

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOQUÍMICA)

THAÍS DUARTE BIFANO
TESE DE DOUTORADO

“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS*
***PERUVIANUS* (HEMIPTERA)”**

São Paulo
28/08/2008

THAÍS DUARTE BIFANO

**“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS*
PERUVIANUS (HEMIPTERA)”**

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo
2008

THAÍS DUARTE BIFANO

**“FISIOLOGIA MOLECULAR INTESTINAL DE *DYSDERCUS PERUVIANUS*
(HEMIPTERA)”**

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

***Aos meus pais Fátima e Adilson ao meu irmão
Gustavo e a amiga Érica por todo amor e apoio.***

AGRADECIMENTOS

Antes mesmo de entrar no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Química da USP, o professor Walter Ribeiro Terra me recebeu e me apoiou na decisão de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Isto nunca será esquecido, muito menos em vão. Toda a sua dedicação ao ensino e a pesquisa me faz cada vez mais querer ser um pouco do que ele é para os seus alunos e para o meio acadêmico. Minha gratidão é eterna e verdadeira! Da mesma forma, fui acolhida pela professora Clélia Ferreira Terra, que além das muitas dicas e idéias para o meu projeto, melhorando e aperfeiçoando as minhas idéias e técnicas, sempre se fez muito presente no meu enriquecimento cultural. Duas pessoas muito especiais que serão para sempre lembradas com muito carinho.

Minha eterna gratidão àquele que foi o meu primeiro e eterno mentor, professor Carlos Peres Silva, presente sempre na minha vida, como um grande amigo e como parceiro de discussões e trocas de idéias.

Agradeço aos meus familiares e principalmente a minha mãe Maria de Fátima Duarte Cataldi Bifano ao meu pai Adilson Cataldi Bifano e ao meu irmão Gustavo Cataldi Bifano que mesmo sofrendo com a minha constante ausência física, sempre me incentivaram e compreenderam a importância desta jornada solitária.

Companheira para todos os momentos e situações, amiga para vida toda, Érica Moreira de Oliveira, define tudo que eu sou e que eu quero ainda ser um dia. Pessoa correta, justa e acima de tudo lutadora e vencedora, te amo!

Minha cachorra Mel, mesmo não sendo uma pessoa de verdade para muitos, pra mim você é e significa paz, tranquilidade, amor e cumplicidade nos momentos mais difíceis. Não sei o que seria do meu doutorado sem o seu apoio diário e incondicional.

A Ana Gomez, John e Daniel, grandes amigos, vizinhos e companheiros meu agradecimento por estar sempre aprendendo a lidar com diferenças que só enriquecem a nossa vida.

A Patrícia Pessoa e ao Chico Schoenmaker, agradeço pela amizade e apoio.

Aos companheiros de instituto que se fizeram presente no decorrer do meu doutorado: Fabiane Cançado, pelas conversas sérias e outras descontraídas; Luci

Deise Navarro, sempre me recebendo e me ajudando com os sequenciamentos de DNA; Milton Nishiyama Junior, me salvando da selva que foi por algum tempo pra mim, a bioinformática; além de todos dos laboratórios de Regulação da Expressão Gênica em Microorganismos, Bioquímica Molecular de Microorganismos, Bases Moleculares das Propriedades Catalíticas das Enzimas e Laboratório de Transdução de Sinal.

As Técnicas do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Luiza Nakabayashi, M^a Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso, a ajuda e dedicação de vocês serão pra sempre lembrada com muito carinho! A aluna Daniela Beton, e Dra. Maria Cícera Pereira da Silva, agradeço pela constante ajuda na biologia molecular, tanto na confecção de protocolos quanto na discussão de resultados. A amiga, Nathália Ramalho, obrigada pela presença na minha vida. Aos colegas Marcelo Padilha, Lucas, Alexandra Drumont, Ivan Bragatto, Fábio Tamaki, Bruno Lira, Fábio Mendes, Pedro Galvão, André Pimentel, Flávia Bartolleti, Walciane da Silva, Dr. Fernando Genta, eu agradeço pela ajuda e pela paciência comigo!

Augusto Crivellari e Thiago Alegria, alunos dedicados que tiveram grande importância no meu crescimento profissional, agradeço por cada momento e cada discussão de resultados e desenho de protocolo.

A Dra. Adriana Rios Lopes, primeira pessoa que me ajudou a dar os passos iniciais no Laboratório de Bioquímica de Insetos. Sua ajuda foi essencial para o meu projeto. Minha admiração e reconhecimento eternos.

As agências que financiaram o meu projeto, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, e Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, sou grata pelo apoio financeiro e por acreditarem na minha competência.

RESUMO

(Bifano, T.D.), Fisiologia Molecular Intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). 2008. 173 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A partir da identificação de catepsinas L em ensaios *in vitro* e em zimogramas partimos para purificação desta enzima no inseto. A região V2 foi selecionada como fonte de obtenção da cisteína proteinase já que dentre os três ventrículos o segundo apresentou maior atividade específica. Após diversas tentativas de isolar esta proteinase, foi estabelecida uma marcha de purificação que envolvia em todas as etapas a participação de metil metanosulfonato (MMTS), o que inativa a proteinase evitando assim autólise ao longo do processo de purificação. A marcha consistiu de três passos cromatográficos (troca-iônica, filtração em gel e afinidade, nesta ordem) onde foi observada a presença de duas cisteína proteinases, cada uma apresentando respectivamente as seguintes massas moleculares 32 e 45 kDa (SDS-PAGE). As duas cisteína proteinases possuem o mesmo pH ótimo igual a 6,3. Além disso, estas enzimas foram termicamente inativadas a 40 °C segundo uma cinética de primeira ordem aparente, sugerindo a existência de apenas uma espécie molecular de cada enzima na preparação com meia vida de 5 minutos para cis 1 e 4,8 minutos para cis 2. Foi determinada a constante de dissociação entre enzima-inibidor, onde foi observado os valores de 17,3 nM para cis 1 e 7,11 nM para cis 2 através da titulação por E-64. A eficiência de catálise cis 1 e cis 2 é maior para o substrato sintético Z-FR-MCA do que para Z-RR-MCA, indicando que tratava-se de catepsinas L.

Com o intuito de descrever os mecanismos moleculares por trás dos fenômenos fisiológicos no intestino médio do Hemiptera *Dysdercus peruvianus* foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA deste tecido. Utilizamos ESTs provenientes desta biblioteca com o objetivo de identificar genes transcritos relacionados com proteínas de transporte de glicose além de enzimas digestivas. Após o processamento das leituras, surgiram 1053 ESTs úteis. Montando estes ESTs por alinhamento de bases, foram produzidos 62 contíguos e 841 singletos, o que totaliza 903 seqüências únicas. Entre as seqüências homólogas encontradas as mais relevantes para o nosso estudo foram: β -glicosidase (marcadora de membranas microvilares), α -glicosidase (marcadora de membranas

perimicrovilares), aminopeptidase (espaço perimicrovilar), catepsina L (conteúdo de vesículas secretoras) e proteína transportadora de açúcar do tipo GLUT. Estas seqüências encontradas tiveram a sua transcrição específica (ou preferencial) averiguada por RT-PCR semiquantitativo nos diferentes tecidos do inseto estudado (intestino médio, túbulo de Malpighi, corpo gorduroso, glândula salivar, ventrículo 1, ventrículo 2 e ventrículo 3 do intestino médio).

O transporte de glicose e água *in vivo* foi estudado. Para isso, os insetos foram alimentados com uma solução contendo glicose e corante não absorvível seguido de dissecação e análise do conteúdo luminal. O transporte de água e glicose foi inibido por floretina 0,2 mM (inibidor do uniportador GLUT) e por florizina 0,1 mM (inibidor do simportador SGLT) e ativado por K_2SO_4 50 mM. Isto sugere a presença do transportador do tipo uniportador (GLUT), e do simportador K^+ -glicose (SGLT), ambos co-transportando água. O transcriptoma revelou proteína homóloga a transportador GLUT cuja seqüência está parcialmente completa e foi analisada com ferramentas de bioinformática.

Palavras-chave: *Dysercus peruvianus*, Hemiptera, transcriptoma, catepsina L, GLUT, SGLT.

ABSTRACT

(Bifano, T.D.), Intestinal molecular physiology of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). 2008. 173 pages. PhD Thesis – Graduate Programme in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

After identification of cathepsins L *in vitro* assays and in zymograms we began to purify this enzyme in insect midgut. The region V2 was selected as a source of material for purifying a cysteine proteinase because it contains most of the activity of that proteinase. After several attempts to purify this proteinase, an effective process was developed that avoid autolysis with methyl methanethiosulfonate (MMTS), a sulfhydryl-reactive and reversible sulfonating reagent for thiol-containing molecules. The purify process was made by three chromatographic steps (anion-exchange column, gel filtration column and affinity column in this order), where two cysteine proteinase were purified, cys 1 and cys 2 with 32 and 45 kDa (SDS-PAGE). The two cysteine proteinases have the same pH optimum of 6.3. Besides that, these enzymes were thermically inactivated following apparent first-order kinetics with a half-life of 5 min (cys1) and 4.8 min (cys2) at 40 °C. Both Cys are inhibited by E-64 with a K_D of 17.3 nM (Cys 1) and 7.11 nM (Cys2). Both Cys are more active on Z-FR-MCA than on Z-RR-MCA, suggesting they are cathepsins-L.

With purpose of describe the molecular mechanisms underlying physiological phenomena in midgut of the Hemiptera *Dysdercus peruvianus* a cDNA library was prepared from midgut mRNA. We used ESTs from this library to identify transcripts genes related with glucose transport proteins besides digestive enzymes. Analysis of 1053 high-quality expressed sequence tags (ESTs) yielded 903 unique sequences comprised of 62 contigs and 841 singlets. Among the homologous sequences found the following are more relevant to our aim: β -glucosidase (microvillar membrane marker), α -glucosidase (perimicrovillar membrane marker), aminopeptidase (perimicrovillar space marker), cathepsin L (vesicles content) and sugar transporter protein, GLUT. These sequences had its specific transcription (or preferential) verified by semi-quantitative RT-PCR on different insect tissues (malpighian tubules, salivary gland, fat body, midgut, midgut first ventriculus, second ventriculus and third ventriculus).

The glucose and water absorption across the first ventriculus of the midgut of the Hemiptera *Dysdercus peruvianus* were determined. The insects were fed with a

glucose-non-absorbable dye solution, followed by periodical dissection of insects and analysis of ventriculus contents. The transport of water and glucose can be inhibited by 0.2 mM phloretin (GLUT inhibitor) and by 0.1 mM phlorizin (SGLT inhibitor) and is activated by 50 mM K_2SO_4 . The results suggest that *D. peruvianus* has a transporter uniporter like (GLUT) and K^+ -glucose symporter like SGLT, both co-transporting water. The transcriptome showed a GLUT homologous protein which sequence is almost complete and was analyzed by bioinformatics tools.

Keywords: *Dysercus peruvianus*, Hemiptera, transcriptome, cathepsin L, GLUT, SGLT.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

