
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E FUNÇÕES DA
MEMBRANA PERITRÓFICA DOS INSETOS**

RENATA BOLOGNESI

TESE DE DOUTORADO
ÁREA: BIOQUÍMICA

Orientadora: Dra. Clélia Ferreira

**São Paulo
4 de março de 2005**

*Aos meus pais, Humberto e Izilda
e irmãos, Michaela e Betinho*

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

À Dra. Clélia Ferreira, pela amizade, exemplos de vida e orientação cuidadosa.

Ao Dr. Walter R. Terra, pela orientação e amizade.

Ao Dr. Karl J. Kramer do Departamento de Agricultura dos EUA e ao Dr. Subbaratnan Muthukrishnan, da Kansas State University, pela orientação e amizade durante o meu estágio no exterior.

Ao Dr. Alberto F. Ribeiro pela contribuição nos estudos de imunocitoquímica.

Aos amigos do laboratório: Dra. Adriana Rios Lopes, Dr. Alcides Batista Dias Jr., Alexandra Dumont, Dr. Alexandre Hamilton P. Ferreira, Érica Hotz Almeida, Érica Moreira de Oliveira, Fábio Kendi Tamaki, Dr. Fernando Ariel Genta, João Vasconcellos de Almeida, Lucas Blanes, Maria Cícera P. da Silva, Paloma Mieko Sato, Dr. Sandro Roberto Marana, Dr Plínio Tadeu Cristofolletti Jr., Tamara Rezende de Azevedo, Thaís Duarte Bifano pelas discussões e amizade.

Aos amigos do laboratório em Manhattan: Dr. Yassuyuki Arakane e Dave Hogenkamp, pela valiosa ajuda e amizade.

Às técnicas Luíza Nakabayashi, Maria Ivanilde Marcolino e Christiane Cardoso, pelo auxílio e amizade.

À FAPESP pelas bolsa concedida.

À CAPES, pelo financiamento do estágio no exterior.

Durante a elaboração dessa tese, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX e CNPq.

Resumo

A maior parte dos insetos possui uma estrutura anatômica em forma de filme (membrana peritrófica, MP) composta de quitina e proteínas (peritrofinas), que separa o alimento do epitélio do intestino médio. A MP protege o epitélio de microorganismos e da abrasão, e possui outras funções baseadas no fato de que a MP promove a compartimentalização de enzimas, que incluem: aumento da eficiência digestiva através da diminuição da taxa de excreção das enzimas e de outros mecanismos postulados que são testados nesta tese. A síntese das peritrofinas é mais conhecida do que a da quitina componente da MP, tornando desejável um esforço no detalhamento dessa última.

Foram realizadas a caracterização e expressão de genes de *S. frugiperda* que codificam uma peritrofina e enzimas responsáveis pela síntese e degradação de quitina (quitina sintases 1 (SfCHS1) e 2 (SfCHS2), e quitinase (SfCHI), respectivamente). As sequências dos cDNAs correspondentes foram determinadas através da amplificação de fragmentos de PCR que se sobrepõem. Os padrões de expressão dos genes envolvidos no metabolismo da quitina da MP foram analisados durante o desenvolvimento do inseto por RT-PCR. *SfCHS2* é expresso no intestino médio durante os estágios de alimentação da larva, enquanto que *SfCHI* é expresso durante as fases de pós-alimentação, pré-pupa, e pupa. Ambos os genes são predominantemente expressos na região anterior no intestino médio com um gradiente decrescente de expressão ao longo do tubo digestivo. A citolocalização da quitina revelou que o polissacarídeo está presente somente quando *SfCHS2* é expresso e não há quitina no intestino médio quando *SfCHI* é expresso. Esses resultados levaram a formulação da hipótese de que *SfCHS2* é responsável pela síntese da quitina da MP durante o estágio larval e *SfCHI* degrada a quitina da MP durante a muda larva-pupa, sugerindo padrões inversos de expressão desses genes.

Em *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* é possível prever o sítio de secreção das enzimas digestivas (ventrículo anterior, médio ou posterior) a partir da distribuição antero-posterior das enzimas no espaço endoperitrófico. Também foi possível mostrar, usando vários modelos experimentais, que a separação de compartimentos luminiais pela MP: a) impede a inibição de despolimerases por remover oligômeros do espaço endoperitrófico; b) evita a inibição de oligômero hidrolases restringindo-as ao espaço ectoperitrófico e impedindo que entrem em contato com o

alimento e c) anula a inibição de enzimas envolvidas na digestão terminal presentes na superfície do epitélio, impedindo que o alimento entre em contato com elas.

Summary

Most insects have a film-like anatomical structure (peritrophic membrane, PM) composed of chitin and proteins (peritrophins), which separates food from midgut tissue. It protects the epithelium against food abrasion and microorganisms and has other functions based on compartmentalization of enzymes, which include: increasing digestive efficiency by decreasing enzyme excretion and by other mechanisms that were tested in this thesis. The peritrophin synthesis is less known than PM chitin synthesis, which needs to be better understood.

The characterization and expression of *S. frugiperda* genes encoding a peritrophin and enzymes responsible for the synthesis and degradation of chitin, chitin synthases 1 (SfCHS1) and 2 (SfCHS2), and chitinase (SfCHI), respectively, were analysed. Sequences of corresponding cDNAs were determined by amplification of overlapping PCR fragments and the expression patterns of chitin metabolism genes were analyzed during insect development by RT-PCR. *SfCHS2* is expressed in the midgut during the feeding stages, whereas *SfCHI* is expressed during the wandering and pupal stages. Both genes are predominantly expressed in the anterior portion of the midgut with a decreasing gradient of transcript levels in the medial and posterior portions. Chitin staining revealed that the polysaccharide is present in the PM only when *SfCHS2* is expressed. There is little or no chitin in the midgut when *SfCHI* is expressed. These results support the hypothesis that *SfCHS2* is responsible for PM chitin synthesis during the larval stage and *SfCHI* for PM chitin degradation during larval-pupal molting, suggesting inverse patterns of expression of these genes.

The secretion site (anterior, middle or posterior midgut) of digestive enzymes can be predicted in *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* and *Musca domestica* based on enzyme activity distribution along the endoperitrophic space. We also have shown, using several experimental models, that the luminal compartment separation by PM: a) avoid the polymer hydrolases inhibition by removing oligomer from endoperitrophic space; b) decrease the oligomer hydrolases inhibition by restricting them to the ectoperitrophic space (by avoiding their contact with food); and c) block the inhibition of enzymes located at the cell surface involved in terminal digestion by avoiding their contact with food.

Abreviações utilizadas

- BSA**-albumina sérica bovina
- BLAST**-"Basic Local Alignment Search"
- CAPS**-(3[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)
- DEPC**-dietilpirocarbonato
- DNA**-ácido desoxiribonucléico
- DTT**-ditiotreitól
- EDTA**-etilenodiaminotetracetato de sódio
- FITC-CBD**-fenilisotiocianato-chitin binding domain
- IP**-intestino posterior
- IPTG**-isopropiltiol beta D galactopiranosídeo
- LB**-meio de cultura de Luria-Bertani
- LpNa**-L-leucina *p*-nitroanilida
- MP**-membrana peritrófica
- mRNA**-RNA mensageiro
- mU**-miliUnidades
- NZY**-meio de cultura com NZ-amina
- pb**-pares de bases
- PCR**-reação em cadeia da polimerase
- pfu**-unidades formadoras de placas
- pl**-ponto isoelétrico
- poli(A)+**-poliadenilação
- p/v**-peso/volume
- PVDF**-difluoreto de polivinilideno
- RMN**-ressonância magnética nuclear
- RNA**-ácido ribonucléico
- RNAi**-RNA interferente
- SDS**-Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE**-Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida em presença de SDS
- TBS**-tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4, contendo NaCl 0,15M.
- TBS-T**-BS acrescido de Tween 20, 0,05%
- Tris**-tris(hidroximetil)aminometano
- WGA**-aglutinina de gérmen de trigo.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações iniciais.....	1
1.2. O tubo digestivo dos insetos.....	2
1.3. Estrutura da membrana peritrófica.....	3
1.3.1. Proteínas da membrana peritrófica.....	5
1.3.2. Quitina.....	11
1.4. Enzimas envolvidas na síntese e degradação da quitina.....	14
1.4.1. Quitina sintase.....	14
1.4.2. Quitinase.....	18
1.5. Funções da MP.....	19
1.6. A MP como alvo para o controle de insetos.....	23
1.7. Objetivos deste trabalho.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Material.....	26
2.2. Animais.....	26
2.2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i>	26
2.2.2. <i>Tenebrio molitor</i>	27
2.2.3. <i>Musca domestica</i>	27
2.2.4. <i>Rhynchosciara americana</i>	27
2.3. Dissecção das larvas e obtenção das amostras.....	28
2.3.1. <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
2.3.2. <i>Tenebrio molitor</i>	31
2.3.3. <i>Musca domestica</i>	31
2.3.4. <i>Rhynchosciara americana</i>	36
2.4. Testes de funções da MP.....	38
2.4.1. Evitar a inibição das despolimerazes presentes no interior da MP de <i>S. frugiperda</i> por seus produtos.....	38
2.4.2. Impedir a inibição das enzimas do fluido ectoperitrófico de <i>R. americana</i> por material presente na MP.....	40
2.4.3. Impedir a inibição de enzimas presentes no epitélio ventricular de <i>S. frugiperda</i> por material presente no conteúdo da MP.....	41

2.4.4. Medidas de parâmetros relacionados à digestão em <i>S. frugiperda</i>	41
2.5. Ensaios enzimáticos.....	43
2.5.1. Amilase.....	43
2.5.2. Tripsina.....	43
2.5.3. Quimotripsina.....	44
2.5.4. β -glicosidase.....	45
2.5.5. Aminopeptidase.....	46
2.5.6. N-acetilglicosaminidase.....	46
2.5.7. Carboxipeptidase A.....	46
2.5.8. Dipeptidase.....	47
2.5.9. Maltase.....	47
2.6. Dosagem de proteína.....	47
2.7. Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular.....	48
2.8. Isolamento, clonagem e sequenciamento de um peritrofina de <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
2.8.1. Plaqueamento e varredura primária da biblioteca de cDNA de <i>S. frugiperda</i>	48
2.8.2. Imunoensaio das membranas de nitrocelulose.....	50
2.8.3. Varredura secundária do clone positivo.....	51
2.8.4. Purificação do plasmídeo e sequenciamento do CDNA correspondente à peritrofina de <i>S. frugiperda</i>	52
2.9. Expressão de um domínio da peritrofina de <i>S. frugiperda</i> em <i>E. coli</i>	55
2.10. Clonagem e sequenciamento dos cDNAs das quitina sintases 1 e 2 e quitinase.....	61
2.11. RT-PCR com múltiplos primers.....	66
2.12. Análise da expressão das quitina sintases 1 e 2 e quitinase ao longo do desenvolvimento.....	69
2.13. <i>Northern blotting</i>	70
2.14. Obtenção do DNA genômico.....	72
2.15. Expressão da quitinase e da região catalítica da quitina sintase de <i>S. frugiperda</i> em <i>E. coli</i>	73

2.16. Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	77
2.17. <i>Western blot</i> e imunoensaio.....	78
2.18. Confecção do RNA de dupla fita específico.....	80
2.19. Injeção do RNA de dupla fita para RNAi.....	80
2.20. Marcação da quitina com FITC-CBD.....	81
3. RESULTADOS.....	82
3.1. Enzimas envolvidas na síntese e degradação da quitina em <i>S. frugiperda</i>	82
3.1.1. Quitina sintase.....	82
3.1.1.1. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs das quitina sintases 1 e 2.....	82
3.1.1.2. Expressão do domínio catalítico da quitina sintase 2 em <i>E. coli</i>	90
3.1.1.3. <i>Knock-out</i> do gene da quitina sintase 2 de <i>Tenebrio molitor</i>	92
3.1.2. Quitinase.....	96
3.1.2.1. Clonagem e seqüenciamento do cDNA da quitinase do tubo digestivo de <i>S. frugiperda</i>	96
3.1.2.2. Expressão da quitinase em <i>E. coli</i>	104
3.1.3. Expressão do RNAm das quitina sintases 1 e 2 e da quitinase durante o desenvolvimento e ao longo do tubo digestivo.....	104
3.2. Caracterização de uma peritrofina presente na MP de <i>S. frugiperda</i>	115
3.2.1. Clonagem e sequenciamento.....	115
3.2.2. Expressão e purificação de um domínio ligante de quitina.....	116
3.3. Distribuição de diferentes enzimas ao longo do espaço endoperitrófico de alguns insetos.....	123
3.4. Papel da integridade da MP na economia de enzimas digestivas.....	131
3.5. Testes das funções da MP derivadas da compartimentação.....	133
3.5.1. Impedir a inibição das polimerases por remover oligômeros produzidos no espaço endoperitrófico.....	133

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:

