

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANDRÉ COPPE PIMENTEL

**Fisiologia Molecular Digestiva da Larva de *Musca*
*domestica***

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

Orientador

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/09/2011

ANDRÉ COPPE PIMENTEL

**Fisiologia Molecular Digestiva da Larva de *Musca
domestica***

*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

2011

Aos meus pais, irmão e família

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra, pela orientação e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

A Dra. Clélia Ferreira, Dra. Adriana Rios Lopes, Dr. Sandro Marana, Dr. Fernando Genta e Dr. Alberto de Freitas Ribeiro pelas discussões.

Aos que me ensinaram o árduo trabalho de bancada Dra. Thaís Bifano, Dr. Fabio Kendi Tamaki e o grande amigo Dr. Marcelo Henrique Padilha.

Aos técnicos que apoiaram este trabalho Luíza Nakabayashi, Maria Ivanilde Marcelino, Christiane Couto, Layla Martins e Luci.

Aos amigos de laboratório Érica Moreira, Dra. Daniela Beton, Daniela de Jesus, Nathalia Ramalho, Walciane da Silva, Dra. Fabiane Cançado, Ivan Bragatto, Kátia Rebola, Ticiane Damasceno, Gilliard, Augusto Crivellari, Pedro Tizei, Fábio Mendes, Dra. Maria do Carmo (Madu), Dra. Maria Cícera (Ciça), João Almeida e Bruno Lira pelas discussões. À aluna de Iniciação Científica Juliene Justino pelo apoio.

A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de mestrado. O projeto teve o apoio da Fapesp, CAPES, CNPq e INCT-EM.

Agradeço aos meus pais Carmem e Geraldo, que sempre estiveram do meu lado, apoiando nos momentos mais difíceis e ao meu irmão Renê, pela inspiração. Essas três pessoas formam a base de quem sou e por isso serei eternamente grato a elas.

Agradeço aos meus avôs, meus familiares, tios e primos, sempre acompanhando minha carreira com palavras de incentivo e carinho.

A querida Sheina Koffler pelas constantes revisões, carinho e imensa paciência. Independente de situação, pude sempre contar com seu apoio.

Aos amigos de sempre Regis Barroso, Renan Souza e Ana Carolina e aos amigos biólogos Renata Aoki, Juliana Vendrami, Ana Teixeira, Barbara Tomotani,

Janaína Meyer, Marcelo Toledo, Daniel Caetano, Luiz Henrique, Carla Verna, Mariana Winandy, Leonardo Hamachi, Felipe Nóbrega, Diego Vasques, Ivan Dias, Adriana Sandre, Leticia Yoshida, Simone Ota, Patricia Tachinardi, Clarice Kim, Aline Tiemi e tantos outros pela grande amizade. Aos amigos da CV, CCSB, da república e dos diversos cursos e viagens.

***“Sofreu durante muito tempo. Não sabia como abraçar a
simplicidade do não saber.
Aos poucos, as coisas começaram a mudar.
A direção que antes levava a nada virou uma nova estrada.
Era bom não ser parte de um plano para o mundo. Pela
primeira vez, o homem velho sentiu-se livre
Podia sempre continuar a perguntar e a aprender sobre o
mundo e sobre si próprio.
Podia sempre amar e esperar que fosse amado.”
Marcelo Gleiser***

RESUMO

Pimentel, A.C. **Fisiologia Molecular Digestiva da Larva de *Musca domestica***. 2011. (ex: 100p). Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A digestão nos insetos ocorre no intestino médio de forma compartimentada. A digestão inicial dos polímeros ocorre no interior da membrana peritrófica. Os oligômeros resultantes difundem-se para o espaço luminal exterior à membrana peritrófica onde são atacados por outras enzimas. Na digestão final os dímeros resultantes são hidrolisados por enzimas imobilizadas na superfície do epitélio do intestino médio. Após o processo de digestão final os monômeros são absorvidos pelas células do epitélio intestinal. Os Díptera ditos superiores, incluindo a mosca doméstica, apresentam peculiaridades digestivas que aparentemente resultam de adaptações para digerir uma dieta que consiste principalmente de bactérias. No ventrículo anterior ocorre uma diminuição no conteúdo de amido do bolo alimentar. Na porção seguinte, o bolo alimentar passa para o ventrículo médio onde as bactérias são mortas pela ação combinada de baixo pH, uma lisozima digestiva e uma proteinase tipo catepsina D. O material liberado das bactérias é digerido no ventrículo posterior, como ocorre no ventrículo inteiro da maioria dos insetos de outros grupos taxonômicos. Com o objetivo de compreender a peculiar digestão em *Musca domestica*, foram utilizadas suas larvas para identificar funcionalmente as regiões absorptivas de nutrientes, identificar as moléculas envolvidas na absorção de nutrientes, identificar as moléculas envolvidas com tamponamento e fluxos de fluidos intestinais, sequenciar as enzimas digestivas principais e identificar os seus sítios de secreção. Experimentos fisiológicos de absorção de glicose e análises de atividade enzimática permitiram acessar de maneira direta os aspectos da digestão. Contudo, experimentos de sequenciamento de bibliotecas de cDNA, análise de sequências transcritas e verificação de expressão de genes em diferentes tecidos foram abordagens fundamentais na identificação das moléculas subjacentes aos processos fisiológicos intestinais de *Musca domestica*. Os indícios de que absorção de glicose no intestino de *Musca domestica* se dê por transportadores do tipo SGLT, com a possível participação de facilitadores do tipo GLUT, permitem estabelecer um

foco para futuros estudos. A descrição de sequências relacionadas ao tamponamento intestinal permitiu ampliar a discussão sobre tal processo. Ao detalhar os sítios de expressão da subunidade a da V-ATPase, do canal de cloreto e do transportador de amônia foi possível testar o modelo de tamponamento proposto anteriormente e propor a participação de outras moléculas no processo. Sequências correspondentes as atividades de carboxipeptidase, maltase e aminopeptidase descritas na literatura foram pesquisadas, gerando sequências candidatas a codificarem as referidas enzimas. Com isso, é possível descrever a digestão de oligômeros e dímeros com base nos genes transcritos e nas sequências de aminoácidos que formam as enzimas digestivas. A descoberta da sequência que transcreve uma metaloproteinase, por sua vez, abre caminhos para a descrição e caracterização de sua atividade proteolítica nos tecidos digestivos da larva de *Musca domestica*. Essa análise permitiu também elucidar a localização dos sítios de expressão e, portanto, as zonas de secreção de enzimas. De maneira geral, este estudo contribuiu para a compreensão de diversos aspectos da digestão de *Musca domestica*, elucidando questões da particular fisiologia digestiva desse inseto.

Palavras-chave: digestão ácida, digestão final, Cyclorrrarpha, V-ATPase, transportador de glicose.

ABSTRACT

Pimentel, A.C. **Digestive Molecular Physiology of *Musca domestica* Larvae.** 2011. (ex. 100p.). Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Digestion in insects occurs in the midgut in a compartmentalized way. Initial digestion takes place inside the peritrophic membrane. The resulting oligomers diffuse into the luminal space outside the peritrophic membrane where they are hydrolyzed by other enzymes. In the final digestion, the resulting dimers are hydrolyzed by enzymes immobilized on the midgut epithelium. After the final digestion, the monomers are absorbed by intestinal epithelial cells. The so-called higher Diptera, including the house fly, have digestive peculiarities apparently resulting of adaptations to digest a diet consisting mainly of bacteria. In the anterior midgut there is a decrease in the starch content of the food bolus. The bolus now passes into the middle midgut, where bacteria are killed by the combined action of low pH, a special lysozyme and a cathepsin D-like proteinase. Finally, the material released by bacteria is digested in the posterior midgut, as is observed in the whole midgut of insects of other taxa. In order to understand the peculiar digestion in *Musca domestica*, the larvae were used to identify (a) the functionally the nutrient absorptive regions, (b) the molecules involved in the absorption of nutrients, (c) the molecules involved in buffering and fluid flows, (d) the cDNA sequences corresponding to intestinal digestive enzymes, (e) the main sites of secretion. Physiological experiments of glucose absorption and enzyme activity analysis allowed a direct access to aspects of digestion. Otherwise, cDNA library sequencing followed by sequence annotation and tissue-specific expression analysis were fundamental approaches in the understanding of intestinal physiology of *Musca domestica*. Evidence that glucose absorption in the gut of *Musca domestica* occurs through SGLT-like transporters, with the possible participation of facilitators GLUT-like, allowed us to establish a focus for future studies. The description of cDNA sequences corresponding to proteins putatively responsible for intestinal buffering widened the discussion of this process. The finding of the expression sites of V-ATPase subunits, chloride channel, and ammonia transporter led to revising the present buffering model and the inclusion of other molecules in the process. The cDNA sequences corresponding to the activities of

carboxypeptidase, aminopeptidase and maltase described in the literature were searched for as candidate sequences to encode those enzymes. This made it possible to describe the digestion of oligomers and dimers based on transcribed genes and enzyme amino acid sequences. The discovery of the metalloproteinase transcribing sequence opened a new research line: the description and characterization of its proteolytic activity in the midgut of the *Musca domestica* larvae. This study also allowed elucidating the location of digestive enzyme expression sites and, therefore, the putative zones of enzyme secretion. Overall, this study contributed to understanding many aspects of digestion of *Musca domestica*, clarifying aspects of the peculiar digestive physiology of this insect.

Keywords: acid digestion, final digestion, Cyclorrapha, V-ATPase, glucose transporter.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura1. Esquema da movimentação dos íons supostamente responsáveis pela manutenção do pH no conteúdo do intestino médio. Retirado de Terra e Regel (1995).....	23
Figura2. Porções do intestino médio de <i>Musca domestica</i> utilizadas nos experimentos.....	29
Figura 3. Representação do intestino médio de <i>Musca domestica</i>	32
Figura 4. Gel de agarose com cDNA dupla fita para confecção de biblioteca.....	34
Figura 5. Distribuição da quantidade de <i>reads</i> (leituras) segundo seu tamanho.....	43
Figura 6. Razão glicose/azul de Evans nas porções do intestino de <i>Musca domestica</i>	44
Figura 7. Efeito da florizina (A) e floretina (B) na absorção de glicose.....	45
Figura 8. Expressão avaliada por RT-PCR dos transportadores SGLT e GLUT de <i>Musca domestica</i>	46
Figura 9. Número de contigs gerados por diferentes quantidades de ESTs.....	48
Figura 10. Proporção de sequências únicas distribuídas segundo suas funções.	49
Figura 11. Expressão avaliada por RT-PCR de diferentes genes que codificam a subunidade G e F da V-ATPase de <i>Musca domestica</i>	50
Figura 12. SDS-Page das subunidades F e G recombinantes da V-ATPase.....	50
Figura 13. Expressão de diferentes genes que codificam a subunidade a da V-ATPase de <i>Musca domestica</i> estudadas por RT-PCR.....	52
Figura 14. Expressão de diferentes genes que codificam a subunidade a da V-ATPase de <i>Musca domestica</i> estudada por RT-PCR.....	52
Figura 15. Expressão avaliada por RT-PCR do Canal de cloreto de <i>Musca domestica</i>	53
Figura 16. Expressão avaliada por RT-PCR da sequencia do transportador de amônia de <i>Musca domestica</i>	54
Figura 17. Sequencias selecionas de aminopeptidase N.....	56
Figura 18. Expressão, verificada por RT-PCR, de diferentes aminopeptidases de <i>Musca domestica</i>	56
Figura 19. Sequencia encontrada de aminopeptidase P (APP).....	57

Figura 20. Verificação da expressão por RT-PCR de dipeptidase.....	58
Figura 21. Avaliação da expressão de carboxipeptidase A por RT-PCR.....	58
Figura 22. Sequência completa de carboxipeptidase A como nucleotídeos e aminoácidos.....	59
Figura 23. Expressão de metaloproteinase verificada por RT-PCR (20, 25 e 30 ciclos).....	60
Figura 24. Atividade hidrolítica sobre maltose em diferentes porções do intestino médio de <i>Musca domestica</i>	62
Figura 25. RT-PCR 25 e 30 ciclos de Maltase.....	63
Figura 26. Sequência da maltase de <i>Musca domestica</i>	64
Figura 27. Esquema de movimentação de íons no processo de acidificação da porção média do intestino médio de <i>Musca domestica</i>	67
Figura 28. Enzimas proteolíticas de <i>Musca domestica</i>	71
Figura 29. Carboidrases de <i>Musca domestica</i>	73
Tabela 1. Número de <i>reads</i> que formaram cada um dos <i>contigs</i> de GLUT.....	47
Tabela 2. Número de sequências obtidas pelo sequenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina Trifosfato

APN: aminopeptidase N

APP: aminopeptidase P

cDNA: Ácido Desoxirribonucléico Complementar

DEPC: Dietil Pirocarbonato

dNTP: Desoxirribonucleotíde Fosfatado

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EST: Etiquetas de Sequências Expressas

GLUT: Transportador de Glicose

GPI: Glicosil Fosfatidil Inositol

IPTG: Isopropil beta-D-1-tiogalactosídeo

LB: Meio de cultura Luria-Bertani

mRNA: RNA mensageiro

PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: cologaritmo de concentração de H⁺.

RPM: Rotação Por Minuto

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa seguida de PCR

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SGLT: Cotransportador Sódio/Glicose

Tris: Tris-hidroximetil aminometano

TAE: Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Considerações iniciais.....	17
1.2. Digestão em insetos.....	18
1.3. Digestão terminal em Diptera “superiores” (Cyclorrhapha).....	18
1.4. Absorção de glicose.....	20
1.5. Absorção de glicose em insetos.....	21
1.6. Tamponamento do intestino médio de <i>Musca domestica</i>	22
1.7. Vacuolar H ⁺ -ATPase.....	24
1.8. Vacuolar H ⁺ -ATPase em epitélio de insetos.....	26
1.9. Transportador de amônia Rhesus-símile.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.1. Animais.....	29
3.2. Preparação de amostras para ensaios de maltase.....	29
3.3. Ensaio enzimático.....	30
3.4. Absorção de glicose em larvas de <i>Musca domestica</i>	30
3.5. Extração de RNA.....	31
3.6. Purificação de RNA mensageiro.....	33
3.7. Construção da biblioteca de cDNA.....	33
3.8. Produção de cDNA.....	35
3.9. PCR e RT-PCR Semiquantitativo.....	36
3.10. Pirosequenciamento.....	37
3.11. Análise de sequências em banco de dados.....	37
3.12. Reação de sequenciamento de DNA.....	38
3.13. Ligação dos fragmentos de cDNA a plasmídeos vetores.....	38
3.14. Clonagem em vetor pAE.....	39
3.15. Transformação de bactérias competentes para expressão.....	40

3.16. Expressão das subunidades da V-ATPase recombinantes com vetor pAE.....	40
3.17. Eletroforeses.....	41
3.18. Meios e soluções.....	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Banco de dados do pirosequenciamento.....	43
4.2. Absorção de glicose em larvas de <i>Musca domestica</i>	44
4.2.1. Fisiologia da absorção de glicose em larvas de <i>Musca domestica</i>	44
4.2.2. Sequencias e zonas de expressão dos transportadores de glicose....	46
4.3. Tamponamento intestinal de <i>Musca domestica</i>	47
4.3.1. Sequenciamento ao Acaso de cDNAs gerados a partir de fração do intestino médio de <i>Musca domestica</i> – Células oxínticas.....	47
4.3.2. V-ATPases nas células oxínticas.....	49
4.3.3. Expressão de subunidades da V-ATPase.....	50
4.3.4. Subunidade a da V-ATPase.....	51
4.3.5. Canal de cloreto.....	53
4.3.6. Transportador de amônia.....	53
4.4. Enzimas digestivas de <i>Musca domestica</i>	54
4.4.1. Aminopeptidase N e aminopeptidase P.....	54
4.4.2. Dipeptidase.....	57
4.4.3. Carboxipeptidase A.....	58
4.4.4. Metaloproteinase.....	60
4.4.5. Maltase.....	60
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Absorção de glicose.....	65
5.2. Tamponamento intestinal.....	66
5.2.1. Processo de acidificação.....	66
5.2.2. Processo de alcalinização.....	68
5.3. Digestão intermediária e final em <i>Musca domestica</i>	69
5.3.1. Proteinases e peptidases.....	69
5.3.2. Carboidrases.....	72

6. CONCLUSÕES.....	74
7. BIBLIOGRAFIA.....	75
8. APÊNDICES.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

Os insetos são, sem dúvida, o grupo predominante da Terra. Eles representam 75% das espécies animais e 57% das espécies vivas, se considerarmos também as plantas e os protozoários (ver Grimaldi & Engel, 2005). Estima-se que os insetos consomem 10% da biomassa vegetal (Schoonhoven *et al.*, 2005) anualmente, além de serem transmissores de doenças em plantas e animais, inclusive o homem.

Os inseticidas químicos selecionam indivíduos que tem mutações naturais em enzimas que desintoxicam produtos químicos, como os herbívoros (Coleoptera e principalmente Lepidoptera), que através dos seus diferentes mecanismos de resistência se adaptaram para resistir ao grande arsenal químico de defesas das plantas. Os verdadeiros afetados são as abelhas e mariposas selvagens e os parasitóides e predadores das pragas agrícolas, que não tem a mesma defesa química. Dessa forma, além de eliminar os inimigos naturais, selecionamos artificialmente, de forma global, pragas cada vez mais resistentes a agentes químicos. Pelo exposto acima fica claro o quanto o desenvolvimento de outras formas de controle de insetos é necessário.

Após a conscientização de que o tubo digestivo é uma enorme interface relativamente pouco protegida entre o inseto e o meio ambiente, uma compreensão da função intestinal foi considerada essencial para o desenvolvimento de novos métodos de controle agindo através do intestino, tais como o uso de plantas transgênicas para controlar insetos fitófagos (Law *et al.*, 1992). Aproximadamente nessa época, o nosso laboratório escolheu a estratégia de estudar detalhadamente insetos-modelo dispostos em pontos relevantes da árvore filogenética, a fim de produzir generalizações que pudessem valer para insetos de interesse aplicado que carecessem de estudos básicos. Esses estudos, que revimos várias vezes à medida que avançavam (Terra, 1988; 1990; Terra & Ferreira, 1994; 2005), avaliavam a organização do processo digestivo através do estudo da distribuição de enzimas nas diferentes partes do intestino e dos fluxos de fluidos intestinais, associados a análises morfológicas macro e ultraestruturais dos tecidos intestinais e do isolamento e caracterização de enzimas representativas. Esses estudos mostraram que o processo digestivo nos insetos organiza-se em padrões filogeneticamente

determinados e permitiram o levantamento de hipóteses sobre o papel da membrana peritrófica (estrutura anatômica, quitino-proteica, que separa o alimento da superfície intestinal no interior do intestino dos insetos) (Terra, 2001) e das membranas perimicrovilares (membrana lipoprotéica que recobre as microvilosidades intestinais como dedo de luva e que terminam em fundo cego) dos Hemiptera (percevejos, cigarras e pulgões) (Terra *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do setor passa pela ampliação do conhecimento dos eventos moleculares subjacentes aos fenômenos fisiológicos intestinais, o que requer conhecimento das enzimas digestivas em detalhe estrutural, assim como de proteínas associadas a outras funções intestinais tais como: transportadores, receptores, bombas, proteínas relacionadas aos mecanismos de secreção, etc.

1.2. Digestão em insetos

A digestão nos insetos ocorre no intestino médio (ventrículo) de forma compartimentada. A digestão inicial dos polímeros (amido, proteína, etc...) ocorre no interior da membrana peritrófica. Os oligômeros resultantes difundem-se para o espaço luminal exterior à membrana peritrófica onde são atacados por outras enzimas (carboxipeptidase, aminopeptidases) e, finalmente, na digestão final os dímeros resultantes são hidrolisados por enzimas imobilizadas na superfície do epitélio do intestino médio. Essa imobilização ocorre devido ao fato das enzimas serem integrantes de membrana em alguns insetos ou por estarem firmemente associados ao glicocálix celular em outros. Ocorre uma circulação endo-ectoperitrófica (isto é entre os espaços interiores e exteriores à membrana peritrófica) de enzimas de digestão inicial, o que leva a uma grande economia dessas enzimas, pois impede a sua excreção junto com o alimento não digerido. Essa circulação ocorre graças à secreção de água na região posterior do intestino médio (ventrículo) e sua absorção na região anterior. Dependendo do grupo filogenético, ocorrem variações nesse esquema (Terra, 1990; Terra & Ferreira, 1994, 2005).

1.3. Digestão terminal em Diptera “superiores” (Cyclorrhapha)

Os Díptera superiores, incluindo a mosca doméstica, apresentam peculiaridades digestivas que aparentemente resultam de adaptações para digerir uma dieta que consiste principalmente de bactérias. No ventrículo anterior ocorre uma diminuição no conteúdo de amido do bolo alimentar graças à ação de uma amilase. O bolo passa agora para o ventrículo médio onde as bactérias são mortas pela ação combinada de baixo pH, uma lisozima especial e uma aspártico proteinase do tipo catepsina D (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Lemos & Terra, 1991a; Lemos & Terra, 1991b).

Finalmente, o material liberado das bactérias é digerido no ventrículo posterior, como ocorre no ventrículo inteiro da maioria dos insetos de outros grupos taxonômicos. Fluxos em contracorrente ocorrem no ventrículo posterior ocasionados pela secreção de fluido na parte distal do ventrículo posterior e sua absorção no ventrículo médio. Após o processo de alcalinização do conteúdo luminal, atuam no espaço endoperitrófico as tripsinas, quimotripsinas, carboxipeptidase A e alfa-glicosidases que liberam oligopeptídeos que passam para o espaço ectoperitrófico, onde ocorre a digestão final (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987, Jordão & Terra, 1991).

O processo de digestão final é o último processo de hidrólise do alimento, permitindo assim sua absorção na forma de monômeros (como glicose, frutose, aminoácidos, etc.). As enzimas ligadas à membrana ou imobilizadas no glicocálix como aminopeptidase, carboxipeptidase, dipeptidase, maltase e trealase hidrolisam os oligopeptídeos liberando aminoácidos e monosacarídeos prontos para serem absorvidos (Jordão & Terra, 1991).

Jordão & Terra (1991) descrevem a partir de preparações da porção posterior do intestino médio de *Musca domestica* a presença de três alfa-glicosidases, duas solúveis e uma ligada à membrana. Os autores descrevem também atividade sobre L-leucina p-nitroanilina (atividade de aminopeptidase) ligada à membrana, não encontrando qualquer atividade nas frações solúveis da porção intestinal estudada. O estudo de Jordão & Terra (1989) revelou a presença das enzimas carboxipeptidase e dipeptidase no ventrículo posterior de *Musca domestica*, sendo que há atividade de carboxipeptidase A nas células (ou membrana celular), associado ao glicocalix e no conteúdo do ventrículo. Pode-se verificar também a presença de uma atividade de dipeptidase associada às células. No entanto, não se

tem ainda informações mais precisas sobre os mecanismos de secreção dessas enzimas ou mesmo sobre suas identidades.

1.4. Absorção de glicose

A absorção de glicose no intestino dos mamíferos compreende dois componentes: o cotransportador ou simportador Na^+ /glicose (SGLT1) e o transportador facilitativo ou uniportador (GLUT2). Crane *et al.* (1961) foi o primeiro a formular o conceito de cotransporte para explicar o transporte ativo. Ele propôs que o movimento de glicose pela membrana das microvilosidades intestinais era acoplado com o transporte de Na^+ no mesmo sentido da glicose com o envolvimento de um transportador chamado transportador sódio-glicose (SGLT). O simportador é estritamente dependente da presença de Na^+ , é inibido por florizina e é encontrado na membrana apical de enterócitos. Em contraste, o uniportador é inibido por fioletina e citocalasina B e está localizado na membrana basolateral de enterócitos (Hediger *et al.*, 1987; Kellett, 2001).

SGLT e GLUT são transportadores que pertencem a famílias da série gênica dos carreadores de solutos (SLC). A família SGLT inclui 11 genes humanos expressos em tecidos desde epiteliais até no sistema nervoso central. O mais bem conhecido membro desta família é o SGLT1 (SLC5A1) expresso no intestino, que transporta glicose ou galactose com Na^+ e água (Wright, 2001; Scheepers *et al.*; 2004; Wright & Turk, 2004).

A família GLUT (nome do gene SLC2A) é composto por 14 genes humanos que podem ser divididos em 3 subfamílias de acordo com a similaridade de sequência. Os GLUT de classe 1 incluem os transportadores melhor conhecidos: GLUT1, preferencialmente expressos em eritrócitos e GLUT2, constitutivamente expresso na membrana basolateral de enterócitos (Scheepers *et al.*, 2004; Kellett *et al.*, 2008).

O modelo clássico de absorção de glicose em mamíferos considera que a glicose resultante da digestão do alimento é absorvida inicialmente pelo SGLT1 no ápice da célula. A glicose, agora no citoplasma do enterócito, é transportada pelo GLUT2 presente na membrana basolateral para a corrente sanguínea, a favor do gradiente de concentração. Contudo, para altas concentrações luminiais de glicose, este modelo não é válido. Neste caso, a absorção de glicose é explicada pelo modelo do GLUT2 apical, no qual o SGLT1 funcionaria como um sinalizador que

teria como final da sua rota a exposição de GLUT2 no ápice da célula (Araújo & Martel, 2009).

1.5. Absorção de glicose em insetos

A absorção de glicose pelo intestino médio de insetos vem sendo estudada há mais de 50 anos, sendo que sempre houve um consenso sobre a glicose ser absorvida por simples difusão (Treherne, 1957; Treherne, 1958; Crailsheim, 1988). Contudo, avanços no conhecimento de transportadores de glicose em mamíferos estimularam seu estudo em insetos, como por exemplo, os estudos moleculares do transportador GLUT. Para *Drosophila*, Escher & Rasmuson-Lestander (1999) descreveram uma sequência com forte similaridade com transportadores de glicose do tipo GLUT de mamíferos. Sua comparação com outros transportadores do tipo GLUT demonstrou a presença de diversos motivos e resíduos de aminoácidos conservados.

Mais recentemente, o envolvimento do facilitador do transporte de glicose (GLUT) foi descrito na epiderme e no intestino médio de insetos (Giordana *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2006; Caccia *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2007). Foi verificada a expressão de GLUT8 em diversos tecidos da formiga *Solenopsis invicta*: cérebro, intestino médio, intestino posterior, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso e ovário (Chen *et al.*, 2006). A clonagem e expressão de um transportador de glicose da cigarrinha *Nilaparvata lugens* permitiu verificar um transporte de glicose saturável, independente de sódio e passível de inibição por citocalasina B, características típicas dos transportadores do tipo GLUT. A expressão deste transportador se dá no intestino médio, mas não em túbulos de Malpighi ou no intestino posterior. As análises cinéticas demonstram que o transportador é específico de glicose, não havendo transporte de frutose (Price *et al.*, 2007). Foi feita a demonstração funcional da presença dos transportadores SGLT1 e GLUT2 no intestino médio do parasitóide himenóptero *Aphidius ervi* (Caccia *et al.* 2007). Contudo, o cDNA correspondente não foi clonado. Transportadores de tipo GLUT e do tipo SGLT foram parcialmente sequenciados em *Dydercus peruvianus* (Hemiptera) e indícios de suas atividades foram demonstrados *in vivo*. Diferentemente dos SGLT de mamíferos, os ensaios fisiológicos indicaram cotransporte glicose/ K⁺ (Bifano *et al.*, 2010).

Os maiores avanços nos estudos de absorção de glicose no intestino médio de insetos ocorreram nos Hemiptera (Bifano *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2007). Ainda não há, portanto, um modelo de absorção de glicose proposto para os Díptera ou mesmo quais transportadores atuariam na absorção.

1.6. Tamponamento do intestino médio de *Musca domestica*

O ventrículo médio possui células especializadas para tamponar os conteúdos luminiais na zona ácida, além de funcionar na absorção de fluido. Essas células são chamadas células oxínticas (também conhecidas como células cuprofílicas por sua capacidade de ligar cobre) e são morfológicamente distintas das demais células do epitélio digestivo devido, entre outras razões, à invaginação da sua membrana apical tendo também uma alta densidade de mitocôndrias no seu citoplasma (Terra *et al.*, 1988a). As células oxínticas apresentam uma diferenciação celular dependente do gene *labial*, o que foi demonstrado em experimentos com *Drosophila* em que não houve diferenciação das células oxínticas na presença de genes mutados (Hoppler & Blenz, 1994). Outra decorrência dessa mutação é a ausência do fenômeno de acidificação do ventrículo médio (Dubreuil *et al.*, 1998).

O pH do intestino médio (ventrículo) da larva de *M. domestica* é 6,1 na região anterior, 3,1 na média e 6,8 na posterior (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). A demonstração de uma anidrase carbônica ativa ao longo do intestino médio pode explicar a origem de prótons e bicarbonato no processo de tamponamento. Entretanto, a não detecção de ATPases ativadas por K^+ tornou incerto o mecanismo de acidificação da região média, enquanto que a descoberta de ATPase ativada por bicarbonato sugeriu um mecanismo para neutralização dos conteúdos intestinais da região posterior do intestino médio (Terra *et al.*, 1988). O processo de acidificação da região média e a neutralização do conteúdo da região posterior foram reestudados por Terra & Regel (1995) (ver figura 1) em busca de mais detalhes e da confirmação das hipóteses aventadas. Para realizar essa descrição foram determinados os valores de pH luminiais e as concentrações de amônia, cloreto e fosfato na presença e ausência dos inibidores ouabaína e vanadato no ventrículo das larvas de *M. domestica* e, juntamente com dados já publicados e referidos acima, foram propostos os seguintes mecanismos de tamponamento. A anidrase carbônica nas células oxínticas do ventrículo médio produz ácido carbônico, que se

dissocia em próton e bicarbonato. O bicarbonato é transportado para a hemolinfa, enquanto que o próton é ativamente translocado para o lúmen ventricular por uma ATPase tipo P similar a H^+/K^+ -ATPase gástrica de mamíferos (Pedersen & Carafoli, 1987). Íons cloreto seguem os prótons translocados por um transportador provavelmente específico (figura 1). A proposta da participação de P-ATPase no processo de acidificação foi considerada a melhor explicação para a acidificação da região média, embora trabalho anterior (Terra *et al.*, 1988) tivesse falhado em detectar esse tipo de enzima. O fato de V-ATPases terem sido responsabilizadas pelo processo de translocação de prótons em vários epitélios (Davies *et al.*, 1996; Debreuil, 2004) incentivou uma re-investigação do fenômeno. Para isso, o estudo das proteínas expressas nas células oxínticas poderia ampliar o conhecimento acerca da digestão ácida definindo os transportadores responsáveis pela secreção de prótons.

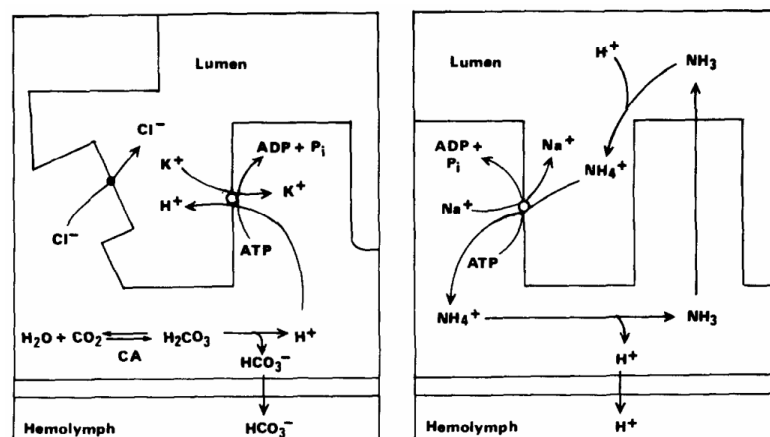


Figura 1. Esquema da movimentação dos íons supostamente responsáveis pela manutenção do pH no conteúdo do intestino médio. Retirado de Terra e Regel (1995).

O processo de alcalinização da região proximal da porção posterior de intestino médio foi atribuído inicialmente à participação do íon bicarbonato gerada pela anidrase carbônica e secretado por ATPase ativada por bicarbonato (Terra *et al.*, 1988). Em diversas espécies de mosquitos, cujos lumens intestinais sofrem grande alcalinização, a participação da anidrase carbônica é fundamental na secreção de íons bicarbonato (Corena *et al.*, 2004). Contudo, a inibição da anidrase carbônica em experimentos com *Musca domestica* afetou a acidificação da região média, impedindo ver seu efeito no processo de alcalinização (Terra & Regel, 1995). Além disso, verificou-se que a concentração luminal de bicarbonato é muito baixa,

enquanto que a amônia é alta (Terra & Regel, 1995). Neste caso, foi sugerido que a alcalinização fosse devida à presença de amônia, que seria responsável pelo tamponamento alcalino. No ventrículo posterior, amônia difundir-se-ia para o lúmen, tornando-se protonada e neutralizando o conteúdo. O íon amônio seria trocado por Na^+ por uma Na^+/K^+ -ATPase microvilar hipotética. Dentro das células, o íon amônio formaria amônia que se difunde para o lúmen, enquanto o próton vai para a hemolinfa, neutralizando o bicarbonato originado a partir do ventrículo médio. Deve-se notar que processos de alcalinização podem ser diferentes do proposto, principalmente para atingir pHs mais elevados, como os observados em larvas de mosquitos (Boudko *et al.*, 2001).

1.7. Vacuolar H^+ -ATPase

As vacuolar H^+ -ATPases (ou V-ATPases) tem como função a acidificação de compartimentos celulares em células eucarióticas, podendo ser encontradas nos mais diversos compartimentos, como endossomos, lisossomos, vesículas sinápticas. A acidificação de compartimentos celulares desempenha importante papel em processos celulares, incluindo endocitose mediada por receptor, direcionamento intracelular de enzimas lisossômicas recém sintetizadas, processamento e degradação de macromoléculas e acoplamento do transporte de pequenas moléculas. As V-ATPases foram também descritas na membrana citoplasmática atuando na acidificação renal, reabsorção óssea, manutenção do pH citoplasmático e transporte de K^+ em intestino médio de insetos (Stevens & Forgac, 1997).

As V-ATPases tem importante função no tráfego de membranas, atuando na acidificação de endossomos e, com isso, há dissociação de ligantes dos processos de endocitose mediada por receptor liberando assim vesículas com seus receptores livres que são encaminhadas novamente para a membrana plasmática. O mesmo processo ocorre na liberação de enzimas lisossomais de receptores de manose-6-fosfato, permitindo a recuperação desses receptores para o *trans*-Golgi (Creek & Sly, 1984). É importante ressaltar que nos processos citados, a atuação de V-ATPase na liberação de íons H^+ é acompanhada pela atuação de um canal de cloreto necessária à dissipação do potencial de membrana gerado pela translocação de prótons.

As V-ATPases presentes na membrana plasmática de células especializadas podem desempenhar diversas funções. Por exemplo, o transporte de prótons nos ductos coletores presentes no rim de mamíferos se dá através das V-ATPases. Há também o controle do pH citossólico pela ação das V-ATPases, que são expostas ao meio externo por exocitose, quando o pH citossólico é baixo, e internalizadas na situação de alto pH citossólico (Gluck *et al.*, 1982). Os osteoclastos promovem a reabsorção da matriz óssea pela ação do baixo pH gerado pelas V-ATPases, sensíveis a vanadato, que além de solubilizar a matriz também ativam enzimas degradativas (Blair *et al.*, 1989). Em epitélios de insetos (que inclui o intestino médio) as V-ATPases desempenham o papel de gerar um potencial de membrana utilizado por um antiportador H^+/K^+ que resulta no transporte do íon K^+ para o lúmen (Harvey *et al.*, 1983, Wieczorek *et al.*, 2009).

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

As V-ATPases são formadas por um complexo de subunidades que formam o domínio periférico V_1 responsável pela hidrólise da ATP e o domínio associado à membrana V_0 responsável pela translocação do próton (Stevens & Forgac, 1997). Subunidades da V_1 são representadas por letras maiúsculas e subunidades de V_0 por letras minúsculas segundo convenção. O complexo V_1 consiste em: um domínio globular em anel formado por três subunidades A e B alternadas; centro rotacional alongado formado por cópias únicas das subunidades D e F; e por uma região periférica alongada formada pelas subunidades C, E, G e H. O complexo transportador de próton V_0 consiste em seis ou mais subunidades c, formando uma estrutura em anel. O modelo funcional mais amplamente aceito diz que as V-ATPases apresentam uma região estática e outra móvel. A região móvel (ou rotor) é composta pelas subunidades D, F e o anel de subunidades c. As demais subunidades compõem a região estática (Beyenbach & Wieczorek, 2006).

A forma com a qual a rotação do motor impulsiona o próton através da membrana se baseia em recentes propostas que utilizam tanto a F-ATPase quanto as V-ATPases para tal compreensão (Murata *et al.*, 2005). A subunidade a matem dois semi-canais de H⁺ próximos ao anel de subunidades c. Tais canais permitem o acesso de H⁺ citossólico aos seus sítios de ligação nas subunidades c que, após o ciclo de 360° do rotor, acessam agora o outro lado da membrana através do segundo semi-canal de H⁺ da subunidade a (Meier *et al.*, 2005).

Nos eucariotos multicelulares diferentes isoformas das subunidades de V-ATPase apresentam expressão específica para tipos celulares ou tecidos específicos. Em mamíferos, por exemplo, foram identificadas diferentes isoformas em rim, ouvido interno, cérebro, osteoclastos, células alveolares e o acrossomo (Beyenbach & Wieczorek, 2006). Foi demonstrada a expressão tecido-específica de isoformas das subunidades da V-ATPase em mamíferos (Murata *et al.*, 2002, Nishi *et al.*, 2003).

1.8. Vacuolar H⁺-ATPase em epitélio de insetos

Em insetos as V-ATPases são encontradas na membrana apical de quase todos tecidos epiteliais (como glândulas salivares, intestino médio e túbulos de Malpighi), garantindo o transporte ativo secundário pelo epitélio (Wieczorek *et al.*, 2009). Em *Drosophila* a V-ATPase é codificada por 33 genes (que inclui as subunidades e proteínas acessórias). Estudo em *Drosophila* demonstrou haver apenas uma holoenzima de membrana plasmática, que consiste em uma única isoenzima composta por subunidades de genes bem definidos (Allan *et al.*, 2005).

A subunidade a é codificada caracteristicamente por vários genes e há indícios de serem diferencialmente expressos (Nishi *et al.*, 2003). Um dos genes que codificam a subunidade a da V-ATPase em *Drosophila* (*vha100-4*) tem, pelo menos na fase embrionária, expressão restrita às células oxínticas. A mesma subunidade é expressa por dois genes diferentes no intestino médio da fase adulta (*vha100-1* e *vha100-2*) sendo que apenas um dos genes foi atribuído à expressão epitelial (*vha100-2*) (Allan *et al.*, 2005). A maior quantidade de genes que codificam a subunidade a sugere uma expressão específica para cada função exercida pela V-ATPase sendo, portanto, um possível alvo para estudos dos papéis fisiológicos da V-ATPase.

1.9. Transportador de amônia Rhesus-símile

As proteínas Rh (Rhesus) foram reconhecidas em mamíferos como membros da superfamília Amt/Mep (transportador de amônia/metilamônio permease) graças à homologia da estrutura primária das proteínas Rh com Amt/Mep de bactérias, Archaea, fungos e plantas (Marini *et al.*, 1997). Em humanos, a família das proteínas Rh é composta por cinco membros, três deles associados aos eritrócitos (RhCE, RhD e RhAG) e dois membros (RhBG e RhCG) que foram caracterizados com expressão em diversos tecidos, incluindo o rim. RhBG e RhCG facilitam o movimento de amônia pela membrana de maneira rápida, de baixo custo energético e bidirecional (Zidi-Yahioui *et al.*, 2005).

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

2. OBJETIVOS

Os objetivos do projeto, a serem perseguidos usando-se larvas de *M. domestica*, distribuem-se em 3 vertentes principais.

- (a) Identificar funcionalmente as regiões absorptivas de nutrientes e identificar as moléculas envolvidas.
- (b) Identificar as moléculas envolvidas com tamponamento e fluxos de fluidos intestinais.
- (c) Sequenciar os genes que codificam as enzimas digestivas principais e identificar os seus sítios de secreção.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Animais

A cultura de *Musca domestica* (Diptera: Cyclorrhapha) utilizada, é mantida no laboratório desde 1985. Uma mistura fermentada de ração comercial para porco e casca de arroz (2:5 v/v) é o substrato onde as larvas se alimentam até atingirem a fase de pupa.

3.2. Preparação de amostras para ensaios de maltase

As larvas de *Musca domestica* são alimentadas com agarose 1% por 2 horas e posteriormente dissecadas em uma solução de NaCl 150 mM depois de imobilizadas em gelo. A porção referente ao intestino médio foi retirada e dividida em oito partes conforme figura 2E.

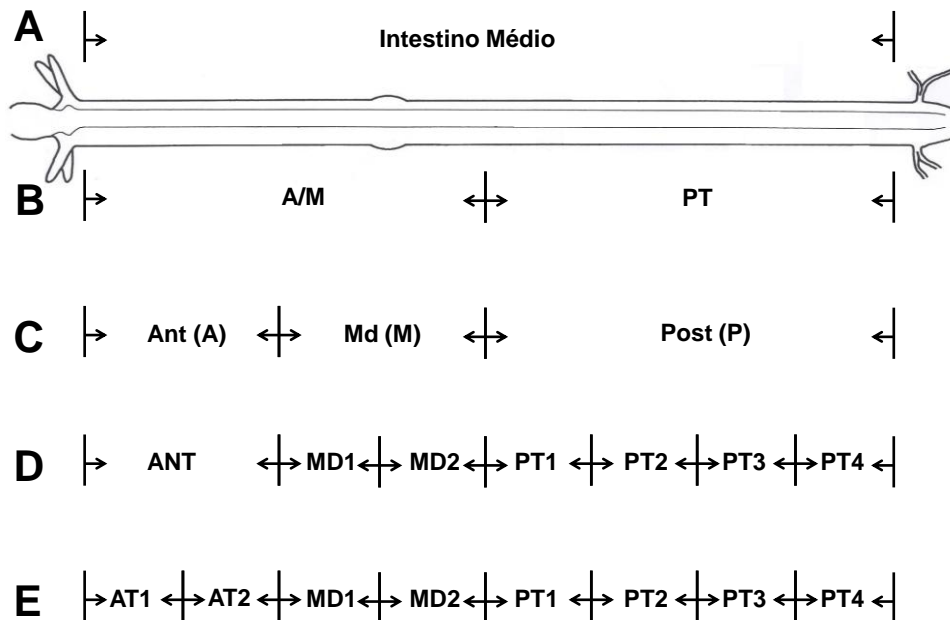


Figura 2. Porções do intestino médio de *Musca domestica* utilizadas nos experimentos. A. Intestino médio total; B. Intestino médio com duas divisões; C. Intestino médio com três divisões; D. Intestino médio com sete divisões; E. Intestino médio com oito divisões.

Cada porção de intestino médio retirado das larvas foi homogeneizada em água destilada e deionizada (Milli-Q), com um homogeneizador do tipo Potter-

Elvehjem. Os procedimentos seguintes foram os mesmos para as oito porções: Ao homogeneizado foram adicionados inibidores de endoproteases (benzamidina 30mM e pepstatina 1mM) para evitar a perda de atividade por degradação das enzimas. Este foi, então, centrifugado a 14000 rpm por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante, que continha enzimas que estavam solúveis no conteúdo, foi transferido para outro recipiente e armazenado. O material que estava aderido ao fundo do tubo foi, ressuspensionado em KCl 150mM, pH: 7.0, submetido ao processo de congelamento e descongelamento por três vezes e depois centrifugado, nas mesmas condições citadas acima, de maneira que as enzimas que pudessem estar presas ao glicocálix estavam, agora, no sobrenadante, que foi coletado e armazenado e o material que ficou aderido ao tubo foi ressuspensionado em Triton X-100 (3%). O Triton – X 100 atua como um detergente, emulsificando a membrana das células e liberando as proteínas que estavam associadas a ela. Na produção de 1 ml de homogeneizado inicial são utilizados o intestino médio de aproximadamente 50 larvas, ou seja, 50 animais/ml. Os tratamentos indicados acima (suspensão em KCl e Triton X-100) foram feitos com volumes idênticos ao volume da primeira homogeneização de modo a manter a razão 50 animais/ml.

3.3. Ensaio enzimático

Os ensaio para atividade de maltase foi feito com uma concentração final de 14mM de maltose. O ensaio foi montado com a adição de 50µl de solução de maltose, 50µl de tampão citrato-fosfato 100mM, pH 6.3 e 20µl de homogeneizado. A reação foi mantida a 30 °C em banho termostatizado por diferentes períodos de tempo, sendo interrompida por fervura por 5 minutos, para cessar a atividade. De cada tubo foi retirada uma amostra (30µl) e passada para uma placa do tipo Elisa, e a cada amostra foi adicionado 300µl de Tris/Glicose Oxidase (TGO), que emite coloração marrom-alaranjada na presença de glicose (Dahlqvist, 1968). A leitura foi feita com um espectrofotômetro de absorvância (a 420nm). Cada molécula de maltose libera duas moléculas de glicose quando hidrolisada. 1 U de enzima é definido como a quantidade capaz de hidrolisar 1µmol de substrato (ou ligação) por minuto.

3.4. Absorção de glicose em larvas de *Musca domestica*

Foi preparado gel de agarose 0,5% contendo 200mM de glicose e Azul de Evans 0,1%. Esse material foi oferecido para as larvas de terceiro instar para posterior análise do seu conteúdo ventricular. Em alguns experimentos houve a adição de 50mM de K_2SO_4 , 50mM de Na_2SO_4 , 0,2 mM de floretina ou 0,1 mM de florizina.

Após 2h em contato com o alimento, tempo necessário para o preenchimento total do intestino com a nova dieta, as larvas foram rapidamente lavadas com água, secas e imobilizadas em gelo para dissecação. O intestino médio foi dividido conforme figura 2E. O conteúdo das porções foi separado do epitélio que o continha através de dissecação, disperso em volume conhecido de água e sua absorvância foi lida em dois comprimentos de onda distintos, sendo que em 800nm o Azul de Evans não absorve e em 630nm é o seu pico de absorção. Assim a leitura feita a 800nm corresponde ao *background* das amostras e pode ser usada para corrigir a leitura fazendo a razão $A_{610}:A_{800}$. A razão das absorções foi determinada em experimento controle no qual larvas alimentadas com gel de agarose 0,5% sem corante foram utilizadas. A massa de Azul de Evans medida utilizando uma curva padrão do corante. A quantificação de glicose foi feita pelo método da Tris-Glicose Oxidase (TGO) segundo Dahlqvist (1968) com uso de curva padrão de glicose para estimar a massa.

A massa de glicose mensurada foi dividida pelo valor da massa de Azul de Evans obtida para a mesma fração do intestino, com isso temos uma razão cuja variação representaria a absorção (ou secreção) glicose.

Experimentos contendo apenas glicose e Azul de Evans (em agarose) são denominados *controle*, pois permitem avaliar a absorção normal de glicose. Experimentos sem a adição de glicose são denominados *branco*, pois evidenciam a razão basal dada por elementos não controlados pelo experimento. O *branco* pode ser descontado das frações equivalentes sem alterar o poder de análise do experimento. Experimentos com adições são denominados segundo a substância adicionada.

3.5. Extração de RNA

Para a obtenção de RNA dos tecidos da *Musca domestica* foi preciso dissecar as larvas utilizando material que permaneceu imerso em água DEPC 0,1% por 1h a

37°C, foi autoclavado e ficou por pelo menos 4hs na estufa a 150°C. Outros materiais necessários no processo de extração sofreram o mesmo processo para que diminuísse as possibilidades de contaminação por RNAses.

As larvas a serem dissecadas eram mantidas em gel amido insolúvel (10%) por 2hs até que todo o conteúdo intestinal tenha sido substituído pelo amido. Essa medida permite que trabalhem como um material livre de bactérias.

O tecido correspondente a porção indicada na figura 3 foi extraído de 30 larvas de *Musca domestica* no terceiro instar para a produção da biblioteca de cDNA. Já para a experimento de RT-PCR foram extraídos de aproximadamente 6 larvas, por dissecação, o corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e frações do intestino médio de acordo com o experimento (ver figura 2). A hemolinfa foi retirada de aproximadamente 30 larvas após perfuração de sua cutícula externa, coletando-se a hemolinfa que extravasada.

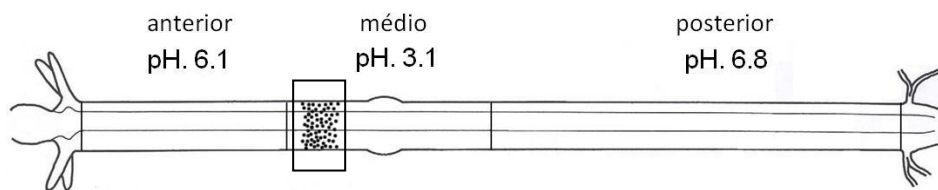


Figura 3. Representação do intestino médio de *Musca domestica*. O retângulo delimita a região utilizada na produção da biblioteca de cDNA. A região delimitada inclui o tecido que contém as células acidificadoras.

Cada tecido foi homogeneizado separadamente em 1mL de Trisol à temperatura ambiente e transferidos para tubos livres de RNAses. O material foi centrifugado a 11.000rpm por 10 minutos, sendo descartado o *pellet*.

Ao sobrenadante foram acrescentados 0,2mL de clorofórmio, mantido por 15 segundos sob agitação e mais 3 minutos de incubação a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 11.000rpm por 15 minutos. Novamente o *pellet* foi descartado.

Ao sobrenadante foram acrescentados 250µL de isopropanol e 250µL de solução de precipitação (1,2M de NaCl e 0,8M de citrato de sódio em água DEPC

0,1%) incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 11.000rpm por 10 minutos e, descartou-se, desta vez, o sobrenadante.

O próximo passo foi acrescentar ao precipitado 500 μ L de etanol 75%, e centrifugado a 11.000rpm por 5 minutos, sendo seu sobrenadante desprezado. Esse passo foi repetido mais uma vez.

O *pellet* foi seco por 3 minutos no fluxo laminar e por fim acrescentaram-se 100 μ L de água DEPC 0,1% que permaneceu por 5 minutos incubando a 65°C.

A quantificação do RNA foi feita pela leitura da absorbância do material em um comprimento de onda de 260nm, para tal medição foi necessário o uso de um espectrofotômetro (uma unidade de absorbância = 40 μ g de RNA). Para a verificação da pureza e integridade do material extraído utilizou-se a razão da absorbância obtida em 260nm pela absorbância obtida em 280nm (valores ideais encontram-se no intervalo 1,9 – 2,1).

Na produção da biblioteca de cDNA o produto final desse conjunto de procedimentos gerou 91 μ g de RNA total com razão 260/280 de 2,04 estando, portanto, dentro do padrão de qualidade aceitável. O mesmo é verdade para o material utilizado nos RT-PCR.

3.6. Purificação de RNA mensageiro

Todo o RNA extraído no passo anterior foi submetido a uma purificação feita em coluna poliT, cujo objetivo é ligar os RNA com a cauda de poliadenilação correspondente as fitas de mRNA. Separa o RNA ribossomal do RNA mensageiro (mRNA), tendo uma baixa recuperação, visto o RNA mensageiro corresponder de 1% a 5% do RNA total.

A purificação foi feita com material do CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Clontec). Após o processo de purificação, foi obtido 2,2 μ g de mRNA que, a partir daí, foi utilizado na confecção da biblioteca de cDNA.

3.7. Construção da biblioteca de cDNA

Foi construída uma biblioteca de cDNA a partir do RNAm extraído da porção proximal do ventrículo médio de *Musca domestica* (figura 3). Essa porção foi

escolhida por apresentar células oxínticas, responsáveis pelo processo de acidificação. A partir da biblioteca de cDNA foi realizado o sequenciamento ao acaso de clones.

A biblioteca foi construída com o Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontec), de acordo com o seu manual do usuário.

Obedecendo ao manual do fabricante o material foi utilizado sobre os dois protocolos distintos. Um, típico para casos de pouco mRNA final (0,025-0,5µg) e o segundo para recuperações de mRNA entre 0,5 e 2,0µg. Para o primeiro protocolo foi utilizado 0,123µg de mRNA e para no segundo 1,5µg.

Após a confecção das simples, e posteriormente a dupla fita, foi feito um gel de agarose para verificar a presença de um *smear* de DNA na faixa entre 1-3Kbases. Esse resultado foi só foi obtido para o primeiro material (0,123µg de RNA inicial), conforme a figura 4.

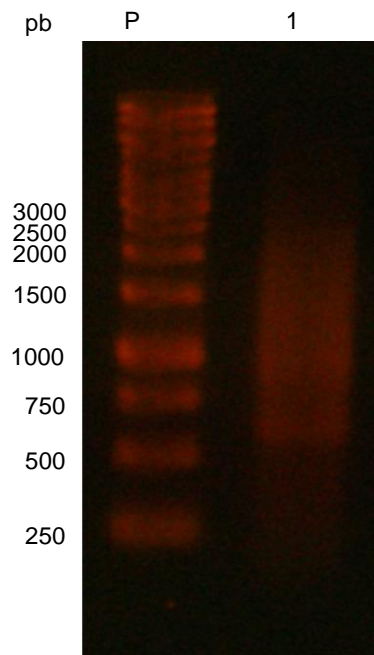


Figura 4. Gel de agarose com cDNA dupla fita para confecção de biblioteca. Raias: P – Padrão - valores representados a esquerda por pares de base nucleotídicas; 1 – Amostra de cDNA dupla fita.

O material correspondente foi submetido a um fracionamento por tamanho, no qual foram selecionadas apenas as frações que continham cDNA na faixa de 4-1kbases. O *pool* das frações somou um volume total de 7µl que foi usado nos passos seguintes.

O cDNA resultante do passo anterior foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega). Seguindo o manual do fabricante para 3 μ l do cDNA foi adicionado 1 μ l de plasmídeo digerido, 5 μ l de tampão 2X e 1 μ l de ligase em tubos de 0,5 ml mantidos *overnight* à 4°C.

Ao volume total de 10 μ l de ligação gerada no passo anterior foram adicionados 250 μ l de etanol 80%, fazendo assim a precipitação do material. O precipitado foi ressuspenso em 5 μ l de tampão TE (10mM tris Hcl, pH 7,5; 1mM EDTA).

Foi feita a eletroporação de bactérias *E. coli* eletrocompetentes ElectroMax™ DH10B™ (Invitrogen). Para isso foi adicionado 1 μ l da ligação para 20 μ l de células. Essa mistura foi adicionada a um cuvete de 0,1cm de espessura resfriado em gelo. A amostra foi eletroporada com o uso de um eletroporador GenePulser Xcell (BioRad) sob as seguintes condições de eletroporação: 2,0kV, 200 Ω , 25 μ F.

Após a eletroporação as células foram diluídas em 1ml de meio LB que por sua vez foi adicionado a um tubo do Falcon de 15ml, permanecendo sob agitação 1h a 37°C. As células foram, por fim, plaqueadas em meio LB-agar contendo ampicilina 100 μ g/ml e mantidas *overnight* à 37°C.

Cresceram entre 10⁴ e 2,3.10⁴ colônias, que correspondem à quantidade de células que contêm o vetor p-GEM-T. O meio LB-agar foi lavado com 2ml de LB líquido 25% de glicerol. Os 2ml foram aliquotados em frações de 50 μ l em tubos de 0,5ml e mantidos como estoque à -80°C.

3.8. Produção de cDNA

A produção do cDNA a partir do RNA total, obtido da extração de diferentes tecidos da *Musca domestica*, foi feita com o uso do kit SuperScript™ (Invitrogen). Esse kit possuía uma transcriptase reversa que transcreveu o RNA formando a primeira fita de cDNA na presença de primers randômicos. Para que as quantidades de cDNA correspondessem ao nível de expressão dos genes em um dado tecido, foi necessário iniciar cada reação (correspondente a cada tecido) com concentrações equivalentes de RNA total (0,2 μ g).

O protocolo se iniciou pela mistura de quantidades iguais de RNA para os diversos tecidos (conforme foi explicado acima) a 1 μ L de dNTPmix, 5 μ L de

hexâmeros randômicos (como primers) e 10µL de água DEPC. Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e posteriormente incubada 1 minuto em gelo.

Foi preparada a mistura de reação contendo (para cada reação): 2µL de RT Buffer 10X, 4µL MgCl₂ 25mM, 2 µL DTT 0,1M e 1µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Após, 9µL da mistura de reação foram adicionados ao volume contendo o RNA e primers e o total foi incubado por 2 minutos a 25°C. Houve a adição de 1µL de enzima transcriptase reversa SuperScript™ sendo, a reação, incubada por 10 minutos a 25°C. Após, foi incubada por 50 minutos a 42°C. A reação foi finalizada incubando os tubos contendo a reação por 15 minutos a 70°C. Os tubos eram postos em gelo e tinham 1µL de RNase H adicionado, para então serem incubados por 20 minutos a 37°C.

Com todo o processo descrito, obteve-se o cDNA que seria usado na reação de PCR.

3.9. PCR e RT-PCR Semiquantitativo

O RT-PCR teve neste experimento o objetivo de amplificar o cDNA obtido com o uso de uma transcriptase reversa, a partir de diferentes tecidos da larva de *Musca domestica* de terceiro instar. O tecido usado variou conforme o experimento. As diferentes formas de fracionar o intestino médio foram escolhidas conforme necessidades específicas (ver figura 2). A hemolinfa, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso são tecidos de origens embriológicas distintas do intestino médio, sendo útil para verificar o grau de abrangência na expressão de um gene.

Diversos genes foram testados. Teve como controle positivo do material utilizado, uma sequência de gene para produção de proteína ribossomal (como gene constitutivo). Os *primers*, correspondentes às sequências utilizadas neste trabalho estão alistados no Apêndice 1.

Os fragmentos de cDNA codificando as respectivas sequências foram amplificados a partir do material produzido na reação da transcriptase reversa sobre o RNA dos diferentes tecidos. Tanto para experimentos de RT-PCR quanto para reação de PCR usuais, cada reação foi montada da seguinte forma:

1 µL	cDNA (RT)/ DNA (amostra)
0,2 µL	<i>primer 1</i> (100µM)

0,2 µL	<i>primer 2</i> (100µM)
0,25 µL	TAQ DNA Polymerase (Invitrogen)
5 µL	Tampão 10 X
1 µL	dNTP (10mM)
2 µl	MgCl ₂ (50mM)
40,35 µL	H ₂ O milliQ

A reação de PCR foi realizada sendo programado, em um termociclador, ciclos conforme especificados:

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

30 segundos a 55°C (anelamento dos “primers”)

0,5-1,5 minutos a 72°C (alongamento das fitas filhas)

No caso de RT-PCR, a partir do 20^o ou do 25^o ciclo amostras de 5µL foram coletadas a cada 5 ciclos. Isso foi feito para obter todas as reações em fase logarítmica. As amostras retiradas foram aplicadas em gel de agarose 0,1% para eletroforese (ver eletroforese em gel de agarose). Para reação de PCR tradicional foram utilizados 30 ciclos.

3.10. Pirosequenciamento

Foi extraído RNA total do intestino médio da larva em terceiro instar de *Musca domestica* conforme especificado no item Extração de RNA. Este material, depois de verificado os parâmetros de qualidade, foi enviado para a empresa de biotecnologia Helixxa, situada em Campinas-SP. Foi utilizada a plataforma 454 da Roche (454 GS FLX) para sequenciamento do cDNA de acordo com os procedimentos padrões definidos pela Roche. O arquivo gerado (.sff) contendo os *reads* foi processado pelo GS De Novo Assembler (Newbler) que gerou os *contigs* que formaram a base de dados para anotação e busca de sequências.

3.11. Análise de sequências em banco de dados

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos (por tradução) obtidas neste trabalho foram comparadas com outras sequências depositadas em bancos de dados. Para isso foi feita uma consulta ao “National Center for Biotechnology

Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) onde foi utilizado o programa de alinhamento de sequências Blast X, quando era analisado a sequência de nucleotídeos e o programa Blast P, quando a sequência analisada era de aminoácidos.

A análise de grande volume de sequências provenientes tanto do processo de sequenciamento ao acaso quanto do pirosequenciamento foi possível com o uso do software dCAS – Desktop cDNA Annotation System (<HTTP://exon.niaid.nih.gov>). Com essa ferramenta foi possível excluir sequências de vetores, montar *contigs* e anotar segundo BLAST X contra vários bancos de dados (por ex. nr, pfam, GO).

Para predição de peptídeo sinal foi utilizada a ferramenta SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e para a predição de alças transmembranas HMMTOP version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi>), SOSUI engine ver. 1.11 (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cgi) e TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Previsões de âncora de GPI foram feitas com o GPI-Prediction Server (http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred.cgi)

3.12. Reação de sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado na central de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP – São Paulo.

Para isso foi utilizado um aparelho ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) e a técnica foi executada conforme recomendação do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando 4 µL da mistura de reação Big Dye terminator mix (Perkin Elmer), 200 – 500 ng de DNA, 20 pmols de oligonucleotídeos, tampão Tris 40mM, pH 9,0 e MgCl₂ 1 mM em um volume final de 20µL. A reação foi incubada por 1 minuto a 96°C e em seguida submetida a 30 ciclos (96°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos). Ao final, o DNA foi precipitado com etanol de acordo com a orientação do fabricante, e ressuspenso em tampão para aplicação no sequenciador automático.

3.13. Ligação dos fragmentos de cDNA a plasmídeos vetores

Para clonagem de fragmentos de cDNAs obtidos de amplificação por PCR, foi utilizado o Kit de ligação “pGEM-T Easy vector Sistem” (Promega). Foi empregada uma mistura de reação que consistia de 1 unidade de T4 DNA ligase, tampão apropriado, plasmídeo (pGEM-T) e o produto de PCR (purificado do gel de agarose). O plasmídeo e o produto de PCR foram utilizados em uma concentração de 1:3. Essa mistura foi incubada por 16 horas a 4°C. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes.

Para inserir fragmentos de cDNAs ao vetor pAE, tanto o inserto quanto o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição, purificados do gel de agarose e a seguir foram misturados numa proporção de 3 volumes de inserto par 1 volume de plasmídeo adicionando 1 unidade de T4 DNA ligase (Gibco) e tampão apropriado. A amostra foi incubada a 16°C por 16 horas e a seguir usada para transformar bactérias competentes.

Os plasmídeos foram purificados utilizando-se o protocolo Wizard Miniprep (Promega) a partir de 3,0 mL de cultura de bactérias cultivadas durante 16h.

3.14. Clonagem em vetor pAE

Para expressão das subunidades F e G da V-ATPase em células de expressão BL21 STAR foi escolhido um vetor chamado pAE (Ramos et al., 2004). O cDNA clonado neste vetor tem sua expressão sob o controle da T7 RNA polimerase e a proteína é sintetizada na forma de uma proteína de fusão com um peptídeo que possui 6 resíduos de histidina adjacentes que liga-se especificamente a uma coluna de níquel.

A estratégia para clonagem em pAE passa pela amplificação por PCR do cDNA que codifica as subunidades F e G da V-ATPase, utilizando como molde uma biblioteca de cDNA de intestino de *Musca domestica*. Para tal foram desenhados dois *primers* específicos que correspondem às extremidades 5' e 3' do cDNA que codifica cada uma das referidas proteínas. Além disso, foi inserido nesses primers sequências que representam os sítios de restrição para enzimas.

Abaixo os pares de *primers* utilizados no processo de clonagem. O primeiro par corresponde a clonagem da subunidade F da V-ATPase e o segundo par corresponde a clonagem da subunidade G da V-ATPase.

MdVatpaseF_Nt 5' cgcgatccatggctttgcattca 3' (BamHI)

MdVatpaseF_Ct 5' ccggaattcctaacgaaccaaatac 3' (EcoRI)

MdVatpaseG_Nt 5' cgcgatccatgactagcctaaacc 3' (BamHI)

MdVatpaseG_Ct 5' tggctctgcagttacttctgtggtg 3' (PstI)

As enzimas de restrição entre parênteses estão ao lado do *primer* com o sítio de restrição específicos para elas. As sequências amplificadas, quando digeridos com as respectivas enzimas de restrição formarão as extremidades coesivas para anelamento com o vetor.

O produto amplificado pelo PCR e o vetor pAE foram digeridos previamente com as enzimas BamHI e EcoRI ou BamHI e PstI para que ambos adquirissem extremidades coesivas. Depois, o produto de PCR e o plasmídeo pAE digeridos foram submetidos a uma reação de ligação. Uma alíquota dessa reação foi utilizada para transformar células XL1-BLUE competentes. A partir de colônias isoladas das células transformadas foi preparada uma cultura em meio líquido que serviu como fonte de extração e purificação do plasmídeo pAE/VATPaseF ou pAE/VATPaseG. Posteriormente estes plasmídeos foram separadamente utilizados para transformar células BL21 competentes e assim originar a linhagem utilizada para expressão das subunidades F e G da V-ATPase recombinantes.

3.15. Transformação de bactérias competentes para expressão

A construção pAE associado às sequências das subunidades G e F da V-ATPase foi adicionada a 50µL de células competentes (BL21 STARtm-DE3) e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e novamente transferidas para o gelo por mais 2 minutos. Adicionamos então, 0,5 mL de meio LB, e essa solução foi incubada por 1 hora a 37°C, para recuperação das bactérias e expressão das proteínas envolvidas na resistência ao antibiótico de seleção. Em seguida, a mistura era plaqueada em LB ágar com ampicilina (50 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C, obtendo-se dessa forma colônias isoladas.

3.16. Expressão das subunidades da V-ATPase recombinantes com vetor pAE

Bactérias *E. Coli* BL21 STAR e foram transformadas com os plasmídeos pAE (Ramos et al., 2004) codificando para as subunidades G e F da V-ATPase. As colônias transformadas eram crescidas em meio LB contendo ampicilina (50µg/mL) sob agitação de 250 rpm a 37°C até atingirem $OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 1,0$, quando eram induzidas com IPTG 1.0mM, para produzir as subunidades recombinantes, por 16 horas a 37°C sob agitação 250 de rpm. Após esse procedimento as células eram sedimentadas por centrifugação a 7.000xg por 30min a 4°C e então armazenadas a -20°C. Foram coletadas alíquotas de 20µL de bactérias não-induzidas e induzidas a fim de verificar através de SDS-PAGE se houve produção da proteína recombinante.

3.17. Eletroforeses

Em experimentos de SDS-PAGE as amostras de proteínas foram diluídas com tampão de corrida (Tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 5% (m/v), β-mercaptoetanol 1,3 mM, EDTA 1,0 mM, glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v). Antes da aplicação as amostras foram fervidas junto com o tampão de amostra por 5 minutos. As amostras foram corridas sob voltagem constante de 200V. O gel de poliacrilamida 12% e SDS 1% foi preparado segundo Laemmli (1970). A coloração dos géis foi feita Comassie Blue R-250 0,1% (p/v) preparado em uma solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

A preparação de eletroforese em gel de agarose foi realizada com géis em uma concentração final 1% (m/v) de agarose em tampão TAE 1X. As amostras de DNA foram misturadas com tampão de amostra (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol 0.25%, glicerol 30% em água) na proporção de 1:10, respectivamente. O azul de bromofenol, devido a sua coloração, auxilia a estabelecer visualmente o final da eletroforese. Após a eletroforese, o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) para visualização das amostras de DNA, pois o DNA complexado com o brometo de etídeo emite luz laranja na presença da luz ultravioleta (312 nm). Os produtos amplificados em reação de PCR foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando o protocolo do produto QIAEX II (Quiagen), o qual se baseia na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA em uma resina de troca iônica.

3.18. Meios e soluções

LB Líquido: 10g NaCl, 10g bactotripton e 5g de extrato de levedura foram dissolvidos em 1,0 L de água milliQ e em seguida autoclavados.

Placas LB – Ágar: Foram usados 20g de bactoágar para 1,0 L de meio LB. Após a autoclavagem a mistura foi espalhada em placas de Petri e quando necessário foi adicionado o antibiótico apropriado antes do meio solidificar.

4. RESULTADOS

4.1. Banco de dados do pirosequenciamento

O pirosequenciamento (plataforma 454 da Roche) de uma biblioteca de cDNA do intestino médio de *Musca domestica* gerou aproximadamente 284.000 *reads* com tamanho médio de 376 bases. A distribuição dos tamanhos dos *reads* pode ser acompanhada na figura 5.

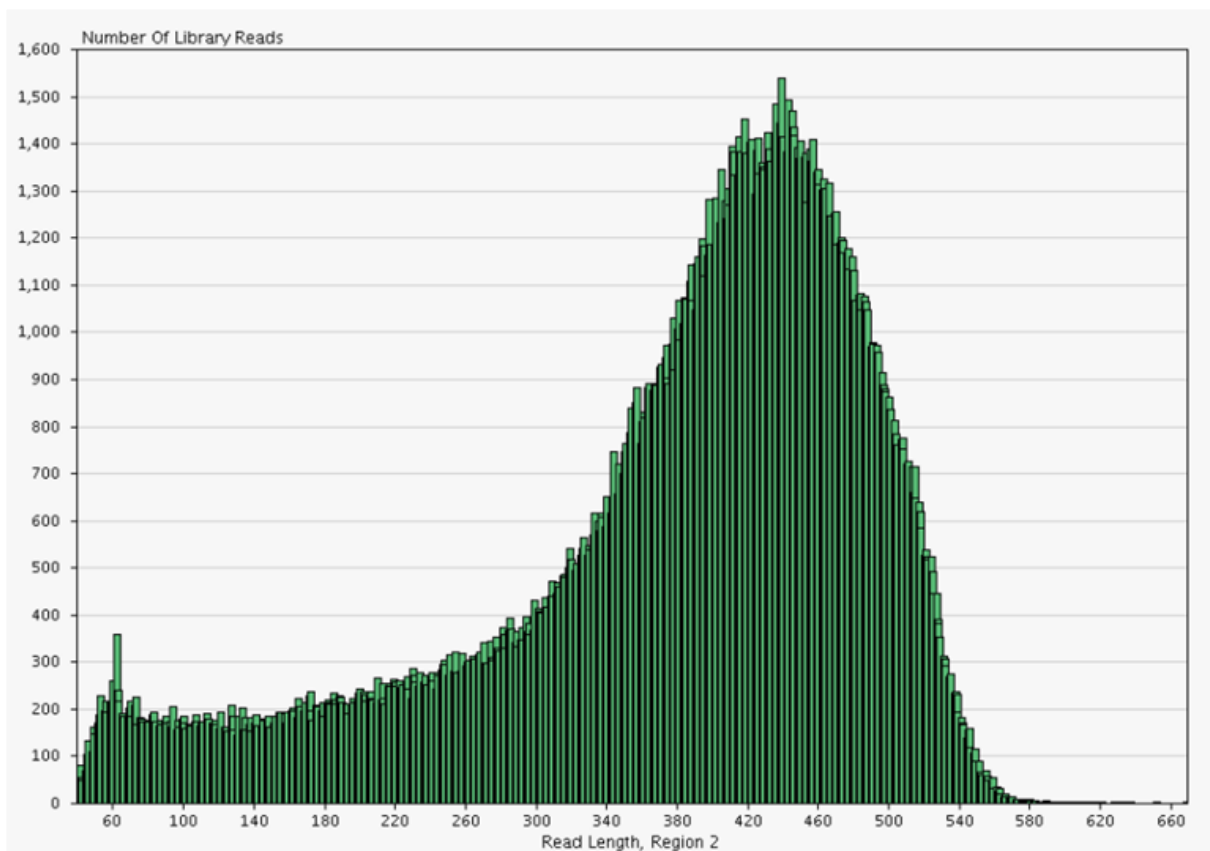


Figura 5. Distribuição da quantidade de *reads* (leituras) segundo seu tamanho em bases obtido a partir do pirosequenciamento da biblioteca de cDNA do intestino médio de *Musca domestica*.

Após processamento dos *reads* pelo GS De Novo Assembler (Newbler) foram obtidos 2.695 *contigs*. Esses *contigs* formaram a base de dados para obtenção de seqüências para os experimentos envolvendo transportadores de glicose, subunidade a da V-ATPase, canal de cloreto e aminopeptidases.

4.2. Absorção de glicose em larvas de *Musca domestica*

4.2.1. Fisiologia da absorção de glicose em larvas de *Musca domestica*

O processo de absorção de glicose pode se dar por cotransporte com íons sódio ou potássio (Bifano *et al.*, 2010). Contudo, o experimento de adição destes íons ao alimento rico em glicose não afetou sua absorção (figura 6). Não é possível fazer maiores inferências sobre a absorção de glicose nas demais porções do intestino médio, pois essa abordagem experimental limita a observação do fenômeno até o limite em que a glicose ainda não foi totalmente absorvida.

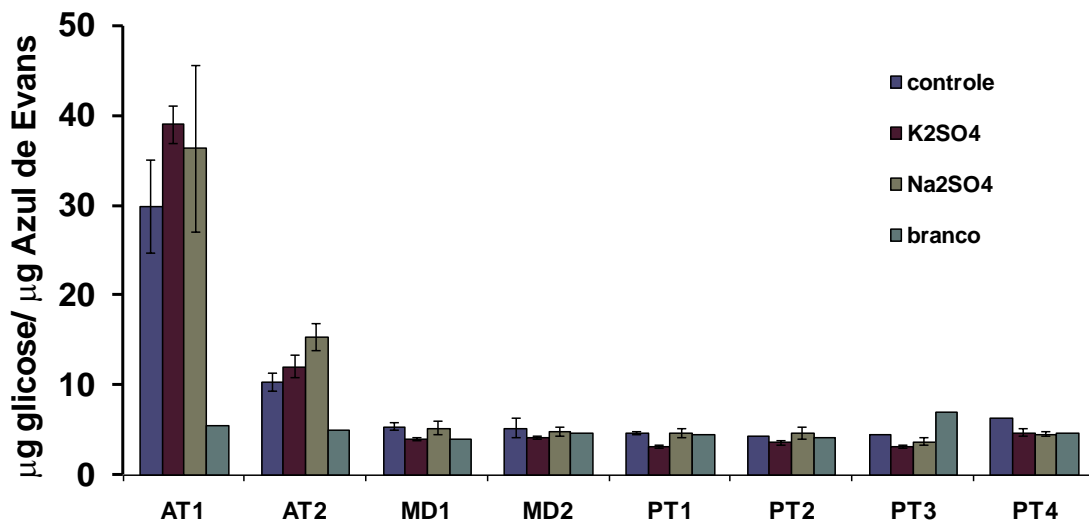


Figura 6. Razão glicose/azul de Evans nas porções do intestino de *Musca domestica*. A diminuição das barras corresponde ao processo de absorção de glicose, sendo que a razão inicial foi de 50 μg glicose/ μg de Azul de Evans. Na porção ant1 do intestino médio já é possível verificar o fenômeno de absorção. A partir de md1 não é possível mais verificar o processo de absorção.

A adição do inibidor do cotransportador SGLT, florizina, afetou a absorção de glicose conforme pode ser verificado na figura 7A. A manutenção a razão alta nas frações AT1 e AT2 indica que o processo normal de absorção (visto na barra *controle*) foi inibido. Contudo, a partir de MD1 até PT4 as razões são equivalentes entre o teste e o controle.

A adição do inibidor do facilitador GLUT, floretina, não alterou o processo de absorção nas frações AT1 e AT2 (figura 7B). A razão barra *controle* das frações

MD1 até PT2 se mostrou acima de 10, o que difere dos resultados obtidos na figura 6 e figura 7A. Esse resultado aberrante impede maiores inferências nas frações MD1 até PT2.

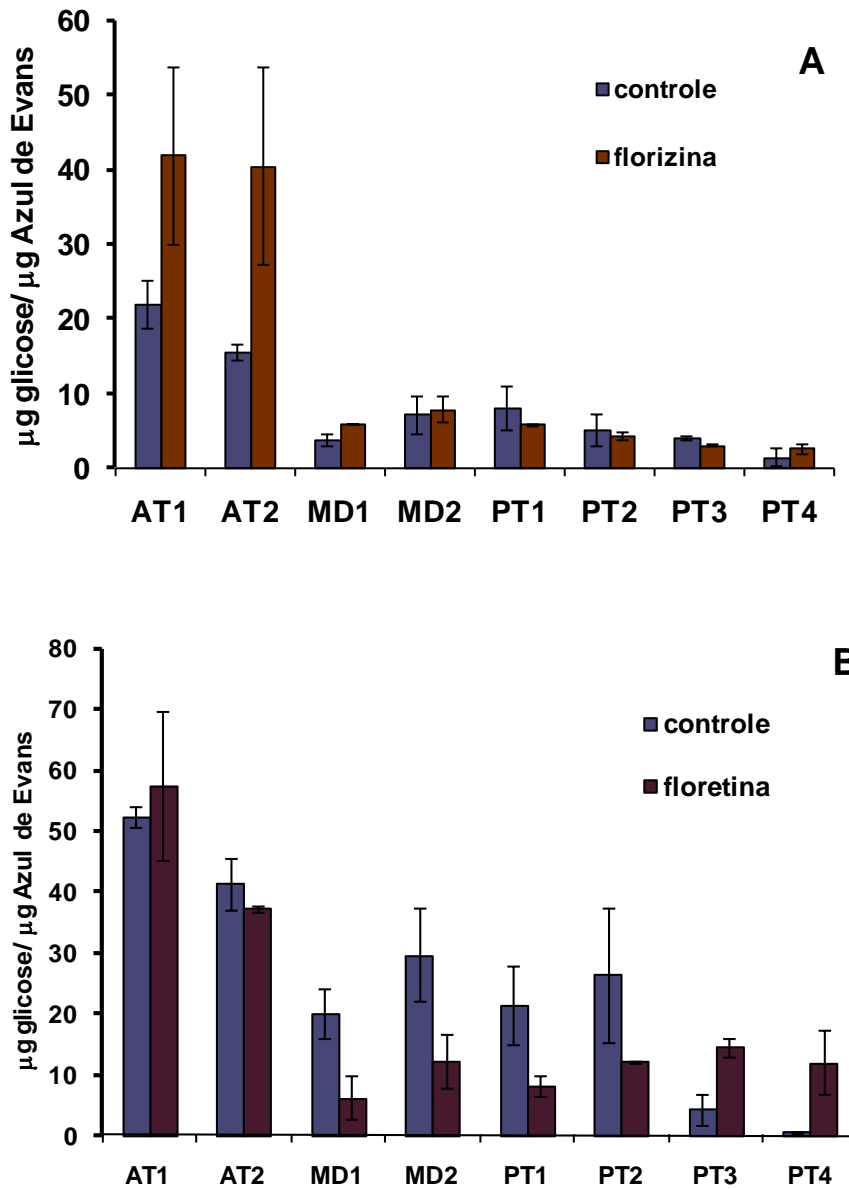


Figura 7. Efeito da florizina (A) e floretina (B) na absorção de glicose. Podemos ver que na presença de florizina (inibidor de SGLT1) a absorção de glicose é parcialmente inibida nas porções ant1 e ant2, já na presença de floretina (inibidor de GLUT2) a absorção de glicose não é inibida. A razão inicial é 50 $\mu\text{g glicose}/\mu\text{g de Azul de Evans}$ para A e 55 $\mu\text{g glicose}/\mu\text{g de Azul de Evans}$ para B. O *branco* foi descontado das frações.

4.2.2. Sequências e zonas de expressão dos transportadores de glicose

Com a obtenção de diversas sequências de transportadores de glicose foi possível verificar os sítios de expressão dos transportadores, para assim elucidar o fenômeno de absorção de glicose e sugerir as moléculas responsáveis.

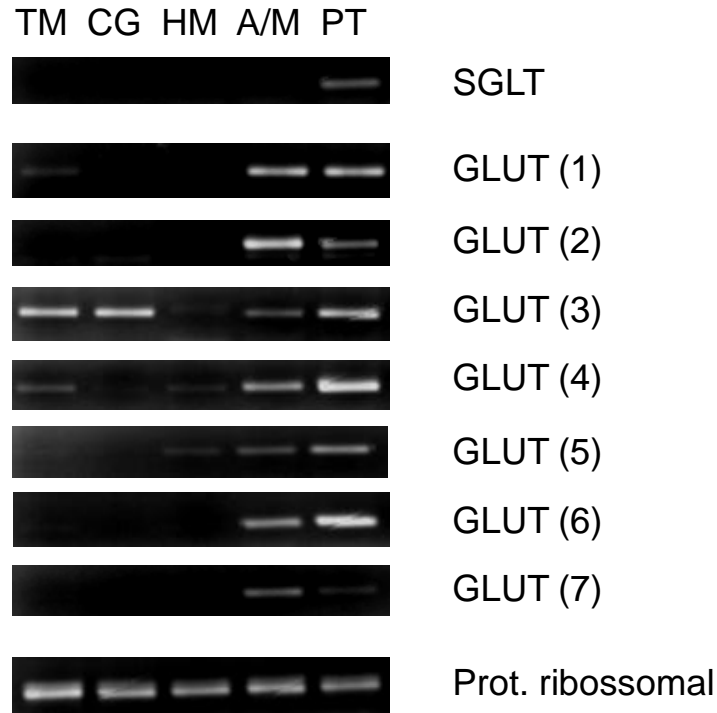


Figura 8. Expressão avaliada por RT-PCR dos transportadores SGLT e GLUT de *Musca domestica*, com 25 ciclos. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa; A/M: porção anterior e média do intestino médio; PT: porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

O transportador de glicose do tipo SGLT é expresso apenas na região posterior do intestino médio. Já quanto à expressão dos transportadores do tipo GLUT, foram observados genes expressos apenas no intestino médio como GLUT(2), GLUT(6) e GLUT(7) e expressos no intestino médio mais túbulos de Malpighi (GLUT(1)) (figura 8). Estes genes são bons candidatos a participarem do processo de absorção, visto serem expressos apenas em tecidos epiteliais que absorvem glicose. Foi verificada a expressão de GLUT(3) e GLUT(4) em todos os tecidos estudados, GLUT(5) é expresso no intestino médio e na hemolinfa (figura 8). Os transportadores codificados por esses três últimos genes, por estarem presente em vários tecidos distintos, devem fazer parte de processos absorptivos mais gerais, possibilitando a

nutrição das células. Aparentemente, o padrão de expressão não tem relação com a abundância relativa de *contigs*, pois os dois genes mais bem representados no cDNA analisado (GLUT(2) e GLUT(4)) apresentam padrões de expressão distintos (tabela 1).

Tabela 1. Número de *reads* que formaram cada um dos *contigs* de GLUT cuja expressão foi analisada. Este valor representa aproximadamente a proporção dos genes na biblioteca de cDNA utilizada, ou seja, reflete a abundância relativa entre os genes (de mesmo tamanho).

Nome do gene	Número de reads
GLUT (1)	34
GLUT (2)	53
GLUT (3)	29
GLUT (4)	52
GLUT (5)	13
GLUT (6)	19
GLUT (7)	13

4.3. Tamponamento intestinal de *Musca domestica*

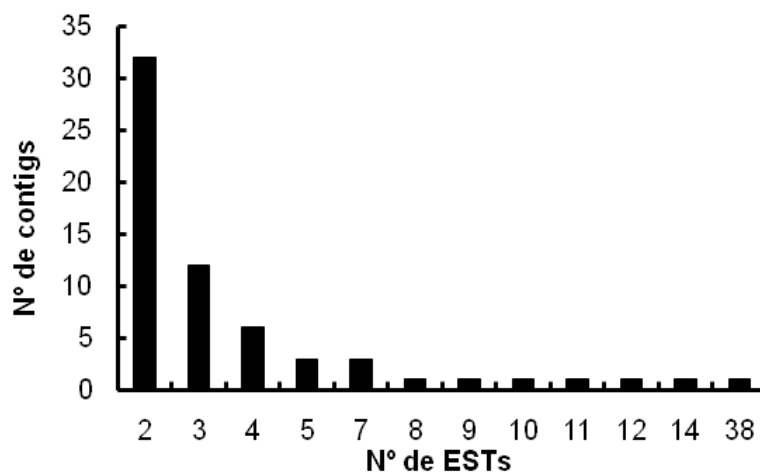
4.3.1. Sequenciamento ao Acaso de cDNAs gerados a partir de fração do intestino médio de *Musca domestica* – Células oxínticas

A fração do intestino médio de *Musca domestica* (ver figura 3) foi escolhida para gerar biblioteca de cDNA por ser sede de processos de tamponamento ácido do lúmen intestinal, provavelmente associados as células oxínticas. A partir do sequenciamento ao acaso, foram geradas 560 sequências, sendo 411 válidas. Tais sequências geraram 211 sequências únicas, destas 148 são *singlets* e 63 são *contigs* (ver tabela 2). Assim, foi possível verificar as proteínas mais expressas desse tecido.

Tabela 2. Número de sequências obtidas pelo sequenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA.

Sequências Totais	560
Sequências Válidas	411
Sequências Únicas	211
Singlets	148
Contigs	63

O fato da biblioteca de cDNA não ser normalizada interfere na qualidade da análise no que se refere a alguns poucos *contigs* serem formados por uma grande quantidade de ESTs (figura 9). Isso ocorre devido a repetidos sequenciamentos de genes muito expressos no tecido. No entanto essa informação permite acessar de forma mais apurada a real proporção dos transcritos no tecido.

**Figura 9.** Número de contigs gerados por diferentes quantidades de ESTs.

Foi possível determinar a identidade por homologia de pouco mais da metade das sequências únicas (Figura 10). Para maior detalhe das anotações e do número de ESTs que formaram cada uma das sequências únicas ver Apêndice 2.

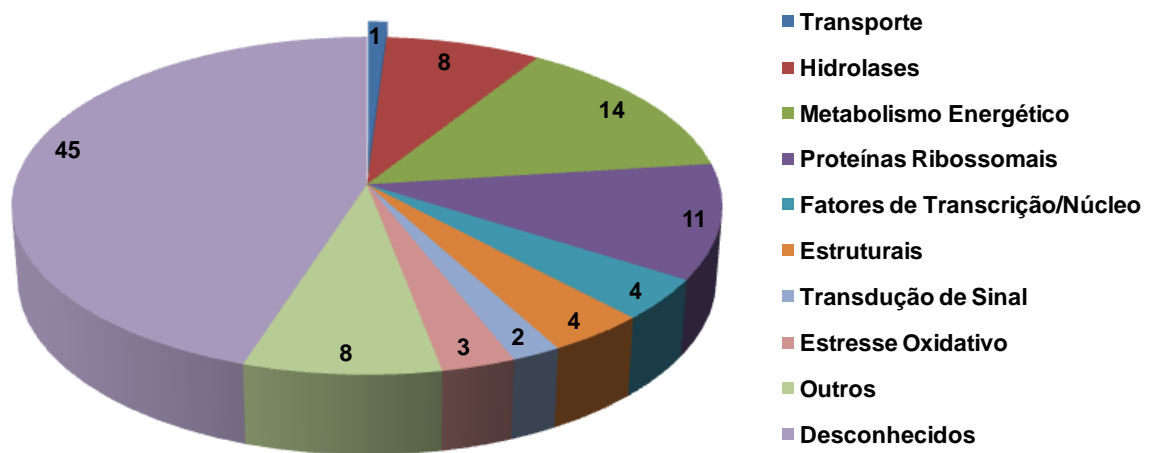


Figura 10. Proporção de sequências únicas distribuídas segundo suas funções. Anotação das sequências conhecidas no apêndice 2.

As sequências únicas de proteínas ribossomais associadas às de metabolismo energético formaram 25% do total. A marcante presença de transcritos relacionados ao metabolismo energético (14% das sequências únicas e 19,2% do total de sequências válidas) corrobora evidências citológicas, como a presença de grande número de mitocôndrias e indica a importância do metabolismo energético no bombeamento de prótons que se sugere para essas células (Terra *et al.* 1988).

A presença de hidrolases deve-se provavelmente aos tecidos ao redor das células oxínticas. Isso pode ser dito visto que enzimas como tripsina e a aspártico proteinase não foram descritas nessas células em trabalhos de imunocitocalização já realizados (Padilha *et al.* 2009, Jordão *et al.*, 1996).

4.3.2. V-ATPases nas células oxínticas

O processo de sequenciamento ao acaso gerou três *contigs* referentes a moléculas transportadoras. Os três genes codificam moléculas relacionadas ao transporte de prótons, sendo que foram encontradas apenas subunidades associadas às V-ATPases. Foram encontrados genes que codificam as subunidades G, F e e da V-ATPase.

Os genes que codificam a subunidade G e a subunidade F da V-ATPase tiveram sua expressão estudada por RT-PCR. A expressão destas subunidades não se restringiu aos tecidos digestivos, estando presente em todos os tecidos estudados (figura 11).

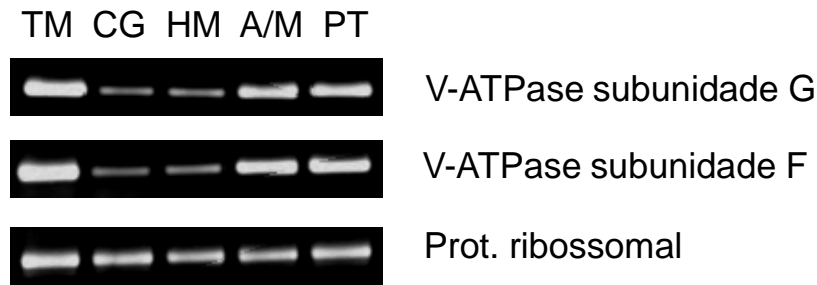


Figura 11. Expressão avaliada por RT-PCR de diferentes genes que codificam a subunidade G e F da V-ATPase de *Musca domestica*. Reações com 25 ciclos. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa; A/M: porção anterior e média do intestino médio; PT: porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

4.3.3. Expressão de subunidades da V-ATPase

Foi possível expressar duas subunidades da V-ATPase recombinantes (figura 12) ambas com massa molar em torno de 14KDa.

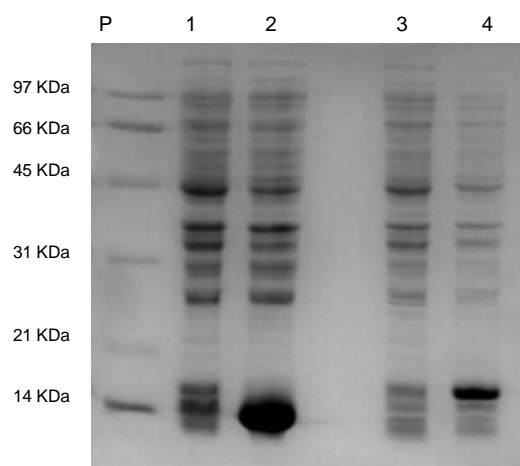


Figura 12. SDS-Page das subunidades F e G recombinantes da V-ATPase. A indução foi feita em células de *E. coli* da linhagem BL21 STAR-DE3 transformadas com as construções abaixo citadas. Raias: **P.** Padrão de massa molecular; **1.** pAE/VATPaseF sem adição de IPTG; **2.** pAE/VATPaseF 16hs após a adição de IPTG; **3.** pAE/VATPaseG sem adição de IPTG; **4.** pAE/VATPaseG 16hs após a adição de IPTG.

A partir da sequência de DNA foi possível prever a sequência de aminoácidos que codifica as subunidades das V-ATPase. Com isso é possível inferir que a massa esperada para a subunidade F e para subunidade G da V-ATPase é de 13,8KDa e que os respectivos pontos isoelétricos teóricos são 5,92 e 9,78. Tem-se, portanto, uma forte correspondência dos valores das massas previstas teoricamente e dos obtidos experimentalmente.

4.3.4. Subunidade a da V-ATPase

A base de dados gerada a partir do pirosequenciamento permitiu uma busca por outras subunidades da V-ATPase. Foi encontrado pelo menos um gene para cada subunidade já descrita para a V-ATPase (Apêndice 3).

Com o intuito de identificar a molécula responsável pelo processo de acidificação, a expressão de genes da subunidade a foi estudada por RT-PCR. Esta subunidade foi escolhida, porque apresenta várias isoformas e muitas delas são tecido-específicas (Allan *et al.*, 2005). Seis genes da subunidade a foram escolhidos e nomeados de acordo com a similaridade de sequências que apresentavam entre si (ver anotação no Apêndice 3).

No primeiro experimento, de caráter amplo, a expressão foi analisada em diversos tecidos: túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, hemolinfa e intestino médio (porção anterior+médio e posterior). Foi possível verificar a expressão diferencial dos genes que codificam a subunidade a da V-ATPase. Os genes nomeados (A3), (B1) e (C) apresentaram expressão nos diversos tecidos analisados. Contudo, três outros genes tiveram um padrão bastante interessante. Tanto o gene (A1) quanto o gene (B2) apresentaram uma expressão diferencial no tecido que apresenta o lúmen ácido e (A2) apresentou uma expressão restrita ao intestino médio (figura 13).

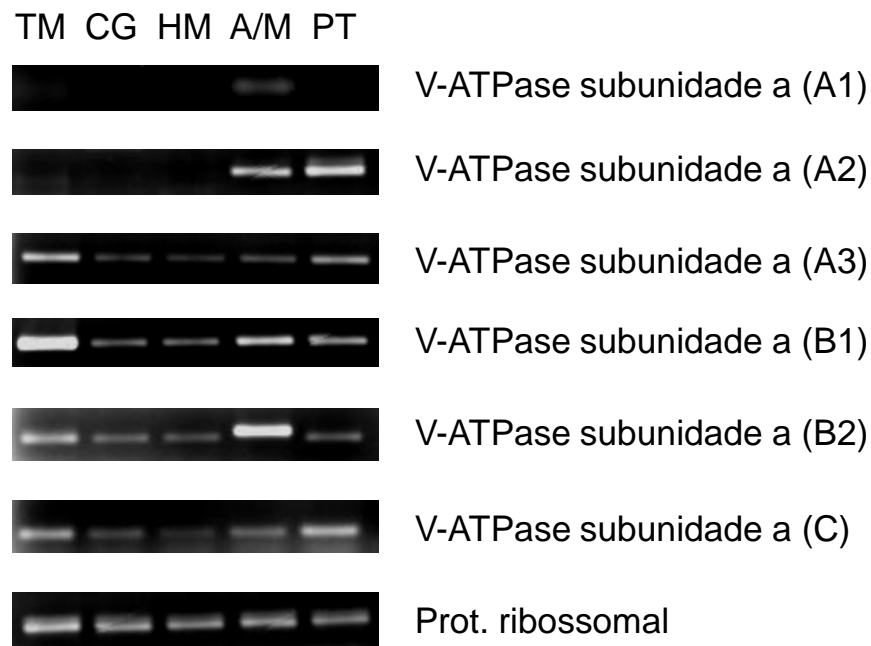


Figura 13. Expressão de diferentes genes que codificam a subunidade a da V-ATPase de *Musca domestica* estudadas por RT-PCR. Reações com 25 ciclos. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa; A/M: porção anterior e média do intestino médio; PT: porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

Um novo experimento foi realizado com os genes que apresentaram expressão restrita ao intestino médio. Analisando agora apenas uma fração do intestino médio pretendeu-se estabelecer a localização da expressão da subunidade a da V-ATPase. A expressão dos genes (A1) e (B2) tem uma grande relação com a região ácida, pois apenas as divisões MD1 e MD2 estão associadas a tecidos da região ácida (figura 14).

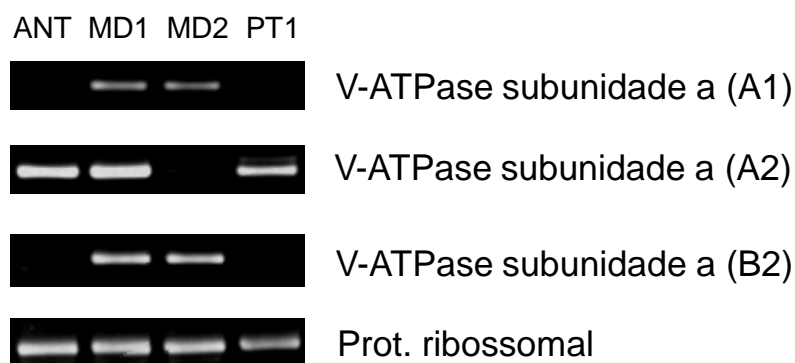


Figura 14. Expressão de diferentes genes que codificam a subunidade a da V-ATPase de *Musca domestica* estudada por RT-PCR. Reações com 25 ciclos. ANT: região anterior do intestino médio;

MD1: metade proximal da porção média do intestino médio; MD2: metade distal da porção média do intestino médio; PT1: quarta divisão mais proximal da porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

4.3.5. Canal de cloreto

O trabalho de Terra e Regel (1995) verificou a presença de íons cloreto na região ácida do intestino médio de *Musca domestica* e Dimitriadis (1991), por métodos citoquímicos, identificou a presença de íons cloreto nas células oxínticas de *Drosophila auraria*. Com isso, é previsto a presença de um transportador de cloreto nesta região que dissiparia o potencial eletroquímico gerado pela secreção de íons H⁺.

A expressão de um transportador de cloreto foi verificado por RT-PCR em vários tecidos incluindo também as células oxínticas.

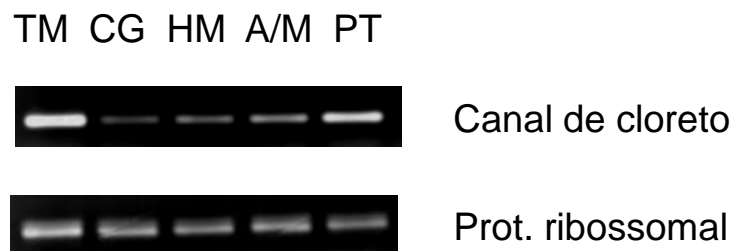


Figura 15. Expressão avaliada por RT-PCR do Canal de cloreto de *Musca domestica*. Reação com 25 ciclos. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa; A/M: porção anterior e média do intestino médio; PT: porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

4.3.6. Transportador de amônia

O processo de acidificação do ventrículo médio é sucedido de um processo de alcalinização, o que garante a alteração de um pH de 3,1 para 6,8. A descrição do mecanismo para esse processo ainda não está clara, mas Terra & Regel (1995) propõem um sistema de tamponamento com base na liberação de amônia na porção anterior e posterior do intestino médio. Essa proposta foi feita pois se verificou um aumento na concentração de amônia, especialmente na porção posterior do intestino médio (de pH 6,8).

Em busca das bases moleculares para esse transporte foi obtida anteriormente uma sequência de transportador de amônia homólogo ao de *Rhesus*. Com base nesta sequência, foi desenhado um par de *primers* para avaliação de expressão por RT-PCR.

Os resultados demonstraram que a expressão deste transportador é restrita à porção média do intestino médio, a fração mais proximal da porção posterior do intestino médio e aos túbulos de Malpighi (figura 16). As porções do intestino médio em que ocorre a expressão do gene que codifica o transportador de amônia são tipicamente ácidas (MD1 e MD2) ou estão na faixa de transição de pH (PT1).

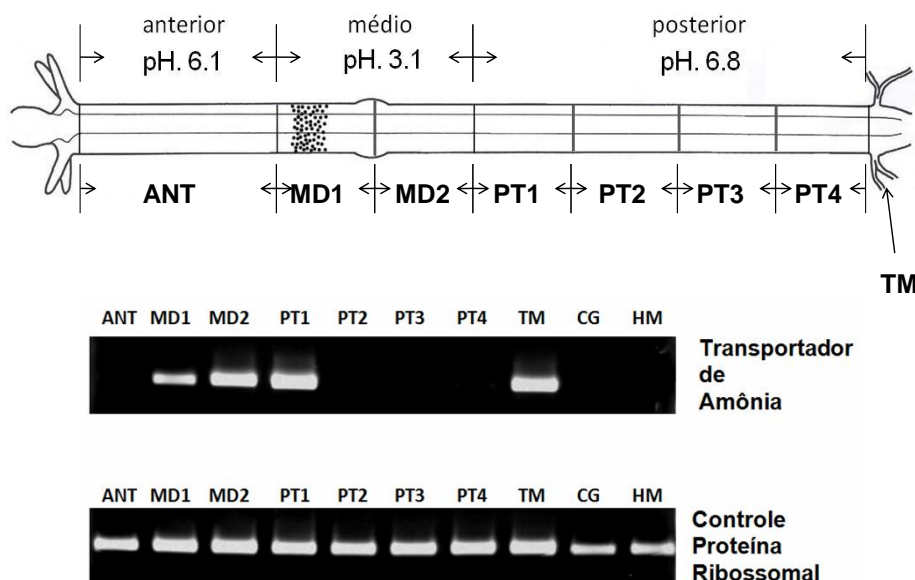


Figura 16. Expressão avaliada por RT-PCR (25 ciclos) da sequência do transportador de amônia de *Musca domestica*. A figura esquemática do intestino médio relaciona os sítios onde a expressão foi avaliada por RT-PCR com os pHs luminiais. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

4.4. Enzimas digestivas de *Musca domestica*

4.4.1. Aminopeptidase N e aminopeptidase P

Foi feita uma busca por aminopeptidases na base de dados gerada pelo pirosequenciamento. Foram encontradas 16 sequências de aminopeptidases da família das peptidases M1 (pfam01433), anotadas como aminopeptidase N (ou alanil

aminopeptidase). Foi encontrada também, uma sequência da família das metalopeptidases M24 (pfam00557), anotada como aminopeptidase P (ou X-Pro aminopeptidase).

Das 16 sequências que codificam aminopeptidases N (APN) obtidas, 2 sequências foram escolhidas para identificação de seus sítios de expressão por RT-PCR. Elas foram escolhidas por terem sido formadas pela maior quantidade de *reads* (475 para a APN(1) e 279 para a APN(2)).

A sequência APN(1) está quase completa, visto que a análise da sequência traduzida permite reconhecer o peptídeo sinal por programas de predição. Contudo não foi possível identificar a metionina inicial (figura 17). O padrão de expressão da APN(1) se mostrou restrito ao intestino médio, tendo maior expressão na porção posterior (figura 18). Isso é bom indício de que a atuação desta aminopeptidase está restrita ao tecido referido.

A sequência da APN(2), por outro lado, precisaria de cerca de 50 aminoácidos (ou 150 bases) para completar a extremidade aminoterminal (figura 17). APN(2), além de ser expressa no intestino, é expressa também nos túbulos de Malpighi e em menor escala no corpo gorduroso e hemolinfa, sugerindo uma atuação mais global, isto é, não digestiva (figura 18).

APN (1) [M. domestica]	<u>FVGVLFF--VGLAAVLLAAGPAQAGTRSLPPLFRESGALENPNFRFDARADDLNYRLPNNT</u>	58
APN (2) [M. domestica]	-----	1
APN (1) [M. domestica]	LPIHYDVELTTNVHDGTK-----KFTGKVQIDVTIVEATTTLVLHKRQLN---ILSAKIE	110
APN (2) [M. domestica]	-----VSLKPYLLDSDPSEKRFTFDGEAYITIKPKVTTSTLVLHSKNLKYSLREFYAKS	54
APN (1) [M. domestica]	SATSASEDLTISYEEREFLTLTRKTNVNFKDETEWKVTLLEYEGELRTDNGGFYLSTYTD	170
APN (2) [M. domestica]	RPTEKATLPAVEPNVTDIVTYT--LTSALVANQEVVLHFVYVTGTMDDMHGFYRSSYTD	112
APN (1) [M. domestica]	ADGNERYLATTQFESTDARHAFPCYDEPNKRATFTITINHSPITYTAISNMPVDTSKTI-	229
APN (2) [M. domestica]	SKNNTKWLGSTQFQTNHARRAFPSFDEPRFKATFDITLTRHKSMKTYSNTRIVNSTTNGD	172
APN (1) [M. domestica]	-GKTVFQKTVNMPTYLLAFIVSDFVYTEGVLNDTPQRIYSRPGTKNEQEWALVSGMLILE	288
APN (2) [M. domestica]	YVTDRYATTPKMSITYILAFIVSEFN---ERFNGDFGVIAARPEFYKQTEYAFDVGQEILK	228
APN (1) [M. domestica]	RLAEYYNVDFALP---KIDQAAIPDFAAGAMENWGLATYREEYMLYNKDTSTVTTQTNIA	345
APN (2) [M. domestica]	DLGDYFDIPYYSMGNDKMMAAIPDFSAGAMENWGLLTYSRERALLYDEGSTTLSAQQYIA	288
APN (1) [M. domestica]	* * *	
APN (1) [M. domestica]	SIIAHEYCHQWFGNYVAVHWWTYLWLKEGFATLFSYKAVDAAYPEWGWVQQFQDDYQSA	405
APN (2) [M. domestica]	AVVAHEQAHMWFGDLVTCQWWSYTWLNEGFARYFQYFGTHNVEYHYQMDQQFVVDQIQAV	348
APN (1) [M. domestica]	LTNDASDYPRPMT-HYVQKPSIAMSYGTVTYAKAGSVLNMWNLHALTDKVFQRLHNYLD	464
APN (2) [M. domestica]	MNMDSTVNTNPMSDENTNTPADLSRMFNISISYKGGTFIRMVKYVMGEENFKNSLREYLK	408
APN (1) [M. domestica]	ANQYSSAVEEQFLAIQTAKEENYEIPAKIEDMLGSWSRQGGYPLLTVTRNYNNGSFTV	524
APN (2) [M. domestica]	THQYTNTPVSDLFTVWKKYIP---AQFQSYADGLFKSFTEQVGPVITFNLTPPTLVIS	465
APN (1) [M. domestica]	TQSSFHNNKNTVTQKSWY-IPFNIAHQSNPDRDTEASHYLLNVS SVRVDKLDKEDWLI	583
APN (2) [M. domestica]	QKRFLLEKGDGADDSLLYTPVITYTTNVENNFNLTPKLFVTPATSVSQTLTPQAVSWVI	525
APN (1) [M. domestica]	LNKQSTGYRINYDEENWKLIIDGLIKSPYK-IHPRNRAQLMHDAYRFSASNRLAHSVLL	642
APN (2) [M. domestica]	GNIQETGYRVNYDVKSWHGIHALLTNWGGIHELNRQVVDLDFNLARASVIDYELAL	585

APN (1) [M. domestica]	DMMTYLPKEDQYAPWSTANGIINVYNYRLSGDAKYYDFQMFVAENRHSLEKLGINDVPG	702
APN (2) [M. domestica]	DTLAYLKTETNYLPWTAAFNGYNYLVIRLG--LETKNFAVYIRDMTAKAYDFLGFEDKPT	643
APN (1) [M. domestica]	EHHYQKYTRNAVINMACLAGIQSCLTETNNKALKALVQHGTPIEANVQSQIYCNGLKQSGD	762
APN (2) [M. domestica]	DTTLDIYNRAKILSWACKFGKKECITKAQEYF-KNLDN-KPVPVNIRSAVYCTAMREGTE	701
APN (1) [M. domestica]	DVFQYVFNQLMDSTDQAFRRVLISSLGCSQ-NENIETYLESSIDKDNKLRNQRITILSP	821
APN (2) [M. domestica]	ADFNKLYNKYLTVATEVTLLIINSLGCVKDSKLVSKFFHIIIVSDS--VRRQDKSAALS	759
APN (1) [M. domestica]	VYSRGSVGLMATIDFLDEHWDEYGNLNTGFGGTNPLNDALVGMSSYVVNTEQEKRLLSLV	881
APN (2) [M. domestica]	LYSENNENVEPVFDLVAENLDALANS---MGYSSVASVISNIASRFTTAQGETKLKNFN	816
APN (1) [M. domestica]	DKVKSSEHASSSLEASVKYNIQSNFDWLKSNRDLPMYWFQSFNIKSGASAVISSSSMAIS	941
APN (2) [M. domestica]	TQNRGKFGSSASTLDSAEKTVKENLDWAEKKLGTFFKSHLEKYTTCSASLSGFTALSMVL	876
APN (1) [M. domestica]	<u>TL</u> LLLLVISR	950
APN (2) [M. domestica]	<u>FAV</u> LARFLC	885

Figura 17. Sequências selecionadas de aminopeptidase N. As regiões transmembranares foram verificadas (HMMTOP; SOSUI e TMHMM) e estão sublinhadas. As regiões com possível modificação por âncora de GPI estão com fundo preto e letras brancas. O peptídeo sinal (Signal P) está marcado com fundo cinza e letra preta. Resíduos responsáveis pela coordenação do zinco e catálise apresentam asterisco acima.

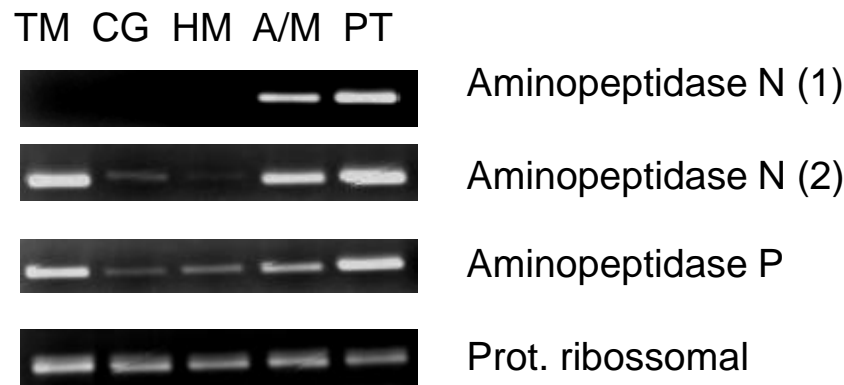


Figura 18. Expressão, verificada por RT-PCR, de diferentes aminopeptidases de *Musca domestica*. Reação com 25 ciclos. TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso; HM: hemolinfa; A/M: porção anterior e média do intestino médio; PT: porção posterior do intestino médio. O controle positivo corresponde a uma proteína ribossomal e sua reação foi submetida a apenas 20 ciclos.

Tanto APN(1) quanto APN(2) apresentam conservados as duas histidinas responsáveis pela coordenação do zinco e o ácido glutâmico do sítio ativo, essenciais para o processo de catálise enzimática.

APP [M. domestica]	MKDTTEILKCLRQLMQSHGSPPLAAYIVPSDDAHQSEYICQHDERRAFVSGFDGSAGTAV	60
APP [M. domestica]	<u>ITADKALLWTDGRYYQ</u> QALKQLDSNWELMKDGLPTTPSVASWLACNLAKDSKVGVDPKLF	120
APP [M. domestica]	<u>SYRLWKPIEKELSGADCC</u> LIPVEENLVDIVWGEEQPKQTSNPIITLDTTFAGMTVSDKWA	180

```

APP [M. domestica] NVKEKLTEKKAQVLVVSALDEIAWFLNLRGSDIDYNPVFFAYLIITHEKLMFFVDSAKLP 240
APP [M. domestica] SDFKQHQSNGVEISYISYSAIGEELGRLTENNVESKIWIWISPGSSYYLNALIPKKIRHQE 300
APP [M. domestica] ITPIALAKAIKNPIEVEGFINSHIRDGVALCQYFAWLEQMVAQKQPVEISGATKLEEFR 360
APP [M. domestica] SKKEHFMGSLSFPTISSSGPNGSVIHYHPAQETNRPINDKEVYLCDSGAQYKDGTTDVTRT 420
APP [M. domestica] WHFGEPTDFQMETYTRVLKQQLALGATVFPKKVKGVLDLTLARKALWDVGLDYGHGTGHG 480
APP [M. domestica] VGHFLNVHEGPMGVGIRLMPDDPGLQENMLISNEPGYYQDGEFGIRIEDIVQIVPATTKY 540
APP [M. domestica] DFNGRGALTFFKTITLAPKQTKMIKKELLLPEEKLLNDYHRLVWDTLSPIKKEDDKLTL 600
APP [M. domestica] AWLERETKEI 610

```

Figura 19. Sequência encontrada de aminopeptidase P (APP). Não existe região transmembranar segundo programas de predição. Não há peptídeo sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Sublinhado o domínio n-terminal de creatinase/prolidase. A sequência apresenta todos os seis resíduos do sítio ativo conservados, que foram evidenciados com asterisco acima.

A única sequência de aminopeptidase P (APP) foi obtida a partir da união de 81 reads. A sequência traduzida indica a presença de todos os resíduos do sítio ativo conservados além de um domínio n-terminal de creatinase/prolidase (figura 19). Ela é expressa, conforme verificação por RT-PCR, em todos os tecidos analisados, com maior expressão nos túbulos de Malpighi e na região posterior do intestino médio (figura 18). Sua atuação, portanto, não deve ser unicamente ligada as funções digestivas.

4.4.2. Dipeptidase

Uma pequena sequência, cujos *best matches* no BlastX correspondem a dipeptidases, foi utilizada para a produção de um par de *primers* que por sua vez serviram para a análise de sua expressão por RT-PCR.

O trecho de sequência entre os *primers* foi amplificado nas diferentes porções do intestino médio bem como nos Túbulos de Malpighi (figura 20). Isso indica que sua transcrição não está restrita aos tecidos relacionados com digestão.

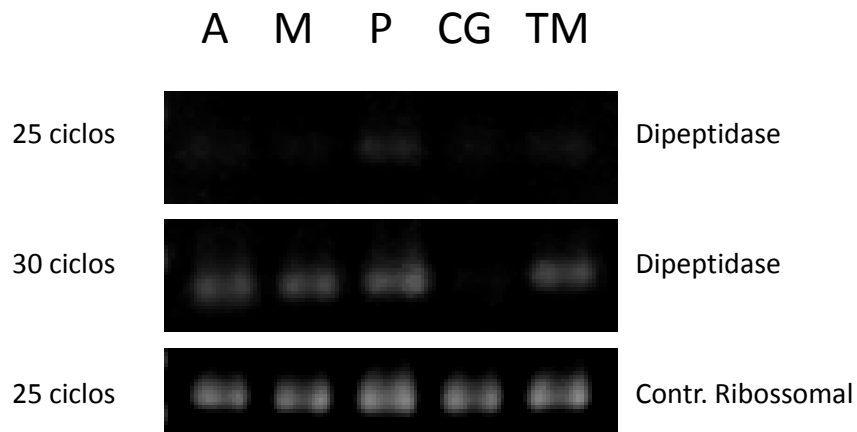


Figura 20. Verificação da expressão por RT-PCR (25 e 30 ciclos) de dipeptidase. A-porção anterior do intestino médio; M-porção média do intestino médio; P-porção posterior do intestino médio; CG-corpo gorduroso e TM-túbulos de Malpighi.

4.4.3. Carboxipeptidase A

A partir de um *contig* associado a uma carboxipeptidase foi construído um par de *primers*, a fim de se verificar por técnica de RT-PCR o tecido que expressa tal enzima. Foi possível amplificar a sequência apenas na porção média e posterior do intestino médio (figura 21). Isso indica que sua expressão estaria restrita ao epitélio digestivo, mais especificamente nas regiões distais do intestino médio.

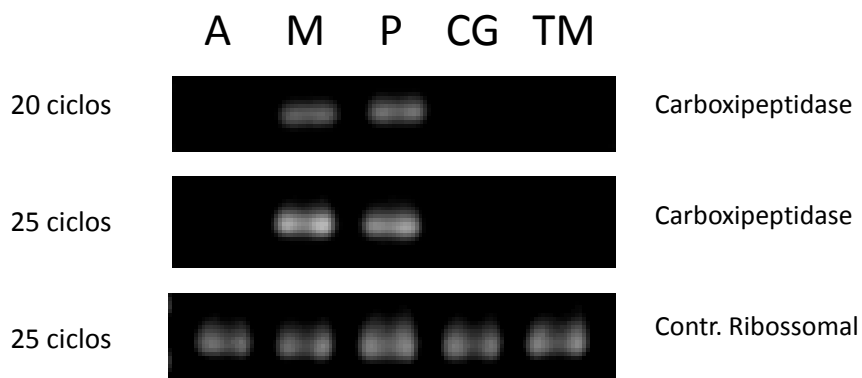


Figura 21. Avaliação da expressão de carboxipeptidase A por RT-PCR (20 e 25 ciclos). A-porção anterior do intestino médio; M-porção média do intestino médio; P-porção posterior do intestino médio; CG-corpo gorduroso e TM-túbulos de Malpighi.

A construção de *primers* mais voltados para a região carboxi-terminal permitiu a obtenção da sequência completa da enzima (figura 22). São 1389 nucleotídeos que codificam uma enzima de 427 aminoácidos. A enzima codificada tem massa molecular teórica de 47,9 KDa e ponto isoelétrico teórico de 5,68.

```

1  cggggaatcacatcgagtatggcaacaagtttaacctagttttggggtttttgccttttg 60
1  M A N K F N L V L G F C L L 14
61  gcagtggccttgtcttccggcgaacgtgcccgttacgataattaccgcggtttaccaaacc 121
15  A V A L S S G E R A R Y D N Y R V Y Q T 35
122  accgcttccagtcctgctgaattggagggtcttgaagaacttggagggtgccagcgattcg 182
36  T A S S P A E L E V L K N L E G A S D S 56
183  attatgttcttggatggcattcatcacatcaacaaggccatcagcgttgtcgttgcctccc 243
57  I M F L D G I H H I N K A I S V V V A P 77
244  cataaggttccagacttcttggagattatgggtgccaatgaaatcgagtacgaattgatt 304
78  H K V P D F L E I M G A N E I E Y E L I 98
305  gaaagcaacttgcгааagtcaattggaagatgatgaagaacaggtggccaagccaaactcc 365
99  E S N L Q S Q L E D D E E Q V A K P N S 118
366  tatgcccggttcttgaactacaactggaatcaatactaccaattggatgacacctacaaa 426
119  Y A R S L N Y N W N Q Y Y Q L D D T Y K 139
427  tggatgcaacaattggccattgaataccccgggtgttgtgactttgattgaaggcggtaaa 487
140  W M Q Q L A I E Y P G V V T L I E G G K 160
488  acctatcagggacgttccattttgggtgttaagatctccaagagccaaaccaccaagcct 548
161  T Y Q G R S I L G V K I S K S Q T T K P 181
549  ggtatcttggttgaagctggtatccatgcccgtgaatggattgctcccgccactgccacc 609
182  G I F V E A G I H A R E W I A P A T A T 202
610  tacttgatcaaccaattgttgacctccaatgtggaaagtgttcgcaacattgcccaaac 670
203  Y L I N Q L L T S N V E S V R N I A Q N 223
671  tacgactggtacattttcccccatgccaatcctgatggttatgtctacaccacaccacc 731
224  Y D W Y I F P H A N P D G Y V Y T H T T 244
732  gatcgcatgtggcgcaagaccgctactccttatggcagctgtttcgggtgctgatcccaac 792
245  D R M W R K T R T P Y G S C F G A D P N 265
793  cgcaactggggcttccaatggaacggttggatctagcaacaatgcctgctctgataacc 853
266  R N W G F Q W N V V G S S N N A C S D T 286
854  tatgctggtccttctgctttctccgaaattgaaacccgatccttctcccaatacatctcc 914
287  Y A G P S A F S E I E T R S F S Q Y I S 307
915  tcattgaagggaagatcttctgtacatctcattccatgcctactctcaatacttgttg 975
308  S L K F G K I F L Y I S F H A Y S Q Y L L 328
976  tatccctatggcactgcatcttggccgtaacgttaaggacttgaagcaagtgttt 1036
329  Y P Y G H T A S L P A N V K D L K Q V F 349
1037  gatgtcagtggttgcctgatgaacaagcgttacgggtaccaaaatacaccggtggcaacatc 1097
350  D V S V A A M N K R Y G T K Y T G G N I 370
1098  tacgatgccatctatcccgttctgagccagtggtgactgggacctacgaaaatgttggc 1158
371  Y D A I Y P A S G A S V D W A Y E N V G 391
1159  accaagatgtccttctgctatgaattgctccatcttcgaaactctgttttgactggcttc 1219
392  T K M S F C Y E L R P S S N S V L T G F 412
1220  aaattgcctgcttcccaaattatccccaccggtgaggagaccatggattctattactgcc 1280
413  K L P A S Q I I P T G E E T M D S I T A 433
1281  atggttcaagaagtccaaaaattgggttatttcaagaactaagcggacgaatgtgattcg 1341
434  M V Q E V Q K L G Y F K N - 446
1342  aaataggaataaatcgataataaaaaattagctaattattaaaatttagaaaaaaaaaaaa 1402
1403  aaaaaaaaa

```

Figura 22. Sequência completa de carboxipeptidase A como nucleotídeos e aminoácidos. O peptídeo sinal (Signal P) está marcado com fundo cinza. O propeptídeo está sublinhado. Os aminoácidos que indicam o sítio de ligação do zinco estão indicados em negrito e sublinhados. Os resíduos do sítio ativo, tanto catalíticos quanto de ligação ao substrato, estão em itálico.

Com a ajuda de programas de predição de peptídeo sinal (signalP), domínio transmembrana (HMMTOP) e âncora de GPI (GPI-Prediction), pode-se inferir que esta enzima apresenta peptídeo sinal, e portanto, contém os sinais que irão dirigir a enzima para seu destino final, indicando que ela é secretada. Seu sitio de clivagem predito do seu peptídeo sinal está entre os aminoácidos 21 e 22. A sequência não apresenta domínio transmembrana e nem âncora de GPI, indicando que não se trata de uma proteína integrante de membrana.

4.4.4. Metaloproteinase

A construção de um par de primers utilizando como base uma pequena sequência corresponde a uma metaloproteinase foi utilizado para estudar a sua expressão por RT-PCR. Foi amplificada a sequência apenas nos epitélios digestivos e mais especificamente nas porções distais do intestino médio (figura 23).

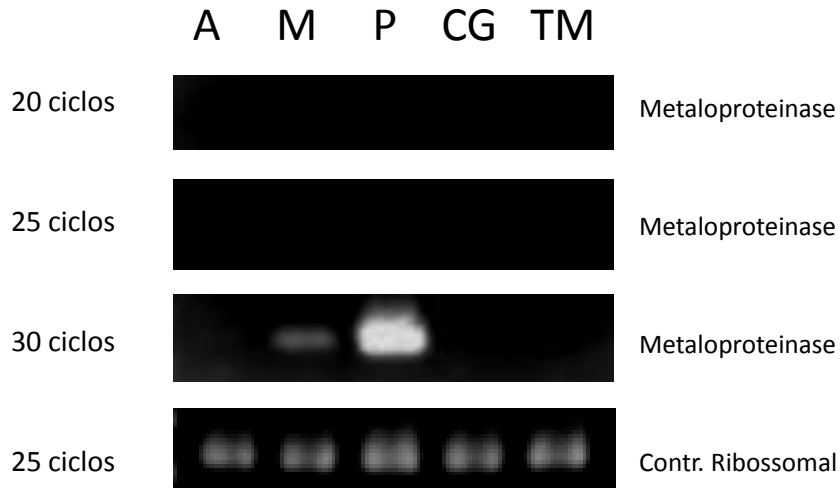


Figura 23. Expressão de metaloproteinase verificada por RT-PCR (20, 25 e 30 ciclos). A-porção anterior do intestino médio; M-porção média do intestino médio; P-porção posterior do intestino médio; CG-corpo gorduroso e TM-túbulos de Malpighi.

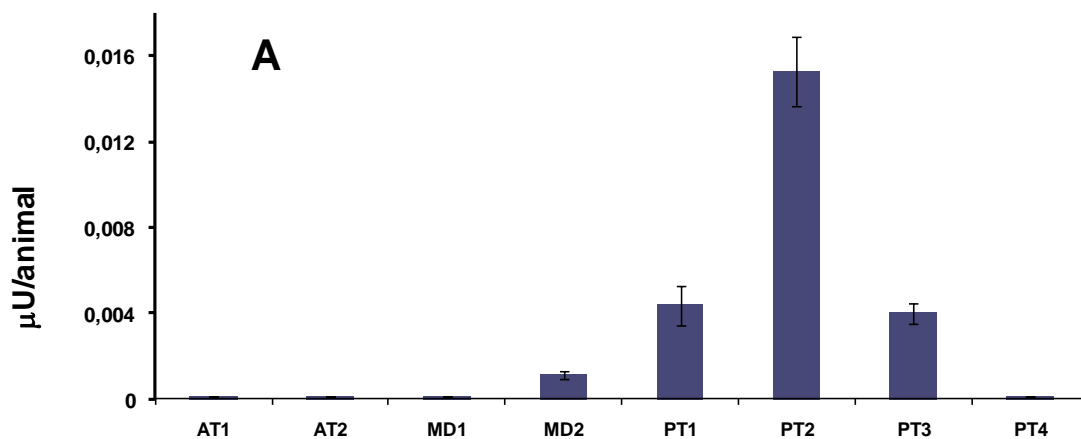
4.4.5. Maltase

As medidas de atividade de alfa-glicosidase foram feitas com o substrato maltose. Esse ensaio é apropriado para identificar enzimas capazes de hidrolisar

ligações alfa-glicosídicas, especialmente às enzimas relacionadas à digestão final (digestão de dímeros). Dessa forma, as medidas de atividade feitas contemplam especialmente enzimas do tipo maltase.

As enzimas solúveis são obtidas na fração solúvel obtida após o processo de homogeneização e centrifugação. A atividade de maltase ligada ao glicocálix é liberada após os ciclos de congelamento e descongelamento sobre a suspensão da fração insolúvel, recuperando assim a atividade na forma solúvel. Já o tratamento com Triton-X100 solubiliza as enzimas ligadas à membrana. Tal abordagem foi validada por trabalho anterior de fracionamento subcelular acompanhado por medidas de atividade hidrolítica (Espinoza-Fuentes *et al.*, 1987).

A figura 24 permite fazer diversas inferências quanto à atividade sobre maltose. É evidente que a maior parte da atividade hidrolítica sobre maltose está restrita à região proximal da porção posterior do intestino médio (PT1, PT2 e PT3). Isso é verdade especialmente para as enzimas solúveis e as ligadas ao glicocalix (figura 24 A e B). Já quanto às enzimas ligadas a membranas temos também uma importante atividade nas regiões anteriores do intestino médio (AT1 e AT2) (figura 24C).



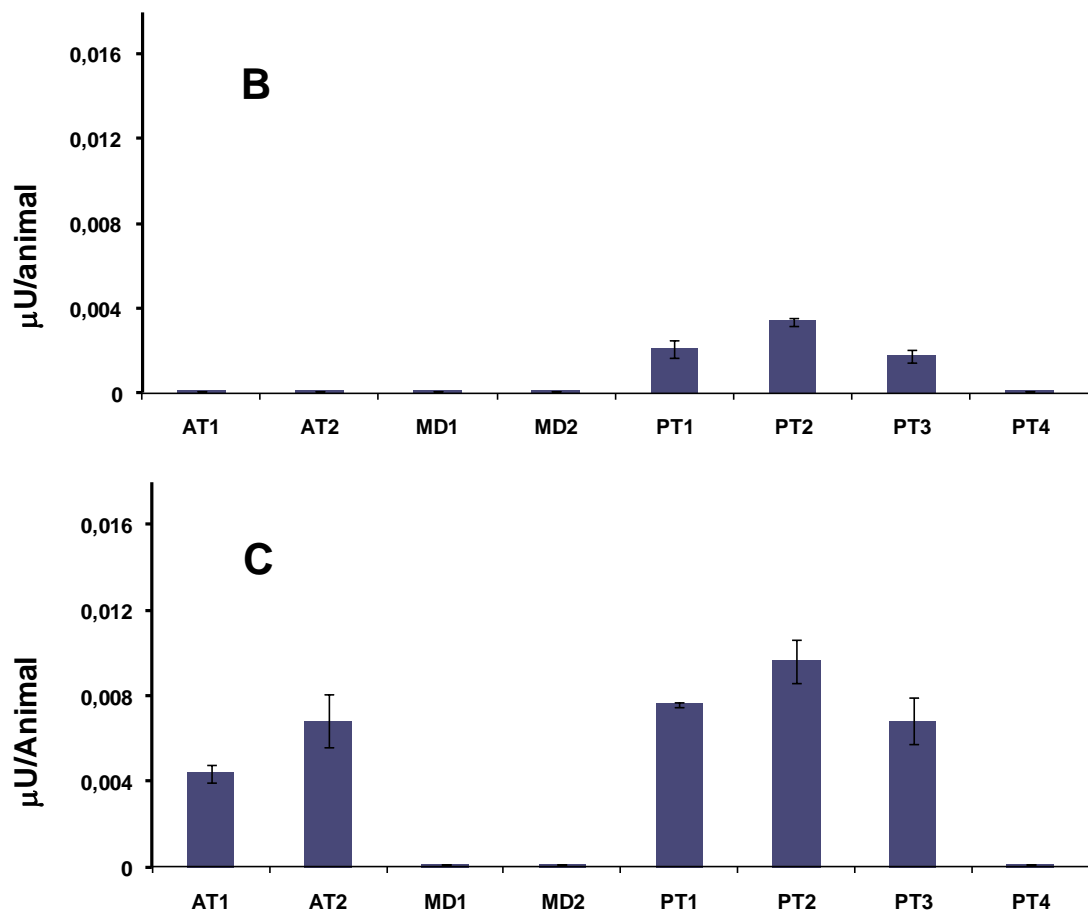


Figura 24. Atividade hidrolítica sobre maltose em diferentes porções do intestino médio de *Musca domestica*. A: atividade presente na fração solúvel dos homogeneizados obtidos a partir de cada seção do intestino médio. B: atividade presente em solução após três ciclos de congelamento e descongelamento de uma suspensão de membranas obtidas por sedimentação a partir do homogeneizado. C: atividade presente em membranas solubilizadas com Triton X-100 (3%). Para detalhes sobre frações consultar materiais e métodos, para legenda consultar figura 2E. Barras de médias (n=3) com desvio padrão da média.

As atividades presentes na região posterior do intestino médio estão, de acordo com trabalhos anteriores, associadas a diferentes enzimas com afinidades por substrato, massa molecular, entre outros parâmetros também diferentes (Jordão & Terra, 1989. Jordão & Terra, 1991). Esses trabalhos abordam tradicionalmente o intestino médio da *Musca domestica* como tendo três porções distintas (anterior, média e posterior – ver figura 2C). Contudo, a abordagem dada aos experimentos neste trabalho nos dá uma visão mais refinada da distribuição da atividade sobre maltose.

Partindo de uma pequena sequência associada a uma maltase, foi feita a construção de um par de *primers* que foi utilizado em uma reação de PCR tendo

com amostra o cDNA simples fita de diferentes tecidos da larva de *M. domestica*. Neste caso foi verificada a amplificação da sequência apenas na porção posterior do intestino médio (figura 25). Esses mesmos *primers* foram utilizados para extensão da sequência até que fosse completada (figura 26).

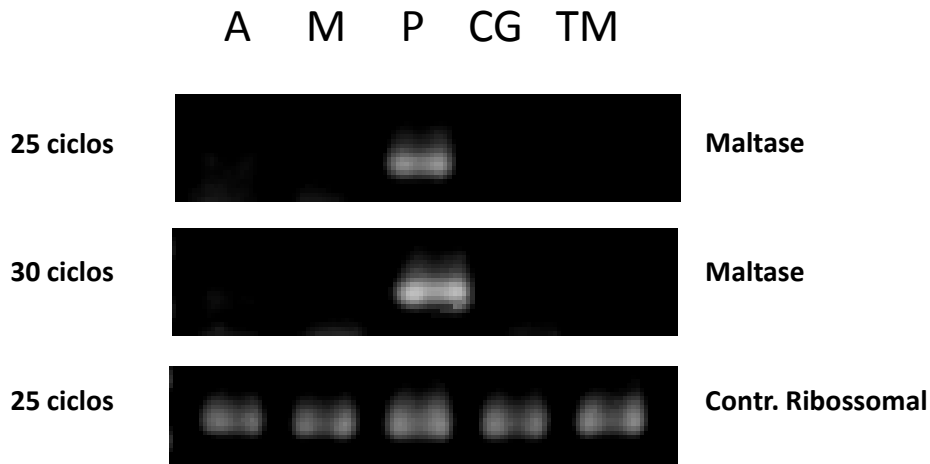


Figura 25. Verificação de expressão por RT-PCR (25 e 30 ciclos) de Maltase. A-porção anterior do intestino médio; M-porção média do intestino médio; P-porção posterior do intestino médio; CG-corpo gorduroso e TM-túbulos de Malpighi.

```
1      cgggggacattagcccatagttggtgttacggttaagagggccaacaacgaaatgagagc 60
1                                     M R A 3
61     tctgcatttggtttgccttttggcaattgtttttggctgtcaggcggccgatttgaaatg 120
4     L H L F C L L A I V F G C Q A A A D L K W 23
121    gtggcagacagcctcgttctatcgaatztatccccggtcctttaaggacagcgatggaga 180
24    W Q T A S F Y R I Y P R S F K D S D G D 43
181    tgggtgtgggagatctcaagggcattaccgaacagctaccctacctaaaggagatcggcat 240
44    G V G D L K G I T E Q L P Y L K E I G I 63
241    aactgccacctggcctttcgcccatcttcacttcgcccatggcctgattttggttacgttgt 300
64    T A T W L S P I F T S P M A D F G Y V V 83
301    ggccaatctaaccgaaatgatccaattttcggtaccatggaagactttgaggccttgat 360
84    A N L T E I D P I F G T M E D F E A L I 103
361    cgaaaaggccaaggcctttgggtgtgaaaattattttggattttgtaccaatcacacgag 420
104   E K A K A L G V K I I L D F V P N H T S 123
421    tgatgaatgtgaatggttcatcaagtccgcagccagagatcccgagtataaggatttcta 480
124   D E C E W F I K S A A R D P E Y K D F Y 143
481    tgtctggcatccgggaaaaattggttaatgggtgttcgccagcctccgaccaactggattag 540
144   V W H P G K I V N G V R Q P P T N W I S 163
541    tgttttccgtggcagcatgtggacatggaatgaacagcgtcaggaatactatctgcatca 600
164   V F R G S M W T W N E Q R Q E Y Y L H Q 183
601    attccatgccaagcaaccggatttgaattatcgcaatccaagggttatggaaatgatgaa 660
184   F H A K Q P D L N Y R N P K V M E M M K 203
661    ggacgtcttccgctttctggctgcgtcgtggcgtctccggcttccggtgctcgatgctgtgcc 720
204   D V F R F W L R R G V S G F R V D A V P 223
721    acacaccttcgaaatcagtcgccgatggcgaactaccccgatgagccccgcaatcc 780
224   H T F E I S P D A D G N Y P D E P R N P 243
781    caatgtcaatgatccccgaagattatgaatacttccaacacatctataccaccaatcagcc 840
```



```

244  N V N D P E D Y E Y F Q H I Y T T N Q P 263
841  ggaaaccattgacatggtctatcaattgCGTcaagtcttggaggagatggatcaggaatt 900
264  E T I D M V Y Q L R Q V L E E M D Q E L 283
901  gggtggtgatgatcgcatcattatgaccgaagcctatgctcccttagatgtaattatgca 960
284  G G D D R I I M T E A Y A P L D V I M Q 303
961  gtattatggcaatggtaccacaatggggcacagatacccttcaatttccaattgattag 1020
304  Y Y G N G T H N G A Q I P F N F Q L I S 323
1021 caatttgaataagaactccaatgcctatcactatgacgagctcatcaatatctggttga 1080
324  N L N K N S N A Y H Y D E L I N I W L K 343
1081 ggcaatgcccgagggcaagacagccaattgggtgcttggcaatcatgaccaaaagcagatt 1140
344  A M P E G K T A N W V L G N H D Q S R F 363
1141 cggtcccgtttgggtgaagatcgcatcgaacacccctgctactcactctcc 1200
364  G S R L G E D R I D I I N T L L L T L P 383
1201 cggtgacagatcacctacaatggtgaggaaattggcatgacagatgtctggatctcatg 1260
384  G C S I T Y N G E E I G M T D V W I S W 403
1261 ggaggaaactggtgatccacaggcctgtcaatcgaatccggaaaattatgagcgtttgac 1320
404  E E T V D P Q A C Q S N P E N Y E R L T 423
1321 ccgcatcccgtgctgacccccctccattggagtgacaacaattttgccggtttcactga 1380
424  R D P V R T P F H W S D N N F A G F T D 443
1381 tggcaactctacttggctgccagtgccgataactacaaatcgggtcaatgtaagcgtga 1440
444  G N S T W L P V A D N Y K S V N V K R E 463
1441 acgaggcatcacctacagccatttgaacgtctacaagcagttgcaaaatctacgtcgaga 1500
464  R G I T Y S H L N V Y K Q L Q N L R R E 483
1501 accacacttccaagggggtgcaagtgaggtcaaggccttgagtgagaataccttggccat 1560
484  P T F Q G G A S E V K A L S E N T L A I 503
1561 caagcgttccctggccggttaccacacctatgtggtcctcctgaacatcaatgacagcgt 1620
504  K R S L A G Y P T Y V V L L N I N D S V 523
1621 tgagtcctgaacttgaacagtgctttctatggccttagcagctctttggaatatgtggt 1680
524  E S L N L N S A F Y G L S S S L E Y V V 543
1681 ggtcaccgatcgcagtcctagacgcaagggagatttggccacaccgattccataaccct 1740
544  V T D R S P R R K G D L A H T D S I T L 563
1741 gatgcccgaaggaagccggtgttctaaagactgtttaaatacgttcttttgtaaaatgta 1800
564  M P K E A V V L K T V * 583
1801 aaatttgtaaacaaaaataataatttgaatttcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1860
1861 aacatgtc 1868

```

Figura 26. Sequência da maltase de *Musca domestica*. O peptídeo sinal (Signal P) está marcado com fundo cinza. A sequência não apresenta domínio transmembrana ou sítio de modificação por âncora de GPI.

A sequência de maltase apresenta peptídeo sinal, mas não foi possível prever nenhum mecanismo de associação com a membrana, seja por domínios transmembrana ou por sítio de modificação por âncora de GPI.

5. DISCUSSÃO

5.1. Absorção de glicose

Os experimentos de absorção de glicose *in vivo* demonstraram que a absorção de glicose é afetada na presença de florizina (figura 7A). Logo, esperamos a ação de transportador do tipo SGLT na porção anterior do intestino médio de *Musca domestica*, mesmo que as observações iniciais não tenham indicado variação na absorção de glicose na presença dos íons sódio e potássio (figura 6). A absorção de glicose não foi afetada pela presença de floretina. Assim, se espera que não haja absorção (direta) de glicose pelo transportador do tipo GLUT (figura 7B).

Os estudos de expressão dos transportadores de glicose indicam que a absorção de glicose na porção anterior e média do intestino médio se daria por transportadores do tipo GLUT e não por transportadores do tipo SGLT, como sugerido pelos experimentos *in vivo*. Contudo, essas análises não são conclusivas. Seria necessário certificar se o transportador, quando expresso, é realmente encaminhado para a região apical da célula ou mesmo se todos os transportadores de glicose que são expressos no intestino médio foram verificados. Considerando a cobertura do pirosequenciamento da biblioteca de cDNA ou seu processo de análise, há possibilidade de alguns transportadores não terem *contigs* representados ou mesmo não terem sido detectados.

O conjunto de experimentos em *Musca domestica* indica, de maneira geral, a participação do transportador do tipo SGLT na absorção de glicose e a clara presença de transportadores do tipo GLUT. A inibição do transporte de glicose na presença de florizina é um indicador de que a absorção de glicose se dá com a participação de SGLT, contudo sua expressão foi detectada apenas na região posterior do intestino médio e não na região anterior, onde o efeito da inibição foi verificado.

A presença de genes de SGLT com expressões distintas foi descrita para o sistema renal humano, em que ocorre um gene expresso na região S1 e S2 do túbulo proximal e um segundo gene expresso em S3 (mais distal), SGLT2 e SGLT1 respectivamente. SGLT2 e SGLT1 apresentam diferenças entre seus parâmetros cinéticos (Hummell *et al.*, 2011). No presente trabalho, apenas um gene de SGLT foi analisado, de forma que outros genes desse tipo possam existir em *M. domestica* e

o gene estudado não seja o responsável pela absorção na porção anterior do intestino médio.

5.2. Tamponamento intestinal

5.2.1. Processo de acidificação

Como a presença de uma V-ATPase com atividade translocadora de prótons é uma hipótese viável para explicar a acidificação da região média do intestino médio, a expressão da subunidade dessa ATPase foi estudada. A expressão de genes que codificam subunidades da V-ATPase em vários tecidos, como das subunidades G e F, deixou claro que algumas subunidades são codificadas por um único gene, mesmo que a V-ATPase esteja associada a funções distintas (figura 11). A expressão heterológa das subunidades G e F da V-ATPase possibilita a produção de anticorpos para estudos futuros da exata localização celular das V-ATPases.

A escolha de algum gene que seja expresso especificamente quando a V-ATPase assume suas diversas funções seria vital para indicar a participação da V-ATPase no processo de acidificação. Trabalhos anteriores indicavam a subunidade a como uma boa candidata, pois apresentava diversas isoformas e estudos anteriores em mamíferos demonstraram sua expressão em diferentes tecidos (Nishi *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2005). Assim, dados de expressão da subunidade a da V-ATPase foram gerados demonstrando uma expressão típica da região ácida para dois dos seis genes estudados (figuras 13 e 14).

A análise conjunta dos dados permite inferir que a montagem da V-ATPase em *Musca domestica* se dá com a presença de subunidades fixas, sendo codificada por um único gene, e subunidades alternativas que apresentam genes que codificam as diferentes isoformas. As diferentes isoformas são expressas de acordo com a função assumida pela V-ATPase na célula.

A expressão da subunidade a da V-ATPase na porção média do intestino médio é forte evidência de que a V-ATPase seria a responsável pelo processo de secreção de prótons que garante o baixo pH da região. O baixo pH, por sua vez, é condição fundamental para a digestão de bactérias pela *Musca domestica*, visto ser na porção média do intestino médio que se dá a ação de uma lisozima e uma proteinase ácida (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

A secreção de prótons isoladamente acarretaria um aumento do potencial eletroquímico e haveria uma hiperpolarização da célula. O transporte de um anion deveria acompanhar a secreção de prótons, para assim diminuir a formação do potencial eletroquímico e favorecer o aumento de pH (Stevens & Forgac, 1997). A expressão do canal de cloreto no tecido que inclui as células oxínticas parece favorecer essa análise. Contudo sua participação em diversos outros processos (como a acidificação de vesículas) garante uma expressão ampla (figura 15), não permitindo precisar se este transportador está realmente participando do processo de acidificação.

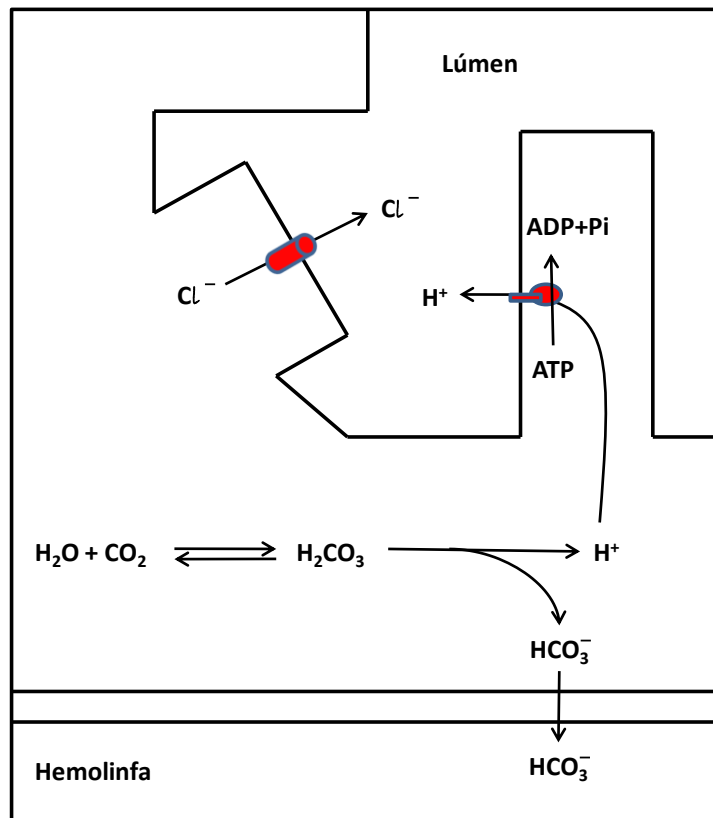


Figura 27. Esquema de movimentação de íons no processo de acidificação da porção média do intestino médio de *Musca domestica*. As moléculas em vermelho representam os avanços experimentais deste trabalho, incluindo no modelo de acidificação a V-ATPase e possivelmente um canal de cloreto.

O conjunto de experimentos realizado com sequências das subunidades da V-ATPase e do canal de cloreto garante um avanço na compreensão do processo de acidificação do lúmen intestinal de *Musca domestica*. Os avanços estão resumidos na figura 27 e indicam a que molécula responsável pela secreção de prótons seria

uma V-ATPase e não mais uma P-ATPase como proposto anteriormente (Terra & Regel, 1995). Contudo, ainda não é possível explicar a supressão do processo de acidificação pelos inibidores de P-ATPase (vanadato) e de Na^+/K^+ -ATPase (ouabaína) identificado pelos autores.

Com o intuito de compreender a supressão da acidificação por ouabaína, foi procurado no banco de dados do pirosequenciamento (do cDNA do intestino médio de *Musca domestica*) sequências de Na^+/K^+ -ATPase. Nenhuma sequência deste transportador foi encontrada, mas foram encontradas sequências de H^+/K^+ -ATPase (ou H^+/Na^+ -ATPase) que são, assim como as Na^+/K^+ -ATPase, P-ATPases. Há na literatura relato deste tipo de transportador ser sensível a ouabaína (Rajendran *et al.*, 2000), podendo ser o elo entre a inibição verificado por Terra & Regel (1995) e o processo de acidificação. A necessidade de estudos destes transportadores se faz necessário, pois possivelmente as H^+/K^+ -ATPases estejam associadas ao processo de acidificação.

5.2.2. Processo de alcalinização

O mosquito *Aedes aegypti* mantém um alto pH no lúmen do intestino médio (cerca de 10,5). Seu processo de alcalinização intestinal é atribuído a uma H^+/V^+ -ATPase da membrana plasmática e a alta concentração de íons bicarbonato/carbonato no lúmen (58,1mM), gerados por uma anidrase carbônica (Corena *et al.*, 2004). Este modelo de alcalinização não pode ser diretamente transposto para *Musca domestica*, pois a concentração de bicarbonato é uniformemente baixa por todo o conteúdo luminal (aproximadamente 1,5mM) (Terra & Regel, 1995).

A expressão do transportador de amônia na porção ácida do intestino médio indica uma possível movimentação amônia nesta região. A partir dos dados da concentração de amônia apresentado por Terra & Regel (1995) é possível concluir que há diminuição da concentração na região ácida (porção média do intestino médio). A diminuição da concentração de amônia seria devido ao processo de absorção pelo transportador de amônia. O transporte é evidente, pois em ambiente ácido haveria maior efeito de *íon trapping* (NH_3 é protonado no lúmen ácido e perde a permeabilidade), o que levaria a um aumento na concentração de amônia luminal.

Com a retirada da amônia do lúmen e a entrada de prótons secretados pela V-ATPase a acidificação da porção média do intestino médio seria garantida.

A abordagem dos estudos realizados com transportadores Rhesus-símile associa normalmente o transporte a processos de detoxificação que são, portanto, secretórios (Worrell *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010). Contudo, a absorção por transporte transepitelial ativo de amônia foi verificada em intestino médio de *Manduca sexta*. Os transportadores de amônia Rhesus-símile têm baixa expressão no intestino médio e o transporte pode ser inibido por bafilomicina A o que levou Weihrauch (2006) a atribuir a absorção de amônia a um transportador do tipo Na⁺/H⁺ antiporter (NHE). A inibição do transporte de amônia por ouabaína foi verificada por Worrell (2008) e foi atribuído a interferência no transportador do tipo Na⁺/K⁺-ATPase. A participação deste transportador ou mesmo deste inibidor no transporte de amônia precisa ser mais bem esclarecida.

A secreção de amônia é proposta para células do cólon de mamíferos, apresentando duas isoformas: RhBG seria o transportador presente na membrana basolateral e RhCG presente na membrana apical (Worrell, 2008). Isso indica a possibilidade de haver mais de uma isoforma também em *Musca domestica*, o que complementaria as análises.

A possível participação do transportador Rhesus-símile na absorção da amônia da região ácida ainda não fornece informações sobre o processo de secreção de amônia que garante sua alta concentração na porção anterior e posterior do intestino médio.

5.3. Digestão intermediária e final em *Musca domestica*

5.3.1. Proteinases e peptidases

As proteínas digeridas pela *Musca domestica* são derivadas em grande parte das bactérias ingeridas. A digestão primária se dá pela ação da endoproteínase catepsina D, que atua na porção ácida do intestino médio, mas é na porção posterior do intestino médio que se dá a maior parte da digestão primária de proteínas pela ação de tripsinas e quimotripsinas (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). A esse cenário devemos incluir agora uma metaloproteínase que age como endoproteínase. O experimento feito com a sequência da metaloproteínase (figura 23) indica que a sua

função estaria relacionada ao processo digestivo. Esta enzima não estava prevista nos trabalhos realizados pelo grupo (Terra & Ferreira, 2005), sendo, portanto uma enzima que carece de esforços na caracterização de sua atividade na própria larva.

A digestão intermediária (ou hidrólise de oligopeptídeos) no espaço endoperitrófico de *Musca domestica* se dá principalmente pela atuação de uma carboxipeptidase solúvel (Jordão & Terra, 1991). Nos trabalhos de Jordão & Terra (1989, 1991) é proposta a existência de duas carboxipeptidases A sendo uma solúvel e outra ligada à membrana. A sequência de carboxipeptidase aqui estudada possivelmente corresponde a uma das carboxipeptidases solúveis verificadas. Essa inferência se baseia na utilização de ferramentas de bioinformática de predição de funções protéicas que não foram capazes de reconhecer regiões transmembrana ou mesmo sinal para âncora de GPI. A sequência completa que codifica a enzima pode agora ser utilizada para a construção de clones de expressão, e no caso de conseguir a enzima recombinante com atividade, podendo comparar os parâmetros cinéticos com os apresentados por Jordão & Terra (1989).

Os oligômeros que difundem para o espaço ectoperitrófico são hidrolisados por carboxipeptidase, aminopeptidase e dipeptidase ligadas à membrana das microvilosidades do ápice das células epiteliais. A atuação dessas enzimas sobre os oligômeros resulta na produção de aminoácidos livres que são então absorvidos (Jordão & Terra, 1991).

A atividade de aminopeptidase que foi demonstrada para *Musca domestica* é restrita a membranas, especialmente de microvilosidades celulares (Espinoza-Fuentes *et al.*, 1987). A presença de peptídeo sinal, alça transmembrana e alta expressão (inferida pelo número de *reads*) da sequência APN(1) associado a expressão restrita ao intestino médio torna a APN(1) uma forte candidata na transcrição da aminopeptidase intestinal (Espinoza-Fuentes *et al.*, 1987; Jordão & Terra, 1991). A sequência da APN(2), mesmo sendo formada também por muitos *reads*, apresenta uma expressão mais difusa, participando de outros processos que não a digestão extracelular. A APP, por sua vez, não apresenta peptídeo sinal ou mesmo alça transmembrana, participando, muito provavelmente, de processos intracelulares.

Os resultados sugerem que a sequência de dipeptidase estudada não deve corresponder à dipeptidase descrita por Jordão & Terra (1989), podendo ser uma

enzima de espectro de atuação mais amplo que simplesmente a participação na digestão. Contudo, estudos mais detalhados são necessários.

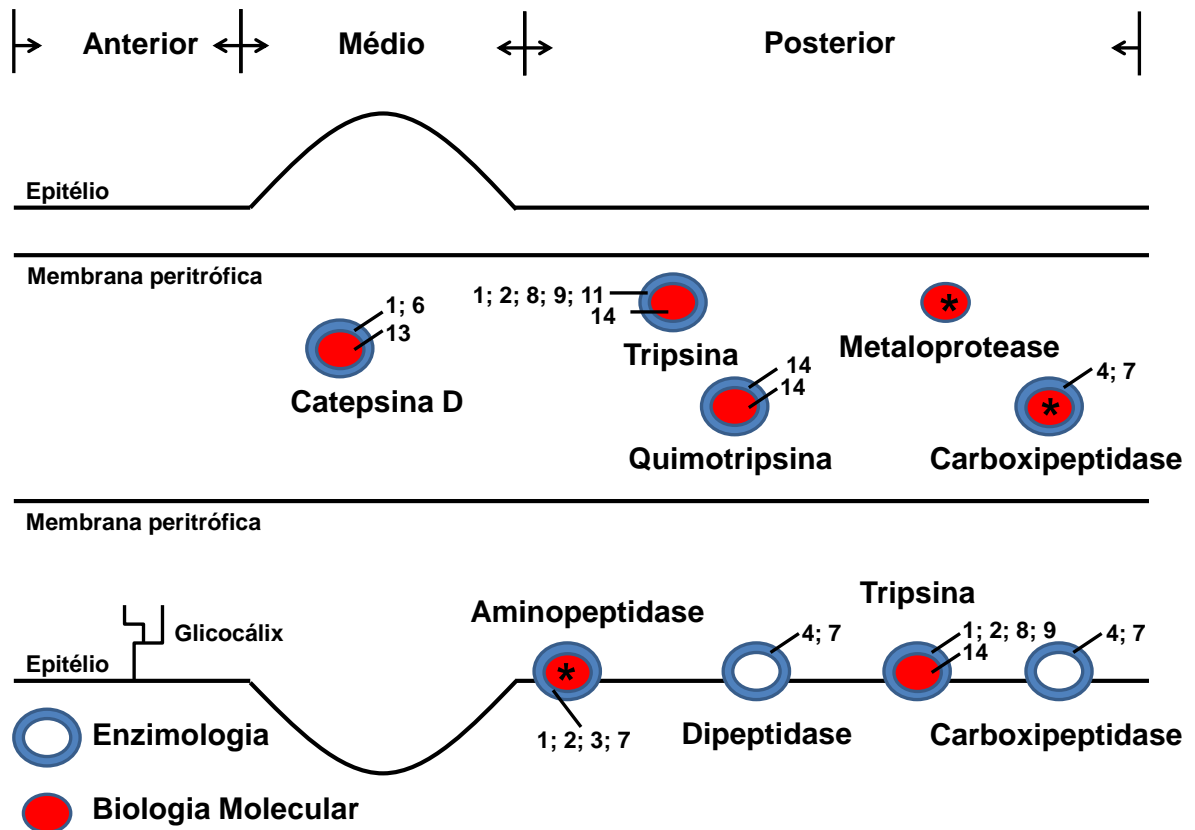


Figura 28. Enzimas proteolíticas de *Musca domestica*. O esquema representa o intestino médio de *Musca domestica*, as enzimas proteolíticas com a posição na qual atuam (legenda no alto da figura) e situação do conhecimento sobre elas (legenda na parte inferior a esquerda da figura). Os asteriscos correspondem ao conhecimento produzido neste trabalho. Artigos: 1. Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; 2. Espinoza-Fuentes *et al.*, 1987; 3. Terra *et al.*, 1988; 4. Jordão & Terra, 1989; 5. Lemos & Terra, 1991b; 6. Lemos & Terra, 1991a; 7. Jordão & Terra, 1991; 8. Lemos & Terra, 1992a; Lemos & Terra, 1992b; 10. Lemos *et al.*, 1993; 11. Jordão *et al.*, 1996; 12. Cançado *et al.*, 2007; 13. Padilha *et al.*, 2009; 14. Tamaki *et al.*, não publicado.

A figura 28 resume como este trabalho contribuiu para o conhecimento da digestão de proteínas em *Musca domestica*. Podemos notar que os estudos de carboxipeptidase e aminopeptidase aqui realizados garantem a base molecular para as atividades enzimáticas descritas e caracterizadas em trabalhos anteriores. Com isso, a digestão intermediária e final de *Musca domestica* pode agora ser descrita com bases nos genes transcritos e nas sequências de aminoácidos que formam as

enzimas. A descoberta da sequência que transcreve uma metaloproteinase, por sua vez, abre caminhos para a descrição e caracterização de sua atividade proteolítica nos tecidos digestivos da larva de *Musca domestica*.

5.3.2. Carboidrases

A hidrólise de amido se dá inicialmente pela atuação de uma amilase na porção anterior de intestino médio (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987) e os oligômeros gerados podem ser hidrolisados pela alfa-glicosidase de membrana (figura 24C). Contudo, a maior atividade de amilase é verificada na porção posterior do intestino médio (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). A digestão do amido na porção posterior do intestino médio se inicia pela ação de uma amilase dentro do espaço endoperitrófico. Os oligômeros gerados podem sofrer outros passos de hidrólise ainda no espaço endoperitrófico pela ação de uma alfa-glicosidase. Os oligômeros difundem então para o espaço ectoperitrófico sofrendo hidrólise por duas alfa-glicosidases, uma presa ao glicocálix e outra presa à membrana microvilar (Jordão & Terra, 1991).

Como visto, Jordão e Terra (1991) identificaram a presença de três atividades de alfa-glicosidase na porção posterior do intestino médio: uma alfa-glicosidase solúvel de baixo peso molecular, outra, também solúvel, tipicamente associada ao glicocálix, de alto peso molecular e por último uma ligada à membrana. A alfa-glicosidase solúvel de baixo peso molecular e aquela ligada à membrana preferem hidrolisar substratos maiores que maltotetraose diferindo da alfa-glicosidase associada ao glicocálix que prefere hidrolisar substratos menores como maltose, maltotriose e maltotetraose. O conjunto de gráficos (figura 21A, B e C) explicita os dados da literatura, dando a eles uma localização mais precisa: a região proximal da porção posterior do intestino médio. As evidências indicam que a sequência de maltase (alfa-glicosidase) codifica uma das duas enzimas solúveis, não havendo qualquer indício de que esteja ligada à membrana. A sequência completa que codifica a alfa-glicosidase pode ser utilizada na expressão heteróloga e, no caso de conseguir a enzima recombinante com atividade, seria possível comparar os parâmetros cinéticos com os apresentados por Jordão & Terra (1991). A figura 29 representa a contribuição deste trabalho para o conhecimento da digestão de carboidratos em *Musca domestica*.

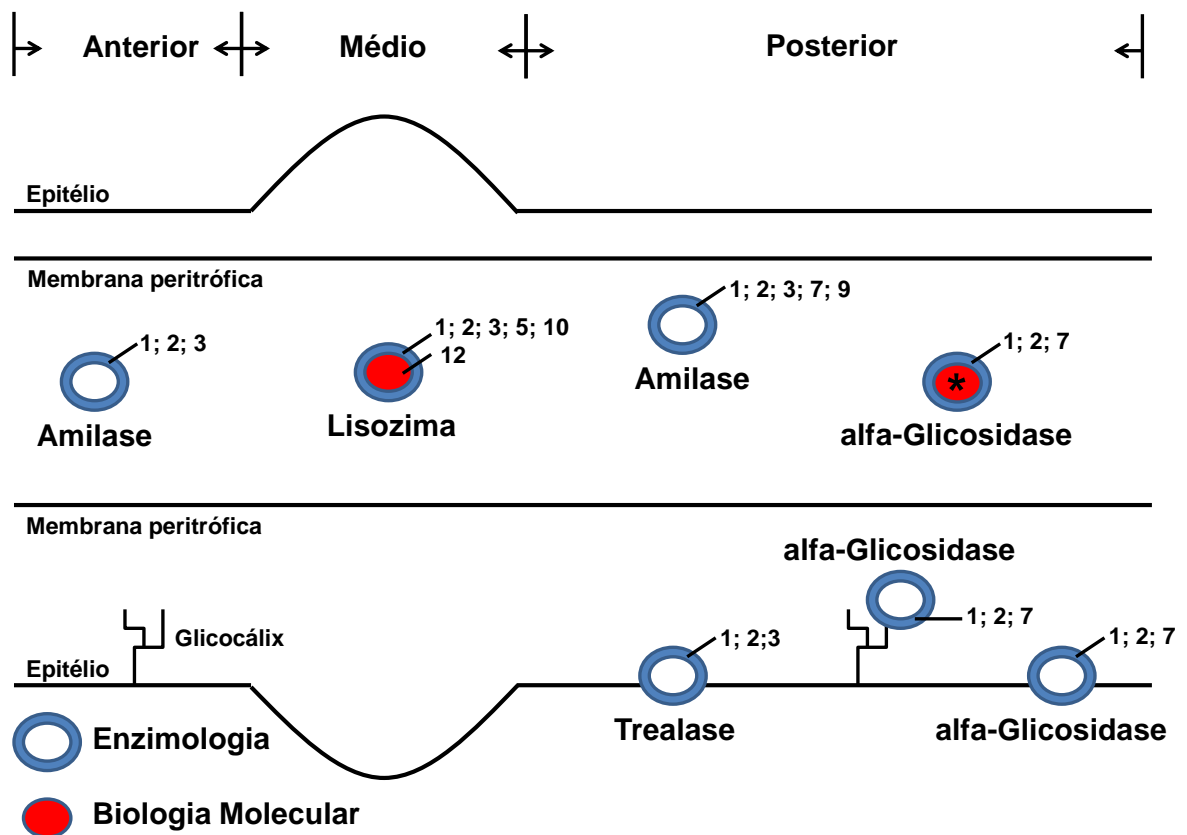


Figura 29. Carboidrases de *Musca domestica*. O esquema representa o intestino médio de *Musca domestica*, as carboidrases com a posição na qual atuam (legenda no alto da figura) e situação do conhecimento sobre elas (legenda na parte inferior a esquerda da figura). Os asteriscos correspondem ao conhecimento produzido neste trabalho. Artigos: 1. Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; 2. Espinoza-Fuentes *et al.*, 1987; 3. Terra *et al.*, 1988; 4. Jordão & Terra, 1989; 5. Lemos & Terra, 1991b; 6. Lemos & Terra, 1991a; 7. Jordão & Terra, 1991; 8. Lemos & Terra, 1992a; Lemos & Terra, 1992b; 10. Lemos *et al.*, 1993; 11. Jordão *et al.*, 1996; 12. Caçado *et al.*, 2007; 13. Padilha *et al.*, 2009; 14. Tamaki *et al.*, não publicado.

6. CONCLUSÕES

Os indícios de que absorção de glicose no intestino de *Musca domestica* se dê por transportadores do tipo SGLT, com a possível participação de facilitadores do tipo GLUT, permitem estabelecer um foco para futuros estudos.

A descrição de sequências relacionadas ao tamponamento intestinal permitiu ampliar a discussão sobre tal processo. Ao detalhar os sítios de expressão da subunidade a da V-ATPase, do canal de cloreto e do transportador de amônia foi possível testar o modelo de tamponamento proposto e indicar a participação de outras moléculas no processo.

As atividades de carboxipeptidase, maltase e aminopeptidase descritas na literatura foram testadas gerando sequências candidatas a codificarem as enzimas de digestão terminal. Essa análise permitiu também elucidar a localização dos sítios de expressão e, portanto, as zonas de secreção de enzimas.

De maneira geral, este estudo contribuiu para a compreensão de diversos aspectos da digestão de *Musca domestica*, elucidando questões da particular fisiologia digestiva desse inseto e trazendo ainda outras perguntas que serão fundamentais nas próximas abordagens experimentais.

7. BIBLIOGRAFIA

- Araújo, J.R. & Martel, F., 2009. Regulação da absorção intestinal de glicose. *ArquiMed*, 23, 35-43.
- Allan, A.K., Du, J., Davies, S.A., Dow, J.A.T., 2005. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. *Physiol. Genomics*, 22, 128-138.
- Beyenbach, K.W. & Wieczorec, H., 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 577-589.
- Bifano, T.D., Alegria, T.G.P., Terra, W.R., 2010. Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior midgut. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology*, 157, 1-9.
- Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R., Gluck, S., 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245, 855-857.
- Boudko, D.Y., Moroz, L.L., Harvey, W.R., Linser, P.J., 2001. Alkalinization by chloride/ bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98, 15354-15359.
- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., de Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B., 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 292, 2284-2291.
- Cançado, F.C; Valério, A.A.; Marana, S.R.; Barbosa, J.A.R.G, 2007. The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. *Journal of Structural Biology*, 160, 83-62.
- Chen, M.E., Holmes, S.P., Pientratonio, P.V., 2006. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 62, 55-72.
- Corena, M.P., Fiedler, M.M., VanEkeris, L., Tu, C., Silverman, D.N., Linser, P.J., 2004. Alkalinization of larval mosquito midgut and the role of carbonic

- anhydrase in different species of mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 207-225.
- Crailsheim, K., 1988. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 34, 839-845.
- Crane, R.K., Miller, D., Bihler, I., 1961. The restrictions on possible mechanisms of intestinal active transport and metabolism. In: Kleizeller, A., Kotyk, A. (Eds.), *Membrane Transport and Metabolism*. Academic Press, London, 439-449.
- Creek, K.E. & Sly, W.S., 1984. The role of phosphamannosyl receptor in the transport of acid hydrolases to lysosomes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, ed. J Dingle, New York, Esvier, 63-82.
- Dahlqvist, A., 1968. Assay of intestinal dissacaridases. *Analyt Biochem.* 22, 99-107.
- Davies, S.A., Goodwin, S.F., Kelly, D.C., Wang, Z., Sözen, A., Kaiser, K., Dow, J.A.T., 1996. Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 30677-30684.
- Dimitriadis, V.K., 1991. Fine structure of the midgut of adult *Drosophila auraria* and its relationship to the sites of acidophilic secretion. *J. Insect Physiol.*, 37, 167-177.
- Dubreuil, R.R., 2004. Copper cells and stomach secretion in the *Drosophila* midgut. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 745-752.
- Dubreuil, R.R., Frankel, J., Wang, P., Howrylak, J., 1998. Mutations of *alfa* spectrin and *labial* block cuprophilic cell differentiation and acid secretion in the middle midgut of *Drosophila* larvae. *Developmental Biology*. 194. 1-11.
- Escher, S.A., Rasmuson-Lestander, A^o., 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*, 130, 95-103.
- Espinoza-Fuentes, F.P. & Terra, W.R., 1987. Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 17, 809-817.
- Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1987. Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.* 17, 819-827.
- Giordana B., Milani A., Grimaldi A., Farneti R., Casartelli M., Ambrosecchio M.R., Digilio M.C., Leonardi M.G., De Eguilear M., Pennacchio F., 2003. Absorption of

- sugars and amino acids by the epidermis of *Aphidius ervi* larvae. J. Insect Physiol., 49, 1115-1124.
- Gluck, S., Cannon, C., Al-Awqati, Q., 1982. Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H⁺ pumps into the luminal membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4327-4331.
- Grimaldi, D. & Engel, M.S., 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press, New York.
- Harvey, W.R., Cioffi, M., Down, J.A.T., 1983. Potassium ion transport ATPase in insect epithelia, J. Exp. Biol., 106, 91-117.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M., 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. Nature, 330, 379-381.
- Hoppler, S. & Blens, M., 1994. Specification of a single cell type by a *Drosophila* homeotic gene. Cell., 76, 689-702.
- Hummel, C.S., Lu, C., Loo, D.D.F., Hirayama, B.A., Voss, A.A., Wright, E.M., 2011. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporter SGLT1 and SGLT2. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 300, 14-21.
- Jordão, B.P. & Terra W.R., 1991. Regional distribution and substrate specificity of digestive enzymes involved in terminal digestion in *Musca domestica* hind-midguts. Arch. Insect Biochem. Physiol., 17, 157-168.
- Jordão, B.P. & Terra, W.R., 1989. Distribution, properties, and functions of midgut carboxypeptidases and dipeptidases from *Musca domestica* larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol., 11, 231-244.
- Jordão, B.P., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Lehane, M.J., Ferreira, C., 1996. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. Insect Biochem. Molec. Biol., 26, 337-346.
- Kellett G.L., 2001. The facilitate component of intestinal glucose absorption. J. Physiol., 531, 585-595.
- Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., Mace, O.J., Leturque, A., 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. Annu. Rev. Nutr., 28, 35-54.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Law, J. H., Ribeiro, J.M., Wells, M. A., 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. Annu Rev Biochem., 61,87-111.

- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R., 1991a. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem.*, 21, 457-465.
- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R., 1992a. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22, 613-619.
- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R., 1992b. A high yield preparation of *Musca domestica* larval midgut microvilli and the subcellular distribution of amylase and trypsin. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22, 433-438.
- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R., 1991b. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100, 265-268.
- Marini, A., Urrestarazu, A., Beauwens, R., Andre, R., 1997. The Rh (Rhesus) blood group polypeptides are related to NH_4^+ transporter. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 460-461.
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., Dimroth, P., 2005. Structure of the rotor ring of F-type Na^+ -ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, 308, 659-662.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2005. Structure of the rotor of the V-type Na^+ -ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science*, 308, 654-659.
- Murata, Y., Sun-Wada, G.H., Yoshimizu, T., Yamamoto, A., Wada, Y., Futai, M., 2002. Differential localization of the vacuolar H^+ pump with G subunit isoforms (G1 e G2) in mouse neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 36296-36303.
- Nishi, T. & Forgacs, M., 2000. Molecular cloning and expression of three 100-kDa a subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 6824-6830.
- Padilha, M.H.P, Pimentel, A.C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinase of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39, 782-791.
- Pascual, I., Berrjo'n, A., Lostao, .M.P., Barber, A., 2006. Transporte f D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 143, 20-26.
- Pedersen, P.L. & Carafolli, E., 1987. Ion motive ATPase. II. Energy coupling and work out put. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 186-189.

- Price, D.R.G., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A., 2007. Functional expression and characterization of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, 11, 1138-1148.
- Rajendran, V.M., Sangan, P., Geibel, J., Binder, H.J., Ouabain-sensitive H,K-ATPase functions as Na,K-ATPase in apical membranes of rat distal colon. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 13035-13040.
- Ramos C. C. R., Abreu P.A.E., Nascimento A.L.T.O. and Ho P.L., 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 37, 1103-1109.
- Scheepers, A., Joost, H.G., Schurmann, A, 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J. Parenter Enteral Nutr.*, 28, 364-371.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A., Dicke, M., 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Stevens, T.H. & Forgac, M., 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, 779-808.
- Weihrauch, D., 2006. Active ammonia absorption in the midgut of Tobacco hornworm *Manduca sexta* L.: Transport studies and mRNA expression analysis of a Rhesus-like ammonia transporter. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36, 808-821.
- Wieczorek, H., Beyenbach, K.W., Huss, M., Vitavska, O., 2009. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 1611-1619.
- Wright, E.M., 2001. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.*, 280, 10-18.
- Wright, E.M. & Turk, E., 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.*, 447, 510-518.
- Worrel, R.T., Merck, L., Matthews, J.B., 2008. Ammonium transport in the colonic crypt cell line, T84: role for Rhesus glycoprotein and NKCC1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 294, 429-440.
- Wu, Y., Zheng, X., Zhang, M., He, A., Li, Z., Zhan, X., 2010. Cloning and functional expression of Rh50-like glycoprotein, a putative ammonia channel, in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1599-1610.
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1988a. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion

- secretion in relation to the organization of digestion. *J. Insect Physiol.*, 34, 463-472.
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ferreira, C., 1988b. Midgut amylase, lysozyme, aminopeptidase, and trehalase from larvae and adults of *Musca domestica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 9, 283-297.
- Terra, W.R. & Regel, R., 1995. pH buffering in *Musca domestica* midguts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112A, 559-564.
- Terra, W. R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21, 675-734.
- Terra, W. R., 2001. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47, 47-61.
- Terra, W.R. & Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B, 1-62.
- Terra, W.R. & Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4, Oxford: Elsevier, 171-224.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 35, 181-200.
- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C., 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 78, 255-269.
- Treherne, J.E., 1957. Glucose absorption in cockroach. *J. Exp. Biol.*, 34, 478-485.
- Treherne, J.E., 1958. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.*, 35, 297-306.
- Zidi-Yahiaoui, N., Mouro-Chanteloup, I., D'Ambrosio, A., Lopez, C., Gane, P., Le Van Kim, C., Cartron, J., Colin, Y., Ripoche, P., 2005. Human Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated ammonium transport in recombinant kidney cells. *Biochem. J.*, 391, 33-40.

8. APÊNDICES

Apêndice 1. *Primers* utilizados em experimentos de RT-PCR.

Nome da Sequência	Nome do Primer	Sequência de Primer
Proteína ribossomal	ContProtRibFw	tcagtgggcaggtagactt
	ContProtRibRv	ccttggtatcagggttatc
SGLT	FW_MD_sglT_V_583	TGGTCCGTGGTCATTGGTGGC
	RV_MD_sglT_V_583	CGCAGGTGACAGCCGACAGG
GLUT(1)	FW_tGlic_MD_III_61	GGGCAGTGGCCTGTATGCCG
	RV_tGlic_MD_III_61	TGCAGCAGCCCCACAATGGG
GLUT(2)	FW_tGlic_MD_III_69	GCACTGCCGTTGAGAGGCGT
	RV_tGlic_MD_III_69	TGGGGTCTCCTTAGGCCGGCC
GLUT(3)	FW_tGlic_MD_III_89	CTTGGGTTCGGCTCGGCCATG
	RV_tGlic_MD_III_89	ACGACGTGTCAGGGCACTGC
GLUT(4)	FW_tGlic_MD_III_168	GCCGCCGTCGGTTCGATGTG
	RV_tGlic_MD_III_168	AGGCCCATGTGGCGTCGTAT
GLUT(5)	FW_tGlic_MD_III_249	CGCGTGCGTGAGGACTGTGT
	RV_tGlic_MD_III_249	CGCTGCCACGCACTTAGCCT
GLUT(6)	FW_tGlic_MD_IV_1	GGCCGCAGTATCCATGGGCTG
	RV_tGlic_MD_IV_1	CACCGATGGCAAGGGCCCAA
GLUT(7)	FW_tGlic_MD_IV_222	CACACTGTTGGCGGCACGGT
	RV_tGlic_MD_IV_222	AAGGCCAACAGGGCACTGCG
Subunidade G da V-ATPase	MdVatpaseG_Nt	cgcgatccatgactagccaaacc
	MdVatpaseG_Ct	tggttctgcagttactcttggtg
Subunidade F da V-ATPase	MdVatpaseF_Nt	cgcgatccatggcttgcattca
	MdVatpaseF_Ct	ccggaattcttaacgaaccaatc
Subunidade a(A1) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_129_II_FW	TACGCCCGGTTGTGCTCCCT
	MD_VATPsub_a_129_II_RV	ATCGTGTCCACCATGGCCGC
Subunidade a(A2) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_130_II_FW	CCAACAGCAGAGGGGCCAGC
	MD_VATPsub_a_130_II_RV	GCCACGGGCCAAAGCATTGC
Subunidade a(A3) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_343_III_FW	GCAGGTGGCCGGAGCCAATA
	MD_VATPsub_a_343_III_RV	CCAGCACCATGGGCAGCTGG
Subunidade a(B1) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_36_III_FW	CAGCTCCCACACCGAGCGTG
	MD_VATPsub_a_36_III_RV	AGCCGTGACCCAAATCGCCG
Subunidade a(B2) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_432_IV_FW	TTGTGGCCGGTGTCTTGGC
	MD_VATPsub_a_432_IV_RV	GCAAATCGCGTTGGGCACCC
Subunidade a(C) da V-ATPase	MD_VATPsub_a_356_V_FW	AGCGGCCTATGCCTGTGTCTCA
	MD_VATPsub_a_356_V_RV	TGGGCTGGGGTGTCTTCTGGA
Canal de Cloreto	FW_MD_CI_Channel	TCGAGGCAACTCATCCGCCAA
	RV_MD_CI_Channel	CGGCCGGACACGATTGAGTG
Transportador de Amônia	MdTransAmo_Rv	gcatcgtttcgtaatgtt
	MdTransAmo_Fw	tgcaggcaaatatgaaggacc

Aminopeptidase N(1)	FW_MD_amino_104_105	ATGTTGGGCTCGTGGTCCGG
	RV_MD_amino_104_105	CCATTGGCCGTGGACCAGGG
Aminopeptidase N(2)	FW_MD_amino_171	CCCCGCCGATTTGTCTCGCA
	RV_MD_amino_171	ACACTGGTGGCGGTGGGAGT
Aminopeptidase P	FW_MD_amino_24	AGTGTGGCCAGCTGGTTGGC
	RV_MD_amino_24	ACGGCCCAACTCCTCCCCAA
Dipeptidase	MdDipep_Fw	accaagtgccggctgccttc
	MdDipep_Rv	ctcaccagcactggcaa
Maltase	MdMalt_Fw	tcccgctcgtacccccttc
	MdMalt_Rv	ggtaaccggccaggaacgc
Carboxipeptidase	MdCarboxi_Fw	attgctccgccactgccac
	MdCarboxi_Rv	acgggtcttgcgccacatgc
Metaloproteinase	MdMetProt_Fw	tggattgctccgccactgc
	MdMetProt_Rv	tgcgatcggtggtggtg

Apêndice 2. Anotação e Classificação das Sequências. Tabelas com as anotações atribuídas aos diferentes *contigs* e *singlets* originados da análise do sequenciamento ao acaso. A divisão foi feita de acordo com a função da proteína. Cada sequência única é individualizada por um número “*contign*” e está representado à esquerda. No centro da tabela esta a anotação atribuída a sequência única. À direita da tabela é representada a quantidade de *reads* que formam a sequência única.

Transporte

contig18	V-ATPase subunit F	2
contig34	V-ATPase M9	3
contig184	V-ATPase subunit G	1

Hidrolases

contig10	Lysozyme	1
contig11	Lysozyme	1
contig12	Lysozyme	2
contig13	Lysozyme	5
contig14	Lysozyme	11
contig39	Trypsin	1
contig40	Trypsin	1

contig41	Trypsin	2
contig45	Trypsin	2
contig46	Chymotrypsinogen	2
contig47	Chymotrypsinogen	3
contig72	aspartic protease	1
contig105	unknown (Diptera conserved) protein/larval chymotrypsin	1
contig128	Ribonuclease	1
contig193	aspartic protease	1
contig206	carboxypeptidase A	2
contig207	carboxypeptidase A	2

metabolismo energético

contig2	NADH dehydrogenase subunit 5	2
contig20	acyl-CoA binding protein	4
contig21	cytochrome c oxidase subunit I	14
contig25	NADH dehydrogenase subunit 5	2
contig26	NADH dehydrogenase subunit 2	1
contig35	ubiquinol-cytochrome c reductase complex protein	1
contig36	cytochrome c oxidase polypeptide Vb	3
contig43	cytochrome b	4
contig49	cytochrome c oxidase subunit III	1
contig58	cytochrome c	1
contig75	acyl-CoA-binding protein	7
contig80	cytochrome oxidase subunit II	10
contig83	NADH dehydrogenase	1
contig87	ATP synthase F0 subunit 6	9

contig99	H ⁺ transporting ATP synthase subunit e	1
contig101	NADH dehydrogenase subunit 5	3
contig124	NADH dehydrogenase subunit 3	2
contig134	ATP synthase c-subunit	1
contig149	NADH dehydrogenase	1
contig152	cytochrome c oxidase subunit VIIC	1
contig155	adenylate kinase	1
contig159	NADH dehydrogenase subunit 2	1
contig160	cytochrome b	1
contig164	NADH dehydrogenase	1
contig168	cytochrome c1	1
contig179	cytochrome b	1
contig181	ATP synthase epsilon chain	2
contig183	NADH dehydrogenase subunit 2	1
contig201	NADH dehydrogenase subunit 4	1

Proteínas Ribossomais

contig8	40S ribosomal protein S29	1
contig9	60S ribosomal protein L13a	3
contig29	ribosomal protein L41	3
contig42	60S ribosomal protein L32	1
contig52	ribosomal protein L38	2
contig54	ribosomal protein L37A	1
contig70	ribosomal protein L27A	2
contig73	ribosomal protein L12	1
contig76	ribosomal protein S28	7
contig81	ribosomal protein L37	10

contig94	60S acidic ribosomal protein P1	3
contig98	60S ribosomal protein L28	1
contig108	ubiquitin/ribosomal protein S30e fusion protein	2
contig109	40S ribosomal protein S2	1
contig114	60S ribosomal protein L22	1
contig119	ribosomal protein S3a	1
contig135	ubiquitin/ribosomal protein S27Ae fusion protein	1
contig143	ribosomal protein S15e	1
contig150	ribosomal protein S13	1
contig162	mitochondrial ribosomal protein S36	1
contig166	40S ribosomal protein S11	1
contig169	60S acidic ribosomal protein P2	1
contig180	40S ribosomal protein S6	2
contig211	60s ribosomal protein L24	1

Fatores de Transcrição / Núcleo

contig82	histone H4	1
contig85	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	1
contig89	RAS GTP-binding protein	3
contig100	mediator complex subunit 9	1
contig147	enhancer of split m1 protein	2
contig153	nucleoporin P54	1
contig161	Ras-related protein	1
contig189	C6 transcription factor	1
contig196	eukaryotic translation initiation factor 4A	1

Estruturais

contig15	actin depolymerizing factor	3
contig31	Mucin	1
contig90	myosin regulatory light chain	1
contig107	microfibrillar-associated protein	1
contig131	actin related protein 2/3 complex	1
contig174	microtubule-binding protein	2
contig177	Mucin	1
contig178	Profilin	1

Transdução de Sinal

contig84	Tetraspanin	2
contig106	gaba receptor protein	4
contig110	Tetraspanin	1
contig156	casein kinase	1

estresse oxidativo

contig51	Metallothionein	2
contig62	Metallothionein	1
contig63	Metallothionein	1
contig64	Metallothionein	7
contig65	Metallothionein	2
contig142	Metallothionein	2

Apêndice 3. Subunidades da V-ATPase encontradas no pirosequenciamento. O conjunto das subunidades encontradas corresponde a V-ATPase completa. O gene de *Drosophila melanogaster* que codifica a proteína com de maior identidade com a proteína de *Musca domestica* está representado na última coluna.

Anotação <i>M. domestica</i>	Domínio	Subunidade	Completa	gene <i>D. melanogaster</i>
MD_V-ATPase_subA	V1	A	+	<i>vha68-2</i>
MD_V-ATPase_subB	V1	B	+	<i>vha55</i>
MD_V-ATPase_subC	V1	C	+	<i>vha44</i>
MD_V-ATPase_subD	V1	D	+	<i>vha36</i>
MD_V-ATPase_subE	V1	E	+	<i>vha26</i>
MD_V-ATPase_subF	V1	F	+	<i>vha14</i>
MD_V-ATPase_subG	V1	G	+	<i>vha13</i>
MD_V-ATPase_subH	V1	H	+	<i>vhaSFD</i>
MD_V-ATPase_suba(A1)	V0	a		<i>vha100-2</i>
MD_V-ATPase_suba(A2)	V0	a	+	<i>vha100-2</i>
MD_V-ATPase_suba(A3)	V0	a		<i>vha100-1</i>
MD_V-ATPase_suba(B1)	V0	a		<i>vha100-2</i>
MD_V-ATPase_suba(B2)	V0	a		<i>vha100-2</i>
MD_V-ATPase_suba(C)	V0	a		<i>vha100-1</i>
MD_V-ATPase_subc'	V0	c'	+	<i>vha16-3</i>
MD_V-ATPase_subc''	V0	c''	+	<i>vhaPPA1-1</i>
MD_V-ATPase_sube	V0	e	+	<i>vhaM9.7-2</i>
MD_V-ATPase_subd	V0	d	+	<i>vhaC39</i>