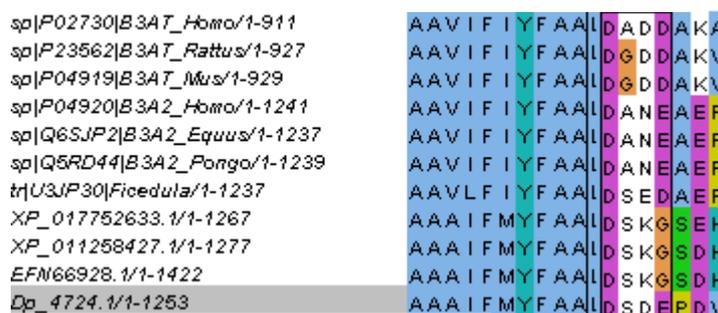


Figura 17 - Motivo importante em AE (em boxes)

Os NKCCs não possuem assinatura, assim, para avaliar as sequências foi feito BLAST e duas sequências foram encontradas e sua classificação foi também validada por meio de um cladograma, construído com sequências da família CCC, conforme é mostrada na Figura 21. Analisando a árvore, pode-se

perceber que houve separação dos KCC, NCC, NKCC e CIP, que é uma proteína acessória.

Foram encontradas duas sequências codificantes para NKCC e uma sequência codificante para CIP, que não foi explorada no trabalho por se tratar apenas de uma proteína acessória. Também foi encontrada uma sequência de KCC, típica de carcaça, porém também expressa no intestino.

Estes transportadores estão envolvidos na manutenção do volume celular (e por isso envolvidos no transporte de íons associados com água) e também auxiliam na manutenção do equilíbrio de íons K^+ , Na^+ e Cl^- .

sendo apenas a prolina conservada em todas as sequências. Com exceção a duas sequências da subunidade β que possuem maior expressão em V3, as outras sequências e a subunidade α possuem maior expressão na carcaça.

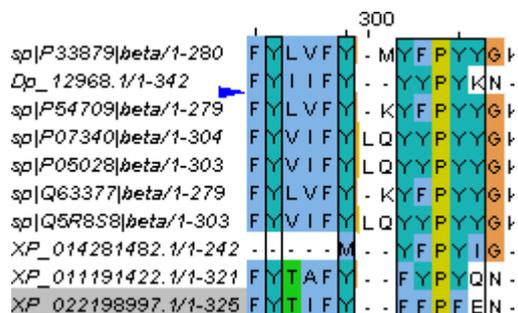


Figura 19 - Resíduos envolvidos na ligação da subunidade alfa em bombas de sódio/potássio (em boxes)

As seis sequências de proteínas codificantes para aquaporinas possuem os motivos NPA, com exceção da sequência Dp_12265, que possui o primeiro motivo NPA de forma não usual, porém Ishibashi (2006) descreve que isso acontece e elas são agrupadas em grupo chamado aquaporina 12. Isso é ilustrado na árvore filogenética que foi construída para classificar as aquaporinas em Eglp, Aqp12, Drip e Prip, que é mostrada (Figura 23).

Das seis aquaporinas encontradas, duas foram classificadas como Eglp, e as aquaporinas Drip, Prip, Bib e Aquaporina 12 tiveram uma sequência cada (Figura 23) (Tabela10).

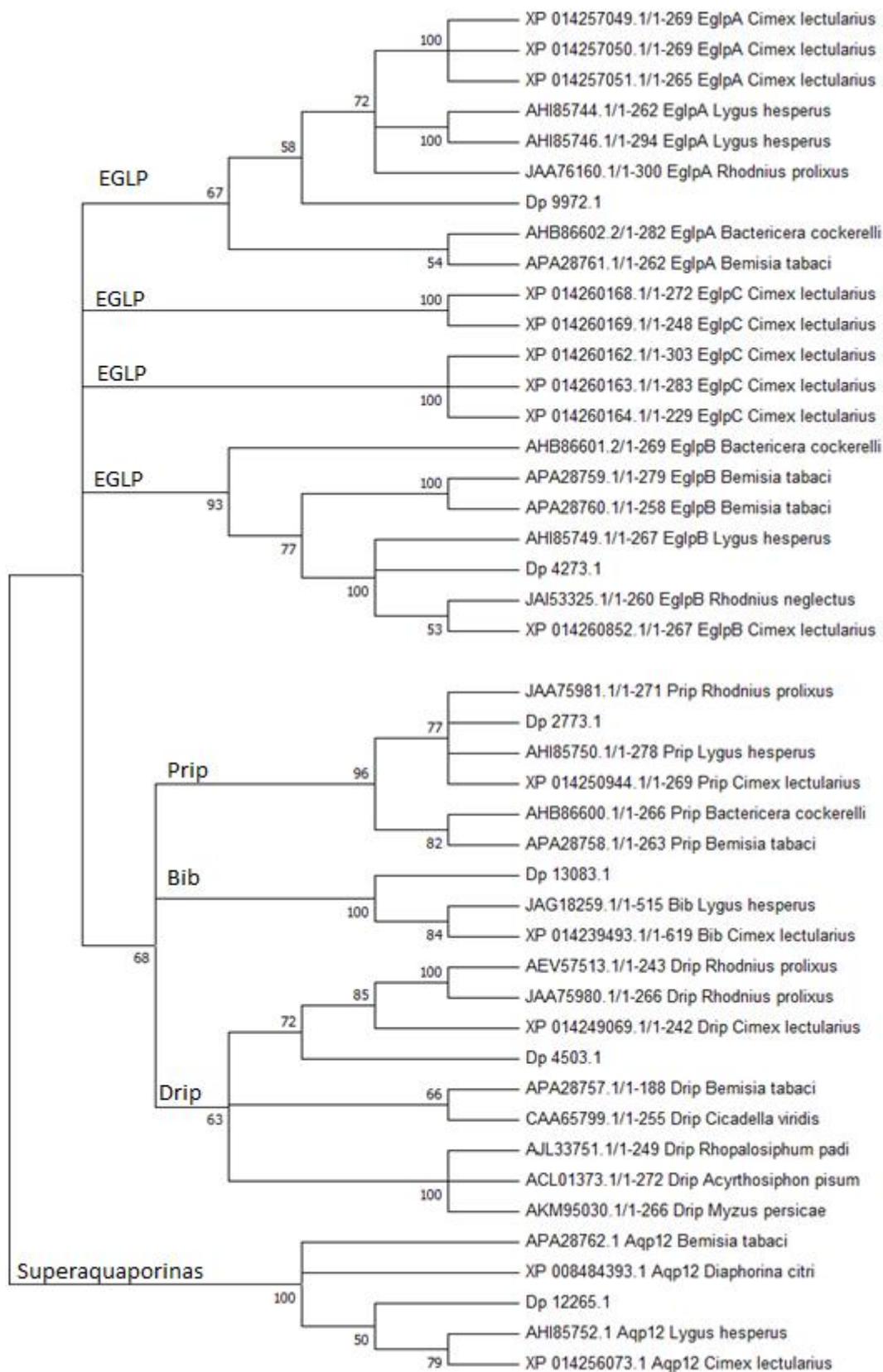


Figura 20 - Classificação das aquaporinas em Drip, Prip, Superaquaporinas, Eglp e Bib.

Os transportadores de íons e água estão envolvidos na manutenção do gradiente eletroquímico na célula. Observe que a bomba de prótons tem expressão maior em V1 e V3, coincidindo com a expressão dos transportadores de peptídeos e aminoácidos PEPT e PAT. Assim, a bomba gera um gradiente de prótons que será utilizado para levar peptídeos e aminoácidos para dentro da célula, através destes transportadores.

Também se pode observar que o NHE tem maior expressão em V3, o que pode auxiliar no funcionamento de NAAT, já que NHE coloca íons sódio para fora da célula e esses íons podem ser usados para mover o transporte de aminoácidos pelo transportador NAAT, que depende de sódio e também tem alta expressão em V3.

5. Discussão

5.1 Organização do processo digestivo em *D. Peruvianus*

A proteína ingerida é hidrolisada principalmente por cisteína endopeptidases, agora identificadas como catepsinas L (Pimentel et al., em preparação). Essas enzimas são inibíveis por proteínas presentes nas sementes de algodão. Em uma adaptação muito interessante, esses inibidores são destruídos por catepsinas D que só se expressam em V1 (Pimentel et al., 2017). Os oligopeptídios resultantes são atacados em seguida por serina carboxipeptidases da família S10 (Ferreira et al., 2015) e, finalmente por aminopeptidases.

A semente de algodão é uma semente oleaginosa pobre em carboidratos. Os principais carboidratos presentes na semente são solúveis, a maior parte dissacarídeos (Silva e Terra, 1994), embora haja muita rafinose. A digestão dessa ocorre por ação da α -galactosidase que libera galactose e sacarose, que é hidrolisada pela α -glicosidase solúvel ou ligada à membrana perimicrovilar.

Os lipídios da dieta são hidrolisados pelas numerosas lipases descritas.

A carência de carboidratos na dieta é compensada por ativa neoglicogênese a partir de aminoácidos, para a qual *D. peruvianus* possui todas as enzimas necessárias e bem ativas (Dias et al., em preparação). A energia necessária para o processo deve vir de ativa β -oxidação de ácidos graxos. As enzimas para esse processo também estão presentes (Dias et al., preparação).

5.2 Modelo do processo absorptivo no intestino de *D. peruvianus*

A análise das expressões dos transportadores levou a formação de um modelo de absorção de nutrientes neste inseto. O modelo (figura 24) é representado por apenas uma célula, visto que as proteínas encontradas estão presentes ao longo

de todo o intestino, diferenciando apenas na intensidade de expressão. A distribuição dos transportadores no ápice ou base da célula baseia-se na literatura de tecidos absorptivos e no fato conhecido que o intestino de *D. peruvianus* absorve água ao longo de toda a sua extensão (Silva and Terra, 1994).

Percebe-se que, de forma geral, os transportadores de macronutrientes possuem expressão crescente ao longo do intestino e as enzimas digestivas, possuem expressão decrescente. Assim, ao ingerir o alimento, as enzimas são secretadas principalmente em V1 e V2 e agem sobre os polímeros e os oligômeros resultantes ao longo do intestino e os monômeros serão absorvidos principalmente ao longo de V2 e V3. Existem transportadores para nutrientes monoméricos em V1, pois a alimentação pode incluir monômeros não polimerizados, já prontos para serem absorvidos.

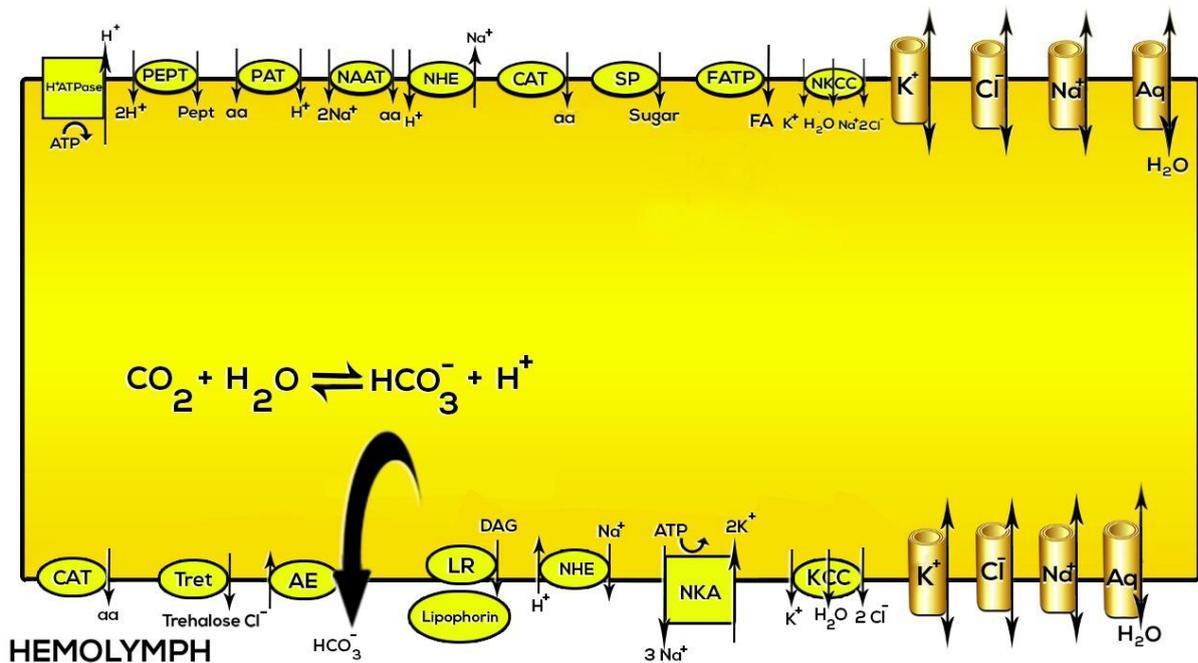


Figura 21 - Célula intestinal de *D. peruvianus*

A anidrase carbônica promove a hidratação do dióxido de carbono a íon bicarbonato, que será retirado pela base da célula pelo transportador AE, com a

entrada de íon cloreto, enquanto que o próton sai apicalmente bombeado pela H^+ -V-ATPase. Essa age em conjunto com os transportadores PAT e PEPT, gerando um gradiente de prótons que será utilizado por esses transportadores para a entrada de aminoácidos e peptídeos. O mesmo gradiente de prótons formado leva à extrusão de Na^+ pelo NHE. O íon Na^+ , por sua vez, é co-transportado para a célula junto com aminoácidos pelo NAAT. Os aminoácidos também podem ser absorvidos passivamente por um CAT apical e transferido para a hemolinfa por um CAT basal.

A manutenção da concentração de íons Na^+ , K^+ e Cl^- é feita pelos transportadores KCC, NKCC, NHE e a Na^+/K^+ ATPase. NKCC e KCC são provavelmente os responsáveis pela maior parte da absorção de água. Canais de água, íons sódio, cloreto e potássio atuam auxiliando no balanceamento do gradiente eletroquímico e o volume celular.

A absorção de glicose ocorre através de transportadores do tipo SP. A transferência de glicose da célula para a hemolinfa não pode ocorrer, porque os insetos não possuem a enzima glicose-6-fosfatase (Dias et al., em preparação), necessária para a remoção de fosfato da glicose. Como se recorda, a primeira coisa que ocorre quando a glicose entra em uma célula é a sua fosforilação pela hexoquinase. A transferência de carboidrato da célula para a hemolinfa é sempre feita na forma de trealose, que é sintetizada a partir de glicose. *D. peruvianus* possui as enzimas necessárias para isso (Dias et al., em preparação). A saída da trealose é feita através dos TRET.

Os ácidos graxos celulares são exportados para a hemolinfa precedido de sua transformação em diacilglicerol (DAG) e seguido de sua transferência para a proteína carreadora hemolinfática lipoforina pelo receptor de lipoforina LR.

6. Conclusão

O transcriptoma foi analisado e foram identificados transportadores e enzimas envolvidos no processo de digestão e a expressão diferencial desses foi determinada e analisada.

O ensaio com as enzimas α -galactosidase e α -N-acetil-D-galactosaminidase demonstrou que ambas enzimas estão presentes no inseto, sendo que a primeira é mais expressa no intestino e a segunda é mais expressa na região da carcaça.

A análise das enzimas envolvidas na formação de diacilglicerol mostrou que provavelmente a via mais utilizada é a acilação do monoacilglicerol a diacilglicerol, para ser levado a lipoforina circulante na hemolinfa.

Foi proposto um modelo de absorção de nutrientes, representado apenas por uma célula, visto que todos os transportadores e enzimas estão presentes no intestino médio inteiro, diferenciando apenas em sua expressão ao longo do intestino.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the cell. 6 ed. New York, 2015.

ALEXANDER, S. P. H., et al. The concise guide to pharmacology 2015/16: Transporters. British Journal of Pharmacology, v. 172, p. 6110-6202, 2015.

ANDERSON, C. M. H. et al. H⁺/Amino Acid Transporter 1 (PAT1) Is The Imino Acid Carrier: An Intestinal Nutrient/Drug Transporter in Human and Rat. Gastroenterology, v. 127, p. 1410-1422, 2004.

ARRESE, E. L. et al. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 31, p. 7-17, 2001.

BEDIKOU, E. M. et al. Biochemical properties of extracellular α -mannosidases from digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. Bulletin of Insectology, v. 62, p. 75-84, 2009.

BENGA, G. On the definition, nomenclature and classification of water channel protein (aquaporins and relatives). Molecular Aspects of Medicine, v. 33, p. 514- 517, 2012.

BIFANO, T. D.; ALEGRIA, T. G. P.; TERRA, W. R. Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior midgut. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 157, p. 1-9, 2010.

CARVALHO, M. C. C. G. e SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. Ciência Rural, v. 40, n.3, p.

735-744, 2010.

CLOSS, E. I. et al. Structure and function of cationic amino acid transporters (CAT). *The Journal of Membrane Biology*, v. 213, p. 67-77, 2006.

COSTA, I. A., et al. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from the midgut tissue of *Dysdercus peruvianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 158, p. 235-241, 2011.

DANIEL, H. Molecular integrative physiology of intestinal peptide transporter. *Annual Review of Physiology*, v. 66, p. 361-84, 2004.

DIAS, R. O., et al. The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin domains in the insect midgut. *Insect Molecular Biology*, v. 27, p. 46-60, 2018.

DUTZLER, R. et al. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, v. 415, p. 287-294, 2002.

EMAMEH, R. Z. et al. Horizontal transfer of β -carbonic anhydrase genes from prokaryotes to protozoans, insects and nematodes. *Parasites & vectors*, v. 9, p. 152-163, 2016.

FERREIRA, C., et al. Insect midgut carboxypeptidases with emphasis on S10 hemipteran and M14 lepidopteran carboxypeptidases. *Insect Molecular Biology*, v. 24, p. 222-239, 2015.

FINN, R. N. Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement. *Nature Communications*, n° 7814, 2015.

FOLLER, P. W. et al. Effect of the Southeast Asian Ovalocytosis Deletion on the Conformational Dynamics of Signal-Anchor Transmembrane Segment 1 of

Red Cell Anion Exchanger 1 (AE1, Band 3, or SLC4A1). *Biochemistry*, v. 56, p. 712- 722, 2017.

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotator proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews*, v.8, p. 917-929, 2007.

FOSTER, J. M.; ROBERTS, D. B. The soluble α -mannosidases of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 27, p. 657-661, 1997.

GOODCHILD, A.J.P. Evolution of the alimentary canal in the hemiptera. *Biology Review*, p. 97-140, 1966.

GORDON, A. and HANNON, G.J. FASTX-TOOLKIT, version 0.0.14: Computer program and documentation distributed by the author. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html by Hannon Lab, 2010.

GOUZY, J., CARRERE, S. and SCHIEX, T. FrameDP: sensitive peptide detection on noisy matured sequences. *Bioinformatics* v. 25, p. 670–671, 2009.

GRIMALD, D., et al. Evolution of insects. 1st edition. New York – NY, 2005.

HASHIRAMOTO, M., et al. Site-directed mutagenesis of GLUT1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 17502-17507, 1992.

HIRSCH, D., STAHL, A., LODISH, F. H. A family of fatty acids transporters conserved from mycobacterium to man. *Cell Biology*, v. 95, p. 8625-

8629, 1998.

HRUZ, P. W. and Mueckler, M. M. Cysteine-Scanning Mutagenesis of Transmembrane Segment 11 of the GLUT1 Facilitative Glucose Transporter†. *Biochemistry*, v. 39, p. 9367-9372, 2000.

HUANG, X. and MADAN, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, v. 9, p. 868–877, 1999.

ISHIBASHI, K. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 989-993, 2006.

JIANG, Y. et al. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, v. 417, p. 523-526, 2002.

KANAMORI, Y. et al. 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 Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, p. 30-7, 2010.

KASAHARA, T. and KASAHARA M. Tryptophan 388 in Putative Transmembrane Segment 10 of the Rat Glucose Transporter Glut1 Is Essential for Glucose Transport. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 29113-29117, 1998.

KLEPPER, J., et al. Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency. *Human Molecular Genetics*, v. 10, p. 63-68, 2001.

KULIK, N. et al. The α -galactosidase type A gene *aglA* from *Aspergillus niger* encodes a fully functional α -N-acetylgalactosaminidase. *Glycobiology*, v. 20, p. 1410-1419, 2010.

LANGMEAD, B. and SALZBERG, S.L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nature Methods*, v. 9, p. 357–359, 2012.

LAUF, P. K and ADRAGNA, N. C. K-Cl Cotransport: Properties and Molecular Mechanism. *Cell Physiology Biochemistry*, v. 10, p. 341-354, 2000.

LI, H., et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, v. 25, p. 2078–2079, 2009.

MILLER, M. M. et al. The invertebrate B^o system transporter, D. melanogaster NAT1 has unique d-amino acid affinity and mediates gut and brain functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, p. 923-931, 2008.

MUECKLER M. and MAKEPEACE C., Analysis of Transmembrane Segment 8 of the GLUT1 Glucose Transporter by Cysteine-scanning Mutagenesis and Substituted Cysteine Accessibility. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 10494-10499, 2004.

MUECKLER M. and MAKEPEACE C., Identification of an Amino Acid Residue That Lies between the Exofacial Vestibule and Exofacial Substrate-binding Site of the Glut1 Sugar Permeation Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 30141-30146, 1997.

MUECKLER M. and MAKEPEACE C., Transmembrane Segment 5 of the Glut1 Glucose Transporter Is an Amphipathic Helix That Forms Part of the Sugar Permeation Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 10923-10926, 1998.

NOMURA, N. et al. Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. *Nature*, v. 526, p. 397-401, 2015.

OLSOWSKI, A., et al. Cysteine Scanning Mutagenesis of Helices 2 and 7 in GLUT1 Identifies an Exofacial Cleft in Both Transmembrane Segments. *Biochemistry*, v. 39, p. 2469-2474, 2000.

PASCIOTTI, S., et al. Lysosomal alpha-mannosidase and alpha-mannosidosis. *Frontiers in Bioscience*, v. 22, p. 157-167, 2017.

PEREIRA, M. J. B., ALBUQUERQUE, F. A., BASTOS, C. S. Pragas do algodoeiro: identificação, biologia e sintomas de ataque. *Revista Brasileira Ol Fibro*, v. 10, p. 1073-1117, 2006.

PIMENTEL, A. C., et al. Role of Cathepsins D in the midgut of *Dysdercus peruvianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 204, p. 45-52, 2017.

ROMERO, M. F. et al. The SLC4 family of bicarbonates (HCO_3^-) transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 34, p. 159-182, 2013.

RUSSEL, J. M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological reviews*, v. 80, p. 211-276, 2000.

SCHÜRMAN, A., et al. Role of Conserved Arginine and Glutamate Residues on the Cytosolic Surface of Glucose Transporters for Transporter Function. *Biochemistry*, v. 36, p. 12897-12902, 1997.

SHENG, S. et al. Characterization of the selective filter of the epithelium sodium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 8572-8581, 2000.

SHINODA, T. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2,4 Å resolution. *Nature*, v. 549, p. 446-451, 2009.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera,

Pyrhocoridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, p. 493-505, 1994.

SILVA, C. P., et al. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*, v. 4, p. 1093-1103, 1995.

SILVA, C. P., RIBEIRO, A. F., TERRA, W. R. Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, p. 1011-1018, 1996.

SILVA, C. P., TERRA, W. R. α -Galactosidase activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochemistry and Physiology*, v. 34, p. 443-460, 1997.

SILVA, C. P., et al. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Structure and Development*, v. 33, p. 139-148, 2004.

SIMPSON, J.T., et al. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, v. 19, p. 1117-1123, 2009.

SLEPKOV, E. R. et al. Structural and functional analysis of the Na^+/H^+ exchanger. *Biochemical Journal*, v. 401, p. 623-633, 2007.

STAHL, A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *European Journal of Physiology*, v. 447, p. 722-727, 2004.

STEINER, H. Y., NAIDER, F. e BECKER, J. The PTR family: a new group

of peptide transporters. *Molecular Microbiology*, v. 16, p. 825-834, 1995.

SUN, Q. et al. Developmental and functional studies of the SLC12 gene family members from *Drosophila melanogaster*. *American Journal of Physiology*, v. 298, p. C26–C37, 2012.

TAMURA, K., et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., GARCIA, E. S. Origin, distribution, properties, and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*, v. 18, p. 423-434, 1988.

VINCE, J. W., REITHMEIER, R. A. F. Identification of Carbonic Anhydrase II Binding Site in the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Anion Exchanger AE1. *Biochemistry*, v. 39, p. 5527- 5533, 2000.

WAGNER, G.P., KIN, K., LYNCH, V.J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Bioscience*, v. 131, p. 281–285, 2012.

WAKABAYASHI S., MUNEKAZU, S. e POUYSSEGUR, J. Molecular physiology of Na^+/H^+ exchangers. *Physiological Reviews*, v. 77, p. 51- 74, 1997.

WANDEL, S. et al., Substitution of conserved tyrosine residues in helix 4 (Y143) and 7 (Y293) affects the activity, but not IAPS-forskolin binding, of the glucose transporter GLUT4. *FEBS Letters*, v. 348, p. 114-118, 1994.

WANG, D. et al. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut- 1 Deficiency Syndrome. *Human mutation*, v. 16, issue 3, 2000.

XIE, Y., et al. SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly

with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* v. 30, p. 1660–1666, 2014.

ZAHA, A. et al. *Biologia Molecular Básica*. 5ª Ed. Porto Alegre – RS, 2015.

ZELLE, K. M. et al. The genetic architecture of Degenerin/Epithelial sodium channels in *Drosophila*. *G3*, v. 3, p. 441-450, 2013.

ZHANG, Z. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, p. 7–12, 2011.

APÊNDICE 1

Tabela Apêndice 1 - Expressão de todas as proteínas avaliadas (DP: desvio padrão).

Nutriente/Enzima	Proteína	Sequência	V1	DP	V2	DP	V3	DP	C	DP
Água	Drip	Dp_450 3.1	2,04	1,6	1,3	1,22	52,4 6	14,6 8	45,1 6	8,6 6
	Aquaporina 12	Dp_122 65.1	0,97	0,35	0,94	0,29	7,48	0,52	6,26	1,9 7
	Prip	Dp_277 3.1	35,2 8	20,6 6	18,8 5	3,1	16,1 4	17,5 9	32,1 8	7,1 8
	Eglp	Dp_997 2.1	79,5 7	11,0 6	82,3 2	16,4 6	91,7 1	34,6 1	41,1 1	4,8
		Dp_427 3.1	0,4	0,21	0,25	0,08	1,05	0,25	106, 41	31, 9
	Bib	Dp_130 83.1	0,06	0,05	0,11	0,06	0,51	0,14	3,98	0,4 3
H ⁺ -ATPase	a	Dp_365 1.1	104, 82	26,3 6	58,2 9	8,64	143, 2	30	15,0 4	3,0 4
		Dp_136 09.1	45,3 2	12,3 6	37,5 5	1,28	87,3	0,78	89,7 5	7,0 2
	d	Dp_710 7.1	160, 48	50,9 9	139, 97	19,7 5	318, 62	7,69	89,7 8	12, 42
	e	Dp_138 28.2	168, 23	18,0 4	158, 87	3,25	279, 39	12,7 4	65,7 7	7,7 8
	16kDa	Dp_130 36.1	4,91	22,0 2	7,18	1	12,7 5	2,86	142, 09	4,2 8
	16kDa	Dp_740 1.1	1136 ,8	226, 65	687, 46	88,3 9	1135 ,46	85,3 3	14,3 5	5,8 3
	21kDa	Dp_268 9.1	135, 58	39,1 6	141, 62	22,3 5	295, 5	25	65,5 4	12, 3
	A	Dp_641 9.1	480, 1	145, 53	423, 95	42,2 7	665, 28	46,9 1	189, 41	24, 86
	B	Dp_112 49.1	296, 65	70,4 6	259, 33	27,5 1	405, 62	21,0 2	124, 1	12, 34
	C	Dp_139 77.1	68,0 3	20,2 6	59,9 8	8,05	85,5 3	2,88	21,1	2,2
		Dp_220 5.1	8,63	3,06	6,1	1,47	20,2 2	3,44	28,1 6	2,9
	D	Dp_574 4.1	140, 68	55,8 4	141, 08	21,8 9	290, 49	17,8 8	79,8 7	11, 79
	E	Dp_707 7.1	271, 53	59,2 9	244, 8	11,5 6	425, 43	18,3 8	109, 98	9,3 4
	F	Dp_159 85.2	185, 04	31,0 4	158, 86	16,1 8	232, 41	9,24	69,6 1	11, 52
	G	Dp_123 49.1	340, 09	16,5 9	292, 34	15,2 3	497, 03	23,4 6	183, 61	20, 45
	H	Dp_134 82.1	210, 15	44,6 4	182, 41	13	318, 44	29,9 9	105, 6	7,0 7
S1	Dp_800 6.1	70,3 6	20,4 6	66,5 4	7,63	133, 44	4,05	32,6 9	3,0 5	

Bomba de sódio potássio	subunidade β	Dp_155 21.1	22,8 9	8,99	14,9 4	3,73	47,5 3	0,76	21,8 6	3,2 6	
		Dp_129 68.1	14,7 6	4,2	14,1 5	2,67	55,7 5	6,28	46,1	3,2 1	
		Dp_460 4	0,05	0,01	0	0	0,03	0,04	9,64	0,7 9	
		Dp_699 1	0,25	0,16	0,03	0,02	0,06	0,05	32,3 6	3,0 5	
		Dp_122 76	0,32	0,22	0,19	0,12	1,05	0,46	3,69	1,2 2	
	subunidade α	Dp_103 99.1	25,7 2	12,6 5	14,2 4	2,71	28,5	11,1 6	86,5 8	13, 4	
Íons	Canal de potássio	Dp_203 60.1	0,08	0,02	0,30 8	0,04	1,22	0,49	3,1	0,8 2	
		Dp_628 6.1	0,4	0,3	0,13	0,11	1,3	0,74	2,17	0,8	
		Dp_138 97.1	0,23	0,15	0,18	0,09	5	2,75	7,8	2,0 9	
		Dp_150 93.1	2,23	0,61	1,24	0,73	6,33	2,02	5,92	1,2 6	
		Dp_439 5.1	23,5 9	13,6 4	10,9 1	2,65	18,3 9	5,98	3,67	0,4	
	Canal de sódio	Dp_134 14	0,62	0,27	0,56	0,21	4,74	0,92	0,09	0,0 8	
		Dp_101 99	1,06	0,56	0,59	0,75	1,52	1,6	44,1 9	54, 49	
		Dp_563 3.1	1,23	0,1	0,64	0,2	1,53	0,45	0,61	0,4 8	
	Trocador Na^+/H^+	Dp_149 77.1	7,78	4,2	10,4 3	2,32	10,5 8	0,9	6,4	0,9 4	
		Dp_155 21.1	22,8 9	8,99	14,9 4	3,73	47,5 3	0,76	21,8 6	3,2 6	
	Canal de cloreto	Dp_141 91.1	5,71	2,64	4,27	0,28	9,21	1,11	9,81	1,3 4	
	Cotransportador de sódio, potássio e cloreto	Dp_729 6.1	9,77	4,08	5,3	0,55	23,1 1	4,85	2,74	0,4 9	
		Dp_131 02.1	14,0 1	8,68	10,6 9	4,81	45,7 9	9,33	19,2 4	4,6 3	
	Cotransportador de potássio e cloreto	Dp_923 8.1	0,14	0,09	0,09	0,02	0,18	0,05	4,81	1,4 4	
	Trocador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$	Dp_472 4.1	14,4	4,51	1,77	0,49	10,1 9	1,65	7,53	0,2	
	Peptídeos	PEPT	Dp_137 53.1	81,1 1	19,7 2	204, 95	29,8	364, 05	59,6 6	36,5 3	14, 06
	Aminoácidos	CAT	Dp_106 17.1	20,9 6	13,1 2	16,6 6	6,33	87,5 8	2,7	6,3	1,4 8
Dp_111 05.1			28,7 7	13,6 3	13,5 4	2,09	5,74	4,45	4,28	3,2 6	
Dp_369 1.1			28,5	0,43	2,01	0,04	2,02	0,24	6,63	1,7 7	
PAT		Dp_580 2.1	56,0 4	22,8 2	21,4 5	6,02	67,6	2,81	16,2 8	4,4 7	
		Dp_350 3.1	51,9 3	24,9 5	27,5 3	3,2	2,62	0,5	27,7	4,9 2	

		Dp_110 74.1	45,6 1	21,9 8	67,7 9	18,6 4	121, 43	37,0 2	102, 59	27, 02	
		Dp_988 9.1	20,2 3	13,0 7	40,5 8	10,1 5	53,0 4	12,0 3	3,53	0,6	
		Dp_367 1.1	8,03	2,84	8,89	2,28	47,5 7	11,0 9	27,3 6	4,2 1	
	NAAT	Dp_634 0.1	0,51	0,38	0,39	0,03	7,9	1,48	10,5 2	3,2 7	
		Dp_995 9.1	38,1 1	9,81	35,3 6	2,21	142, 42	7,93	5,09	0,5 1	
Açúcares	Sugar Porters	Dp_712 7.1	32,8 1	6,65	24,7 4	1,08	2,49	0,52	49,3 8	5,7	
		Dp_980 6.1	45,4 4	10,0 1	80,5 3	10,6	895, 73	212, 74	13,9 1	1,4 2	
		Dp_899 1.1	70,9 8	19,3 8	138, 56	14,1 8	60,2 8	6,2	27,5 3	2,0 7	
			Dp_153 61.2	0,14	0,04	2,38	0,58	25,8 5	3,58	12,2 1	3,1 6
			Dp_347 7.1	46,5	15,1 5	100, 32	14,2 8	311, 38	29,3 2	60,0 1	8,5 1
			Dp_248 0.1	197, 68	2,17	10,9 6	55,6 1	27,6 6	3,53	14,6 7	6,4 7
			Dp_861 5.2	1,11	0,35	31,0 5	7,23	428, 2	89,4 5	27,8 6	4,4 7
			Dp_114 80.1	158, 58	30,3	50,4 3	3,57	35,1 2	9,6	1,74	0,2 4
			Dp_116 91.1	0,83	0,26	0,11	0,04	12,7 3	0,2	17,5 5	4,0 5
			Dp_129 92.1	10,5 6	7,42	17,8 1	4,03	36,8	3,9	18,3 6	16, 73
			Dp_131 51.1	183, 12	80,2	145, 14	50,6 9	142, 4	13,6	5,73	0,8 5
			Dp_135 13.1	45,4 5	16,6 3	41,7 4	12,8 8	107, 68	11,9 2	31,1 3	4,2 5
		TRET	Dp_137 55.1	54,2 7	8,36	31,6 4	3,83	35,1	4,82	9,75	0,4 2
			Dp_137 76.1	60,0 2	57,2 6	113, 02	35,3 7	51,5 7	8,55	11,7	2,2 7
			Dp_232 1.1	26,9	17,0 1	14,9 3	5,93	42,1 3	7,44	26,4 2	2,9 4
			Dp_233 6.1	23,6 8	6,41	9,55	3,36	4,52	1,98	0,14	0,1
			Dp_259 1.1	10,3 8	2,44	14,0 9	1,38	2,22	0,76	2,97	0,5 2
			Dp_365 8.1	2,77	2,69	28,2 2	5,87	31,7 4	19,4 2	4,43	1,3
			Dp_486 3.1	13,5 8	2,46	11,2 6	1,78	0,77	0,38	0,15	0,1 3
			Dp_629 9.1	0,01	0,02	0,01	0,01	118, 15	19,6 3	0,09	0,0 8
	Dp_633 4.1		250, 28	104, 3	7,02	3,29	2,16	1,97	243	44, 78	
	Dp_671 7.1		0,75	1,14	2,17	0,04	4,62	0,68	18,3 5	1,0 3	

	Dp_113 08.1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dp_435 .1	0	0	0	0	0	0	0	0
Trealose-6-fosfato sintase fosfatase	Dp_139 41.1	0,09	0,02	0,15	0,07	0,12	0,08	9,73	3,8 8
	Dp_655 6.1	1	0,04	1,16	0,11	4,8	0,88	14,7 6	1,4 3
Lipases ácidas	Dp_128 37.1	1687 ,17	211, 05	607, 47	30,4	12,0 4	6,17	0,76	0,5 7
	Dp_126 75.1	843, 5	167, 62	1610 ,42	301, 99	225, 13	121, 86	2,52	1,2 8
	Dp_725 1.1	2195 ,61	378, 38	523, 6	128, 76	88,0 5	11,0 9	4,87	7,1 2
	Dp_543 1.1	111, 81	69,6 1	269, 46	102, 61	15,7 1	4,76	56,9 9	41, 42
Lipases pancreáticas	Dp_103 22.1	573, 94	128, 76	2,86	0,74	0,26	0,16	5,6	3,2 4
	Dp_733 3.1	0,99	0,1	1,04	0,54	3,47	2,08	228, 33	47, 77
	Dp_145 37.1	0,23	0,08	0,12	0,08	0,32	0,33	44,6 6	15, 58
NAGA/ α -Galactosidase	Dp_128 41.1	26,0 2	7,53	47,4	5,8	28,7	7,09	31,2 7	8,2 2
	Dp_314 9.1	1	1,73	0,02	0,03	0,93	0,13	40,3 9	5,7 7
α -Manosidase	Dp_132 32.1	0,75	0,63	0,75	0,38	2,31	1,09	82,8 5	7,7 7
	Dp_157 38.1	4,85	6,27	44,1 8	11,0 7	0,9	0,59	0,46	0,1 1
	Dp_157 06.1	0,21	0,16	2,01	0,72	0,21	0,22	52,4 6	6,9 7
	Dp_226 2.1	0,34	0,07	0,33	0,1	0,92	0,17	7,03	1,3 3
	Dp_870 4.1	0,97	0,1	0,71	0,17	2,95	0,26	57,0 3	7,5 9
β - Glicosidase	Dp_112 17.1	351, 73	168, 82	552, 62	114, 75	213, 25	16,6 6	0,64	0,2 5
	Dp_133 17.1	6,66	0,96	0,54	0,6	20,5 9	1,21	31,4 5	3,7 8
	Dp_178 04.1	100, 59	32,1 7	95,8 9	11,8 6	337, 56	42,2 6	68,6 4	17, 87
	Dp_436 4.1	99,2	15,5 7	13,4 3	0,62	0,47	0,47 3	0,29	0,1 3
	Dp_594 3.1	59,9 5	14,2 9	59,6 2	4,45	215, 09	22,3 7	56,9 2	6,8 5
	Dp_920 8.1	291, 5	57,3 3	17,1	1,39	0,68	0,44	0,25	0,3 9

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Bárbara Bacelar Nascimento
07/02/1994, Ipatinga - MG

EDUCAÇÃO

Instituto Federal de Minas Gerais, São João Evangelista – MG, 2011.
Ensino Médio e Técnico em Alimentação

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2017.
Bacharela em Bioquímica

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2019.
Mestrado em Ciências (Bioquímica) – em andamento

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, vigência até 07/2019

PUBLICAÇÕES

NASCIMENTO, B. B., CARDOSO, C., TERRA, W. R. Physiologically-Oriented Transcriptomic Analysis Of The Midgut Of The Bug *Dysdercus Peruvianus*. 47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ), 2018.