

**ALFA-GLUCOSIDASES E SUA ATIVIDADE DE FORMAÇÃO DE  
HEMOZOÍNA EM *Rhodnius prolixus* E OUTROS MODELOS**

**LÍGIA SOUZA FERREIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –

UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO-2015

# ALFA-GLUCOSIDASES E SUA ATIVIDADE DE FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA EM *Rhodnius prolixus* E OUTROS MODELOS

LÍGIA SOUZA FERREIRA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marílvia Dansa de Alencar

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos - LQFPP, no Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO– 2015

# **ALFA-GLUCOSIDASES E SUA ATIVIDADE DE FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA EM *Rhodnius prolixus* E OUTROS MODELOS**

LÍGIA SOUZA FERREIRA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta – FIOCRUZ/RJ

---

Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes – IBqM / Campus Macaé / UFRJ

---

Dr<sup>a</sup> Beatriz da Silva Ferreira - CEDERJ / UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marílvia Dansa de Alencar – LQFPP / CBB / UENF  
(Orientadora)

Dedico aos meus filhos Gabriel e Heitor,  
meus amores, minha vida.

## *Agradecimentos*

Não foi fácil chegar até aqui... e em meio a tanto trabalho, dedicação, tropeço: viagens, cansaço, saudade de casa, aperto no peito em ficar longe do meu filho, incertezas, atrasos, aceite ou não dos artigos... consegui finalizar esse trabalho, fim de um ciclo acadêmico marcado pela presença de tantos que me acompanharam até aqui.

E eu não poderia deixar de agradecer a todas pessoas que foram peças chaves para a realização desse trabalho:

Primeiramente a minha orientadora Marilvia Dansa que com tanto carinho me acolheu em seu laboratório, obrigada pelos ensinamentos, pela linha de pesquisa, por acreditar em mim quando nem eu mesma sabia que era capaz, por todo incentivo e motivação, pela confiança e por mostrar que, não importa o quão difícil seja, nós somos capazes.

Minha querida amiga e co-orientadora Flávia Borges, quanta coisa passamos juntas! Obrigada por ser essa pessoa tão especial que mesmo em meio aos problemas e atividades, correria do dia-a-dia, sempre me atendeu em meus desesperos com alegria e prontidão, sempre com uma solução em suas palavras, meu porto-seguro científico. Com você aprendi a confiar em mim mesma; obrigada por sempre me ouvir e por toda ajuda. E principalmente por sua amizade que pretendo continuar cultivando ao longo da vida.

Às minhas amigas irmãs-científicas Lívia Ferreira e Magda Delorence; vocês foram o presente de Deus em minha vida! Vocês sempre tão presentes, obrigada por toda alegria compartilhada, por sempre me ouvirem, pela força, por tudo que dividimos juntas. Vocês são demais, amizade que vou levar por resto da vida! Saibam que mesmo distante podem contar comigo sempre!

À Raquel Vionette minha amiga de graduação e de coração, que mesmo de longe está sempre por perto me apoiando e torcendo por mim, obrigada por me mostrar este mundo acadêmico, se não fosse você, nada disso teria iniciado. Você é muito especial!!!!

Ao Profº Gonçalo Apolinário e seus alunos pelo empréstimo do nanodrop e uso de alguns equipamentos do seu laboratório.

À Unidade de Experimentação Animal pelo uso do Tempo Real, e a Mariana da Rocha por nossas conversas sempre muito produtivas.

À Prof<sup>a</sup> Kátia Valevski e Prof<sup>a</sup>. Elenir Amâncio, pela utilização de alguns equipamentos em seu laboratório e pela amizade.

Aos professores do LQFPP Olga Machado, Thiago Venâncio, Jorge Hernandez, Elias Walter, Gustavo Rezende pelos incentivos e ajuda sempre que precisei.

Aos colegas de trabalho do LQFPP Nathalia Bastos; Leonardo Sá; Ariane Fabres; Nadia Casarin; Keyson Vieira; Dayanni Padua; Eduardo; Janaina Macedo; Elane da Silva e em especial minha amiga Lucilene Ollivier.

Ao amigo Dr<sup>o</sup> José Roberto da Silva, pelo incentivo e companhia dos congressos.

À amiga Beatriz dos Santos Ferreira que confiou em mim como sua parceira, e por toda ajuda nos Races da vida do início do doutorado. Você é 10!

Às colegas de trabalho Rosana Lelis, Gabi Calegario, Diana Rangel, Eloá Tostes.

Aos alunos de apoio técnico Breno Mellado e Raynan Aguilar que foram grandes parceiros no cuidado com a colônia de *Rhodnius* e por sempre estarem presentes nos momentos em que precisei.

Aos técnicos Cristóvão Barros Pinheiro, Izabela Dantes Sampaio, Rogério Gama da Mota e Jucélia da Silva Araujo.

E não poderia deixar de agradecer também aqueles que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando:

Pai e Mãe este trabalho também é dedicado a vocês, obrigado é muito pouco pra agradecer por tudo que vocês fizeram e fazem até hoje pra que eu pudesse chegar até aqui. A vocês eu devo tudo! Eu os amo muito!

Ao meu esposo Amilton, que sempre me apoiou, esteve comigo, suportou a distância, foi meu maior incentivador nesse percurso; obrigada por tudo, principalmente pela paciência em aguentar meus estresses e por dividir comigo a alegria de ter nossos dois filhos que são bênçãos de Deus em nossa vida! Meu amor por você só aumenta por caminhar ao meu lado me incentivando e dando força pra seguir em frente.

Aos meus queridos filhos, Gabriel e Heitor Antônio, comecei com um e terminei com o outro, este trabalho é dedicado a vocês, todo esforço e dedicação são para que eu possa proporcionar-lhes um futuro abençoado assim como meus pais fizeram por mim. Mamãe AMA muito e não consegue viver sem vocês!

Às minhas irmãs Luciana e Luciene, minhas confidentes e apoio nas horas mais difíceis, vocês são a melhores amigas que eu poderia ter, obrigada por sempre estarem ao meu lado e me compreenderem, e Luciene por dividir um pouquinho dessa caminhada comigo quando veio morar em Campos. Agradeço também ao mais novo membro da família, meu cunhado Guido, que trouxe ainda mais alegria para nossa família.

À minha grande família Souza e Gonçalves Ferreira, de tios e primos que estão sempre na torcida lembrando de mim em suas orações e pensamentos positivos, em especial a família da tia Angélica, junto ao meu afilhado Elias e a Regininha que quando juntos formamos uma só.

Aos meus sogros e cunhadas por entenderem minha ausência e estarem sempre prontos a me ajudar sempre que precisei.

Às amigas queridas Andreia Oliveira, Paolla Cipriano, Deise Lorencini, Erica Bachetti, sempre tão presentes em minha vida, obrigada pela torcida e apoio que sempre me motivaram, e em especial minha amiga confidente Jacqueline Toneto que sempre que precisei, esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando.

À Débora Ferreira e Michelle Rigo, amigas que mesmo longe se fazem presente. À Anie Oliveira e Miriam que me acolheram no início do doutorado e dividiram comigo momentos muito divertidos. Ao casal de amigos Adriano Pósse e Adriana Paraízo sempre na torcida me motivando.

Ao meu avô, Antônio Satyro de Souza (*in memoriam*) que foi um dos meus maiores incentivadores, obrigada por tudo! Você faz muita falta! Saudades eternas!

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que de alguma forma estiveram presentes nesta etapa da minha vida e contribuíram para realização deste trabalho.

A Deus por sempre me atender em minhas orações, permitindo que o melhor fosse feito, por colocar cada uma dessas pessoas em minha vida mostrando o caminho certo a seguir e à Nossa Senhora por sua intercessão!!!

*Desistir...*

*Eu já pensei seriamente nisso,  
mas nunca me levei realmente a sério.  
É que tem mais chão nos meus olhos do que  
cansaço nas minhas pernas, mais esperança  
nos meus passos do que tristeza nos meus ombros,  
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.*

*Cora Coralina*



|   |    |
|---|----|
| <b>1 – INTRODUÇÃO</b>   |    |
| 1.1 – O <i>Rhodnius prolixus</i> .....                                  | 17 |
| 1.2 – A digestão e o aparelho digestório de <i>R. prolixus</i> .....    | 19 |
| 1.2.1 – Membranas perimicrovilares.....                                 | 20 |
| 1.2.2 – Evolução da hematofagia em artrópodes.....                      | 21 |
| 1.3 – Heme.....   | 23 |
| 1.4 – Defesas antioxidantes em artrópodes hematógafos .....             | 24 |
| 1.5 – Formação de hemozoína (Hz).....                                   | 26 |
| 1.6 – Glicosidasas.....   | 29 |
| 1.6.1 - Classificação e estrutura.....                                  | 30 |
| 1.7 – Alfa-glucosidasas .....   | 32 |
| 1.7.1 - Alfa-glucosidasas em insetos.....                               | 33 |
| 1.7.2 - Alfa-glucosidasas e a síntese de Hz em <i>R. prolixus</i> ..... | 34 |
| <b>2 - JUSTIFICATIVA</b>  | 36 |
| <b>3 – OBJETIVOS</b>  | 38 |
| <b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 39 |
| 4.1 – Materiais Biológicos.....   | 39 |
| 4.2– Colônia de <i>R. prolixus</i> .....                                | 39 |
| 4.3– Alimentação de <i>R. prolixus</i> .....                            | 40 |
| 4.4 – Preparação das amostras biológicas .....                          | 40 |
| 4.5 – Extração de proteínas de amostras.....                            | 41 |
| 4.6 – Síntese de hemozoína <i>in vitro</i> .....                        | 41 |
| 4.6.1.– Extração de Hz.....   | 42 |
| 4.6.2 –Dosagens de heme/Hz.....   | 42 |
| 4.7 – Ensaio de atividade de $\alpha$ -glucosidase.....                 | 42 |
| 4.8 –Bases de dados da sequência gênica de <i>R. prolixus</i> .....     | 43 |
| 4.9 – Silenciamento da $\alpha$ -glucosidase por injeção de dsRNA.....  | 44 |
| 4.10 – Extração de RNA total.....                                       | 44 |
| 4.11 – Dosagem de RNA.....  | 44 |
| 4.12 – Remoção da contaminação por DNA genômico.....                    | 44 |
| 4.13 – Síntese da primeira fita de DNA complementar.....                | 45 |
| 4.14 – Desenho dos iniciadores.....                                     | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 4.15 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....  | 46 |
| 4.16 – Produção da dupla-fita (dsRNA).....  | 46 |
| 4.17 – Análise da expressão da $\alpha$ -glucosidase por PCR em Tempo Real.....   | 47 |
| 4.18 – Análise dos dados.....   | 48 |
| 4.19 – Análise estatística.....   | 48 |
| <b>5. RESULTADOS</b>  | 49 |
| 5.1 – Expressão dos genes da $\alpha$ -glu em diferentes tecidos de <i>R. prolixus</i> .....                                    | 49 |
| 5.2 - Influência da alimentação na atividade da $\alpha$ -glucosidase.....  | 50 |
| 5.3 - Expressão das isoformas dos genes de <i>R. prolixus</i> em resposta à alimentação   | 52 |
| 5.4 – Influência do silenciamento da $\alpha$ -glucosidase na síntese de hemozóina e<br>atividade de $\alpha$ -glucosidase..... | 54 |
| 5.5 - Atividade da $\alpha$ -glucosidase de outros organismos e seu potencial de<br>cristalização de heme <i>in vitro</i> ..... | 63 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>   | 69 |
| <b>7. CONCLUSÕES</b>  | 78 |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 79 |
| <b>9. ANEXO</b>   | 94 |

## Índice de Figuras

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Ciclo de vida de <i>R. prolixus</i>  | 18 |
| Figura 2  | Alimentação sanguínea de <i>R. prolixus</i>  | 22 |
| Figura 3  | Representações da estrutura do grupo heme (Fe-protoporfirina IX)   | 23 |
| Figura 4  | Estrutura da hemozoína segundo Egan, (2008)  | 27 |
| Figura 5  | Análise da expressão dos genes de $\alpha$ -glu A, $\alpha$ -glu B, $\alpha$ -glu C, $\alpha$ -glu D, $\alpha$ -glu E e $\alpha$ -glu F em diferentes te idos. | 50 |
| Figura 6  | Influência da alimentação na atividade de $\alpha$ -glucosidase (A) e formação de Hz (B) do intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> .                  | 51 |
| Figura 7  | Efeito da alimentação na expressão dos genes $\alpha$ -glu A, B, C D, E e F.   | 53 |
| Figura 8  | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu A na expressão relativa (A), na atividade hidrolítica e da formação de Hz (B).                                   | 57 |
| Figura 9  | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu B na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).                           | 58 |
| Figura 10 | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu C na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).                           | 59 |
| Figura 11 | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu D na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).                           | 60 |
| Figura 12 | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu E na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).                           | 61 |
| Figura 13 | Efeito do silenciamento do gene $\alpha$ -glu F na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).                           | 62 |
| Figura 14 | Atividade de $\alpha$ -glucosidases e formação de Hz em diferentes insetos usando extrato proteico de membrana - não solúvel (M) e solúvel (S).                | 64 |
| Figura 15 | Atividade de $\alpha$ -glucosidases e formação de Hz de extrato protéico de membrana em diferentes organismos não insetos                                      | 65 |

## Índice de Tabelas

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Sequência de iniciadores usados para amplificação de RT-PCR e qPCR.  | 45 |
| Tabela 2 | Sequências de iniciadores utilizados na síntese de dsRNA.  | 47 |
| Tabela 3 | Efeito da injeção de ds $\alpha$ -glu em fêmeas de <i>R. prolixus</i>  | 55 |
| Tabela 4 | Ensaio da atividade hidrolítica <i>in vitro</i> do extrato proteico da fração não solúvel de insetos e outros organismos não insetos, na presença ou ausência dos inibidores eritritol, DEPC e cloroquina. | 67 |
| Tabela 5 | Ensaio da formação de Hz <i>in vitro</i> do extrato proteico da fração não solúvel de insetos e não insetos, na presença ou ausência dos inibidores eritritol, DEPC e cloroquina.                          | 68 |

*Lista de abreviaturas e siglas*

|                                 |       |  |
|---------------------------------|-------|--|
| <b><math>\alpha</math>-GLU</b>  | ..... | $\alpha$ -glucosidase                      |
| <b>BCA</b>                      | ..... | Ácido bicinconínico                        |
| <b>BSA</b>                      | ..... | Albumina sérica bovina                     |
| <b>cDNA</b>                     | ..... | DNA complementar                           |
| <b>CLQ</b>                      | ..... | Cloroquina                                 |
| <b><i>dcr2</i></b>              | ..... | Dicer 2                                    |
| <b>DEPC</b>                     | ..... | Dietilpirocarbonato                        |
| <b>dNTP</b>                     | ..... | Desoxirribonucleotídeo trifosfato          |
| <b>dsRNA</b>                    | ..... | Dupla fita de RNA                          |
| <b>dsNeo</b>                    | ..... | Dupla fita de RNA resistente à neomicina   |
| <b>ds<math>\alpha</math>Glu</b> | ..... | Dupla fita de RNA de $\alpha$ -glucosidase |
| <b>FP</b>                       | ..... | Ferroprotoporfirina                        |
| <b>Fe(III)PPIX</b>              | ..... | Ferroprotoporfirina IX                     |
| <b>HO</b>                       | ..... | Heme oxigenase                             |
| <b>HRP II</b>                   | ..... | Proteína rica em histidina II              |
| <b>Hz</b>                       | ..... | Hemozoína                                  |
| <b>Kb</b>                       | ..... | Quilo base                                 |
| <b>MPMV</b>                     | ..... | Membrana perimicrovilar                    |
| <b>PAGE</b>                     | ..... | Eletroforese em gel de poliacrilamida      |
| <b>PBS</b>                      | ..... | Tampão fosfato de sódio                    |
| <b>PCR</b>                      | ..... | Reação em cadeia da polimerase             |
| <b>qPCR</b>                     | ..... | PCR quantitativo                           |
| <b>PMSF</b>                     | ..... | Fenilmetilsulfonil fluoreto                |
| <b>RNAi</b>                     | ..... | RNA de interferência                       |
| <b>ROS</b>                      | ..... | Espécies reativas de oxigênio              |
| <b>RT</b>                       | ..... | Transcrição reversa                        |
| <b>SDS</b>                      | ..... | Dodecil sulfato de sódio                   |
| <b>WHO</b>                      | ..... | Organização Mundial da Saúde               |

## **Resumo**

As  $\alpha$ -glucosidases ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolase; EC 3.2.1.20) catalisam a exohidrólise de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 das extremidades não redutoras de oligo ou polissacarídeos. Em adição a esta atividade hidrolítica,  $\alpha$ -glucosidases têm papéis secundários, como a formação de hemozoína através da biocristalização de heme no intestino do inseto hematófago *Rhodnius prolixus*. Hemozoína (Hz), um cristal de heme conhecido anteriormente como pigmento da malária, reduz a toxicidade do heme em alguns organismos hematófagos, tais como protozoários, helmintos e insetos. O mecanismo de síntese de Hz permanece mal compreendido, mas em *Rhodnius prolixus* estudos indicam o envolvimento de uma enzima  $\alpha$ -glucosidase contendo papel nucleador na síntese do cristal. Aqui nós usamos neste trabalho informações genômicas obtidas a partir de estratégias de silenciamento gênico, para explorar as funções clássicas e alternativas das  $\alpha$ -glucosidases de *R. prolixus*, a fim de identificar quais parálogos desta enzima estão associados com a formação de hemozoína. Através de análises computacionais encontramos cinco  $\alpha$ -glucosidases no genoma de *R. prolixus*, que chamamos  $\alpha$ -glucosidases A, B, C, D e E. A denominada de  $\alpha$ -glucosidase F, sequenciada por Mury et al. (2009), também foi alvo deste estudo. Os dsRNAs foram injetados na hemocele de fêmeas adultas, e essas foram monitoradas quanto à mortalidade, oviposição e viabilidade de ovos postos. Enquanto o silenciamento da  $\alpha$ -glucosidase C não alterou oviposição e viabilidade de ovos, o silenciamento de cada uma das outras isoformas resultou na redução da oviposição, embora sem impacto na viabilidade dos ovos. A expressão relativa dos genes, atividade da  $\alpha$ -glucosidase e formação de hemozoína (Hz) foram medidas após o silenciamento gênico. Outro objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a  $\alpha$ -glucosidase de outros organismos também teriam a capacidade para formar Hz in vitro. Esta hipótese foi testada utilizando extratos de proteínas de insetos hematófagos e não hematófagos, e diferentes organismos não-insetos. Os nossos resultados indicam que extratos proteicos a partir de várias fontes têm o potencial para cristalizar heme in vitro. Esta atividade é provavelmente relacionada com  $\alpha$ -glucosidases. Assim, estas enzimas parecem ter a capacidade de desintoxicar heme mesmo em organismos não hematófagos. Esta função latente pode representar um passo evolutivo, pré-adaptativo, crucial na adoção de hematofagia nos hemoparasitas.

Palavras-chave: RNAi, genômica funcional, glucosidases, hemozoína, glicosídeo-hidrolases, biocristalização de heme,

## *Abstract*

The  $\alpha$ -glucosidases ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolase; EC 3.2.1.20) are enzymes that hydrolyze terminal, non-reducing (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\alpha$ -D-glucose residues, releasing  $\alpha$ -D-glucose. In addition to this canonical hydrolytic activity,  $\alpha$ -glucosidases have secondary roles, such as hemozoin formation through heme biocrystallization in the midgut of *Rhodnius prolixus*. Hemozoin (Hz) is a heme crystal initially known as malaria pigment. This crystal reduces the heme toxicity in hematophagous organisms such as protozoan, worms and insects. The mechanism of the Hz synthesis is still poorly known and studies on the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* indicate the involvement of an  $\alpha$ -glucosidase enzyme in the hemozoin formation. Here, we used genome information obtained from gene silencing strategies to explore classical and alternative roles of *R. prolixus*  $\alpha$ -glucosidases, in order to identify which  $\alpha$ -glucosidase paralogs are associated with hemozoin formation. Through computational analysis, we found five  $\alpha$ -glucosidases in the *R. prolixus* genome, which we named  $\alpha$ -glucosidases A, B, C, D and E. A sixth *R. prolixus* paralog (Mury et al., 2009), named  $\alpha$ -glucosidase F, was also included in the study. The dsRNAs were injected in female hemocoel, and females were monitored for mortality, oviposition and egg viability. While silencing of  $\alpha$ -glucosidase C did not alter oviposition and viability, silencing of each of the other isoforms resulted in reduced oviposition, although with no impact in egg viability. Relative expression,  $\alpha$ -glucosidase activity and hemozoin biocrystallization were measured after silencing. Another objective of this study was to test the hypothesis that  $\alpha$ -glucosidases from other organisms present the ability to form Hz *in vitro*. This hypothesis was tested for the protein extract from non-hematophagous insects and non-insect samples. Our results indicate that protein extracts from various sources have the potential to crystallize heme *in vitro*. This activity is probably related to  $\alpha$ -glucosidase. Thus, these enzymes appear to have the ability to detoxify heme even in non-hematophagous organisms. This latent function may represent an evolutionary step, pre-adaptive and crucial the adoption of hematophagy in hemoparasites.

**Keywords:** RNA-mediated interference, functional genome, glycosidase, hemozoin, heme biocrystallization.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O *Rhodnius prolixus*

Dentre os artrópodes, a classe Insecta é a mais numerosa, com mais de 1 milhão de espécies descritas, constituindo a maior classe de animais existente. Das inúmeras espécies de insetos descritas, estima-se que aproximadamente 14.000 sejam hematófagas (Lehane, 1991). Acredita-se que os primeiros insetos hematófagos surgiram no período Cretáceo (Lukashevich e Mostovski, 2003; Mans e Neitz, 2004) e que o aparecimento da hematofagia neste grupo ocorreu paralelamente ao início da divisão de mamíferos e aves, acompanhados pela diversificação e expansão dos animais terrestres (Lehane, 2005).

Os insetos hematófagos são vetores de diversos agentes etiológicos causadores de doenças como a malária, dengue, leishmaniose, febre amarela e doença de Chagas, tornando este grupo extremamente importante sobre o ponto de vista médico (Stiebler, 2008).

A ordem Hemiptera contém cerca de 80.000 espécies, constituindo-se no grupo dominante de insetos de metamorfose simples. Pertencem a esta ordem os conhecidos barbeiros, percevejos, pulgões, cigarras e outros (Lehane, 1991). O trato intestinal parece ser o responsável pela capacidade que os Hemipteras têm de explorar um grande número de recursos alimentares, o que permitiu a sua capacidade adaptativa (Damasceno-Sá et al., 2007). Neste grupo estão insetos com hábitos alimentares bastante diversos, como hematófagos, sugadores de seiva, sugadores de sementes, predadores de outros insetos (Lehane, 2005).

*Rhodnius prolixus* é um hemíptera hematófago obrigatório da família Reduviidae, subfamília Triatominae, cujos representantes são popularmente conhecidos como “barbeiros”. Seu ciclo biológico de desenvolvimento passa pelas fases de ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adultos machos e fêmeas (**Figura 1**) (Lent & Wygodzinsky 1979). Todos os estádios de vida, e também ambos os sexos, têm o mesmo hábito alimentar (**Figura 1**). Isto faz destes insetos bons vetores de doenças, pois um inseto imaturo tem o mesmo potencial para transmitir a doença que o inseto adulto (Aldana et al., 2001).

O triatomíneo *R. prolixus* destaca-se por ser considerado o principal vetor do *Trypanosoma cruzi*, no norte da América do Sul, em países como Colômbia e

Venezuela, e em vários países da América central, onde apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos (Lehane, 1991; Schofield 1994). O *R. prolixus* é também um modelo clássico para estudos de biologia e fisiologia de insetos (Fresquet & Lazzari 2011).



**Figura 1: Ciclo de vida de *R. prolixus*.** Ovos, cinco estádios de ninfas e adulto de *Rhodnius prolixus*. (Vetores da Doença de Chagas na Região Norte do Brasil, FIOCRUZ, 2009)

Neste inseto, cada muda, assim como cada ciclo reprodutivo do *R. prolixus*, é sincronizada por uma alimentação na qual o inseto ingere uma quantidade de sangue equivalente a até dez vezes seu peso em sangue (Friend *et al.*, 1965). Após a alimentação, o animal passa por um período de jejum prolongado, que pode chegar a vários meses. Por volta do terceiro dia após a alimentação, os ovários do *R. prolixus* já se encontram repletos de ovócitos e, por volta do sexto dia após a alimentação, estes insetos realizam a postura. As ninfas de primeiro estágio eclodem dentro de um período de dez a vinte dias após a postura (Aldana *et al.*, 2001). As próximas mudas só acontecem após a ingestão de sangue. O ciclo de vida completo do *Rhodnius* pode chegar a seis meses (**Figura 1**).

## 1.2. A digestão e o aparelho digestório do *R. prolixus*

O *R. prolixus* é um hematófago obrigatório em todas as fases do seu ciclo de vida. Seu aparelho digestório é dividido em intestino anterior, médio e posterior. O intestino médio, por sua vez, é subdividido em intestino médio anterior e intestino médio posterior. O intestino médio posterior é, ainda, subdividido em porção anterior e porção posterior (Billingsley & Downe, 1983). Após a ingestão, o sangue é estocado no intestino médio anterior (IMA), região onde se inicia uma intensa atividade de hemólise (Billingsley, 1990). No IMA ocorrem ainda outros processos como diurese, regulação iônica, digestão de carboidratos e processamento de lipídeos (Bauer, 1981; Billingsley e Downe, 1989). As células do IMA contêm numerosos esferócitos, estruturas multilamelares envolvidas na regulação iônica (Bauer, 1981; Billingsley e Downe, 1989; Pacheco e Ogura, 1966). O transporte de água é dependente desta regulação iônica, conseqüentemente da funcionalidade destas estruturas. Em *R. prolixus* os esferócitos ocupam seu próprio compartimento celular até os vinte dias após a alimentação, quando, então, são absorvidos por lisossomos autofágicos. Os esferócitos têm sido considerados como sítios de seqüestro de íons minerais que podem ser mobilizados quando requeridos (Billingsley e Downe, 1989).

Após os eventos que ocorrem no IMA, os produtos da digestão do sangue do hospedeiro vertebrado são digeridos e absorvidos (Lehane, 1991). Estas etapas acontecem no intestino médio posterior (IMP). A etapa de digestão das proteínas sanguíneas se inicia na porção anterior do IMP, onde catepsinas B e D, aminopeptidase, carboxipeptidases e outras enzimas hidrolíticas (Houseman et al., 1985; Ferreira et al., 1988) estão ativas. Billingsley (1990) mostrou que a porção posterior do IMP apresenta uma maior densidade de mitocôndrias, possui uma área superficial maior e exibe uma separação clara das membranas do labirinto basal, quando mais nutrientes estão disponíveis em etapas mais avançadas da digestão.

Uma característica marcante no intestino dos Hemípteras é a presença de uma estrutura membranosa que reveste as células epiteliais no lado luminal, conhecida como membranas perimicrovilares (MPMV). Estas membranas separam o conteúdo luminal das células epiteliais durante o ciclo digestivo destes insetos (Silva et al., 2004).

De maneira geral, o intestino médio de insetos hematófagos mostra poucas variações. Por exemplo, em mosquitos o sangue também é estocado e digerido no intestino médio posterior, embora o principal grupo de proteinases neste caso seja a

tripsina, diferente de Hemíptera nos quais as proteinases digestivas encontradas são principalmente do tipo catepsinas (Terra, 1990). Estas diferenças não podem ser atribuídas à dieta, mas a uma adaptação relacionada à origem de diferentes ancestrais. Este fato reforça a hipótese de que a hematofagia não surgiu em um ancestral comum que deu origem a todas as espécies existentes até o momento, mas provavelmente tem origem polifilética, como resultado de um processo de convergência adaptativa (Wheeler et al., 2001).

### 1.2.1 – Membranas perimicrovillares

Uma característica da fisiologia digestiva da maioria dos insetos é a presença de uma barreira entre o bolo alimentar e o epitélio intestinal. Muitas espécies apresentam estruturas extracelulares secretadas pelo epitélio intestinal. Na maior parte dos insetos esta camada extracelular recebe o nome de membrana ou matriz peritrófica, uma estrutura anatômica quitino-protéica que envolve o bolo alimentar, levando a uma compartimentalização do processo digestivo (Terra *et al.*, 1979; Terra e Ferreira, 1994). A matriz peritrófica é formada basicamente por quitina, proteínas e proteoglicanos, e cria espaços definidos onde enzimas distintas atuam. A matriz peritrófica provavelmente foi perdida em ancestrais Hemiptera na adaptação ao ato de sugar o floema (Terra, 1990). No lugar de uma matriz peritrófica, a ordem Hemiptera apresenta estruturas extracelulares denominadas membranas perimicrovillares (MPMV) por sua localização entre as microvilosidades intestinais e sua natureza fosfolipídica (Silva *et al.*, 2004). As membranas perimicrovillares envolvem as microvilosidades e se projetam para a luz do tubo digestivo, algumas vezes formando camadas sobre as microvilosidades das células do intestino médio, provavelmente em todos os hemípteros. Essas membranas foram descritas tanto em Heteroptera, quanto em Fulgoroidea (superfamília de Homoptera onde se encontram as cigarras, pulgões, cigarrinhas e colchonilhas) (Andries e Torpier, 1982; Baerwald e Delcarpio, 1983).

Diferente da matriz peritrófica, as membranas perimicrovillares são semelhantes à membrana plasmática, embora apresentem um teor protéico inferior. As  $\alpha$ -glucosidases são proteínas majoritárias presentes nessas estruturas e, por isso, têm sido utilizadas como marcadores moleculares de MPMV em Hemiptera (Silva *et al.*, 1996).

No intestino médio dos insetos,  $\alpha$ -glucosidases podem ser solúveis ou ligadas à MPMV. A localização da  $\alpha$ -glucosidase no intestino depende amplamente da posição

filogenética do inseto (Terra, *et al.*, 1988, Terra, 1990). As  $\alpha$ -glucosidases de membrana são proteínas integrais da membrana microvilar em células intestinais de Diptera (Espinoza-Fuentes & Terra, 1986; Terra & Jordão, 1991). Em Hemiptera, esta enzima é encontrada associada às MPMV (Terra *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2004).

No *R. prolixus* e no *D. peruvianus*, há evidências de que a digestão de proteínas ocorre com a separação espacial da digestão inicial, que envolve a participação de proteinases catepsina-símile no lúmen ventricular, e a digestão intermediária, onde participa uma aminopeptidase confinada no espaço perimicrovilar (Billingsley & Downe, 1985; Ferreira *et al.*, 1988; Terra *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 1996).

Alguns hemípteros podem carregar parasitos em seus intestinos, principalmente Tripanosomatídeos. Em algumas destas interações parasita/inseto, a colonização do trato digestivo por estes microorganismos parece envolver o ancoramento do parasito às membranas perimicrovillares (Romeiro *et al.*, 2000). Assim, estas membranas poderiam exercer um papel de barreira contra a entrada destes parasitos na hemocele destes insetos, como é proposto para as membranas peritróficas (Beaty e Marquard, 1996).

A biogênese das membranas perimicrovillares ainda não está completamente elucidada. Silva *et al.* (1995) propuseram uma provável origem das membranas perimicrovillares a partir do aparato de Golgi, de acordo com observações de vesículas com dupla membrana nas células epiteliais do intestino médio de *D. peruvianus*. O trabalho propõe que haja liberação de vesículas que migram do retículo endoplasmático em direção ao aparato de Golgi. A partir desta organela, as vesículas de dupla membrana, transportando proteínas secretoras, seriam liberadas dentro do lúmen intestinal, depois de fundir as membranas externas com as membranas microvillares e as membranas internas com as membranas perimicrovillares.

### **1.2.2 – Evolução da hematofagia em artrópodes**

A hematofagia surgiu várias vezes ao longo da evolução dos artrópodes (Ribeiro, 1995). A evolução do hábito de sugar sangue em insetos parece ter ocorrido pela presença de partes bucais pré-adaptadas para perfurar e através da associação prolongada entre insetos e vertebrados. Essa relação iniciou-se através da atração de insetos para ninhos e tocas dos vertebrados, onde encontrariam calor e umidade (Lehane, 2005). Adaptações morfológicas foram claramente necessárias, como a modificação das peças bucais do tipo sugadoras (Emmerson *et al.*, 1973).

Outra hipótese para explicar o surgimento da hematofagia em insetos é aquela que propõe que isso ocorreu a partir de espécies de insetos que se alimentavam de seiva de plantas. Esses insetos sugadores de seiva podem ter perdido suas proteases originais, visto que vegetais produzem inibidores de serino-proteases. Dessa forma, seletivamente, estas enzimas foram descartadas pelos insetos fitófagos (Lehane, 2005). Hemipteras fazem uso de proteases do tipo catepsinas com grande eficiência. Sugadores de seiva vegetal provavelmente perderam suas proteases e para digerirem novamente proteínas, passaram a utilizar enzimas proteolíticas lisossomais do tipo catepsinas, como enzimas digestivas (Houseman *et al.*, 1985; Billingsley & Downe, 1989; Lehane, 2005).

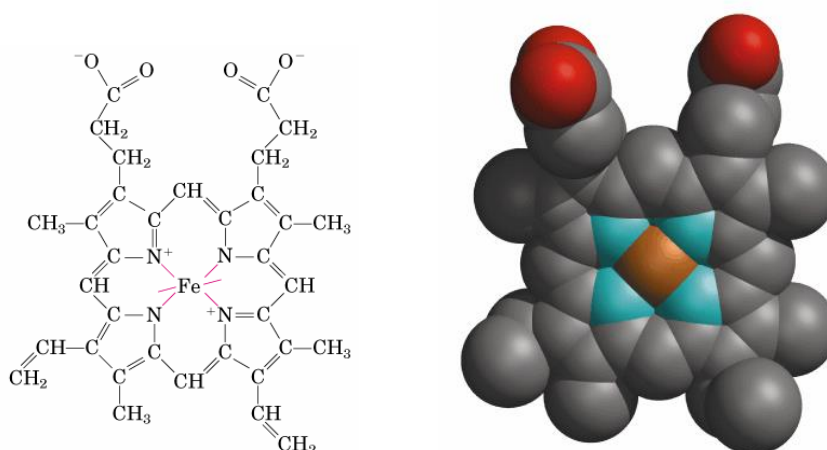
Na maior parte dos insetos da família Reduviidae a alimentação se caracteriza pela ingestão de grande quantidade de sangue. O *Rhodnius prolixus*, por exemplo, chega a ingerir 10 vezes o seu próprio peso (**Figura 2**) (Friend et al., 1965). Esta grande quantidade de sangue ingerida de uma só vez minimiza o número de visitas que estes ectoparasitos temporários precisam fazer ao hospedeiro e, portanto, diminui o risco que estas investidas representam (Lehane, 1991). No entanto, esta grande quantidade de sangue ingerida de uma só vez apresenta algumas desvantagens: após o repasto sanguíneo, o inseto tem sua mobilidade diminuída em função do seu peso corporal e o outro problema é o estresse oxidativo gerado pela liberação de grandes quantidades de heme, proveniente da digestão da hemoglobina presente no sangue, no intestino destes insetos (Alvarenga, 2005).



**Figura 2:** Alimentação sanguínea de *R. prolixus*. 1. Antes da alimentação; 2. Depois da alimentação – o inseto chega a ingerir até 10 vezes seu próprio peso em sangue em uma única alimentação (Stiebler, 2008).

### 1.3 – Heme

O grupo heme, ou ferro-protoporfirina IX (Fe(III)PPIX), pertence à família das porfirinas que são moléculas biologicamente importantes relacionadas principalmente aos processos de captura e transdução de energia. Porfirinas formam uma família de compostos intensamente coloridos, formados por um grande macro-ciclo de vinte átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio (Milgron, 1997). O macro-ciclo é construído a partir de quatro pequenos anéis pirrólicos, cada anel formado por quatro átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Cada um desses anéis é unido ao seu vizinho por uma ponte de átomos de carbono (Milgron, 1997; Moreira et al., 2004). O grupo heme apresenta um átomo de ferro no centro desta estrutura (**Figura 3**).



**Figura 3 – Representações da estrutura do grupo heme (Fe-protoporfirina IX)** (Adaptado de Lehninger, 2004). Heme é um macrociclo, formado por 4 anéis pirrólicos unidos por pontes metênicas. O átomo de ferro no heme liga-se a 4 nitrogênios no centro do macrociclo.

A molécula de heme encontra-se envolvida com processos vitais como a cadeia transportadora de elétrons, detoxificação, transporte de oxigênio, sinalização celular, decomposição de peróxido e transporte de gases (Bewley et al., 2013; Tsiftoglou et al., 2006; Ponka, 1999; Ryter & Tyrrel, 2000). A utilização da molécula de heme ingerida por organismos hematófagos poderia ser uma grande vantagem adaptativa uma vez que poderia minimizar a utilização da via metabólica de biossíntese de heme, presente na maior parte dos seres vivos. Isto de fato parece ocorrer em *Rhodnius prolixus*, já que tem sido demonstrado que uma parte do heme gerado no aparelho digestório é capaz de

ser absorvido por este inseto (Dansa-Petretski et al., 1995). Este heme absorvido parece regular de uma forma ainda pouco entendida, a ovogênese (Braz *et al.*, 2001).

No carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* o heme derivado da digestão parece ser essencial no desenvolvimento de ovos (Lara et al., 2003), já que esta espécie não apresenta a via de biossíntese deste composto (Braz et al., 2001).

Enquanto diferentes funções biológicas do heme são bem conhecidas em diversos modelos, um número de efeitos deletérios são direta ou indiretamente atribuídos ao heme livre (Ryter & Tyrrel, 2000). O acúmulo de heme na sua forma monomérica, livre em solução aquosa, poderia promover a lise de células. Por ser um ânion anfifílico, o grupo heme é capaz de alterar a permeabilidade e seletividade da membrana (Schmitt et al., 1993). O heme pode causar danos moleculares diversos, como a peroxidação lipídica, através da geração de radicais livres, por decomposição de peróxidos orgânicos gerando espécies altamente reativas como os radicais alcóxil (RO•) e peróxil (ROO•) (Kalyanaraman et al., 1983; Van der zee et al., 1996).

Sendo assim, diversos mecanismos de proteção contra os efeitos deletérios do heme livre tornam-se necessários para os organismos hematófagos, pois a utilização do sangue como nutriente representa um grande desafio oxidativo, uma vez que produtos gerados na digestão do sangue, como o heme e ferro, são liberados no trato digestivo desses organismos (Stiebler, 2008).

#### **1.4 – Defesas antioxidantes em outros organismos**

Na ingestão de sangue em insetos hematófagos uma grande quantidade de heme é gerada promovendo um ambiente oxidante que pode, teoricamente, levar o inseto à morte. Portanto, os insetos hematófagos devem possuir mecanismos de detoxificação de heme e antioxidantes capazes de contrabalançar o efeito do heme (Graça-Souza et al., 2006).

Em mamíferos, a maior parte da detoxificação do heme ocorre através da reação catalisada pela enzima heme oxigenase, pela qual o heme sofre uma degradação oxidativa gerando biliverdina, monóxido de carbono e íon ferroso (Ryter & Tyrrell, 2000). Lara et al. (2003) ao estudarem o destino do heme derivado da hemoglobina nas células digestivas de *Rhipicephalus microplus*, carrapato bovino, identificaram a presença de uma estrutura que denominaram hemossomos, uma estrutura celular envolvida no processo de detoxificação de heme. Outro trabalho do mesmo grupo



mostra a presença de proteínas que estão provavelmente envolvidas com o transporte intracelular de heme (Lara et al., 2005).

O lúmen do intestino dos insetos hematófagos é o primeiro local a enfrentar este desafio oxidativo, pois é ali onde ocorre a digestão da hemoglobina (Hb). Entretanto, sabe-se que o heme é capaz de atravessar o epitélio intestinal e atingir a hemolinfa (Dansa-Petretski et al., 1995). Diversos mecanismos adaptativos de defesa e detoxificação do heme livre têm sido desenvolvidos, não só no intestino mas em outros tecidos do *Rhodnius prolixus*.

Um destes mecanismos é a síntese de uma proteína de ligação de heme, RHBP (Rhodnius-heme binding protein) (Oliveira et al., 1995). Esta proteína presente na hemolinfa liga heme inibindo a lipoperoxidação induzida por hemina (Dansa-Petretski et al., 1995). A ação da RHBP ocorre porque esta proteína é capaz de interagir com o heme livre e formar um complexo que inibe a geração de radicais livres (Dansa-Petretski et al., 1995). Em 2002, Pascoa et al. mostraram que a matriz peritrófica de *Aedes aegypti* funciona como uma barreira ao heme derivado da hemoglobina do hospedeiro vertebrado e, portanto, pode ser considerada um mecanismo antioxidante neste inseto. No mesmo inseto, Devenport et al. (2006) identificaram uma peritrofina – um componente protéico da matriz peritrófica – como sendo também uma proteína de ligação de heme.

Outro mecanismo antioxidante hemolinfático descrito em *R. prolixus* é a presença de altas concentrações de ácido úrico na hemolinfa (Graça-Souza et al., 1997). O concentração hemolinfática do ácido úrico chega a 5 mM. Esta concentração aumenta em decorrência da alimentação ou à injeção de hemina na hemocele (Graça-Souza et al., 1997).

As enzimas antioxidantes também são importantes em *R. prolixus* uma vez que convertem espécies reativas em produtos não reativos ou menos reativos. Paes et al. (2001) demonstraram que enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione cooperam para controlar a concentração de peróxido de hidrogênio nas células do intestino médio de *R. prolixus* e previnem a geração de radicais hidroxil. Além disso, sabe-se que as vias de degradação de heme também são essenciais para o processo de detoxificação. Em *R. prolixus* uma via de degradação de heme possui como enzima chave uma heme oxigenase que leva à produção de dicisteinil-biliverdina IX $\gamma$  (Paiva-Silva et al., 2002). No mosquito *Ae. aegypti*, a via de degradação de heme parece ser

amplamente distinta da demonstrada para o hemíptero hematófago *R. prolixus* (Pereira et al., 2007).

Mais recentemente foi descrita a presença de uma proteína desacopladora UCP4 nas células do intestino médio de *R. prolixus*, local onde esta proteína é superexpressa em resposta à alimentação com sangue (Alves-Bezerra et al., 2014). A modulação da atividade desta proteína altera a taxa de geração de peróxido de hidrogênio no intestino médio e ajuda a controlar a ação citotóxica do heme gerado durante a degradação da hemoglobina.

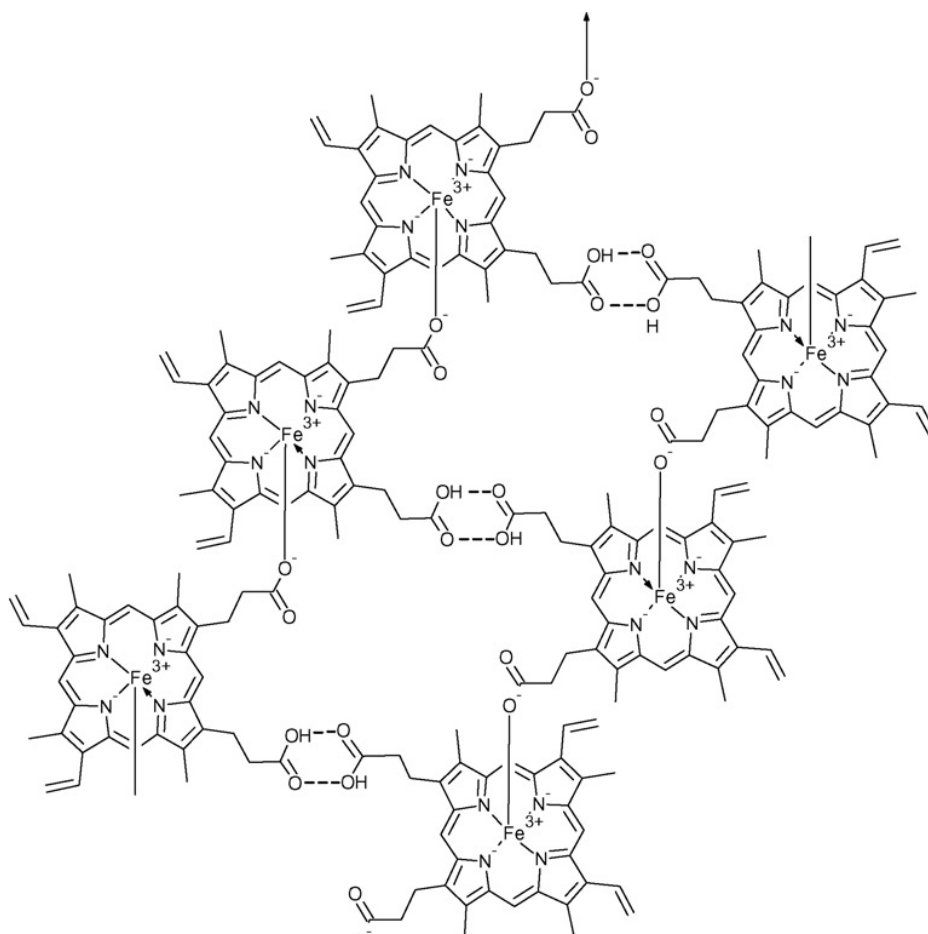
A biocristalização de heme em hemozoína representa outro importante mecanismo da diminuição da disponibilidade de heme livre no intestino médio de *Rhodnius prolixus*, e é a primeira defesa contra o heme derivado da hemoglobina do hospedeiro vertebrado (Oliveira et al., 1999; 2000, 2011).

### 1.5 – Formação de hemozoína

A hemozoína (Hz), originalmente descrita como o pigmento da malária, é um agregado cristalino de heme. Por muito tempo acreditou-se que a presença de hemozoína era exclusiva do *Plasmodium*. Posteriormente a presença de hemozoína foi descrita em diversos organismos como o barbeiro *Rhodnius prolixus* (Oliveira et al. 1999), no helminto *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al., 2000) e no protozoário *Haemoproteus columbae* (Chen & Sullivan., 2001). A Hz é um cristal de coloração marrom cuja formação se dá a partir da dimerização do heme, através de ligações ferro carboxilato, que, por sua vez, formam pontes de hidrogênio entre si formando o cristal (Pagola et al., 2000) (**Figura 4**).

Esta molécula é química e estruturalmente similar à beta-hematina (Slater et al., 1991). A Hz é um cristal insolúvel em tampão bicarbonato em pH básico e solventes apróticos como o dimetil sulfóxido e a piridina (Slater et al., 1991). Em contraste, o heme é solúvel em ambos os tipos de solventes, por solvatação das cadeias carboxilato ou por coordenação do solvente com o ferro em seu estado férrico (Brown & Lantzke, 1969). O mecanismo de síntese de Hz é pouco conhecido. Existem indícios de que as unidades de heme sejam primeiro dimerizadas através de ligações ferro-carboxilato recíprocas. Esta ligação ferro-carboxilato entre hemes adjacentes permite agregar dois ou mais dímeros em hemozoína, embora o número exato de unidades de heme em cada cadeia não possa ser determinado (Slater et al., 1991). Os dímeros são ainda

estabilizados através de pontes de hidrogênio entre os grupamentos propionato não dissociados de moléculas de heme de diferentes cadeias (Bohle & Helms, 1993; Bohle et al., 1997). A complexa estrutura da hemozóina é mantida por interações iônicas entre as moléculas de heme e por ligações de hidrogênio entre as cadeias já formadas. Esta estrutura da hemozóina diferencia-se de outras formas, como o monômero de heme, apresentando distinta solubilidade, perfil na difração de raio-X e espectrometria de infravermelho (FTIR) (Pagola et al., 2000).



**Figura 4: Estrutura da hemozóina segundo Egan, (2008).** A seta indica o sentido de prolongação das cadeias do cristal. Ocorre ligação entre o ferro de uma molécula de heme com o radical carboxilato da molécula de heme adjacente. Diferentes cadeias são mantidas juntas por ligações de hidrogênio.

A formação de Hz a partir de monômeros de heme necessita de determinadas condições nas quais 50% dos grupamentos de ácido propiônico do heme estejam desprotonados, o que ocorre em valores de pH iguais ao pK<sub>a</sub> dos propionatos, sendo

estes entre 4,8 – 5,0. Este valor coincide com a faixa de pH do vacúolo digestivo do *Plasmodium* (Ridley et al., 1996), onde esta estrutura foi descrita pela primeira vez e do intestino médio de *R. prolixus* (Oliveira et al., 1999).

Estudos foram realizados sobre o mecanismo de formação de Hz e, até então, era amplamente assumido que hemozoína era simplesmente um produto de degradação, possivelmente constituído apenas de hemoglobina parcialmente degradada (Goldie et al., 1990). Entretanto, alguns autores, sugeriram que ela poderia consistir de Fe (III) PPIX associada com proteínas ricas em glicina (Ashong et al., 1989). Slater et al. (1991) assumiram que hemozoína era um polímero de heme. Em 1992, Slater & Cerami verificaram que o extrato de trofozoíto capaz de promover formação de hemozoína aparentemente era sensível ao calor e apresentava um pH ótimo em torno de 5, próximo ao pH do vacúolo digestivo. Isto os levou a propor a existência de uma enzima associada à formação de Hz, que foi denominada heme polimerase.

Dorn et al. (1995) mostraram que existe uma taxa de formação espontânea de hemozoína, que ocorre em temperatura fisiológica. Entretanto, a autocatálise se mostrou lenta para explicar a formação de hemozoína *in vivo*.

Bendrat et al. (1995) sugeriram que os lipídios promovem a formação de hematina e que tanto hemozoína como  $\beta$ -hematina são “contaminadas” com lipídios, o que justificaria o comportamento auto-catalítico. Dorn et al. (1998) investigaram o processo de formação de hemozoína *in vitro* e verificaram, inicialmente, que a formação de hematina ocorre espontaneamente mesmo na ausência de Hz pré-formada, após muitos dias de ensaio. No entanto, os mesmos autores verificaram que o processo é mais rápido quando foi adicionado um extrato acetônitrílico de trofozoítas de malária, resultado reproduzido quando lipídios eram utilizados no ensaio. Sullivan et al. (1996) mostraram que uma Proteína Rica em Histidina II (HRPII), abundante em *P. falciparum*, também é capaz de catalisar ou iniciar a formação de hemozoína *in vivo*. De acordo com Egan (2008a), a estrutura da hemozoína foi proposta como sendo um polímero de heme e o termo polimerização era muito usado. Porém, Pagola et al. (2000) verificaram que a hemozoína não é um polímero, mas sim um dímero de Fe(III)PPIX. No entanto, o processo de formação de Hz ainda é controverso. Segundo Egan (2008b) provavelmente, o crescimento do cristal é um processo autocatalítico, pois após ocorrer a nucleação (formação do primeiro dímero), outras moléculas aderem a este núcleo. A contribuição de proteínas, em maior escala, bem como de lipídios neste processo ainda é pouco compreendida. Devido a existência de poucas evidências acerca da função das

proteínas HRP na síntese de hemozoína, Jackson et al. (2004) investigaram a participação de lipídios neutros neste processo em *P. falciparum*. Um pouco depois, Pisciotta et al. (2007) alteraram a perspectiva do processo de formação de hemozoína, confirmando que o cristal é formado no interior dos corpos lipídicos dentro do vacúolo digestivo do parasita. A presença de proteína ou proteínas no processo de síntese de hemozoína havia sido totalmente excluída. No entanto, uma proteína presente em pequenas quantidades poderia agir como sítio de nucleação para a formação de hemozoína (Egan, 2008a). Em *Plasmodium*, tem sido sugerida a participação de HRP (Lynn et al., 1999) e em *Schistosoma mansoni* a influência de lipídios (Oliveira et al., 2005). Pandey et al. (2003) verificaram que a formação de Hz na presença de HRPII sozinha não é rápida o suficiente e também pode requerer a participação de lipídios. Em 2008, outro grupo de proteínas foi identificado como promotoras da síntese de Hz em *Plasmodium* (Jani et al., 2008). Esta proteína foi denominada HDP, do inglês “heme detoxification protein”.

Nosso grupo mostrou que uma  $\alpha$ -glucosidase da membrana perimicrovilar de *R. prolixus* promove a síntese de Hemozoína (Mury et al., 2009). Neste trabalho, foi mostrado que o anti-corpo anti- $\alpha$ -glucosidase e inibidores da atividade desta enzima, como eritritol e DEPC, são capazes de inibir a síntese de hemozoína *in vitro*. Além disso, o silenciamento do gene desta enzima, por injeção de dsRNA construído para o gene de uma  $\alpha$ -glucosidase de *Anopheles aquasalis*, resultou em um decréscimo da capacidade de síntese de Hz pelo *R. prolixus* (Mury et al., 2009).

## 1.6 – Glicosidases

As glicosidases formam um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas (Bhatia et al., 2002), que participam de processos bioquímicos fundamentais ao metabolismo como degradação dos polissacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades de monossacarídeos para obtenção de energia, biossíntese de glicogênio, biossíntese e modificação de  $\alpha$ -glicoproteínas celulares e catabolismo de peptideoglicanos e outros glicoconjugados (Ganem, 1996; Withers, 2010). Tais enzimas podem ser importantes também em eventos de sinalização celular, invasão viral, e estão presentes nos mamíferos, vegetais, microrganismos e insetos (Zechel & Withers, 2000).

Glicosidases são as primeiras enzimas da digestão nos insetos sugadores de seiva (Morgan, 1975). Entre as glicosidases, enzimas denominadas  $\alpha$ -glicosidases são encontradas no intestino médio dos insetos, na forma solúvel ou ligadas a membranas. As  $\alpha$ -glicosidases de membrana são proteínas integrais da membrana microvilar em células intestinais de Diptera (Espinoza-Fuentes & Terra 1986; Terra & Jordão, 1991). Na ordem Hemiptera, uma  $\alpha$ -glicosidase é encontrada associada às membranas perimicrovilares, que envolvem as microvilosidades e se projetam para a luz do tubo digestivo, algumas vezes formando múltiplas camadas sobre as microvilosidades das células do intestino médio, provavelmente em todos os hemípteros (Terra, 1988; Silva et al., 2004).

As  $\alpha$ -glicosidases são conhecidas também por outros nomes como: isomaltase, maltase, maltase ácida, glicoinvertase, glicosídeo-sacarase,  $\alpha$ -glicosidase lisossomal e maltase-glicosidase (Hakamata et al., 2009).

### **1.6.1 - Classificação e estrutura**

A Nomenclatura de Enzimas IUB (1984) baseia-se no tipo de reação que as enzimas catalisam e sobre a sua especificidade de substrato. Para as glicosil hidrolases ou glicosidases (EC 3.2.1.x), os três primeiros dígitos indicam enzimas que hidrolisam ligações O-glicosil enquanto que o último número indica o substrato e, às vezes, reflete o mecanismo molecular. Esta classificação é muito útil, especialmente para evitar ambiguidades e a proliferação de nomes triviais, e proporciona uma classificação original (Henrissat, 1991).

A classificação do grupo das glicosidases se dá de acordo com a especificidade da clivagem da ligação glicosídica, com relação ao número, posição ou configuração do grupo hidroxila na molécula de açúcar (Melo et al., 2006). Desse modo, o subgrupo das  $\alpha$ -glicosidases ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolases; EC 3.2.1.20) é formado por exo-glicosídeo hidrolases que são capazes de clivar os resíduos de  $\alpha$ -glicosil das extremidades não redutoras de substratos  $\alpha$ -ligados para liberar  $\alpha$ -D-glicose (Chiba, 1997). No mesmo trabalho, Chiba classificou as  $\alpha$ -glicosidases dentro de três grupos (I, II e III) dependendo do tipo do substrato. O primeiro grupo consiste nas  $\alpha$ -glicosidases típicas, que são mais ativas com phenyl- $\alpha$ -glicosídeo ou sacarose como substrato em vez de maltose. O segundo grupo consiste nas chamadas de “maltases” prontamente

hidrolisando maltooligossacarídeos. Enzimas do terceiro grupo exibem atividade maltase, e podem também hidrolisar  $\alpha$ -glucanos.

Henrissat (1991) classificou as glicosidases a partir da comparação da sequência de aminoácidos de 301 glicosil hidrolases. A partir daí foram criadas 35 famílias que englobam enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. As  $\alpha$ -glicosidases são encontradas principalmente nas famílias 13 e 31 das glicosídeo hidrolases (Henrissat, 1991; Lovering et al., 2005). As  $\alpha$ -glicosidases da família 13 são mais ativas em substratos heterogêneos como, por exemplo, p-nitrofenil  $\alpha$ -glicosídeo e sacarose do que em relação a maltose, e as enzimas dessa família são incluídas no grupo I. As enzimas da família 31 possuem preferência por substratos homogêneos como maltose, maltotriose e maltotetraose em comparação com os substratos heterogêneos, e compreende as  $\alpha$ -glicosidases do grupo II e III. Além disso,  $\alpha$ -glicosidases do grupo III hidrolisam polissacarídeos, como por exemplo, amilose e amido (Chiba, 1997; Frandsen e Svensson, 1998; Macgregor et al., 2001). As enzimas da família 13, são aquelas produzidas por *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *Bacillus* sp. e insetos. Na família 31, estão inseridas as enzimas de plantas, mamíferos e fungos como *A. niger*, *M. javanicus*. (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993; Chiba, 1997; Frandsen & Svensson, 1998; Naested et al.; 2006).

As  $\alpha$ -glicosidases são enzimas essenciais para a digestão dos carboidratos. Elas clivam a maltose e as unidades menores de oligossacarídeos, após a hidrólise do amido pela  $\alpha$ -amilase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo (Shine et al., 2008). Unidades terminais de glicose da amilose ou da amilopectina, também são clivadas pela  $\alpha$ -glicosidase, embora ela tenha preferência por malto-oligossacarídeos menores, liberando glicose com uma configuração  $\alpha$  (van der Maarel et al., 2002).

Desde o trabalho de Henrissat de 1991, tem sido observado que a classificação das famílias de glicosídeo hidrolases baseada apenas na sequência de aminoácidos agrupou enzimas de diferentes especificidades ao substrato, ou seja, enzimas com diferentes números EC. Atualmente, o CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes database-<http://www.cazy.org>) disponibiliza acesso contínuo e online à classificação de famílias baseada além da sequência, na especificidade e na estrutura 3D de enzimas que montam, modificam ou quebram oligo e polissacarídeos.

As  $\alpha$ -glicosidases são encontradas em cinco famílias de glicosídeo hidrolases (GHs): GH4, GH13, GH31, GH97 e GH122, baseado no sistema de classificação “Carbohydrate-Active enZymes” (CAZy) (Cantarel et al., 2009). A família 13 (família

$\alpha$ -amylase) inclui  $\alpha$ -amylases,  $\alpha$ -glucosidases, pullulanases, ciclodextrina glucanotransferases, 1,4-  $\alpha$ -D-glucano, entre outras. As enzimas da família 13 têm características estruturais comuns específicas, tais como o domínio catalítico ( $\beta/\alpha$ )8-barril, que age especificamente em ligações  $\alpha$ -1,4- e  $\alpha$ -1,6-O-glucosídicas (Henrissat, 1991; Jespersen et al., 1993; Svensson, 1994; Janecek, 2000).

### 1.7 – $\alpha$ -Glucosidases

As  $\alpha$ -glucosidases ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolase; EC 3.2.1.20) catalisam a exohidrólise de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 das extremidades não redutoras de oligo ou polissacarídeos (NC-IUBMB, 2006). A ligação glicosídica é uma das ligações químicas mais estáveis na natureza, com uma meia-vida para hidrólise espontânea de aproximadamente 5 milhões de anos (Zechel & Whitters, 2000). Sequências gênicas de milhares dessas importantes enzimas têm sido determinadas e as enzimas correspondentes agrupadas em famílias (família 1 a família 106) com base na similaridade de suas seqüências (Campbell et al., 1997). As  $\alpha$ -glucosidases são encontradas principalmente nas famílias 13 e 31 e, em menor extensão, nas famílias 4 e 63 das glicosídeo hidrolases (Lovering et al., 2005).

Estudos realizados com  $\alpha$ -glucosidase de *Entamoeba histolitica* mostraram indícios de que existem resíduos de histidina no sítio catalítico desta enzima (Bravo-Torres et al., 2004). Estas observações foram possíveis pela utilização de uma droga (dietilpirocarbonato - DEPC) capaz de modificar resíduos de histidina. Sullivan et al. (1996) identificaram proteínas ricas em histidina como candidatas a catalisadoras do mecanismo de agregação de heme.

Glucosidases são as primeiras enzimas da digestão nos insetos sugadores de seiva (Morgan, 1975), mas a presença de uma alta atividade dessas enzimas em insetos hematófagos, como *R. prolixus*, sugere que estas são também importantes para insetos que se alimentam de sangue (Silva et al., 2004).

Em *Rhodnius prolixus* a atividade desta enzima está diretamente relacionada com as membranas perimicrovilares, sugerindo a participação dessas membranas na síntese de hemozoína (Silva et al., 2007). Provavelmente, a pressão evolutiva determinou uma função diferente para esta enzima nestes animais, visto que, proteína, e



não carboidrato é o nutriente majoritário presente nas dietas de insetos sugadores de sangue.

### 1.7.1 - Alfa-glucosidases em insetos

Em insetos, a digestão de carboidratos, tanto a inicial quanto a intermediária, é realizada por  $\alpha$ -amilases e a digestão final por  $\alpha$ -glucosidases intestinais (Terra e Ferreira, 2005 e 2012). Muitas propriedades do extrato bruto ou parcialmente purificado da  $\alpha$ -glucosidase de intestino de insetos são conhecidos, mas apenas alguns estudos relatam sobre a especificidade da  $\alpha$ -glucosidase através de valores cinéticos (Terra e Ferreira, 2005). A ocorrência de uma série de isoformas com diferentes especificidades parece estar relacionada com uma participação destas enzimas durante a digestão de carboidratos. Na alimentação de floema Hemipteros da subordem Sternorrhyncha, como pulgões e moscas brancas,  $\alpha$ -glucosidases parecem estar envolvidas não só na hidrólise da sacarose dietética abundante, mas também na osmorregulação no intestino médio através da sua atividade transglucosidase (Ashford et al., 2000).

As  $\alpha$ -glucosidases de insetos podem ser encontradas no intestino médio na forma solúvel ou ligada à membrana. As solúveis podem ocorrer no lúmen do intestino médio, como observado em Coleoptera (Colepico-Neto et al., 1986; Baker, 1991), e Himenoptera (Schumaker et al., 1993) ou podem permanecer no interior do glicocálix, como encontrado em Lepidoptera (Ferreira et al., 1993). Em *Musca domestica* (Diptera), uma  $\alpha$ -glucosidase é encontrada no lúmen intestinal e uma outra permanece no glicocálix (Terra & Jordão, 1989). As  $\alpha$ -glucosidases de membrana são proteínas integrais da membrana microvilar em células intestinais de Diptera (Terra e Jordão, 1991).

Em *Phlebotomus langeroni* foi observado que a atividade de  $\alpha$ -glucosidase aumentou significativamente 1h após a alimentação com sangue e foi mantida até 48hs após a alimentação enquanto que, quando outro grupo de insetos foram alimentados com sacarose, a atividade também aumentou 1h após a alimentação, porém essa não se manteve (Dillon e Kordy, 1997).

A atividade de  $\alpha$ -glucosidase foi detectada também em glândulas salivares dos mosquitos *Aedes albopictus* (Marinotti et al., 1996) e *Anopheles darlingi* (Moreira-Ferro et al., 1999). Marinotti et al. (1990) detectaram também uma  $\alpha$ -glucosidase

secretada pelas glândulas salivares de *Ae. aegypti*, em resposta à ingestão de açúcares ou sangue.

Estudos mostraram a atividade de  $\alpha$ -glucosidase no intestino de *Anopheles stephensi*, antes e após uma refeição sanguínea (Billingsley e Hecker, 1991) e no intestino médio dos flebotomíneos *Phlebotomus*, *Lutzomyia longipalpis* (Gontijo et al., 1998) e *Phlebotomus papatasi* (Jacobson e Schlein, 2001), sendo correlacionadas com a digestão de sacarose. Souza-Neto et al., (2007) identificaram três diferentes  $\alpha$ -glucosidases no intestino médio das fêmeas de *Anopheles aquasalis*. A presença desta enzima foi identificada por caracterização bioquímica e pela identificação dos três fragmentos codificantes para  $\alpha$ -glucosidases e transcritos codificantes para  $\alpha$ -glucosidases nos tecidos epiteliais do intestino médio. Em estudos com o mosquito *Anopheles stephensi*  $\alpha$ -glucosidases ligadas a membranas foram detectadas apenas na região médio-anterior do intestino médio após a alimentação sanguínea, ao passo que toda atividade  $\alpha$ -glucolítica encontrada no intestino médio-posterior estava restrita ao lúmen intestinal (Billingsley e Hecker, 1991).

O pH ótimo encontrado para atividade das  $\alpha$ -glucosidases de insetos varia entre 5,0-6,5 e a massa molecular aparente ( $M_r$ ) entre 60-80 kDa. Em *Anopheles aquasalis*, a hidrólise do substrato por uma  $\alpha$ -glucosidase ocorre em torno do pH 5,5, o que a classifica como  $\alpha$ -glucosidase ácida (Terra et al., 1996).

### **1.7.2– Alfa-glucosidase e a síntese de H<sub>z</sub> em *R. prolixus***

O processo de biocristalização de heme em H<sub>z</sub> tem sido mostrado em um grande número de organismos, como citado anteriormente. Entretanto, o mecanismo de formação do cristal é pouco conhecido. Em *R. prolixus* foi verificado inicialmente que a atividade  $\alpha$ -glucosidase aumenta significativamente nos quatro primeiros dias após o repasto sanguíneo (Silva et al., 2007). Este aumento coincide com o aumento de H<sub>z</sub> no lúmen intestinal desta espécie. Como esta enzima é um marcador enzimático das MPMV (Silva et al., 1995; 2004), foi sugerida a participação destas membranas no processo de biomineralização de heme (Silva et al., 2007). Posteriormente foi mostrado que a  $\alpha$ -glucosidase presente nestas membranas tem, de fato, um papel fundamental na síntese de H<sub>z</sub> em *R. prolixus* (Mury et al., 2009). Seu papel parece ser o de nucleadora, iniciando o processo que culmina na formação do cristal. Já nos momentos iniciais do processo digestivo, a cristalização do heme parece ser bastante eficiente do ponto de

vista fisiológico, já que 97% do heme derivado da hemoglobina está na forma de Hz no intestino médio de *R. prolixus* (Stiebler et al., 2010). Stiebler et al. (2011) propuseram que a liberação de heme e seu rápido sequestro pela  $\alpha$ -glucosidase permite a formação dos primeiros cristais que, em seguida, são alongados na interface hidrofílica-hidrofóbica formada pelos lipídeos das MPMV. Após se desprenderem das membranas perimicrovilares, os cristais por autocatálise, aumentam de tamanho, numa etapa mais lenta de formação de Hz.

Nosso grupo vem trabalhando com o processamento e detoxificação de heme por artrópodes hematófagos. Já foram descritos pelo grupo mecanismos de detoxificação de heme em *Aedes aegypti* – através da sua ligação com a matriz peritrófica (Páscoa et al., 2002), *Rhipicephalus microplus* – através da formação do hemossomo em células digestivas (Lara et al., 2003), e *R. prolixus* – através da formação de Hz (Oliveira et al., 1999). Mais recentemente, estudando o processo de formação de Hz, vimos que as MPMV eram estruturas responsáveis por este processo em *R. prolixus* (Silva et al., 2007). Investigando o fator presente nessas membranas que seria responsável por esta atividade foi descoberto que o fator era termolábil. Isso nos remeteu à enzima marcadora destas estruturas, uma  $\alpha$ -glucosidase, como o provável fator chave na síntese de Hz no intestino médio deste inseto (Mury et al., 2009). Inibidores clássicos para  $\alpha$ -glucosidase, como castanospermina, eritritol e mesmo um anticorpo produzido contra uma  $\alpha$ -glucosidase de *Dysdercus peruvianus* foram todos capazes de inibir a formação de Hz tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Somado a isso, foi verificado ainda que o silenciamento do gene da  $\alpha$ -glucosidase, por injeção de uma ds-RNA, causa uma forte redução na formação de Hz (Mury et al., 2009).

Paralelamente nós temos mostrado que membranas perimicrovilares de outros hemípteras, como *Dysdercus peruvianus* e *Quesada gigas*, também são capazes de promover a síntese de Hz *in vitro* (Calegario et al., em preparação). Estes resultados indicam que a capacidade de  $\alpha$ -glucosidases de formar Hz já existia neste grupo de enzimas e, provavelmente, esta característica favoreceu o aparecimento da hematofagia neste grupo.

Neste contexto, o presente projeto tem por objetivo avançar no entendimento do processo de síntese de hemozoína, principalmente, em termos fisiológicos.

## 2 – JUSTIFICATIVA

O papel das  $\alpha$ -glucosidases na formação de Hz ainda não foi completamente elucidado. Dados do grupo mostraram que uma  $\alpha$ -glucosidase da MPMV intestinal de *Rhodnius prolixus* é responsável pela síntese de Hz nesta espécie, possibilitando a ingestão de sangue sem os efeitos tóxicos que o heme poderia produzir no interior do inseto (Mury et al., 2009). As informações sobre a estrutura e a capacidade de biocristalizar o heme pelas  $\alpha$ -glucosidases de diferentes espécies (hematófagas e não hematófagas) poderão ser a chave para entender a plasticidade funcional desta enzima, em resposta à pressão seletiva. Conhecer esse sistema e como as diferentes espécies se adaptaram ao longo da evolução, pode ser um caminho para o desenvolvimento de novas drogas com ação sobre a interação patógeno/vetor ou com ação inseticida direcionada a insetos hematófagos.

Por muito tempo não existiu consenso acerca dos fatores responsáveis pela síntese de hemozoína. Evidências da participação de lipídios como catalisadores na formação de Hz em *P. falciparum* já foram descritos em 1997 por Ridley et al.. Outros trabalhos apontaram a presença de proteínas ricas em resíduos de histidina com atividade de biocristalização de heme, também em *P. falciparum* (Sullivan, 1996) e em 2008, Jani et al. descrevem uma proteína de detoxificação de heme (HDP) supostamente envolvida na síntese de hemozoína em *P. falciparum*. Silva et al. (2007) observaram que há atividade de síntese de hemozoína na fração proteica de epitélio intestinal de *R. prolixus*. No entanto, observou-se um sinergismo quando frações lipídica e proteica foram associadas. Mais atualmente, trabalhos de Egan (2008a, 2008b) propõem que a formação de Hz aconteça na interface lipídeo-água. Stielbler et al. (2011) mostraram que, em *R. prolixus*, a interface lipídeo-água também é essencial para a síntese e que para a etapa de nucleação do cristal é necessária uma  $\alpha$ -glucosidase de membrana. Assim, embora alguns avanços tenham sido alcançados nos últimos anos, o mecanismo de síntese ainda é pobremente entendido.

Dados na literatura mostram que drogas anti-malária, como a cloroquina, atuam no *Plasmodium* através da inibição da síntese de hemozoína (Sullivan et al., 1996; Ridley et al., 1997). A ação eficaz do mesmo grupo de drogas anti-malária em *Schistosoma mansoni* (Corrêa-Soares et al., 2009), levando em consideração o mecanismo de inibição da síntese de Hz, possibilita utilizar o processo de formação de Hz como um alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento

de doenças causadas ou transmitidas por agentes formadores de H<sub>2</sub>. Assim, estudar a participação de  $\alpha$ -glucosidases no processo de biomineralização de heme em *R. prolixus* pode ajudar a elucidar os mecanismos que regem esse importante sistema antioxidante e, conseqüentemente, fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas metodologias de combate a doenças transmitidas por vetores.

### 3 – OBJETIVO GERAL

Verificar se  $\alpha$ -glucosidases apresentam como atividade secundária a biocristalização de heme em *R. prolixus* e outros organismos biológicos.

#### 3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Investigar a expressão dos genes das  $\alpha$ -glucosidases em diferentes tecidos de *R. prolixus*;

✓ Investigar a influência da alimentação na atividade e na expressão das diferentes  $\alpha$ -glucosidases de *R. prolixus*;

✓ Verificar a influência do silenciamento de genes de  $\alpha$ -glucosidases na síntese de hemozóina e na atividade de  $\alpha$ -glucosidase;

✓ Verificar se  $\alpha$ -glucosidases de outros organismos (hematófagos e não-hematófagos) são capazes de catalisar a formação de hemozóina *in vitro*.

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – Materiais Biológicos

Os materiais biológicos utilizados neste trabalho foram:

- *Rhodnius prolixus* – Inseto – Ordem: Hemiptera – colônia mantida no laboratório – SEBIN, LQFPP, UENF.

- *Callosobruchus maculatus* larva e adulto – Inseto – Ordem: Coleoptera - doados pela Dr<sup>a</sup>. Elenir Amâncio (LQFPP, CBB, UENF).

- *Tribolium castaneum* larva e adulto – Inseto – Ordem: Coleoptera - doados pelo Dr. Gustavo Rezende (LQFPP, CBB, UENF).

- *Arabidopsis thaliana* – Planta – Ordem: Brassicales - cedidas pelo Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (LBT, CBB, UENF).

- *Saccharomyces cerevisiae* – Fungo – Ordem: Saccharomycetales - cortesia do Dr. Lev Alexandrovitch Okorokov (LFBM, CBB, UENF).

- *Bacillus thuringiensis* - Bactéria – Ordem: Bacillales - cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Marília Amorim Berbert de Molina (LBT, CBB, UENF).

- *Toxoplasma gondii* - Protozoário – Ordem: Eucoccidiorida - cortesia do Dr. Renato DaMatta (LBCT, CBB, UENF).

- *Schistosoma mansoni* – Platelmino – Ordem: Strigeiformes - cortesia do Dr. Marcus Fernandes de Oliveira (IBqM, UFRJ).

- Células Vero - células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) - cortesia do Dr. Renato DaMatta (LBCT, CBB, UENF).

Todos esses materiais foram mantidos nos seus respectivos laboratórios.

### 4.2– Colônia de *Rhodnius prolixus*

A colônia de *Rhodnius prolixus* foi mantida em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), CBB, UENF, a uma temperatura de 28°C, e umidade relativa de aproximadamente 80%. A colônia de *R. prolixus* é mantida no laboratório desde 1995 e teve sua origem a partir de uma colônia mantida pelo Laboratório de Bioquímica de insetos, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqM), UFRJ.

### 4.3 – Alimentação do *Rhodnius prolixus*

*R. prolixus* foram alimentados com uma periodicidade de 21 dias para adultos e 30 dias para os diferentes estágios, com sangue de coelho, diretamente na orelha dos animais imobilizados em caixas de contenção. No caso de dietas artificiais, foi utilizado um alimentador artificial descrito por Garcia et al. (1975). Dietas artificiais com plasma de coelho foram usadas para alimentar os insetos adultos, com a intenção de limpar o intestino dos mesmos, para eliminação do heme que fica impregnado no intestino.

### 4.4 – Preparação das amostras biológicas

Quatro dias após alimentação com sangue ou plasma de coelho, os intestinos de *R. prolixus* foram dissecados. Destes insetos foram retirados o intestino médio posterior, intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovários em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4. Os epitélios intestinais foram colocados em tubo de polipropileno, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70°C, para extração de RNA total e extração de proteínas.

Para investigar a expressão gênica, o intestino médio posterior, intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovários de fêmeas injetadas com as diferentes dsRNAs foram também dissecados 4 dias após a injeção e posterior alimentação.

Para avaliar a atividade da  $\alpha$ -glucosidase de outros organismos e sua capacidade de cristalização de heme *in vitro*, foram utilizados os intestinos de fêmeas de *R. prolixus* que foram usados como controle positivo (Silva et al., 2007). Os intestinos foram lavados em água deionizada para remover o conteúdo luminal e homogeneizados. O mesmo procedimento foi aplicado para *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*. A forma circulante do adulto de *Schistosoma mansoni*, foi lavada em água deionizada e centrifugada a 8000 xg por 15 min a 4 °C; depois, o precipitado foi usado para o procedimento de extração de proteínas descrito abaixo. Folhas de *Arabidopsis thaliana*, foram maceradas em nitrogênio líquido e solubilizadas em água destilada. Fase log de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Toxoplasma gondii* e Células Vero (ATCC® CCL-81™), foram colhidos, lavados em água deionizada e centrifugados a 8000 xg por 15 min a 4 °C.



Demais condições experimentais são indicadas nas legendas das respectivas figuras. Em todos os casos, os tecidos foram limpos em água deionizada ou solução salina (NaCl 0,15 M) e processados conforme descrito nas seções seguintes.

#### **4.5 – Extração de proteínas de amostras**

Cada amostra foi homogeneizada em água destilada usando um homogeneizador do mecânico do tipo Potter-Elvehjem, seguido de 5 ciclos de congelamento de descongelamento em nitrogênio líquido. Entre cada ciclo, as amostras foram centrifugadas a 15000xg por 30min a 4°C. Proteínas ligadas a membranas celulares foram extraídas pelo tratamento do precipitado com 0,1% Nonidet P-40 (NP-40) por 12h a 4°C em 20mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4, imidazol 5 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM (Silva et al., 2007). As amostras foram incubadas por 16h no mesmo tampão a 4° C com agitação. Depois foram centrifugadas a 15000xg por 30 min a 4°C, e a concentração das proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al.,1985). A curva padrão foi realizada utilizando ovoalbumina (SIGMA – USA).

#### **4.6 – Síntese de hemozoína *in vitro***

Alíquotas de extratos proteicos contendo 12µg/mL de proteína foram incubadas durante 24 h a 28 °C em 0,5 M de acetato de sódio, pH 4,8, na presença de 100 mM de hemina (Sullivan et al., 1996). Após a incubação, a reação foi centrifugada a 15.000 xg durante 15 min a 25 °C. O sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, 2,5% de SDS, pH 9,1, e duas vezes com água deionizada. O sedimento final foi solubilizado em NaOH 0,1 M, e a quantidade de heme foi determinada a 400 nm em um espectrofotômetro Shimadzu / UV-1240.

Alternativamente, foram utilizados um inibidor específico da  $\alpha$ -glucosidase, o eritritol (100 mM), dietilpirocarbonato (DEPC) (10 mM) e um inibidor específico da hemozoína, a cloroquina (20 mM), que foram incubados com as amostras e a quantidade de Hz formada foi avaliada.

#### **4.6.1– Extração de Hz**

A hemozoína formada a partir das incubações *in vitro* foi extraída através de um processo de solubilização baseado no método descrito por Sullivan et al. (1996). Após 24 h de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 15300 xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (Hz) ressuspense em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,2) + SDS 2,5 %. Posteriormente os tubos permaneceram sob agitação por 15 min a temperatura ambiente seguido de uma centrifugação a 15300 xg por 15 min. Novamente o sobrenadante obtido foi descartado e o processo de lavagem com o tampão carbonato-bicarbonato foi repetido por mais duas vezes. Após a última etapa de extração, procederam-se duas lavagens, agitando e centrifugando a 15300 xg com água destilada, pelo mesmo período utilizado com tampão. Após este procedimento, a hemozoína resultante foi sedimentada por centrifugação na mesma velocidade e ressuspensa em 1 mL de NaOH 0,1 N e agitada por 20 min a temperatura ambiente (Silva et al., 2007) para ser novamente solubilizada, assumindo a forma de heme.

#### **4.6.2– Dosagens de heme/Hz**

As dosagens de heme foram realizadas utilizando-se uma curva padrão com hemina bovina comercial (SIGMA) diluída em NaOH 100 mM. A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de hemina na concentração de 1 mM. A leitura do heme contido nas amostras foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu/UV-1240, utilizando um filtro com comprimento de onda de 400nm.

#### **4.7 – Ensaio de atividade de $\alpha$ -glucosidase**

A atividade enzimática foi determinada utilizando *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (10 mM) (Sigma Aldrich Co., EUA) em tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,5, de acordo com o método de Terra et al. (1979). Todos os ensaios foram realizados a 30 °C. As incubações foram realizadas durante quatro períodos de tempos diferentes (15, 30, 45 e 60 min). As reações foram paradas com 200  $\mu$ L de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 0,5 M e as taxas iniciais de hidrólise foram calculadas. A absorvância

de  $\rho$ -nitrofenolato liberado foi lida a 405 nm. Alternativamente, eritritol (100 mM), DEPC (10 mM) ou cloroquina (20 mM), foram incubados com as amostras e a atividade de  $\alpha$ -glucosidase foi medida pela formação de  $\rho$ -nitrofenolato.

#### **4.8 Bases de dados da seqüência gênica de *R. prolixus***

O genoma de *R. prolixus* foi sequenciado pelo Sequencing Genome Center da Faculdade de Medicina da Universidade de Washington (TGI 2012). A partir dos dados do genoma disponíveis, duas previsões de regiões de splicing foram feitas: a projeção feita pela Equipe de Bioquímica do Laboratório de Vetores de Doenças (LBVD) da UFRJ, Rio de Janeiro, chamado de "projeção Lagerblad" (Lagerblad, 2012), e da projeção feita pelo grupo VectorBase (VECTORBASE-*Rhodnius prolixus*, 2012).

A partir da seqüência parcial da  $\alpha$ -glucosidase de *R. prolixus* obtida por Mury et al. (2009), denominada neste trabalho de  $\alpha$ -glu F, outras  $\alpha$ -glucosidases foram encontradas no banco de dados da projeção Lagerblad e do VectorBase de *R. prolixus*, usando a ferramenta de busca HMMER. Estas proteínas encontradas no genoma do *Rhodnius* foram extensivamente analisadas em relação a outras  $\alpha$ -glucosidases de insetos e não insetos, por alinhamento múltiplo de seqüências e análise filogenética (Gutierrez, 2013).

#### **4.9 – Silenciamento das $\alpha$ -glucosidases por injeção de dsRNA**

Vinte e um dias depois da alimentação de sangue, um volume de 2  $\mu$ L de dsRNA numa diluição de 4  $\mu$ g/ $\mu$ L foram injetados intratoracicamente na hemocele de fêmeas adultas de *R. prolixus* usando uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ L. Foram utilizados grupos de 15 fêmeas para cada ds $\alpha$ -Glu A, B, C, D, E e F. Os insetos usados nos experimentos foram de segunda alimentação com sangue de coelho, sendo alimentados 2 h após a injeção. Após 4 dias desde a 2<sup>a</sup> alimentação, os tecidos (corpo gorduroso, ovários, intestino médio anterior e intestino médio posterior) foram colhidos e armazenados em Trizol a -80°C até à extração de RNA. Um grupo controle foi injetado com uma dupla-fita não relacionada, de um gene resistente a neomicina (dsNeo) selecionado a partir de um plasmídeo com duas enzimas de restrição (Kelly et al., 1992) e insetos não injetados também foram utilizados como controle (Brandt et al., 2008).

#### **4.10 – Extração de RNA total**

O RNA total foi extraído a partir de intestinos médios de *R. prolixus* utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Estes foram dissecados e homogeneizados em 1mL de Trizol, em um tubo eppendorf 1,5 mL utilizando um pistilo de polipropileno. Em seguida, centrifugou-se o material a 15000xg por 15 min a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e este foi transferido para um novo tubo, visando a eliminação de restos celulares e membranas. Adicionou-se 200µL de clorofórmio ao sobrenadante coletado e agitou-se vigorosamente incubando por 3 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 15000 xg por 15 min a 4°C. Ao final da centrifugação foi possível distinguir uma fase inferior correspondente ao fenol-clorofórmio e uma fase superior aquosa que continha o RNA de interesse. Essa fase foi, então, coletada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Após a adição de igual volume de isopropanol, a amostra foi agitada manualmente e incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Lavou-se o precipitado com 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se, ressuspensando as amostras de RNA em 20 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC incubando a 56°C por 10 min (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

#### **4.11 – Dosagem de RNA**

As amostras de RNA foram quantificadas por determinação da absorbância a 260 e 280 nm no aparelho Nanodrop Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA), conforme instruções do fabricante.

#### **4.12 – Remoção da contaminação por DNA genômico**

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Fermentas). Em um tubo de 0,2 mL mantido em gelo foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL do tampão de DNase I (10X), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e água-DEPC 0,1% suficiente para completar o volume para 10 µL. As reações foram incubadas durante 30 min a 37 °C. Após essa reação adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mM, e incubou-se a reação a 65 °C por 10 min.

#### 4.13 – Síntese da primeira fita de DNA complementar

Para a síntese de cDNA utilizou-se o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Aos 11 µL obtidos na etapa anterior foram adicionados 2,2 µL do tampão de reação (10X), 0,88 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de oligonucleotídeos aleatórios (10X), 1,1 µL da enzima Transcriptase Reversa (50 U/µL) e água-DEPC 0,1% para completar 22 µL. As reações foram incubadas por 10 min a 25 °C, seguido por uma incubação a 37 °C durante 2 h e finalmente, a 85 °C por 5 min. As amostras de cDNA foram estocadas a -20 °C até o uso.

#### 4.14 – Desenho dos Iniciadores

Para análise da expressão gênica de  $\alpha$ -glu de *R. prolixus*, iniciadores foram desenhados a partir das sequências de  $\alpha$ -glucosidase utilizando o programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000). As sequências destes iniciadores e dos iniciadores dos genes de referência (Majerowicz et al., 2011) são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência de iniciadores usados para amplificação de RT-PCR e qPCR.

| Gene                 | Sense (5' – 3')        | Anti-sense (5' – 3')  | Amplicon (pb) |
|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------|
| <b><i>αgluA</i></b>  | GCTGGTCTGTATGGCTGCTT   | TTAGCTATTAGAATTATAAAC | 227           |
| <b><i>αgluB</i></b>  | CGAAGCCATCAACAACATCA   | TTGAAAAGTGGTAATCCCGG  | 123           |
| <b><i>αgluC</i></b>  | TGGACACTTATATGGGCAGAAA | ATCAAGAAAAAGAAGCCGCA  | 164           |
| <b><i>αgluD</i></b>  | CCACAGCAGAGGAATGGAAT   | TTACCAGGATACGTGAGCAG  | 118           |
| <b><i>αgluE</i></b>  | TGGAGGCTTTAGGGTTGATG   | ATAATGGTTGGATATGTGAAC | 195           |
| <b><i>αgluF</i></b>  | CCAACCATTTCGAGTAATCTG  | TAACTGGGTTCTGGGCAATC  | 196           |
| <b><i>RPEF*</i></b>  | GATTCC ACTGAACCGCCTTA  | GCCGGGTTATATCCGATTTT  | 218           |
| <b><i>RP18S*</i></b> | TCGGCCAACAAAAGTACACA   | TGTCGGTGTAAGTGGCATGT  | 104           |

\* Iniciadores descritos por Majerowicz et al. (2011)

#### **4.15 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para as reações em cadeia da polimerase foi utilizada a enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas). As misturas de reação para PCR continham 1 µL de cDNA, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de cada iniciador, 2 µL de tampão para Taq DNA Polimerase, 0,16 µL da enzima Taq DNA Polimerase 5 U/µL e água ultra pura autoclavada para completar um volume final de 20 µL. As amostras foram levadas ao termociclador sob o seguinte programa: 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; e 72 °C por 5 min. Para a amplificação do cDNA alvo, foram utilizados iniciadores senso e anti-senso específicos, desenhados para o gene de interesse. O cDNA de RNA ribossomal 18S de *R. prolixus* (MAJEROWICZ et al., 2011) foi amplificado como controle positivo. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 0,2 µg/mL em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8). Após a eletroforese, seguiu-se a visualização sob luz ultravioleta em transiluminador UV e os géis foram fotografados.

#### **4.16 – Produção da dupla fita de RNA (dsRNA)**

A produção de dsRNA para o silenciamento gênico por RNA interferente foi realizada utilizando MEGAScript RNAi Kit (Ambion Inc., Applied Biosystems). Em um microtubo de 1,5 ml foi adicionado 1 µg de amostra de cDNA, os nucleotídeos (ATP, CTP, GTP, UTP) e a enzima T7 polimerase. O material foi homogeneizado gentilmente e incubado por 12h a 37 °C. Após a transcrição dos fragmentos em ambas orientações, duas fitas complementares foram geradas no mesmo tubo. Desta forma, foi necessário anelar estas duas fitas para a formação do dsRNA. Para isso, as amostras foram incubadas a 75 °C por 5 min e em seguida resfriadas naturalmente em temperatura ambiente. Após a formação do dsRNA, o material passou por um tratamento com DNase/RNase, realizado a 37 °C por 1h. Este passo é necessário para a digestão das demais fitas de ácidos nucléicos, tais quais os moldes de DNA e qualquer RNA simples-fita que não tenha se anelado a outra molécula complementar. Após a digestão com as nucleases, a reação foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 ml e a ele foram adicionados 50 µL do tampão de ligação (10X), 250 µL de etanol 100% (Merck, Darmstadt, Germany) e H<sub>2</sub>O-DEPC 0,1% (Merck, Darmstadt, Germany). A

qualidade do dsRNA produzido foi avaliada por visualização do material em gel de agarose. A quantificação do produto da reação foi realizada por espectrometria em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific). O dsRNA produzido foi estocado a -20°C até o uso.

#### 4.17- Análise da expressão da $\alpha$ -glucosidase por PCR em Tempo Real

Para reações de PCR em tempo real, foram utilizados 7,5  $\mu$ L de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) misturados com 0,75  $\mu$ L de cada iniciador (Tabela 1) a 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de água ultrapura e 5  $\mu$ L de cDNA a 10ng (Cf = 50ng), em um volume final de 15  $\mu$ L. As reações foram realizadas no sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems, CA, EUA) sob as seguintes condições: primeiro ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15s a 95 °C, e o ultimo ciclo durante 1 min a 60 °C. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, e a expressão do gene foi normalizada utilizando um factor de alongamento (RpEF) envolvido na síntese de proteínas (Majerowicz et al., 2011). A análise de dados foi realizada usando o método 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001). Os iniciadores utilizados para a alfa-glucosidase de amplificação por PCR estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados na síntese de dsRNA**

| dsRNA primer                     |                              |                                   |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Gene                             | Sense (5' – 3') <sup>1</sup> | Anti-sense (5' – 3') <sup>1</sup> |
| <b><math>\alpha</math>-glu A</b> | ATTACCAGCGGCAAAGATTG         | AAAGTATCTGGCCACCAACG              |
| <b><math>\alpha</math>-glu B</b> | GGGTGCCAGATAACGAAGAG         | CCGGGATTACCACTTTTCAA              |
| <b><math>\alpha</math>-glu C</b> | TGGCATTGGCGATTTAAAAG         | CCAGCAAGGAAACCCAATTA              |
| <b><math>\alpha</math>-glu D</b> | AGAATGATTTGGGTGGTGTG         | CCTTCAGTTTTTGGGGGTTT              |
| <b><math>\alpha</math>-glu E</b> | CAAGATGCTGCTGGAAAACA         | TGTAGTCATTGCGCCCCATTA             |
| <b><math>\alpha</math>-glu F</b> | TGGCCGTTATGAGGACTAC          | CAACTCTCCCATTCGTACA               |

<sup>1</sup>Para todos os iniciadores descritos incluímos a sequência do promotor T7 (TAATACGACTCACTATAG).

#### **4.18 – Análise dos dados**

Os dados foram analisados utilizando o método de quantificação relativo  $\Delta\Delta C_t$ , calculados a partir dos valores de  $C_t$  (“threshold cycle”, ou seja, o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade de fluorescência definida), obtidos através do PCR em tempo real, segundo Norgard et al. (2006). Os valores de  $\Delta C_t$  foram utilizados para as análises estatísticas pelo método ANOVA. Os valores de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) serão utilizados apenas para montagem dos gráficos.

#### **4.19 – Análise estatística**

Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste T de Student com organização não-pareada de dados. As médias dos valores de  $\Delta\Delta C_t$  obtidos nos experimentos para avaliar a expressão relativa, foram comparadas através de teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, sendo consideradas significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software). Para todos os testes, uma diferença de  $P < 0,05$  foi considerada significativa.



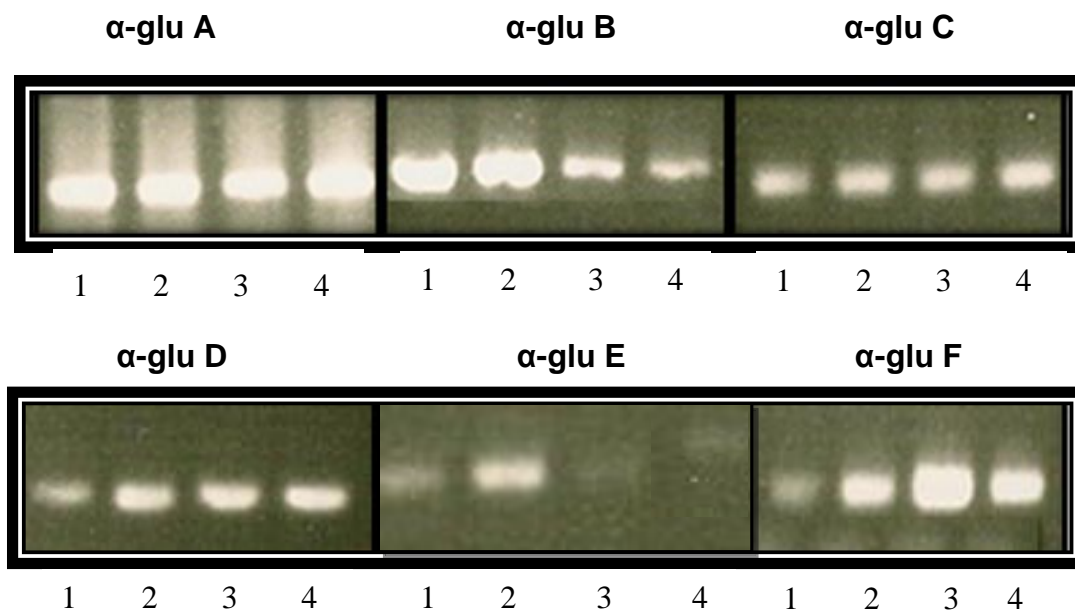
## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – Expressão dos genes da $\alpha$ -glu em diferentes tecidos de *R. prolixus*

As  $\alpha$ -glucosidases detectadas no genoma de *R. prolixus* foram nomeadas como  $\alpha$ -glucosidase A ( $\alpha$ -gluA - RPRC006247-PA),  $\alpha$ -glucosidase B ( $\alpha$ -gluB - RPRC010194-PA),  $\alpha$ -glucosidase C ( $\alpha$ -gluC - RPRC012963-PA),  $\alpha$ -glucosidase D ( $\alpha$ -gluD - RPRC006918-PA) e  $\alpha$ -glucosidase E ( $\alpha$ -gluE - RPRC012570-PA). A enzima descrita por Mury et al (2009) ainda não foi identificada no genoma do *R. prolixus*. Esta sequência foi chamada no presente trabalho de  $\alpha$ -glucosidase F ( $\alpha$ -GluF - Rpro|ACI96031.1).

Em 2009, Mury e colaboradores mostraram que a injeção de dsRNA utilizando uma sequência de  $\alpha$ -glu de *Anopheles aquasalis* podia silenciar o mesmo gene em *Rhodnius prolixus* e que este tratamento era capaz de diminuir, não só a atividade hidrolítica da  $\alpha$ -glucosidase, mas também diminuía a formação de hemozoína no lúmen dos insetos tratados. No presente trabalho, nós refinamos a análise utilizando genes do próprio inseto, no intuito de identificar se um ou mais destes genes da família GH13 codificam enzimas envolvidas na síntese de Hz, no lúmen intestinal do inseto. Assim, utilizando as sequências encontradas no banco de dados do genoma, foram desenhados os primers para construção das ds $\alpha$ -glus e para análise da expressão destes genes por qRT-PCR para cada  $\alpha$ -glucosidase selecionada como descrito em materiais e métodos (**Tabela 1**).

Para avaliar a presença de transcritos dos genes  $\alpha$ -glu A,  $\alpha$ -glu B,  $\alpha$ -glu C,  $\alpha$ -glu D,  $\alpha$ -gluE e  $\alpha$ -glu F, fêmeas adultas de *R. prolixus* foram dissecadas quatro dias após a segunda alimentação sanguínea. A expressão dos genes nos diferentes tecidos: ovário, corpo gorduroso, intestino médio posterior e intestino médio anterior, foi avaliada por RT-PCR seguida de eletroforese em gel de agarose. Os transcritos dos seis genes foram detectados em quase todos os tecidos analisados (**Figura 5**). Embora o método não seja quantitativo é possível ver neste resultado que o gene  $\alpha$ -gluE apresentou uma expressão menos intensa tanto em intestino médio posterior como no anterior; que, no corpo gorduroso, temos uma menor expressão dos genes  $\alpha$ -glu D, E e F; que o  $\alpha$ -gluB tem uma expressão mais intensa no corpo gorduroso e ovário e os genes  $\alpha$ -gluA e  $\alpha$ -gluC tem uma expressão menos tecido específica.



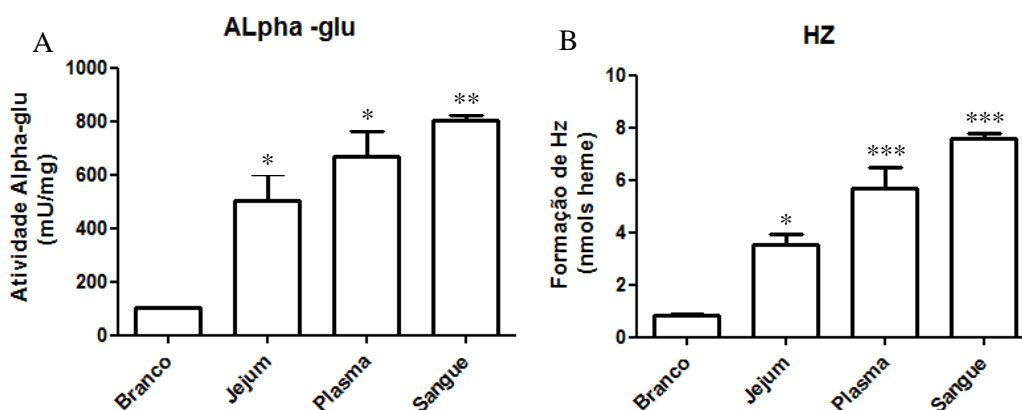
**Figura 5**– Análise da ocorrência de  $\alpha$ -glu A,  $\alpha$ -glu B,  $\alpha$ -glu C,  $\alpha$ -glu D,  $\alpha$ -glu E e  $\alpha$ -glu F em diferentes tecidos de *Rhodnius prolixus*. Quatro dias após alimentação sanguínea com sangue de coelho fêmeas adultas foram dissecadas e o RNA total foi extraído dos diferentes tecidos. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I e submetidas a reação de RT-PCR usando primers específicos desenhados para cada sequência de Alfa-glu. 1 - Corpo gorduroso; 2 - ovário; 3 – Intestino Médio posterior; 4 - Intestino Médio anterior. Como controle positivo foi utilizado a amplificação do gene Rp18S. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

## 5.2 – Influência da alimentação na atividade da $\alpha$ -glucosidase

A alimentação sanguínea é uma dieta considerada pobre em carboidratos e rica em proteínas.

Nós avaliamos o efeito da dieta sobre a atividade da  $\alpha$ -glucosidase (**Figura 6A**) e formação de Hz *in vivo* (**Figura 6B**). Para isso, um grupo de 20 insetos foi alimentado artificialmente com plasma, outro grupo alimentado com sangue e um terceiro grupo permaneceu em jejum. Quatro dias após a alimentação, esses insetos foram dissecados e retirou-se o intestino médio posterior para extração de proteínas. Ao compararmos as atividades de  $\alpha$ -glucosidase e síntese de Hz no lúmen intestinal dos insetos alimentados com as diferentes dietas, foi possível observar de um modo geral uma menor atividade hidrolítica e de síntese de Hz naqueles insetos alimentados com plasma, quando comparados aos insetos alimentados com sangue. Entretanto, a diminuição das atividades em dietas mais pobres não foi tão restritiva quanto esperávamos, pois na ausência de alimentação os insetos foram capazes de manter aproximadamente a metade

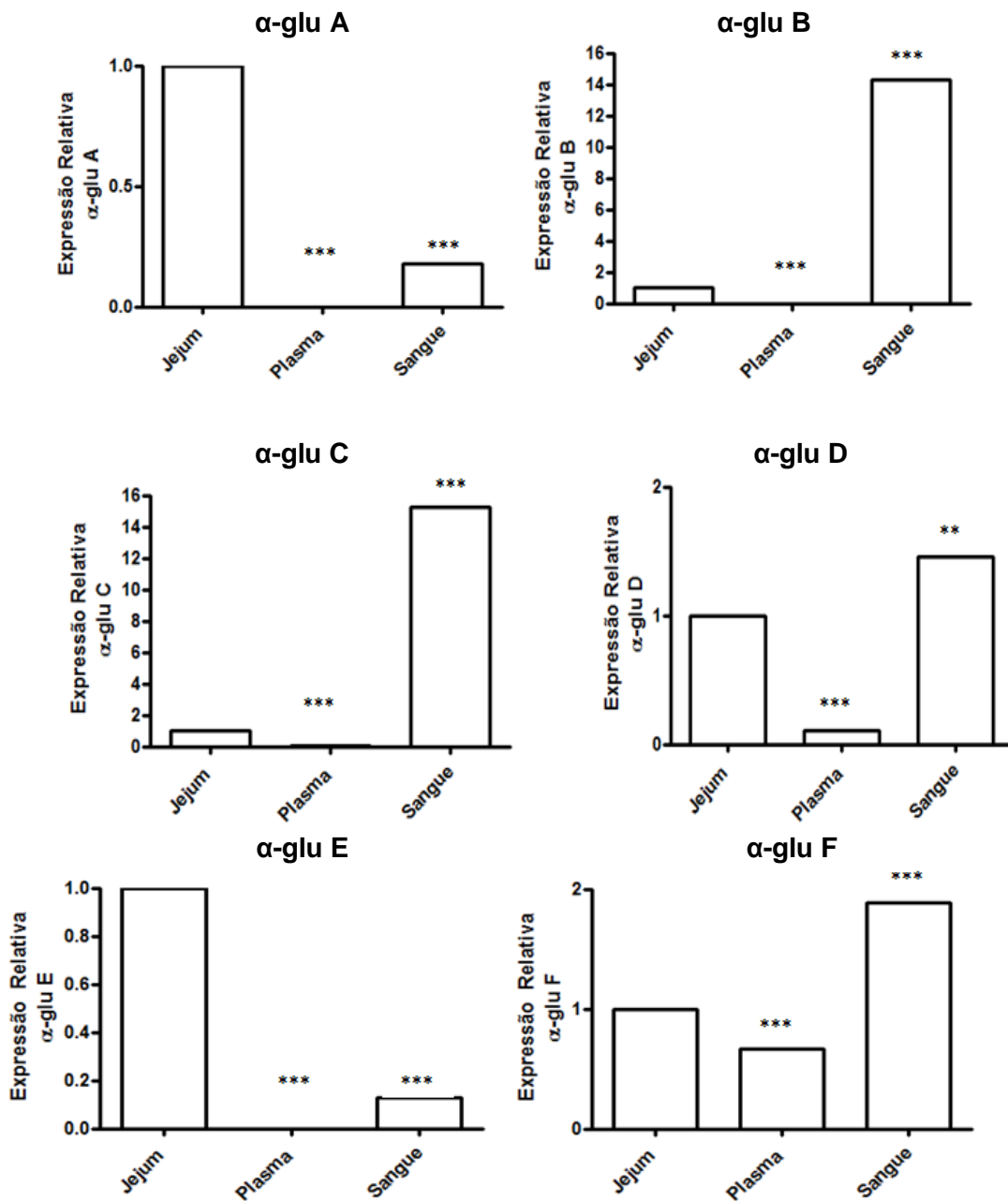
dos valores de atividade hidrolítica e de biocristalização. A diferença é menor ainda quando observamos insetos alimentados com plasma, cuja redução de proteína e a ausência de heme resultaram na redução de apenas 20% de ambas atividades.



**Figure 6 – Influência da alimentação na atividade de  $\alpha$ -glucosidase (A) e formação de HZ (B) do intestino médio posterior de *R. prolixus*.** Insetos foram alimentados com sangue ou plasma de coelho. Quatro dias após a segunda alimentação, os intestinos médios dos insetos (n=20) foram dissecados em salina gelada (0,15M). Jejum – insetos não alimentados por 21 dias; Plasma – insetos alimentados com plasma de coelho; Sangue - insetos alimentados com sangue de coelho. Resultados representam a média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P<0,05$ ,  $P<0,01$  e  $P<0,001$ , respectivamente.

### 5.3– Expressão dos genes das $\alpha$ -glus de *R. prolixus* em resposta à alimentação

Com o intuito de acompanhar possíveis variações nos níveis de transcritos dos genes  $\alpha$ -glu A, B, C, D, E e F em resposta às diferentes alimentações, cDNAs do intestino médio posterior de *R. prolixus* que ingeriram diferentes dietas foram submetidos a PCR em tempo real. A **Figura 7** mostra que, principalmente, os genes  $\alpha$ -glu B e C foram induzidos pela alimentação sanguínea. Nestes dois casos, o nível de expressão aumentou aproximadamente 15 vezes, quando comparadas com o nível de expressão em insetos alimentados com plasma ou insetos em jejum. A expressão dos genes  $\alpha$ -glu D e  $\alpha$ -glu F de insetos alimentados com sangue também apresentaram um aumento moderado (2x) em relação à expressão dos mesmos genes de insetos alimentados com plasma ou em jejum. No caso da expressão dos genes  $\alpha$ -glu A e  $\alpha$ -glu E observou-se uma diminuição da expressão gênica em insetos alimentados com sangue quando comparada a alimentação com plasma ou jejum. Isso pode indicar uma diferente regulação dos genes que pode estar relacionada à função das diferentes enzimas nos diferentes tecidos.



**Figura 7: Efeito da alimentação na expressão dos genes  $\alpha$ -glu A, B, C D, E e F.** O RNA total foi extraído do intestino médio posterior de fêmeas adultas de *R. prolixus* em jejum, alimentadas com plasma e alimentadas com sangue que foram dissecadas quatro dias após a alimentação. As amostras de RNA foram tratadas com DNaseI e o cDNA foi sintetizado por transcrição reversa. As reações de RT-PCR e qRT-PCR foram realizadas utilizando-se iniciadores específicos para a sequência de  $\alpha$ -glu A, B, C, D, E e F. Os níveis de expressão de cada gene são representados em relação ao valor obtido para o os insetos em jejum (1,0). (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente

#### 5.4 – Influência do silenciamento da $\alpha$ -glucosidase na síntese de hemozóina e atividade de $\alpha$ -glucosidase

Em *R. prolixus* a função da  $\alpha$ -glucosidase na síntese de Hz foi investigada pela injeção de dsRNA de  $\alpha$ -glucosidase (ds $\alpha$ Glu), construído com base na sequência gênica da  $\alpha$ -glucosidase de *Anopheles aquasalis* (Mury et al., 2009). A partir dessa sequência foi previamente mostrado que uma  $\alpha$ -glucosidase de *R. prolixus* expressa no intestino é capaz de promover a formação de Hz a partir de unidades de heme livre (Mury et al., 2009).

No presente trabalho, nós identificamos cinco outras  $\alpha$ -glucosidases no genoma de *R. prolixus* e avaliamos seu papel na formação de Hz. Para investigar a influência das  $\alpha$ -glucosidases de *R. prolixus* na síntese de Hz *in vivo*, foi construído dsRNAs para todas as seis  $\alpha$ -glucosidases e foi injetado em fêmeas adultas. As fêmeas injetadas foram monitoradas durante 30 dias para análise de características fenotípicas, tais como: taxa de mortalidade, postura de ovos e viabilidade (**Tabela 3**). Embora a injeção de ds $\alpha$ -gluA, ds $\alpha$ -gluB, ds $\alpha$ -gluE e ds $\alpha$ -gluF tenha diminuído consistentemente a oviposição, não foi observado impacto direto sobre a viabilidade (**Tabela 3**). A injeção de ds-gluC causou um baixo nível de mortalidade e não apresentou nenhum efeito sobre a oviposição ou viabilidade dos ovos de insetos injetados. Os efeitos mais drásticos na oviposição foi observado quando  $\alpha$ -glu A e  $\alpha$ -gluF foram silenciados, sugerindo um possível papel na ovogênese ou em eventos relacionados. O silenciamento dos mesmos genes também promoveu o maior efeito na viabilidade dos ovos, confirmando esta hipótese.

**Tabela 3. Efeito da injeção de *dsα-glu* em fêmeas de *R. prolixus***

| Tratamento       | Mortalidade <sup>3</sup><br>(%) | <i>p</i> -value | Oviposição <sup>1,3</sup> | <i>p</i> -value | Viabilidade <sup>2</sup><br>(nº de ovos eclodidos/%) | <i>p</i> -value |
|------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|--|-----------------|
| Controle         | 0                               |                 | 88                        |                 | 72 (81)  |                 |
| <i>dsα-glu A</i> | 32                              | 0,0039**        | 16                        | 0,0074**        | 15 (98)  | 0,0869          |
| <i>dsα-glu B</i> | 28                              | 0,0051**        | 45                        | 0,0402*         | 38 (84)  | 0,0907          |
| <i>dsα-glu C</i> | 8                               | 0,0572          | 90                        | 0,9002          | 90 (100)   | 0,4226          |
| <i>dsα-glu D</i> | 20                              | 0,0572          | 58                        | 0,0742          | 30 (51)  | 0,1448          |
| <i>dsα-glu E</i> | 40                              | 0,0153*         | 40                        | 0,0346*         | 35 (87.5)  | 0,1482          |
| <i>dsα-glu F</i> | 28                              | 0,0198*         | 18                        | 0,0014**        | 16 (88.8)  | 0,0984          |

Insetos em grupos experimentais (25 fêmeas) foram injetadas com *dsα-glu* (8 µg/µL fêmea); Controle experimental foi conduzido com fêmeas não injetadas. <sup>1</sup>Número de ovos postos por 6 fêmeas durante 30 dias depois da alimentação; <sup>2</sup>número de ovos que eclodiram após 30 dias; <sup>3</sup>n= 25. \*(*p* < 0.05); \*\*(*p* < 0.01).

A eficiência do silenciamento gênico foi avaliada por qRT-PCR e, em paralelo, foi medida a atividade hidrolítica e de formação de Hz da  $\alpha$ -glucosidase. As  $\alpha$ -glucosidases de membrana, ou seja, não solúveis ( $\alpha$ -gluA,  $\alpha$ -glu B e  $\alpha$ -glu C) (Gutierrez, 2013) apresentaram padrões distintos de transcrição (**Figuras 8A, 9A e 10A**). A  $\alpha$ -glu A foi expressa no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA) e corpo gorduroso (CG). Na  $\alpha$ -glu B a transcrição é mais restrita ao intestino anterior e a  $\alpha$ -glu C mostrou um elevado nível de expressão na região do intestino médio posterior e baixo nível de expressão nos ovários. Além disso, a atividade hidrolítica e de formação de Hz foram medidas no intestino posterior dos insetos silenciados (**Figuras 8B, 9B e 10B**). Os resultados mostraram uma clara associação entre a expressão de  $\alpha$ -glu, atividade de  $\alpha$ -glucosidase e síntese de Hz.

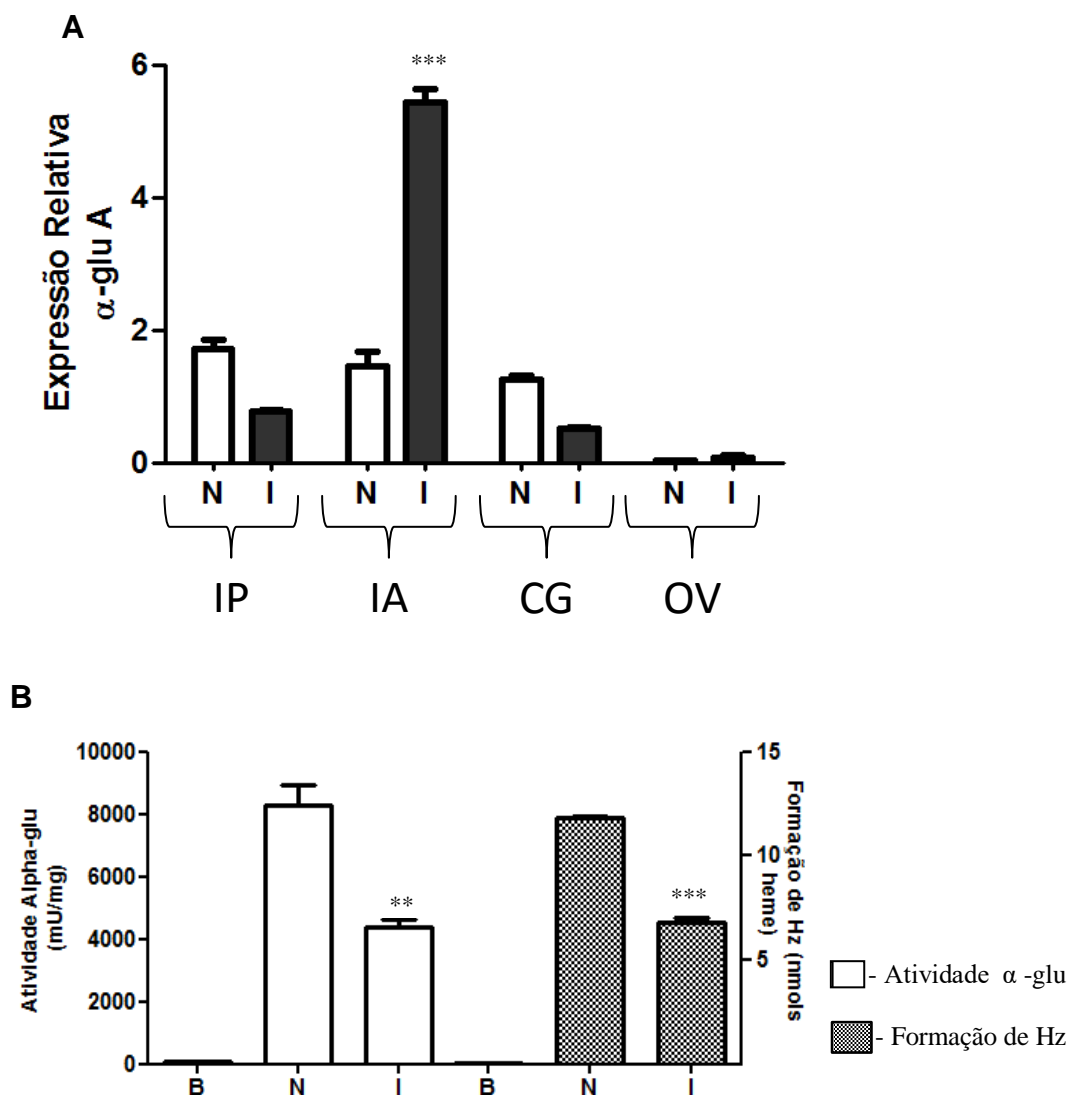
Padrões de transcrição, atividades hidrolítica e de formação de Hz também foram analisados em insetos silenciados para  $\alpha$ -glucosidases solúveis ( $\alpha$ -glu D,  $\alpha$ -gluE e  $\alpha$ -glu F) (**Figuras 11, 12 e 13**). Embora a  $\alpha$ -glu D tenha sido expressa, principalmente, no intestino médio anterior, a injeção da *dsα-glu D* não teve efeito na expressão de nenhum dos tecidos examinados (**Figura 11A**), provavelmente devido a uma superexpressão compensatória, contrariando os efeitos esperados para o silenciamento.

Um decréscimo na formação de Hz foi observado possivelmente devido ao silenciamento cruzado entre os diferentes genes (**Figura 11B**).

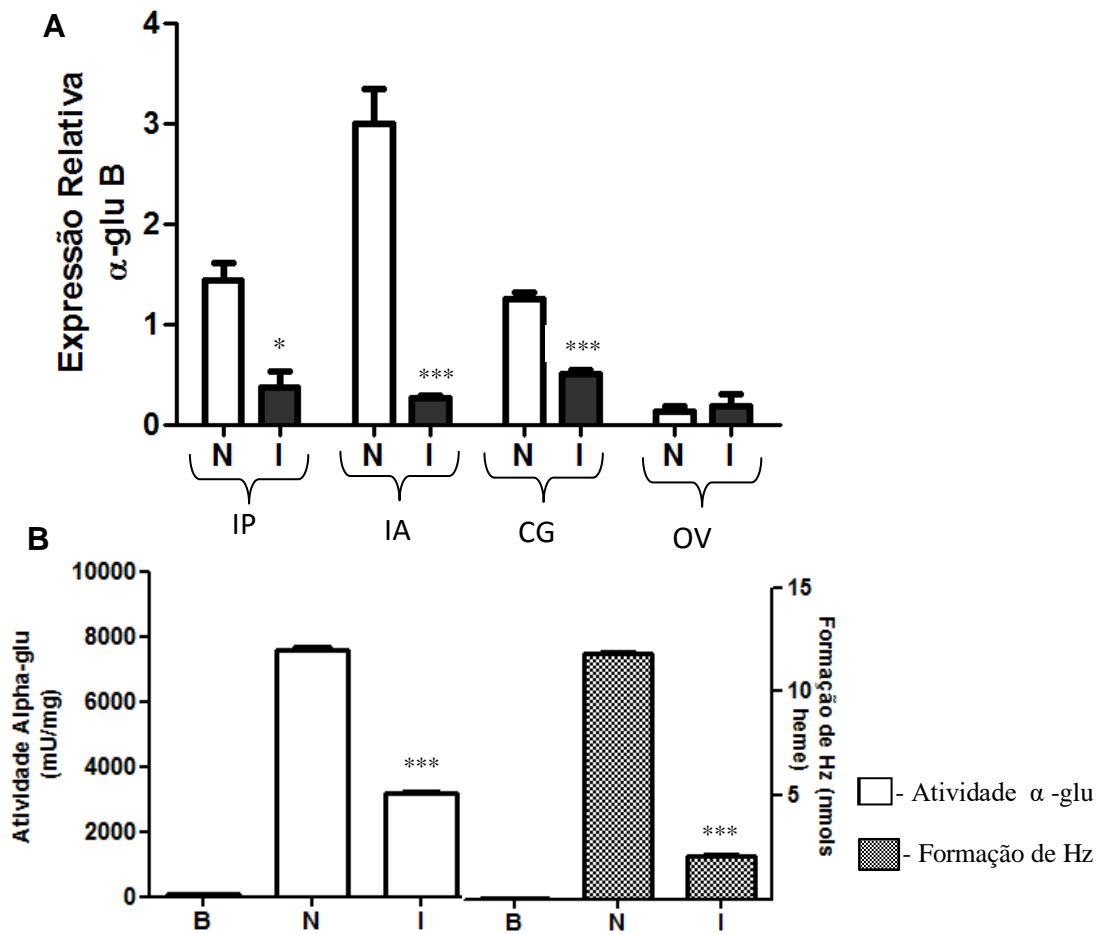
O silenciamento da  $\alpha$ -glu E foi eficiente no intestino médio anterior e corpo gorduroso, mas não no ovário ou no intestino médio posterior (**Figura 12A**). Inesperadamente, neste último tecido, o aumento da expressão foi observado após a injeção de dsRNA. No entanto, a atividade de  $\alpha$ -glu diminuiu (**Figura 12B**). A  $\alpha$ -glu F, teve sua expressão reduzida no intestino médio posterior, mas não no intestino médio anterior e corpo gorduroso, em que o aumento da expressão é claramente observado (**Figura 13A**). Apesar da não eficiência do silenciamento no intestino médio anterior e corpo gorduroso, a atividade hidrolítica e de formação de Hz foram largamente reduzidas no intestino médio posterior das fêmeas injetadas com ds $\alpha$ -glu F (**Figura 13B**).

O conjunto desses resultados indicam efeitos compensatórios e modulação da transcrição da  $\alpha$ -glucosidase em alguns tecidos de *R. prolixus*.

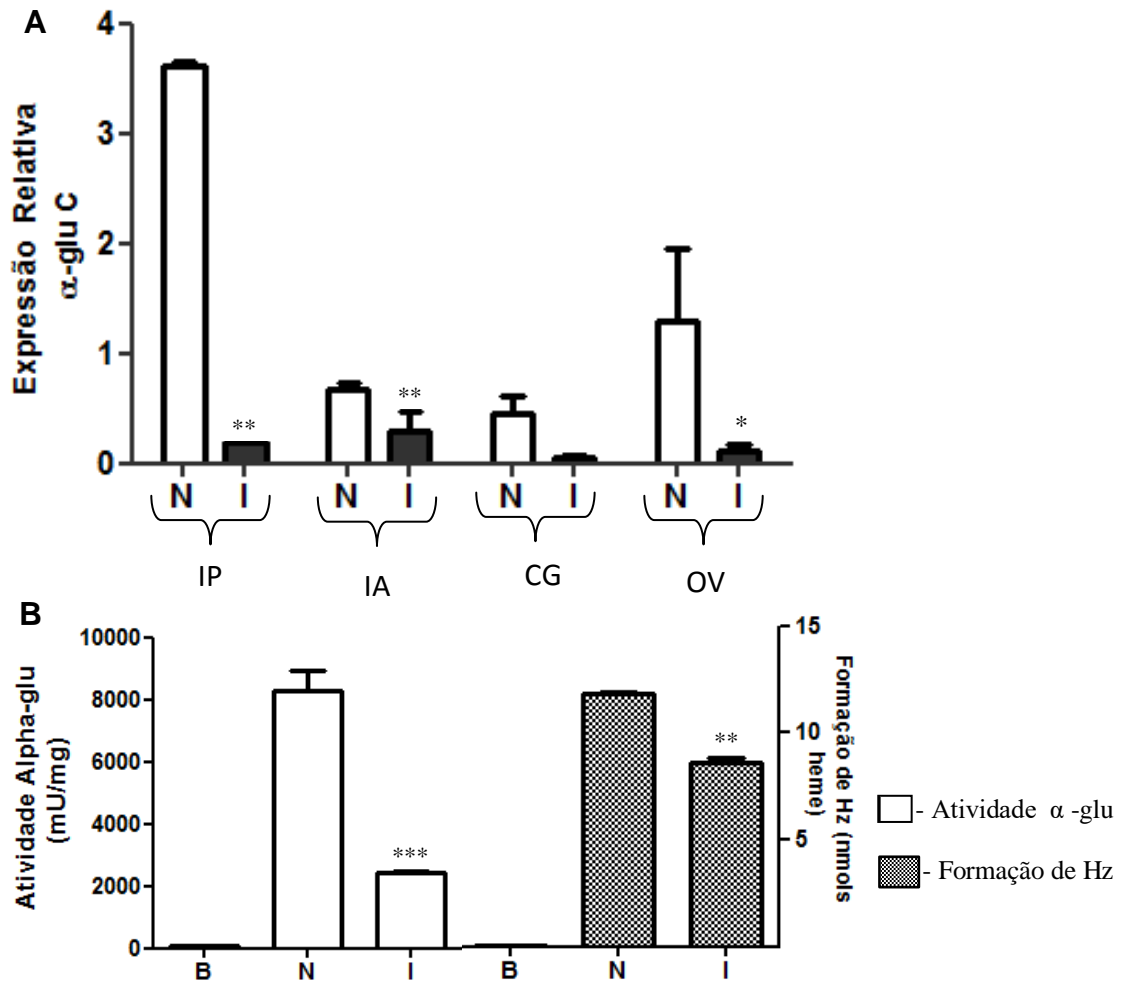




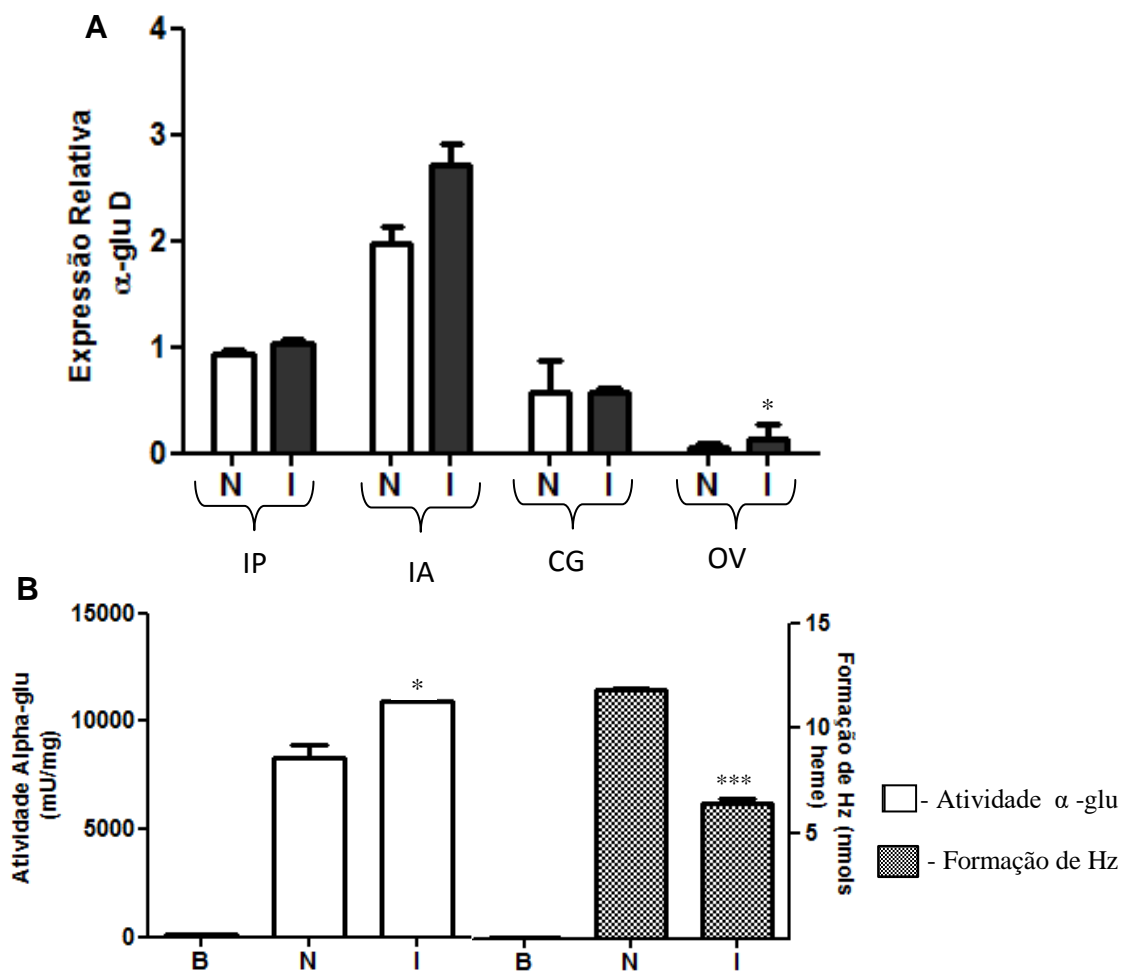
**Figura 8.** Efeito do silenciamento do gene  $\alpha$ -glu A na expressão relativa (A), na atividade hidrolítica e da formação de Hz (B). Expressão relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). Os insetos foram injetados com 8  $\mu$ g/fêmeas de ds $\alpha$ -glu (A, B, C, D, E e F) e analisados 4 dias após a alimentação sanguínea. A reação de qRT-PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos desenhados para cada  $\alpha$ -gluce *R. prolixus*. *RpEF* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão dos genes são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0) pela injeção de 2  $\mu$ g/fêmea de dsNeo. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.



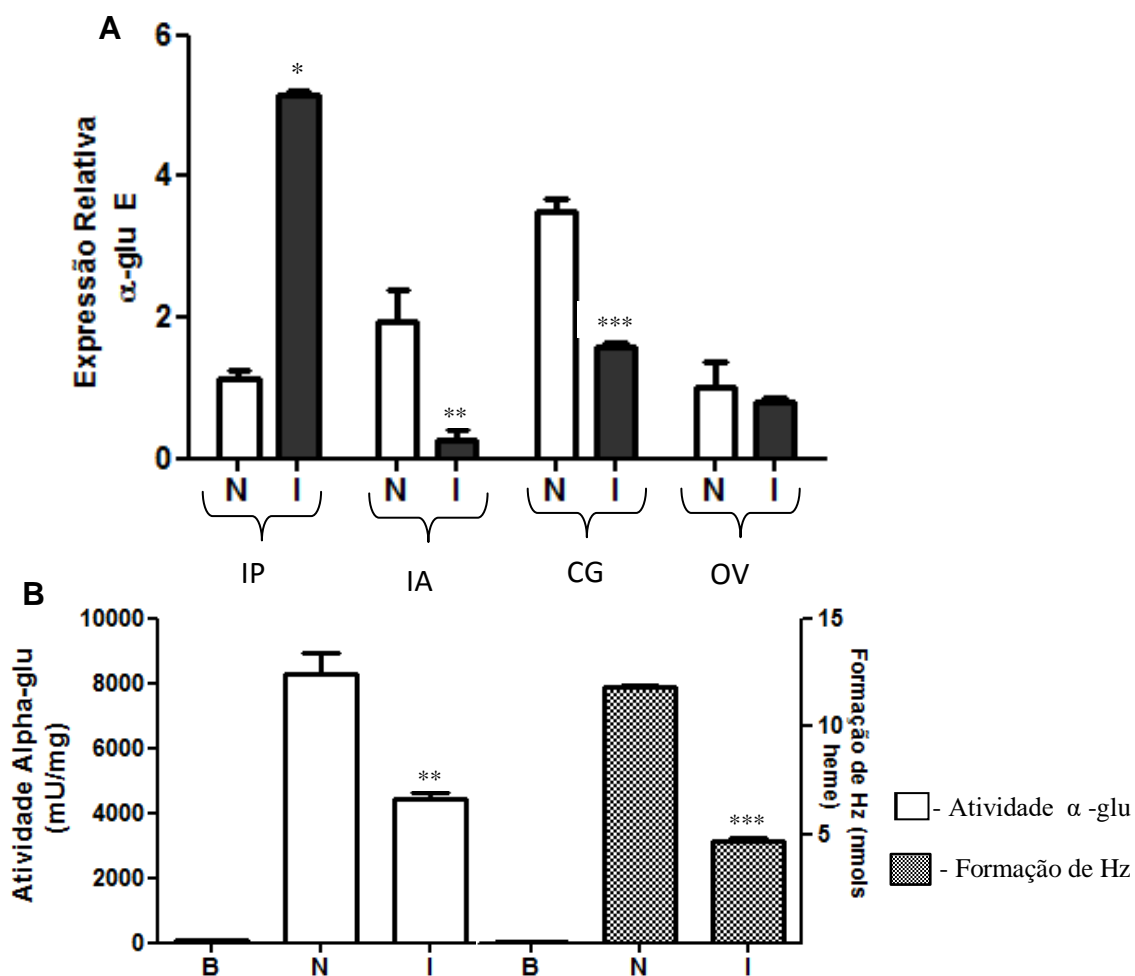
**Figura 9.** Efeito do silenciamento do gene  $\alpha$ -glu B na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B). Expressão Relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). As condições utilizadas para realização deste experimento foram as mesmas descritas na figura 8. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.



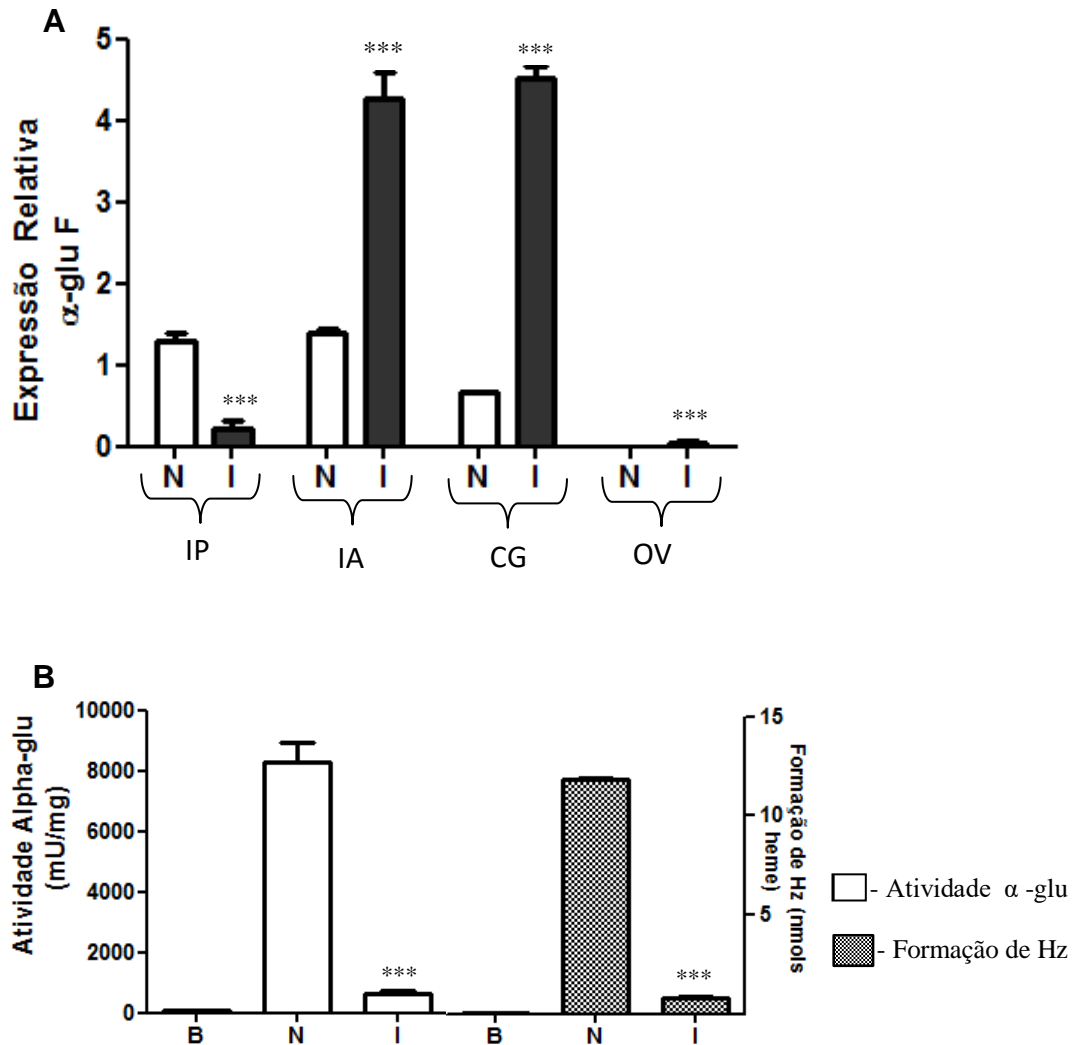
**Figura 10. Efeito do silenciamento do gene  $\alpha$ -glu C na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).** Expressão Relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). As condições utilizadas para realização deste experimento foram as mesmas descritas na figura 8. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.



**Figura 11. Efeito do silenciamento do gene  $\alpha$ -glu D na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).** Expressão Relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). As condições utilizadas para realização deste experimento foram as mesmas descritas na figura 8. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.



**Figura 12. Efeito do silenciamento do gene  $\alpha$ -glu E na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).** Expressão Relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). As condições utilizadas para realização deste experimento foram as mesmas descritas na figura 8. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.



**Figura 13. Efeito do silenciamento do gene da  $\alpha$ -glu F na expressão relativa (A), na atividade enzimática primária e na formação de Hz (B).** Expressão Relativa (qRT-PCR) da  $\alpha$ -glucosidase foi medida nos insetos Injetados (I) e Não Injetados (N) no intestino médio posterior (IP), intestino médio anterior (IA), corpo gorduroso (CG) e ovário (OV), Branco (B). As condições utilizadas para realização deste experimento foram as mesmas descritas na figura 8. A atividade de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz dos insetos injetados foram feitas a partir de um pool de 6 fêmeas adultas. Resultados são média de 3 determinações independentes  $\pm$  S.E.M. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) significam  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, quando comparados ao valor de injetados com dsNeo.

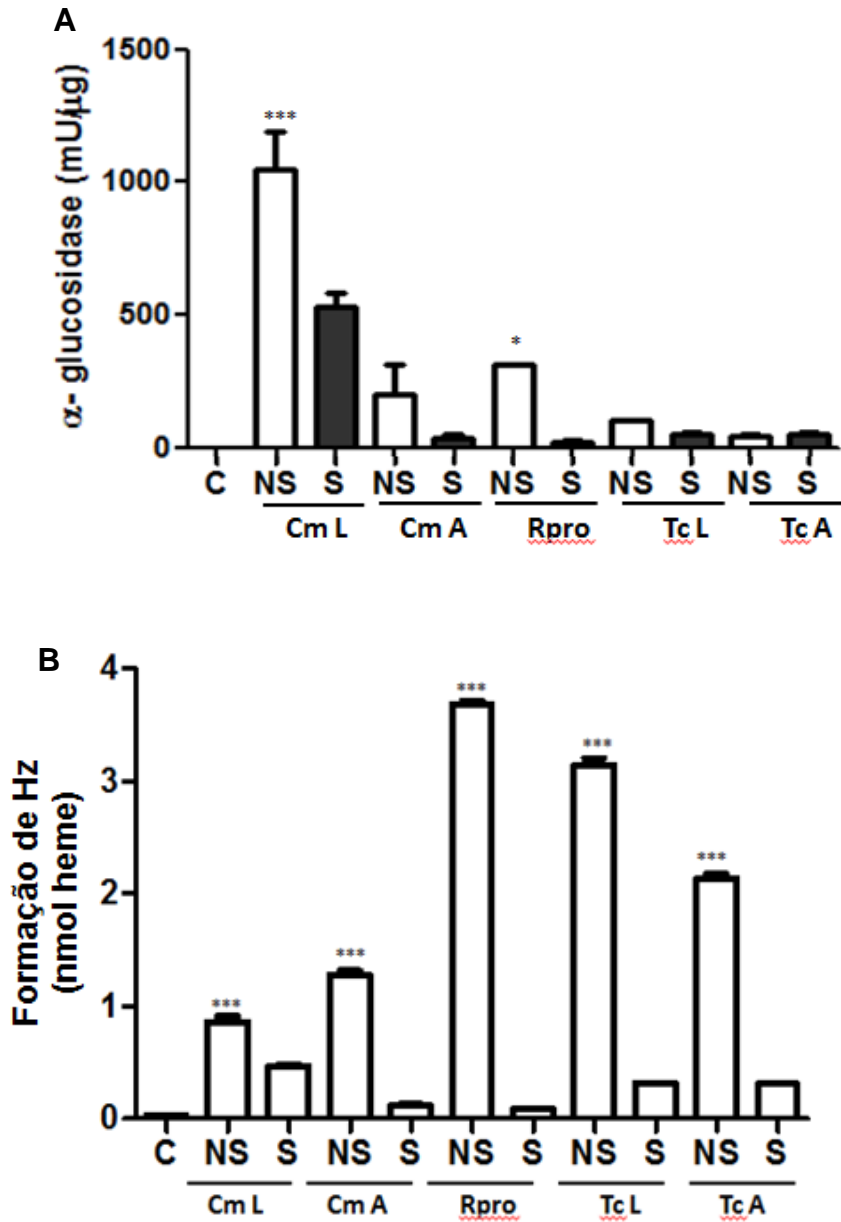
## 5.5 – Atividade da $\alpha$ -glucosidase de outros organismos e seu potencial de cristalização de heme *in vitro*

A atividade hidrolítica e de formação de Hz foram medidas nas frações proteicas solúvel e não solúvel, de dois insetos não hemiptera (Coleoptera) e não hematófagos, *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum* (larva e adulto). *Rhodnius prolixus* foi utilizado como controle positivo (**Figura 14A**). As frações não solúveis de *C. maculatus* e *R. prolixus* apresentaram maior atividade hidrolítica do que suas frações solúveis. Amostras de *T. castaneum* apresentaram baixa atividade, e diferenças significativas entre as frações de proteínas solúveis e não solúveis. A formação de Hz foi substancialmente maior nas frações não-solúveis em comparação com as frações solúveis (**Figura 14B**) e foi maior em *R. prolixus* e larvas de *T. castaneum* do que nos extratos de intestino médio de *C. maculatus*.

Além dos insetos, um grupo de diferentes organismos foi utilizado para verificar a presença da atividade hidrolítica e de formação de hemozina de  $\alpha$ -glucosidases. Para isso nós testamos a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a bactéria *Bacillus thuringiensis*; o trematódeo *Schistosoma mansoni*; o protozoário *Toxoplasma ghondii*; células Vero (células epiteliais de rim de Macaco verde Africano em cultura) e a planta *Arabidopsis thaliana*. Destes diferentes materiais também foram obtidas uma fração proteica solúvel e não solúvel. O material obtido foi analisado quanto a presença da atividade hidrolítica e de formação de Hz da  $\alpha$ -glucosidase (**Figura 15A e 15B**). A atividade hidrolítica de  $\alpha$ -glucosidase na fração não solúvel foi significativamente maior que a atividade na fração solúvel somente no material obtido a partir do trematódeo *S. mansoni* em relação a todas as outras amostras (**Figura 15A**). Quando avaliamos a atividade de formação de Hz nesses mesmos organismos observamos uma maior atividade nas frações não solúveis de todos os materiais testados, exceto em *Toxoplasma ghondii* (**Figura 15B**).

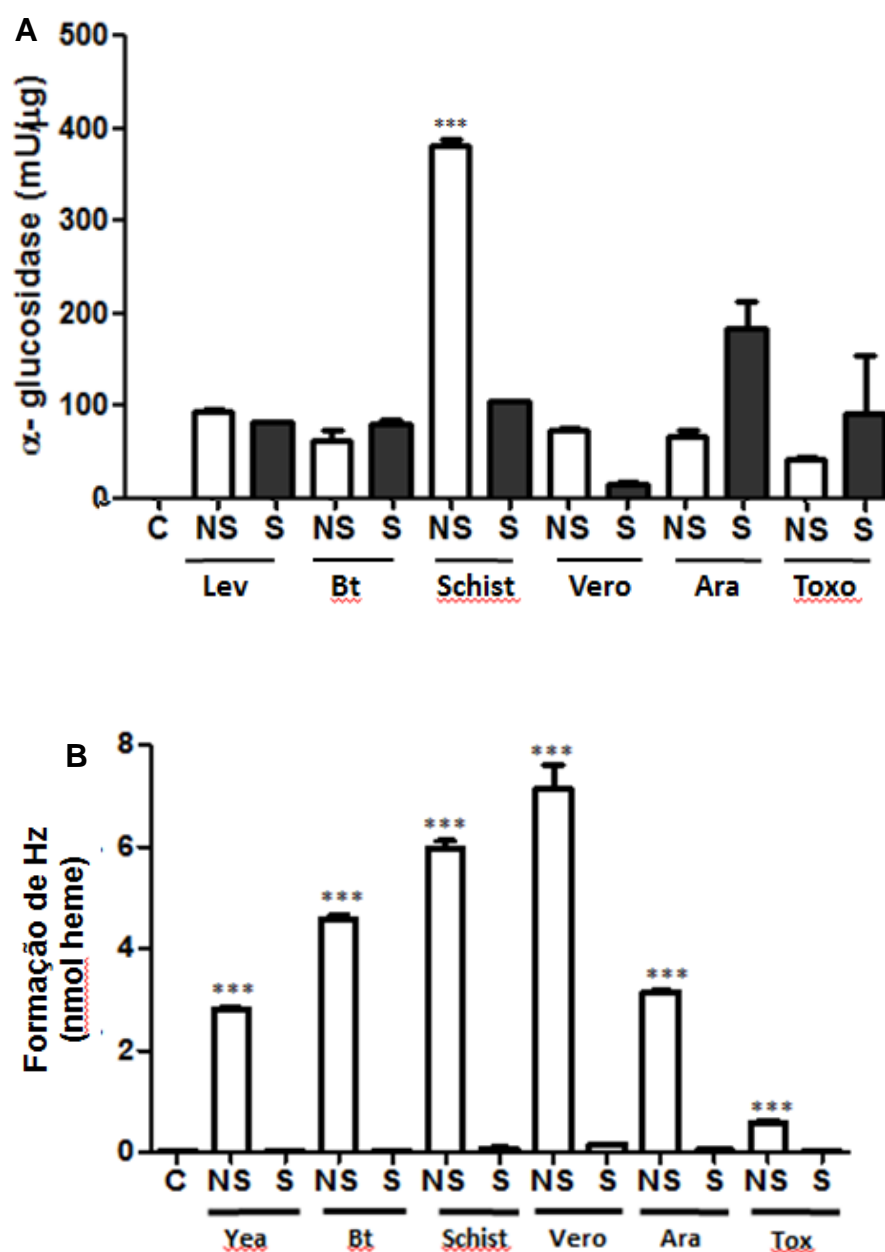
Mury et al. (2009) sugeriu que a formação de Hz está diretamente relacionada com enzima  $\alpha$ -glucosidase em *R. prolixus*. Aqui verificamos se a relação entre a atividade hidrolítica e de biocristalização existem também em outros materiais biológicos. Analisando os resultados mostrados nas **figuras 14A e 14B** temos que apenas os insetos *C. maculatus* larva e adulto e *R. prolixus* apresentaram o mesmo perfil de atividade hidrolítica e de síntese de Hz, indicando que essas atividades podem estar diretamente relacionadas nesses insetos. Nos diferentes organismos todas as frações não solúveis avaliadas foram capazes de promover a formação de Hz (**Figura 15A e 15B**).

Todas essas atividades analisadas podem ser comparadas às atividades de *R. prolixus* e *S. mansoni* que demonstraram uma clara relação entre as atividades de  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz.



**Figura 14:** – (A) Atividade de  $\alpha$ -glucosidase e (B) formação de Hz em diferentes insetos, usando extrato proteico não solúvel (NS) e solúvel (S). A extração de proteína foi feita com Tampão Fosfato 20 mM, pH 7,4, contendo 0.1% NP-40. C – Controle; Cm.L – *Callosobruchus maculatus* Larva; Cm.A. - *C. maculatus* Adulto; Rpro – *Rhodnius prolixus*, Tc L. – *Tribolium castaneum* Larva; Tc A – *T. castaneum* Adulto. Resultados são representativos de três experimentos realizados em triplicata.





**Figura 15:** (A) Atividade de  $\alpha$ -glucosidase e (B) formação de Hz de extrato protéico de membrana em diferentes organismos não insetos usando extrato proteico não solúvel (NS) e fração solúvel (S). A extração de proteína foi feita com Tampão Fosfato 20 mM, pH 7.4, contendo 0.1% NP-40. C – Controle; Lev – Levedura - *Saccharomyces cerevisiae*, Bt – *Bacillus thuringiensis*; Schist. - *Schistosoma mansoni*, Vero – Células Vero; Ara – *Arabidopsis thaliana*, Toxo – *Toxoplasma ghondii*. Resultados são representativos de três experimentos realizados em triplicata.

A atividade de formação de Hz associada à fração não solúvel traz um problema adicional à interpretação dos resultados. É possível que, junto a estas frações, existam resquícios de lipídeos de membrana, lipoproteínas e/ou outras moléculas lipofílicas, carregadas pelo processo de extração. Estas moléculas podem apresentar potencial de promover a biocristalização de heme (Stiebler et al., 2011). Assim, seria preciso uma prévia extração de lipídeos destes materiais de maneira a descartar este efeito secundário. Para, tornar mais clara, então, a associação entre a presença da enzima e a atividade de biocristalização de heme, foram utilizados inibidores da atividade hidrolítica (DEPC e eritritol) e também um inibidor da atividade de formação de Hz (cloroquina) cujos efeitos em uma e em outra atividade podem nos ajudar a validar nossa hipótese.

Os efeitos da cloroquina, DEPC e eritritol na atividade hidrolítica da  $\alpha$ -glucosidase podem ser vistos na **tabela 4**. Por outro lado, a **tabela 5** mostra o efeito dos mesmos inibidores na atividade de formação de Hz. A atividade hidrolítica em *C. maculatus* e *R. prolixus* foi sensível ao eritritol mas não a de *T. castaneum*. A atividade hidrolítica nos extratos das larvas de *C. maculatus*, larvas de *T. castaneum* e *R. prolixus* adultos foram significativamente reduzida na presença de DEPC. Cloroquina reduziu a atividade hidrolítica de *C. maculatus* adulto e *R. prolixus* (**Tabela 4**). A atividade hidrolítica em *S. cerevisiae*, *S. mansoni* e células Vero foi sensível a cloroquina e eritritol (**Tabela 5**). DEPC não inibiu a atividade hidrolítica dos extratos proteicos dos não insetos, exceto para a atividade observada em extratos proteicos de *S. mansoni* (**Tabela 5**). A atividade de formação de Hz foi significativamente reduzida na presença de eritritol, DEPC e cloroquina em todos os extratos de insetos e não insetos (**Tabela 4 e 5**). DEPC não foi eficaz como inibidor da atividade de formação de Hz, exceto em extrato de células Vero.

**Tabela 4: Ensaio da atividade hidrolítica *in vitro* do extrato proteico da fração não solúvel de insetos e outros organismos não insetos, na presença ou ausência dos inibidores eritritol, DEPC e cloroquina.**

| Amostras                   | Atividade $\alpha$ -Glucosidase (mU/mg) – Insetos |            |                |        |                |             |                |
|----------------------------|---|------------|----------------|--------|----------------|-------------|----------------|
|                            | Controle  | +Eritritol | $\rho$ - value | +DEPC  | $\rho$ - value | +Cloroquina | $\rho$ - value |
| <i>C. maculatus</i> larva  | 1047,03   | 112,5      | 0,0232*        | 600,18 | 0,036 *        | 900,18      | 0,4228         |
| <i>C. maculatus</i> adulto | 89,40   | 23,52      | 0,0128*        | 154,58 | 0,2691         | 115,58      | 0,031*         |
| <i>R. prolixus</i> adulto  | 287,04  | 26,465     | 0,0007***      | 104,96 | 0,0017**       | 89,69       | 0,0031**       |
| <i>T. castaneum</i> larva  | 101,17  | 105,40     | 0,7456         | 50,77  | 0,001**        | 90,81       | 0,1461         |
| <i>T. castaneum</i> adulto | 41,99   | 82,76      | 0,0503         | 30,15  | 0,4587         | 70,23       | 0,0544         |

| Amostras                | Atividade $\alpha$ -Glucosidase (mU/mg) – não-insetos |            |                |        |                |             |                |
|-------------------------|---|------------|----------------|--------|----------------|-------------|----------------|
|                         | Controle  | +Eritritol | $\rho$ - value | + DEPC | $\rho$ - value | +Cloroquina | $\rho$ - value |
| <i>S. cerevisiae</i>    | 93,35   | 28,94      | 0,0148*        | 103,76 | 0,1565         | 47,73       | 0,0142*        |
| <i>B. thuringiensis</i> | 62,64   | 12,88      | 0,0549         | 47,9   | 0,3083         | 46,23       | 0,3194         |
| <i>S. mansoni</i>       | 380,86  | 37,93      | 0,0005***      | 199,99 | 0,0025**       | 198,99      | 0,0042**       |
| Células Vero            | 72,93   | 17,17      | 0,0048**       | 78,8   | 0,1907         | 42,34       | 0,0171*        |
| <i>T. gondii</i>        | 43,05   | 40,93      | 0,623          | 39,25  | 0,1476         | 26,84       | 0,1099         |
| <i>A. thaliana</i>      | 126,17  | 27,93      | 0,1257         | 77,05  | 0,3283         | 61,76       | 0,2375         |

Os resultados dos ensaios de atividade hidrolítica foram expressos como nmol  $\rho$ -nitrofenolato formado. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados em triplicata  $\pm$ SEM (n = 4) \*( $p < 0.05$ ); \*\*( $p < 0.01$ ).

**Tabela 5: Ensaio da formação de Hz *in vitro* pelo extrato proteico da fração não solúvel de insetos e não insetos, na presença ou ausência dos inibidores eritritol, DEPC e cloroquina.**

| Amostras                   | Formação de Hz (nmol heme) – Insetos     |            |                |       |                |             |                |
|----------------------------|--|------------|----------------|-------|----------------|-------------|----------------|
|                            | Controle                                 | +Eritritol | $\rho$ - value | +DEPC | $\rho$ - value | +Cloroquina | $\rho$ - value |
| <i>C. maculatus</i> larva  | 0,21                                     | 0,13       | 0,0002***      | 0,09  | 0,0001***      | 0,03        | 0,0001***      |
| <i>C. maculatus</i> adulto | 6,52                                     | 0,23       | 0,0001***      | 1,70  | 0,0003***      | 0,06        | 0,0001***      |
| <i>R. prolixus</i> adulto  | 9,98                                     | 0,17       | 0,0001***      | 1,16  | 0,0001***      | 0,02        | 0,0001***      |
| <i>T. castaneum</i> larva  | 0,32                                     | 1,18       | 0,0001***      | 0,32  | 0,0001***      | 0,03        | 0,0001***      |
| <i>T. castaneum</i> adulto | 1,22                                     | 1,32       | 0,0013**       | 1,22  | 0,0024**       | 0,03        | 0,0001***      |
| Controle (Branco)          | 0,03                                     | 0,03       |                | 0,03  |                | 0,03        |                |
| Amostras                   | Formação de Hz (nmol heme) – não-insetos |            |                |       |                |             |                |
|                            | Controle                                 | +Eritritol | $\rho$ - value | +DEPC | $\rho$ - value | +Cloroquina | $\rho$ - value |
| <i>S. cerevisiae</i>       | 1,14                                     | 0,27       | 0,0001***      | 2,03  | 0,0001***      | 0,04        | 0,0001***      |
| <i>B. thuringiensis</i>    | 9,98                                     | 0,17       | 0,0001***      | 1,16  | 0,0003***      | 0,02        | 0,0001***      |
| <i>S. mansoni</i>          | 5,97                                     | 1,51       | 0,0001***      | 3,20  | 0,0001***      | 0,05        | 0,0001***      |
| Vero Cells                 | 7,27                                     | 4,14       | 0,0029**       | 8,20  | 0,1578         | 0,05        | 0,0001***      |
| <i>T. gondii</i>           | 2,81                                     | 1,47       | 0,0001***      | 2,81  | 0,0001***      | 0,04        | 0,0001***      |
| <i>A. thaliana</i>         | 3,36                                     | 0,40       | 0,0002***      | 2,88  | 0,0001***      | 0,05        | 0,0005***      |
| Controle (Branco)          | 0,03                                     | 0,03       |                | 0,03  |                | 0,03        |                |

Os ensaios de biocristalização foram realizados por 24h a 28°C. A atividade de síntese de Hz foi expressa em nmol de heme convertido a Hz em 24h, utilizando 12 µg de extrato proteico. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados em triplicata.  $\pm$ SEM (n = 4) \* ( $p < 0.01$ ). \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

## 6 – DISCUSSÃO

Várias  $\alpha$ -glucosidases têm sido associadas com a digestão de carboidratos em insetos (Terra & Ferreira, 1994, Carneiro et al, 2004; Kubota et al, 2004; Damasceno-Sá et al, 2007; Zibae et al, 2009; Santos et al, 2008; Fonseca et al, 2010; Ghadamyari, 2010; Vale et al, 2012.; Watanabe et al, 2013; Fialho et al, 2013; Mehrabadi, 2011; Souza-Neto et al, 2007). Porém, trabalhos realizados com hemípteras mostram o envolvimento dessas enzimas em diferentes funções que não a digestão. Em pulgões, por exemplo,  $\alpha$ -glucosidases parecem ser essenciais no controle da osmolaridade em dietas contendo sacarose (Ashford et al., 2000).

O grupo de pesquisa de Silva-Filha trabalhando com  $\alpha$ -glucosidases de *Culex quinquefasciatus*, mostrou que a atividade da toxina de *Bacillus sphaericus* binário (bin) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* depende da sua ligação específica ao receptor CQM1, uma  $\alpha$ -glucosidase ligada à membrana do intestino médio do inseto (Romão et al, 2006; De Melo et al, 2008; Chalegre et al, 2009; Amorim et al, 2010; Ferreira et al, 2014).

As  $\alpha$ -glucosidases de insetos podem ser encontradas, no intestino médio, na forma solúvel ou ligadas à membrana. As solúveis podem ocorrer no lúmen do intestino médio, como observado em Coleoptera (Colepico-Neto et al.,1986; Baker, 1991), e Himenoptera (Schumaker et al., 1993) ou pode permanecer no interior do glicocálix, como encontrado em Lepidoptera (Ferreira et al.,1993). Em *Musca domestica* (Diptera), uma  $\alpha$ -glucosidase é encontrada no lúmen intestinal e uma outra permanece no glicocálix (Terra & Jordão, 1989). As  $\alpha$ -glucosidases de membrana são proteínas integrais da membrana microvilar em células intestinais de Diptera (Terra e Jordão, 1991).

Gutierrez (2013), a partir da sequência parcial de uma  $\alpha$ -glucosidase de *R. prolixus* (Mury et al., 2009), que neste trabalho chamamos de  $\alpha$ -glu F, localizou outras 5  $\alpha$ -glucosidases nos bancos de dados genômicos de *R. prolixus* e outros organismos utilizando o programa HMMER. Essas  $\alpha$ -glucosidases foram chamadas aqui de  $\alpha$ -glu A, B, C, D e E. A partir das sequências dessas  $\alpha$ -glus foram construídas ds $\alpha$ -glus (**Tabela 1**) para verificar o efeito do seu silenciamento gênico, e entender melhor as correlações entre a atividade hidrolítica e a atividade de formação de Hz dessas  $\alpha$ -glus no inseto *R. prolixus*. Gutierrez (2013) também as classificou como proteínas solúveis e de

membrana, identificando a ocorrência de regiões transmembranas nas sequências, e mostrou que as  $\alpha$ -glus A, B e C são provavelmente proteínas de membrana e as  $\alpha$ -glus D, E e F são proteínas solúveis. No caso específico da  $\alpha$ -glu F, a sequência indica uma proteína solúvel. Entretanto, esta classificação não é completamente confiável visto que a análise foi realizada apenas com 50% da sequência.

Souza-Neto et al., (2007) identificaram três diferentes  $\alpha$ -glucosidases no intestino médio das fêmeas de *Anopheles aquasalis*. A presença desta enzima foi identificada por caracterização bioquímica e pela localização dos três fragmentos codificantes para  $\alpha$ -glucosidases e transcritos codificantes para  $\alpha$ -glucosidases nos tecidos epiteliais do intestino médio deste inseto. Em estudos com o mosquito *Anopheles stephensi*,  $\alpha$ -glucosidases ligadas a membranas foram detectadas apenas na região médio-anterior do intestino médio após a alimentação sanguínea, ao passo que toda atividade  $\alpha$ -glucolítica encontrada no intestino médio-posterior estava restrita ao lúmen intestinal (Billingsley e Hecker, 1991). Em *Rhodnius prolixus* verificamos que  $\alpha$ -glucosidases podem ser encontradas não somente no intestino médio posterior, como também no intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovários (**Figura 5**), podendo estar envolvidas em diferentes processos fisiológicos desses tecidos.

Estudos relatam que insetos hematófagos como *Phlebotomus papatasi* (Jacobson & Schlein, 2001) e *Aedes aegypti* (Whitby et al., 2005), quando alimentados com sangue possuem uma alta atividade de  $\alpha$ -glucosidase. Dillon & el-Kordy (1997) observaram maior atividade de  $\alpha$ -glucosidase em *Phlebotomus langeroni* após uma refeição de sangue. Em outros organismos hematófagos como, por exemplo, *Lutzomyia longipalpis*, há um aumento na atividade da  $\alpha$ -glucosidase quando na presença de dieta rica em sangue (Gontijo et al., 1998). No presente trabalho, avaliamos a influência da alimentação na atividade hidrolítica da  $\alpha$ -glucosidase e formação de H<sub>2</sub> no intestino médio posterior de *R. prolixus*. Verificamos que a alimentação com sangue foi capaz de aumentar tanto atividade hidrolítica da enzima quanto a síntese de H<sub>2</sub> (**figura 6**). Mury (2010) corrobora com esses resultados quando mostra a atividade da  $\alpha$ -glucosidase derivada do intestino médio de *R. prolixus* alimentados com plasma comparada com a de insetos alimentados com plasma na presença de hemina. A atividade hidrolítica dos insetos alimentados sem hemina foi menor quando comparada com insetos que se alimentaram com plasma suplementado com hemina. Nestes últimos, a atividade hidrolítica da  $\alpha$ -glucosidase foi claramente aumentada, sugerindo que o heme é um importante regulador da síntese da  $\alpha$ -glucosidase.

Heme não é apenas o grupamento prostético de proteínas, mas atua como uma molécula regulatória versátil conhecida por regular processos celulares diversos, como diferenciação, transcrição e processamento pós-traducional em diferentes sistemas. Heme é capaz de regular a transcrição de muitos genes por ligar elementos responsivos a heme (HRE) e/ou controlar a atividade de fatores de transcrição específicos (Sinclair *et al.*, 2010). Mosquitos *Aedes aegypti* quando desafiados com *Serratia marcescens* apresentaram uma expressão reduzida de genes envolvidos com resposta imune (cecropina D, cecropina G e atacina) no intestino após alimentação sanguínea. Neste mesmo trabalho verificaram que a suplementação com heme aumenta em 2 vezes os níveis microbianos, sugerindo que a molécula de heme influencia diretamente a resposta imune também *in vivo*, resultando na proliferação da microbiota intestinal (Bottino-Rojas *et al.*, 2015). Dessa forma, o passo seguinte foi no âmbito de investigar se, além da sua ação sobre a atividade de formação de H<sub>2</sub>, esta molécula poderia atuar como modulador da expressão da  $\alpha$ -glucosidase. Verificamos que a maioria dos genes codificantes de  $\alpha$ -glucosidases tiveram uma expressão significativamente mais elevada quando *R. prolixus* foram alimentados com sangue em comparação a dieta com plasma e insetos mantidos em jejum (**figura 7**). Estes resultados ampliam aqueles obtidos por Mury (2010) que mostrou que a suplementação da alimentação de *R. prolixus* com hemina, aumenta a expressão da  $\alpha$ -glucosidase. Por outro lado, nós mostramos que este efeito não é aplicável a todos os genes estudados, pois somente os genes  $\alpha$ -glu B, C, D e F tiveram sua expressão aumentada pela alimentação com sangue. Este aumento não está associado à solubilidade das proteínas codificadas por estes genes.

Triatomíneos diferem de outros insetos hematófagos (como Diptera) cujos dados genômicos estão disponíveis, porque apresentam intestino dividido em três segmentos distintos (intestino médio anterior, AM; intestino médio posterior, PM e intestino posterior, RE) que executam diferentes funções durante a digestão do sangue (Ribeiro *et al.*, 2014). A porção AM possui um endossimbionte, *Rhodococcus rhodnii*, que é essencial para o desenvolvimento e fertilidade do barbeiro. Nenhuma digestão proteolítica ocorre nesta região. A porção AM libera lentamente o seu conteúdo no PM durante um período de 20 dias (Ribeiro *et al.*, 2014). No sequenciamento do genoma de *R. prolixus* foram utilizados vários tecidos em diferentes estados pós-alimentares e diferentes estágios de desenvolvimento para a construção de bibliotecas de cDNA que foram submetidos a pirosequenciamento, incluindo uma biblioteca de corpo inteiro (WB, 862.980 leituras) e bibliotecas do AM (156.780 leituras), do PM (145.986

leituras), assim como de corpo gorduroso (FB, 177.944 leituras) e ovário (OV, 111.190) (Ribeiro et al., 2014). Estas leituras foram reunidas em contigs, permitindo a identificação de transcritos que são significativamente superexpressos em tecidos específicos, permitindo assim uma visão sobre transcrições específicas nos segmentos do trato digestivos de *R. prolixus* (Ribeiro et al., 2014). Através do transcriptoma de *R. prolixus*, obtivemos as sequências das  $\alpha$ -glucosidases (Gutierrez, 2013) identificadas através do número dos contigs e utilizadas para construir as ds $\alpha$ -glus (**Tabela 2**) para os experimentos de silenciamento gênico no inseto *R. prolixus*.

Silenciamento gênico é uma poderosa ferramenta para o estudo da função de genes em diferentes organismos e se processa pela utilização de RNA de interferência ou RNA interferente (RNAi; em condições naturais, constitui-se em um fenômeno caracterizado pela presença de siRNAs, com papel de regulação negativa de genes (Fire et al., 1998). A introdução de dsRNA induz silenciamento gênico específico em organismos vivos produzindo um bloqueio na produção da proteína correspondente (Hammond et al., 2001).

Os efeitos do tratamento com dsRNA em eventos fisiológicos têm sido relatados em várias espécies de insetos (Zhou et al., 2008; Boerjan et al., 2011). Walter-Nuno (2011) ao silenciar a RHBP (do inglês *Rhodnius Heme Binding Protein*), proteína sintetizada pelo corpo gorduroso e encontrada tanto na hemolinfa como nos ovócitos de *R. prolixus* (Oliveira et al., 1995), verificou que a postura de ovos não foi afetada nas fêmeas em que RHBP foi silenciada, mas a coloração dos ovos variou do rosa ao branco, o que mostrou que o silenciamento afetou a transmissão de RHBP para o embrião. Os resultados mostraram que insetos injetados com dsRHBP tiveram cerca de 90% de redução nos níveis de RNA mensageiro da RHBP, entre os dias 2 e 12 após a alimentação, diminuindo a viabilidade destes ovos. Outros trabalhos de silenciamento em *R. prolixus* também comprovam a eficiência do silenciamento de alguns genes no inseto. Ao investigar a embriogênese de *R. prolixus*, foi silenciado o gene *giant*, que é expresso nos ovários e fornecido ao embrião. A diminuição da expressão desse gene através de injeção de dsRNA mostrou a importância de *giant* para a formação adequada da cabeça e do abdômen do embrião. Os embriões originados das fêmeas silenciadas não apresentaram apêndices mandibulares e maxilares na cabeça e nem segmentos anteriores no abdômen (Lavore et al., 2012). Araujo et al. (2006) também mostraram o silenciamento mediado por RNAi em *R. prolixus*, ao injetar na hemocele de fêmeas uma dsRNA para o gene que codifica a nitroforina 2 em glândula salivar. Esta proteína auxilia na prevenção da



coagulação do sangue ingerido no repasto sanguíneo. O silenciamento provocou o encurtamento do tempo de coagulação do sangue ingerido pelos insetos silenciados.

No presente trabalho nós avaliamos a eficiência do silenciamento de 6 genes de  $\alpha$ -glucosidases, injetando dsRNAs específicas na hemocele das fêmeas de *R. prolixus*. O efeito do silenciamento foi avaliado 4 dias após o repasto sanguíneo, pois de acordo com Mury (2010) no 4º dia após a alimentação, o nível de RNAm de  $\alpha$ -glucosidase é maior, o que reflete uma alta atividade de  $\alpha$ -glucosidase e, portanto, o efeito do silenciamento é mais evidente. Além disso, a atividade de  $\alpha$ -glucosidase é baixa nos primeiros estágios da digestão sanguínea no intestino médio de *R. prolixus* (Silva et al., 2007).

Inicialmente, nós monitoramos a mortalidade, oviposição e viabilidade de ovos de *Rhodnius prolixus* após a injeção de dsRNA desenhadas para o silenciamento dos 6 genes de  $\alpha$ -glucosidases (**Tabela 3**), de maneira a entender a ação das dsRNAs sobre a fisiologia e saúde do inseto. Com a exceção do silenciamento de  $\alpha$ -gluC e  $\alpha$ -gluD, todos os outros silenciamentos gênicos de  $\alpha$ -glus ( $\alpha$ -glu A, B, E, F) resultaram numa redução significativa da postura de ovos, que vão desde 51% de ovos postos (ds $\alpha$ gluB) a 82% de ovos postos (ds $\alpha$ gluA). No entanto, a viabilidade dos ovos permaneceu inalterada, sugerindo que a oviposição reduzida pode ser uma consequência da reduzida disponibilidade de nutrientes causada por um processo digestivo alterado. Verificamos uma taxa de mortalidade significativamente aumentada em ds $\alpha$ gluA, ds $\alpha$ gluB, ds $\alpha$ gluE, e ds $\alpha$ gluF em fêmeas tratadas. Mury et al. (2009) mostram que o silenciamento de  $\alpha$ -glucosidases usando uma dsRNA construída a partir de uma sequência de  $\alpha$ -glucosidase de *Anopheles aquasalis* foi capaz de silenciar  $\alpha$ -glucosidases no *R. prolixus* e que o silenciamento aumentou em 34% a mortalidade e diminuiu em 15% a postura de ovos de fêmeas injetadas.

A eficiência do silenciamento gênico foi monitorada tanto por qRT-PCR, como pela atividade hidrolítica da enzima, usando  $p$ -nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo como substrato. Ao injetarmos cada uma das ds $\alpha$ -glus em fêmeas de *R. prolixus*, nós avaliamos a expressão desses genes em diferentes tecidos do inseto, a saber: intestino médio posterior, intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovários, usando como controle (expressão relativa =1) insetos injetados com uma dsRNA não relacionada (dsNeo). Os resultados mostram um padrão de expressão diferenciado para cada tecido em cada uma das  $\alpha$ -glus selecionadas (**figura 8A a 13A**). Quando ds $\alpha$ gluA foi injetada, foi observada expressão reduzida em intestino médio posterior e corpo gorduroso, mas

não no intestino anterior, em que a expressão mostrou-se três vezes maior quando comparada as fêmeas controle (**figura 8A**). Este padrão inesperado, pode ser uma resposta compensatória para o silenciamento de um gene aumentando a expressão de genes homólogos, ou talvez por alguma característica da sequência utilizada no desenho da dupla fita que poderia causar um efeito indireto que culminasse no aumento da expressão do gene alvo, em vez do seu silenciamento (Scacheri et al., 2004;. Portnoy et al., 2011).

Para confirmar o envolvimento da enzima  $\alpha$ -glucosidase na formação de Hz, vimos que os resultados obtidos tanto da atividade hidrolítica da enzima quanto a formação de Hz, mostram uma clara associação entre a expressão de  $\alpha$ -glu, atividade de  $\alpha$ -glucosidase e síntese de Hz para todas as  $\alpha$ -glus exceto a atividade hidrolítica em fêmeas injetadas com a ds $\alpha$ -gluD (**Figura 8B a 13B**). Os resultados obtidos de fêmeas injetadas com ds $\alpha$ -glu F (**Figura 13A e 13B**) corroboram com os dados anteriores do grupo em que Mury et al., (2009) sequenciaram 50% do gene da  $\alpha$ -glu, e injetaram dsRNAs desenhados a partir da sequência gênica da  $\alpha$ -glucosidase de *Anopheles aquasalis*, na hemocele de fêmeas deste mesmo hemíptero, que foram capazes de diminuir a expressão do gene, resultando em uma redução das atividades de  $\alpha$ -glucosidase e de formação de hemozoína em um padrão muito similar.

No curso da evolução, organismos que selecionaram o sangue como fonte de nutrientes apresentavam um conjunto de estratégias capazes de superar a toxicidade do heme e, portanto, estavam pré-adaptados a este hábito alimentar (Graça-Souza et al., 2006; Ferreira et al., 2015). No entanto, estudos do grupo mostraram que extratos proteicos do intestino médio de insetos hemípteros não hematófagos, como *Dysdercus peruvianus* e *Quesada gigas*, também têm uma atividade de formação de Hz (Ferreira et al., 2015). Os resultados deste trabalho sugerem que a formação de Hz poderia ser uma atividade secundária de  $\alpha$ -glucosidases e não uma característica específica destas enzimas em hemípteros hematófagos. Para testar esta hipótese, avaliamos a presença desta atividade em diferentes modelos biológicos.

Inicialmente comparamos o *R. prolixus* com dois insetos coleópteros, *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*. Larvas de *C. maculatus* tem atividade hidrolítica superior aos adultos, tanto no extrato solúvel quanto no extrato não solúvel. *T. castaneum* apresentou baixa atividade hidrolítica nas duas fases de vida observadas e para os dois tipos de extrato proteicos do intestino médio desses insetos (**Figura 14 A**). Uma atividade de formação de Hz residual foi encontrada em extratos

de proteína solúvel para todos os insetos. Entretanto, a fração não solúvel apresentou atividade de formação de Hz. Esta atividade foi maior para *T. castaneum* do que para *C. maculatus* (**Figura 14B**). Este resultado pode ser interpretado a luz dos trabalhos de Egan, que mostram que lipídeos presentes nas diferentes amostras podem ser indutores da síntese de Hz (Egan, 2008a; Egan, 2008b, Stiebler et al., 2014) Portanto, diferentes conteúdos lipídicos, seja da alimentação dos insetos ou dos tecidos do próprio inseto poderiam interferir com os resultados.

Na próxima etapa, procuramos ampliar a triagem para a síntese de Hz associada à  $\alpha$ -glucosidase utilizando extratos proteicos de diferentes organismos não-insetos, *Schistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*. Entre estes organismos, uma alta atividade foi encontrada no extrato proteico não-solúvel de *Schistosoma mansoni*. Todos os outros extratos tiveram uma baixa atividade hidrolítica. No entanto, a atividade de formação Hz foi facilmente detectável em todos os extratos, exceto em *Toxoplasma gondii*, onde uma baixa atividade foi observada apenas na fração insolúvel do extrato.

Stiebler et al. (2011) analisaram os fatores envolvidos na síntese de Hz em diversos sistemas biológicos. No intestino médio de *R. prolixus*, ambos lipídeos e proteínas constituintes da PMM cooperam para promover a síntese de Hz (Stiebler et al., 2010). Em *Schistosoma mansoni*, a Hz também é produzida fisiologicamente e lipídeos parecem ser os principais agentes da formação de Hz (Côrrea-Soares et al., 2007). Em *Plasmodium falciparum*, uma HDP (*heme detoxification protein*), bem como lipídeos, foram implicados na síntese de Hz (Jani et al., 2008; Fitch et al., 1999). Perante estas possibilidades, foram testados os efeitos de inibidores de  $\alpha$ -glucosidases sobre a atividade hidrolítica e a síntese de Hz. Também testamos os efeitos de um inibidor conhecido da síntese de Hz (cloroquina) sobre a atividade hidrolítica de  $\alpha$ -glucosidase. Nossos resultados até aqui não foram capazes de clarificar a questão.

DEPC inibe várias enzimas por modificação de resíduos de histidina (Coan & DiCarlo, 1990). Tratamento com DEPC inibe a atividade de  $\alpha$ -glucosidase de *C. elegans* em 40% (Torre-Bouscoulet et al., 2004). O eritról é um inibidor competitivo da  $\alpha$ -glucosidase (Auricchio et al., 1968). Ambos os inibidores foram utilizados no presente estudo para avaliar a presença da atividade de  $\alpha$ -glucosidase em associação com a síntese de Hz nos extratos proteicos (**Tabela 4**). Os resultados mostram que nem todos os extratos tem atividade hidrolítica sensível aos inibidores eritról ou DEPC.

Este resultado pode servir para o desenvolvimento de uma ferramenta para distinguir diferentes grupos de  $\alpha$ -glucosidases.

Drogas do tipo quinolina, tais como a cloroquina, agem contra o *Plasmodium* através de inibição da síntese de Hz (Sullivan et al., 1996, Meshnik, 1996; Ridley et al., 1997). Estas drogas inibem a síntese de Hz *in vitro* em diferentes condições fisiológicas (Slater e Cerami, 1992). A ação dessas drogas anti-malária em *S. mansoni* (Corrêa-Soares et al., 2009) ocorre através de um mecanismo idêntico e abre uma nova frente de desenvolvimento quimioterápico. Aqui, a cloroquina inibiu a atividade de formação de Hz de todos os extratos proteicos (**Tabela 5**). Por outro lado, a cloroquina também reduziu a atividade hidrolítica da  $\alpha$ -glucosidase em *C. maculatus*, *R. prolixus*, *S. cerevisiae*, *S. mansoni* e células Vero (**Tabela 4**). Inesperadamente, os inibidores de  $\alpha$ -glucosidase também foram capazes de diminuir a formação de Hz (**Tabela 5**) em quase todos os extratos proteicos, exceto em células Vero. Estes resultados sugerem uma associação física de ambas as atividades na estrutura da enzima. Além disso, as nossas constatações indicam que a cloroquina e outros inibidores podem ser utilizados para avaliar ambas as atividades hidrolíticas da  $\alpha$ -glucosidase e formação de Hz. Entretanto, mais estudos cinéticos com medidas de constantes de inibição e ensaios de competição entre as diferentes drogas são ainda necessários. Uma abordagem cinética aliada ao estudo da estrutura desta enzima pode ser fundamental para entender o mecanismo de inibição e elucidar as interseções entre as atividades aqui descritas.

Moléculas de heme interagem com as PMM e se ligam a elas, em intervalos regulares (Silva et al., 2007), o que facilita a formação de cristais. A proteína marcadora destas membranas é uma  $\alpha$ -glucosidase (Ferreira et al., 1988; Silva et al., 1995; Smith et al., 2004). Durante a formação de Hz, é provável que a interação do heme com as PMM seja mediada por esta  $\alpha$ -glucosidase. Durante a formação de cristais, o processo de nucleação é um passo limitante. O papel da  $\alpha$ -glucosidase da PMM na formação de Hz provavelmente é promover o processo de nucleação na interface entre os lipídeos da PMM e o lúmen intestinal (Mury et al., 2009, Stiebler et al., 2011). Uma vez que cristais de Hz são formados nas PMM nas fases iniciais do processo da digestão, a continuação da cristalização de heme se torna fisiologicamente muito eficaz. Este aumento da eficácia certamente explica porque 97% do heme no intestino médio de *R. prolixus* é encontrado sob a forma de Hz (Stiebler et al., 2010). No contexto do atual trabalho, isso explica também nossa interpretação dos resultados obtidos a partir de

diferentes materiais biológicos, cujo conteúdo de proteínas é conhecido, mas de lipídeos não.

Demonstramos aqui que os extratos proteicos derivados de insetos não hematófagos, tais como *C. maculatus* e *T. castaneum*, bem como aqueles a partir de diferentes organismos não-insetos, incluindo *S. mansoni*, *A. thaliana*, *T. gondii* e *S. cerevisiae* apresentaram atividade de biocristalização de heme. Além disso, esta atividade em alguns desses extratos foi provavelmente associada a  $\alpha$ -glucosidases. Este potencial catalítico fornece mais uma prova da plasticidade de  $\alpha$ -glucosidases, o que pode ter representado um passo crucial para a adaptação dos organismos a diferentes pressões seletivas e, em insetos hematófagos provavelmente foi um passo fundamental para o surgimento da hematofagia.

A maioria das enzimas aceita mais que um substrato e possuem afinidades diversas a uma gama mais vasta de compostos, um fenômeno referido como promiscuidade enzimática (Piedrafita et al., 2015). Alguns autores consideram que a capacidade de uma enzima para catalisar vários substratos naturais podem ser mais convenientemente descrita pela expressão "multi-especificidade de substrato" ou "reatividade cruzada", de modo que o termo "promiscuidade enzimática" é reservada para as atividades secundárias diferentes da atividade central fisiológica, a partir da qual a enzima tem evoluído (Copley, 2003; Khersonsky & Tawfik, 2010; Piedrafita et al., 2015). Neste contexto, a enzima  $\alpha$ -glucosidase parece ser um excelente modelo de estudo para se entender como uma mesma enzima pode atuar de diferentes maneiras, catalisando reações completamente diversas em resposta a uma pressão seletiva específica.

## 7 –CONCLUSÕES

- Os genes  $\alpha$ -glu A-F foram encontrados em todos os tecidos investigados.
- A expressão dos genes das  $\alpha$ -glucosidases B, C, D e F foi aumentada pela alimentação com sangue, entretanto a atividade hidrolítica e de formação de Hz não foram aumentadas na mesma proporção no intestino destes insetos, provavelmente porque a expressão desses genes está sob a regulação de heme ou outro componente do sangue, mas não as atividades.
- O silenciamento dos genes de  $\alpha$ -glucosidases A, B, D e F aumentaram a mortalidade e alteraram a taxa de oviposição das fêmeas injetadas, porém nenhum grupo teve a viabilidade dos ovos alterada..
- O silenciamento das  $\alpha$ -glucosidases A, B, C, e F foram efetivos no intestino médio posterior e isso resultou da diminuição da atividade hidrolítica e de atividade de formação de Hz neste ambiente.
- Extratos proteicos derivados de insetos não hematófagos e de diferentes organismos não-insetos, apresentaram atividade de biocristalização de heme, associada à fração não solúvel dos materiais biológicos, porém esta atividade não pode ser associada à atividade hidrolítica observada.
- O efeito da cloroquina, do eritritol e do DEPC mostra que a atividade de formação de Hz é sensível a todos os inibidores. Por outro lado, a atividade hidrolítica de apenas alguns dos materiais biológicos testados foi alterada na presença destes inibidores e, portanto, este efeito deve ser melhor investigado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldana, E; Lizano, E; Valderrama, A (2001). Effects of human blood feeding on the fecundity, fertility and biological cycle of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). **Rev. Biol. Trop.** 49 (2):689-691.
- Alvarenga, PH (2005). Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti*. Tese de doutorado. Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ-RJ.
- Alves-Bezerra, M; Cosentino-Gomes, D; Vieira, LP; Rocco-Machado, N; Gondim, KC; Meyer-Fernandes, JR (2014). Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. **Insect Biochem Mol Biol.** 50: 24-33.
- Amorim, LB; Barros, RAB; Chalegre, KDM; Oliveira, CMF; Regis, LN; Silva-Filha, MHNL (2010). Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect Biochem Mol Biol.** 40: 311- 316.
- Andries, JC & Torpier, G (1982). An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepacineria* (Insecta: Heteroptera): ultrastructure and genesis. **Biol. Cell.** 46: 195-202.
- Ashford, DA; Smith, WA & Douglas, AE (2000). Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **J. Insect Physiol.** 46: 335–341.
- Ashong JO; Blench IP; Warhurst DC (1989). The composition of haemozoin from *Plasmodium falciparum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 83:167–72.
- Baerwald, JC; Delcarpio, JB (1983) Double membrane-bound intestinal microvilli in *Oncopeltus fasciatus*. **Cell Tiss. Res.** 232: 593-600.
- Baker, JE (1991). Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Insect Biochem.** 21: 615Sh21.
- Bauer, PG (1981). Ultrastrukturelle und physiologische aspekte des mitteldarms von *Rhodnius prolixus* Stal (Insecta, Heteroptera). **PhD thesis, Univ. Basel, Switzerland (appud).**
- Beaty, J & Marquardt, WC (1996) The biology of disease vectors. **Ed. Colorado Niwot, Colorado.**
- Bendrat, K, Berger, BJ, Cerami, A (1995). Haem polymerization in malaria. **Nature.**

378, 138.

- Bewley KD, Ellis KE, Firer-Sherwood MA, Elliott SJ (2013). Multi-hemeproteins: Nature's electronic multi-purpose tool. **Biochim. Biophys. Acta** 1827: 938–948.
- Bhatia, Y; Mishra, S; Bisaria, VS (2002). Microbial  $\beta$ -glucosidases: Cloning, properties and applications, **Crit.Rev.Biotechnol.** 22: 375-407.
- Billingsley, PF & Downe, AER (1983). Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Can. J. Zool.** 61: 2574-2586.
- Billingsley, PF & Downe, AER (1989). The effects of artificial diets on the anterior intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus*. **Inter. J. for Parasitol.** 19(3): 291-299.
- Billingsley, PF & Downe, AER (1985). Cellular localization of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Cell Tissue Res.** 241: 421-428.
- Billingsley, PF & Hecker, H (1991). Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and  $\alpha$ -glucosidase in the midgut. **J. Med. Entomol.** 28: 865–871.
- Billingsley, PF (1990). The midgut ultrastructure of hematophagous insect. **Annu. Rev. Entomol.** 35: 219-248.
- Bohle, DS & Helms, JB (1993). Synthesis of beta-hematin by dehydrohalogenation of hemin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 193 (2): 504-508.
- Bohle, DS; Dinmbier, RE; Madsen, SK & Stephens PW (1997). Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. **J Biol Chem.** 272:713–6.
- Bottino-Rojas, V; Talyuli, OAC; Jupatanakul, N; Sim, S; Dimopoulos, G; Venancio, TM; et al. (2015). Heme Signaling Impacts Global Gene Expression, Immunity and Dengue Virus Infectivity in *Aedes aegypti*. **PLoS ONE** 10(8): e0135985.
- Bravo-Torres, JC; Julio, C; Villagómez-Castro; Calvo-Méndez, C; Flores-Carreón, A & López-Romero, E (2004). Purification and biochemical characterisation of a membrane-bound  $\alpha$ -glucosidase from the parasite *Entamoeba histolytica*. **Internat. J. For Parasitol.** 34: 455 – 462.
- Braz, GRC; Abreu, L; Masuda, H, Oliveira, PL (2001). Heme biosynthesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Insect. Bioch. Mol. Biol.** 31: 359-364.



- Brown, SB & Lantzke, LR (1969). Solution structures of ferriheme in some dipolar aprotic solvents and their binary aqueous mixture. **Biochem. J.** 115: 279-285.
- Campbell, JA; Davies, GJ; Bulone, V; Henrissat, B (1997) **Biochem. J.** 326:929–939.
- Cantarel, BL; Coutinho, PM; Rancurel, C; Bernard, T; Lombard, V; Henrissat, B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 37:D233-8.
- Carneiro, CNB; Isejima, EM; Samuels, RI; Silva, CP (2004). Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Insect Physiology.** 50 (11): 1093-1101.
- Chalegre, KDM; Romão, TP; Amorim, LB; Anastacio, DB; Barros, RA; Oliveira, CMF; Regis, L; de-Melo-Neto, OP; Silva-Filha, MHNL (2009). Detection of an Allele Conferring Resistance to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex quinquefasciatus* Populations by Molecular Screening. **Applied Environmental Microbiology.** 75:1044–1049.
- Chen, MM; Shi, L & Sullivan, JRDJ (2001). *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize haem polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and beta-hematin. **Mol. Biochem. Parasitol.** 113:1-8.
- Chiba, S. (1997) Molecular mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 61 (8): 1233-1239.
- Coan, C & DiCarlo, R (1990). Effect of diethyl pyrocarbonate modification on the calcium binding mechanism of the sarcoplasmic reticulum ATPase. **J Biol Chem.** 265(10): 5376-84.
- Colepico-Neto, P; Bechara, EJH; Ferreira, C & Terra, WR (1986). Evolutionary considerations of the spatial organization of digestion in the luminescent predaceous larvae of *Pyrophorus punctatissimus* (Coleoptera: Elateridae). **Insect Biochem.** 16: 811-817.
- Copley, S.D (2003). Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 7: 265–272.
- Corrêa-Soares, JB; Menezes, D; Vannier-Santos, MA; Ferreira-Pereira, A; Almeida, GT; Venancio, TM; Verjovski-Almeida, S; Zishiri, VK; Kuter, D; Hunter, R; Egan, TJ & Oliveira, MF (2009). Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. **PLoS Negl Trop Dis.** 3(7): e477.

- Damasceno-Sa, JC; Carneiro, CNB; Damatta, RA; Samuels, RI; Terra, WR & Silva, CP (2007). Biphasic perimicrovillar membrane production following feeding by previously starved *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Journal of Insect Physiology** 53: 592-600.
- Dansa-Petretski, M; Ribeiro, JMC; Atella, GC; Masuda, H & Oliveira, PI (1995) Antioxidante role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein: protection against heme-induced lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.** 270(18) 10893-10896.
- De Melo, JV; Vasconcelos, RHT; Furtado, AF; Peixoto, CA; Silva-Filha, MHNL (2008). Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron.** 39: 1342–1350.
- Devenport, M, Alvarenga, PH, Hisashi, LS, Fujioka, M, Bianconi, L, Pedro, L; Oliveira, PL, Jacobs-Lorena, M. (2006). Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. **Biochem.** 45, 9540-9.
- Dillon, RJ & Kordy, EE (1997). Carbohydrate Digestion in Sandflies:  $\alpha$ -Glicosidase Activity in the Midgut of *Phlebotomus langeroni* **Comp. Biochem. Physiol.** 116B(1): 35–40.
- Dorn, A; Stoffel, R; Matile, H; Bubendorf, A & Ridley, RG. (1995). Malarial haemozoin/ $\beta$ -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature** 374: 269–71.
- Dorn, A; Vippagunta, SR; Matile, H; Bubendorf, A; Vennerstrom, JL & Ridley RG (1998). A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerisation and an assessment of its initiation in vitro. **Biochem Pharmacol** 55: 737–47.
- Egan, TJ (2008a). Haemozoin formation. **Mol. & Bioch. Parasitology.** 157: 127–136.
- Egan, TJ (2008b). Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. **Journal of Inorganic Biochemistry.** 102: 1288–1299.
- Emmerson, KC.; Kim, KC, Price, RD. (1973). Parasites of Laboratory Animals. Ames, a State University Press. Lice. In R.J. Flynn (ed).
- Espinoza-Fuentes, FP & Terra, WR (1986). Properties of larval and imaginal membrane-bound digestive enzymes from *Trichosiu pubescens*. **Archs Insect. Biochem. Physiol.** 3: 181-192.
- Ferreira, LS; Calegário, G; Mury, FB; Alencar, MD (2015) Alpha-glucosidases from Non-hematophagous Organisms Crystallize Heme in Vitro. **ijSciences.** 4 (08):24-33.

- Ferreira, C; Ribeiro, AF & Terra, WR (1993). Ultrastructural and biochemical aspects of digestion in the imagoes of the fly *Rhynchosciara americana*. **Entomol. Exp. Appl.** 66: 1355-143.
- Ferreira, C; Ribeiro, AF; Garcia, ES & Terra, WR (1988). Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. **Insect Biochem.** 18: 521-530.
- Ferreira, LM; Romão, TP; Nascimento, NA; Costa, MC; Rezende, AM; de-Melo- Neto, OP; Silva-Filha, MH (2014). Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito  $\alpha$ -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochem Mol Biol.** 50: 34-42.
- Fialho, MCQ; Terra, WR; Moreira, NR; Zanuncio, JC; Serrão, JE (2013). Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Arth.Struc. & Development.** 42: 277 e 285.
- Fonseca, FV; Silva, JR; Samuels, RI; DaMatta, RA; Terra, WR; Silva, CP (2010). Purification and partial characterization of a midgut membrane-bound  $\alpha$ -glucosidase from *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae). **Comp. Biochy. and Physiology.** 155B: 20–25.
- Frandsen, T; Svensson, B. (1998). Plant  $\alpha$ -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. **Plant Molecular Biology.** 37: 1-13.
- Fresquet N, Lazzari CR (2011). Response to heat in *Rhodnius prolixus*: the role of the thermal background. **J Insect Physiol.** 57: 1446-1449.
- Friend, WG (1965). The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stål. **Can. J. Zool.** 43: 125-132.
- Ganem, B; Murray, D K; Granner, DK; Mayes, PA; Rodwell, VW (1994) Harper: Bioquímica, **Atheneu**: São Paulo.
- Garcia, ES; Macarini, JD; Garcia, MLM & Ubatuba, FB (1975) Alimentação de *Rhodnius prolixus* no laboratório. **An. Acad. Brasil. Cienc.** 47: 539-545.
- Ghadamyari, M; Hosseinaveh, V; Sharifi, M (2010). Partial biochemical characterization of a- and b-glucosidases of lesser mulberry pyralid. *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). **Comptes Rendus Biologies.** 333, 197–204.
- Gerin, I; Noël, G; Bolsée, J; Haumont, O; van Schaftingen, E; Bommer, GT (2014) Identification of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) as the

- phosphoglycolate-independent 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase. **Biochem. J.** 458: 439–448.
- Goldie, P; Roth, EF; Oppenheim, J & Vanderberg, JP (1990). Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hemozoin. **Am J Trop Med Hyg.** 43: 584–96.
- Gontijo, NF; Almeida-Silva, S; Costa, FF; Mares-Guia, ML; Williams, P & Melo, MN (1998). *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive Glycosidases, and Some Speculations upon Leishmania Development. **Exp. Parasitol.** 90: 212–219.
- Graça-Souza, AV; Maya-Monteiro, C; Paiva-Silva, GO; Braz, GRC; Paes, MC; Sorgine, MHF; Oliveira, MF; Oliveira, PL (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochem Mol Biol** 36(4): 322- 335.
- Graça-Souza, AV; Petretsky, JH; Demasi, M; Bechara, EJH & Oliveira, PL (1997). **Free Rad. Biol. Med.** 22: 209-214.
- Gutierrez, E. I. (2013) Análise Computacional de Alfa-Glucosidases de Insetos Hematófagos. Dissertação de Mestrado, Uenf- RJ.
- Hakamata W, Kurihara M, Okuda H, Nishio T, Oku T. (2009). Design and Screening Strategies for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on Enzymological Information. **Current Topics in Medicinal Chemistry** 9: 3-12.
- Henrissat, B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal.** 280: 309-316.
- Henrissat, B; Bairoch, A (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal.** 293: 781-788.
- Houseman, JG; Morrison, PE; Downe, AER (1985). Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* (Hemiptera: Phymatidae). **Can J. Zool.** 63, 1288-1291.
- Jackson, KE; Klonis, N; Ferguson, DJP; Adisa, A; Dogovski, C & Tilley, L (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.** 54: 109–122.
- Jacobson, RL & Schlein, Y (2001). *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express alpha-amylase and alpha-glucosidase. **Acta Trop** 78(1): 41–49.
- Janecek, S (2000). Structural features and evolutionary relationship in the  $\alpha$ -amylase family. **Glycoenzymes**, 19-54.

- Jani, D; Nagarkatti, R; Beatty, W; Angel, R; Slebodnick, C; Andersen, J; Kumar, S & Rathore, D (2008). HDP – a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. **PLoS Pathog** 4(4): e1000053.
- Jespersen, HM; MacGregor, EA; Henrissat, B; Sierks, MR; Svensson, B (1993). Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural feature of the catalytic (L/K)8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes, **J. Protein Chem.** 12.
- Kalyanaraman B, Sivarajah K, Eling TE, Mason RP (1983). A free radical mediated cooxidation of tetramethylhydrazine by prostaglandin hydroperoxidase. **Carcinogenesis.** 4(10):1341-3.
- Kelly, JM; Ward, HM; Miles, MA; Kendall, G (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and Leishmania. **Nucleic Acids Research.** 20: 3963-3969.
- Khersonsky, O; Tawfik, DS (2010). Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. **Annu. Rev. Biochem.** 79: 471–505.
- Kubota, M; Tsuji, M; Nishimoto, M; Wongchawalit, J; Okuyama, M; Mori, H; Matsui, H; Surarit, R; Svsti, J; Kimura, A; Chiba, S (2004). Localization of  $\alpha$ - glucosidases I, II and III in Organs of European Honeybees, *Apis mellifera* L., and the Origin of  $\alpha$ - Glucosidase in Honey. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 68: 2346-2352.
- Lagerblad – Previsão Lagerblad. Disponível em: <[http://rhodnius.iq.ufrj.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=22&Itemid=34](http://rhodnius.iq.ufrj.br/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=34)>. Acessado em 2012 e 2013.
- Lara, FA; Lins, U; Paiva-Silva, G; Almeida, IC; Braga, CM; Miguens, FC; Oliveira, PI & Dansa-Petretski, M (2003). A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **J. Exp. Biol.** 206: 1707-1715.
- Lehane, M. (2005). Biology of blood-sucking insects. **Harper Collins Academic.** London, 427p.
- Lehane, MJ (1991) Biology of Blood-Sucking Insects. Harper Collins. **Academic Press, New York.**
- Lent H, Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vector of Chagas'disease. **Bull Am Mus Nat Hist.** 125-520.
- Livak, KJ e Schmittgen, TD (2001). Analysis of relative gene expression data using

- real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **Methods**. 25: 402-408.
- Lovering, Al; Lee, SS; Kim, Y; Withers, SG & Strynadka, CJ (2005) Mechanistic and Structural Analysis of a Family 31 Glycosidase and Its Glycosyl-enzyme Intermediate. **J. Biol. Chem.** 280 (3): 2105–2115.
- Lukashevich, ED & Mostovski, MB. (2003). Hematophagus insects in the fossil record. **Paleont. J.** 37: 153 – 161.
- Lynn, A; Chandra, S; Malhotra, P; Chauhan, VS (1999). Heme binding and polymerization by Plasmodium falciparum histidine rich protein II: influence of pH on activity and conformation. **FEBS Lett** 459(2): 267–271.
- MacGregor, EA; Janecek, S; Svensson, B (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1546: 1-20.
- Majerowicz, D; Alves-Bezerra, M; Logullo, R; Fonseca-de-Souza, AL; Meyer-Fernandes, JR; Braz, GR; Gondim, KC (2011). Looking for reference genes for real time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Molecular Biology**. 20: 713-22.
- Mans, BJ & Neitz, AWH (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insect Biochem. Mol.Biol.** 34: 1-17
- Marinotti, O; Brito, M & Moreira, CK (1996). Apyrase  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 113: 657–679.
- Marinotti, O; James AA (1990). An  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 113: 675-679.
- Mehrabadi, M. and Bandani, AR (2011). Secretion and Formation of Perimicrovillar Membrane in the Digestive System of the Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) in Response to Feeding. **Archives of Insect Biochemistry Physiology**. 78: 190–200.
- Melo, E; Carvalho, I (2006).  $\alpha$  e  $\beta$ -Glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**. 29: 840-843.
- Milgron, LR (1997). The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. **Oxford University press Inc., NY**.547: 593-dc20.
- Moreira, LM; Ribelatto, JC; Imasato, H. (2004). Ruffled and planar conformations of the porphyrin ring in complexes and heme proteins: physical-chemistry properties and spectroscopic implications. **Quím. Nova**. 27(6): 958-963.

- Moreira-Ferro, CK; Marinotti, O & Bijovsky, AT (1999). Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue Cell** 31: 264–273.
- Morgan, MRJ (1975). A qualitative survey of the carbohydrases of the alimentary tract of the migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. **J. Insect. Physiol.** 21: 1045–1053.
- Mury, FB; Da Silva, JR; Ferreira, LS; Ferreira, BS; De Souza-Filho, GA; Souza-Neto, JA, Ribolla, PEM; Silva, CP, Nascimento, VV, Machado, OLT, Berbert-Molina, MA (2009). Alpha-Glucosidase Promotes Hemozoin Formation in a Blood-Sucking Bug: An Evolutionary History. **PLoS ONE**. 4(9): e6966.
- Lehninger, A L; Nelson, KY (2006). *Princípios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: **Sarvier**.
- Naested, H; Kramhoft, B; Lok, F; Bojsen, K; Yu, S; Svensson, B (2006). Production of enzymatically active recombinant full-length barley high pI  $\alpha$ -glucosidase of glycoside family 31 by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris* and affinity purification. **Protein Expression and Purification**. 46:56-63.
- NordgArd, O; Kvaloy, JT; Farnen, R.K., Heikkila, R (2006). Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: The balance between accuracy and precision. **Analytical Biochemistry**. 356: 182-193.
- Oliveira, JH; Goncalves, RL; Lara, FA; Dias, FA; Gandara, AC; Menna-Barreto, RF; Edwards, MC; Laurindo, FR; Silva-Neto, MA; Sorgine, MH; Oliveira, PL (2011). Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. **PLoS Pathog** .7: e1001320.
- Oliveira, MF; Gandara, AC; Braga, CM; Silva, JR; Mury, FB; Dansa-Petretski, M; Menezes, D; Vannier-Santos, MA & Oliveira, PL. (2007). Heme crystallization in the midgut of triatomine insects. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 146(1-2):168-74.
- Oliveira, MF; Kycia, SW; Gomez, A; Kosar, AJ; Bohle, DS; Hempelmann, E; Menezes, D; Vannier-Santos, MA; Oliveira, PL & Ferreira, ST (2005). Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. **FEBS Lett**. 579(27): 6010– 6016.

- Oliveira, MF; Silva, JR; Dansa-Petretski, M; De Souza, W; Braga, CMS; Masuda, H & Oliveira, PL (2000) Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **FEBS Letters**. 477: 95-98.
- Oliveira, MF; Silva, JR; Dansa-Petretski, M; Souza, W; Lins, U; Braga, CMS; Massuda, H & Oliveira, PL (1999). Haem detoxification by an insect. **Nature** 400: 517-18.
- Oliveira, PL; Kawooya, JK; Ribeiro, JMC; Meyer, T; Poorman, R; Alves, EW; Wajker, FA; Machado, EA; Nussenzeig, RH; Padovan, GJ & Massuda, H (1995). A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*: isolation and characterization. **J. Biol. Chem.** 270: 10897-10901.
- Orijih, AU & Fitch, CD (1993). Hemozoin production by *Plasmodium falciparum*: Variation with strain and exposure to cloroquine. **Biochim Biophys. Acta**. 1157: 270-274.
- Pacheco, J & Ogura, M (1966). Ultraestructura del promesenterio de *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera). **Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat.** 26: 44-68.
- Paes, MC; Oliveira, MB & Oliveira, PL (2001). Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol** 48: 63–71.
- Pagola, S; Stephen, PW; Bohle, DS; Kosar, AD & Madsen, S (2000). The structure of malaria pigment ( $\beta$ -haematin). **Nature** 404:307–10.
- Paiva-Silva, GO; Sorgine, MHF; Benedetti, C; Meneghini, R; Almeida, IC; Machado, EA; Petretski, MDA; Law, JH; Oliveira, PL; Masuda, H (2002). On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32:1534-1541.
- Pandey, AV; Babbarwal, VK; Okoyeh, JN; Joshi, RM; Puri, SK; Singh, RL & Chauhan, VS (2003). Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. **Biochem Biophys Res Commun** 308: 736–43.
- Pascoa, V; Oliveira, PL; Dansa-Petretski, M; Silva, JR; Alvarenga, PH; Jacobs-Lorena, M & Lemos, FJ (2002) *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32: 517-523.
- Pereira, LOR; Oliveira, PL; Almeida, IC & Paiva-Silva, GO (2007) Biglutaminylbiliverdin ix alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect vector *Aedes aegypti*. **Biochemistry**. 46(23): 6822–6829.



- Piedrafita, G., Keller, M.A.(2015) Ralser, M. The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions. **Biomolecules**. 5, 2101-2122
- Pisciotta, JM; Coppens, I; Tripathi, AK; Scholl, PF; Shuman, J & Bajad, S (2007). The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. **Biochem. J.** 402: 197–204.
- Ponka P (1999). Cell biology of haem. **Am. J. Med. Sci.** 318: 241–256.
- Portnoy, V; Huang, V; Place, RF; Li, LC (2011). Small RNA and transcriptional upregulation. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**. 2: 748–760.
- Ribeiro, JM (1995). Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? **Insect. Agent. Dis.** 4:143-152
- Ribeiro, JMC; Genta, FA; Sorgine, MHF; Logullo, R; Mesquita, RD; et al. (2014) An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(1): e2594.
- Ridley, RG; Hofheinz, W; Matile, H; Jaquet, C; Dorn, A; Masciadri, R; Jolidon, S; Richter, WF; Guenzi, A; Girometta, MA; Urwyler, H; Huber, W; Thaithong, S; Peters, W (1996). 4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother**.40(8):1846-54.
- Ridley, DG; Dorn, A; Vippagunta, SR & Vennerstrom, JL (1997) Haematin (haem) polymerization and its inhibition by chloroquine antimalarials. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 91(5): 559-566.
- Romão, TP; Chalegre, KDM; Key, S; Ayres, CFJ; Oliveira, CMF; de-Melo- Neto, OP; Silva-Filha, MHNL (2006). A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS Journal**. 273, 1556–1568.
- Romeiro, A; Sole-Cava, A; Sousa, MA; De Souza, W & Attias, M (2000). Ultrastructural and biochemical characterization of promastigote and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. isolated from the intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). **J Eukaryot Microbiol**. 47(3): 208-20.
- Rozen, S e Stanletsky, HJ (2000). Primer on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**.132:365-86.

- Ryter, SW & Tyrrell, RM (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med.** 28: 289-309.
- Santos, VC; Araujo, RN; Machado, LAD; Pereira, MH; Gontijo, NF (2008). The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **Journal of Experimental Biology.** 211, 2792-2798.
- Scacheri, PC; Rozenblatt-Rosen, O; Caplen, NJ; Wolfsberg, TG; Umayam, L; Lee, JC; Hughes, CM; Shanmugam, KS; Bhattacharjee, A; Meyerson, M; Collins, FS (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 101(7):1892-7.
- Schmitt, TH; Frezzatti, WA; Schreier, S (1993). Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. **Arch.Biochem. Biophys.** 307, 96-103.
- Schumaker, TTS; Cristofolletti, PT & Terra, WR. (1993). Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. **Apidologie** 24: 3317.
- Shine, J; Taldone, T; Barletta, M; Kunaparaju, N; Hu, B; Kumar, S; et al. (2008). Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydr Res.** 343 (7):1278-81.
- Silva, CP; Ribeiro, AF & Terra, WR (1996). Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus*, (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 26: 1011-018.
- Silva, CP; Ribeiro, AF; Gulbenkian, S & Terra, WR (1995). Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. **J. Insect. Physiol.** 41: 1093-1103.
- Silva, CP; Silva, JR; Vasconcelos, FF; Dansa-Petretski, M; Damatta, RA; Ribeiro, AF & Terra, WR (2004). Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. **Arthropod Structure and Development.** 33:139-148.
- Silva, JR, Mury FB, Oliveira MF, Oliveira PL, Silva CP, DANSA-PETRETSKI, M. (2007). Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochem Molec Biol** 37(6): 523–531.

- Sinclair, J; Hamza, I (2010). A novel heme-responsive element mediates transcriptional regulation in *Caenorhabditis elegans*. **J Biol Chem.** 285(50):39536-43
- Slater, AF & Cerami, A (1992). Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature.** 355:167-169.
- Slater, AFG; Swiggard, WJ; Orton, BR; Flitter, WD; Goldberg, E; Cerami, A & Henderson, GB (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88: 325-329.
- Smith, PR; Krohn, RI; Hermanson, GT; Mallia, AK; Gartner, FH; Provezano, MD; Fujimoto, EK; Goeke, NM; Olson, BJ & Klenk, DC (1985). Measurements of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** 150: 76-85.
- Souza-Neto, JÁ; Machado, FP; Lima, JB; Valle, D; Ribolla, PEM (2007). Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut  $\alpha$ -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Comp. Biochem. and Physiol.** 147: 993-1000.
- Stiebler, R (2008). Estudos sobre o processo de cristalização de heme em *Rhodnius prolixus*. Dissertação de mestrado. Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ-RJ.
- Stiebler, R; Majerowicz, D; Knudsen, J; Gondim, KC; Wright, DW; Egan, TJ; Oliveira, MF (2014). Unsaturated Glycerophospholipids Mediate Heme Crystallization: Biological Implications for Hemozoin Formation in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. **PLoS ONE.** 9: e88976.
- Stiebler, R; Soares, JBR; Timm, BL; Silva, JR; Mury, FB; Dansa-Petretski, M; Oliveira, MF (2011). On the mechanisms involved in biological heme crystallization. **J. Bioenerg. Biomembr.** 43, 93-99.
- Stiebler, R; Timm BL.; Oliveira, PL; Hearne, GR, Egan, TJ; Oliveira, MF (2010). On the physico-chemical and physiological requirements of hemozoin formation promoted by perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochem Mol Biol.** 40(3):284-92.
- Sullivan, JRDJ; Gluzman, IY & Goldberg, DE (1996) Haemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science.** 271: 219-221.
- Svensson, B (1994). Protein engineering in the K-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. **Plant Mol. Biol.** 25:141-157.
- Terra, WR (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Braz J Med Biol Res.** 21(4): 675–734.

- Terra, WR (1996). Evolution and function of insect peritrophic membrane. **Ciência e Cultura**. 48(5/6), 317-324.
- Terra, WR; Ferreira, C (2012). Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: Gilbert, L.I. (Ed.), **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Academic Press, London, 365–418.
- Terra, WR & Ferreira, C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** 109b: 1-62.
- Terra, WR & Ferreira, C (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science** 4: 171–224
- Terra, WR & Jordão, BP (1989) Final digestion of starch in *Musca domestica* larvae. Distribution and properties of midgut  $\alpha$ -o-glucosidases and glucoamylase. **Insect Biochem.** 19: 285-292.
- Terra, WR & Jordão, BP (1991) Regional distribution and substrate specificity of digestive enzymes involved in terminal digestion in *Musca domestica* hind-midguts. **Archs Insect Biochem. Physiol.** 17: 157-168.
- Terra, WR (1990) Evolution of digestive systems of insect. **A. Rev. Entomol.** 35:181-200.
- Terra, WR; Ferreira, C & Garcia, ES (1979) Carbodiimide-reactive carboxil groups at the active site of na insect midgut trehalase. **Biochim Biophys. Acta** 571(1): 79-85.
- Terra, WR; Ferreira, C; Garcia, ES (1988) Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. **Insect. Biochem.**, 18: 423-434.
- Torre-Bouscoulet, ME; López-Romero, E; Balcázar-Orozco, R; Calvo-Méndez, C & Flores-Carreón, A (2005) Partial purification and biochemical characterization of a soluble alpha-glicosidaseII-like activity from *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.** 251(2): 355.
- Tsiftoglou, AS; Tsamadou, AI; Papadopoulou, LC (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. **Pharmacol. Ther.** 111: 327–345.
- Vale, VF; Moreira, BH; Pereira, MH; Genta, FA; Gontijo, NF (2012). Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis*’ larvae (Diptera – Psychodidae). **Journal of Insect Physiology**. 58:1314–1324.
- Van der Maarel, MJ; van der Veen, B; Uitdehaag, JC; Leemhuis, H; Dijkhuizen, L (2002). Properties and applications os starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **J. Biotechnol.** 94(2):137-55.

- Van der Zee, J; Barr, DP; Mason, RP (1996). ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. **Free Radic Biol Med.** 20,199-206.
- VECTORBASE - BLAST - RHODNIUS PROLIXUS. Disponível em: < <https://www.vectorbase.org/blast/> >. Acessado em abril de agosto de 2012.
- Watanabe, S; Kakudo, A; Ohta, M; Mita, K; Fujiyama, K; Inumaru, S (2013). Molecular cloning and characterization of the  $\alpha$ -glucosidase II from *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. **Ins. Bioch. and Mol. Biology.** 43: 319- 327.
- Wheeler, WC; Whiting, M; Wheeler, QD; And Carpenter, JM (2001). The phylogeny of the extant hexapod orders. **Cladistics** 17: 113-169.
- Withers, N; (2010). Liesegang rings: nanoparticles ring the changes. **Nat Chem.** 2(3):160.
- Zechel, DL & Withers, SG (2000) Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18.
- Zibae, A; Bandani, AR; Ramzi, S; (2009). Enzymatic properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases extracted from midgut and salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Comptes Rendus Biologies,** 332, 633–641.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase A de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

ATGGGTCCCTTGGAAATACATACGAGCTTTGTTTTCTTGGCTTTATTTATTAATTCTGGGTCTGTTCTACAC  
GGAAAATGGGTTCTTAGCTTCAAATCTAAAATTGGAATAAAGCCTGATGTAACCTAGAAAAATGG  
ACGGTCCAATTATAGATTTAGAACTTAATAAAGGAGAGAATCGAGAAAAGGAACCTTTTCAGAATTAGA  
AAAGATTATCAAGTCAGATTAAGGAAGGTCCATCTCTATACGGTTGTAATGTTTCGAGTGTATACTAAT  
CTGCCAGAATTTCTGAACAAAAATTGCAACGCTCACAGTACAGACTGGTCAAAGATGGAGTTTTACTA  
GCTGATCGTGGTTCATTTCACTACTATTTCTGTCATTGAAACCTCTGATTCCAGAAAATGATGCTGCCG  
GTGAAGGTTATATTCTTGTAGAGCCTAACCTTACTTTAAACGGTGAGGAATTACCTTTAGACTGTATTCA  
ATGTGTGACCGTACTTTCCAAGTGTTTAGGCCCTATGTCTACTTGGAAATGATCGTTTAAAGTATAGCCGTT  
CAATCTGGTTATAATATGGTTCATTTTACCCCAATTCAGCAACGTGGCAAGTCTAATTCTGCATATTCCA  
TCAATGATCAACTGTCTATCGATCAAAGCTTTGCTGAAGGCCCTTTTCAAACAAGACCAACTATGGAAC  
AGGTGGGAAATTTTCATGGAAAATTTACGCAAAGAGCATAAAGGTATTAAGTATATGTGATGTTGTGCTGA  
ATCATACAGCAACCGAAGCAGAATGGTTACAATCTCATCCTGAATGCGCGTACAATTTAATGAATACAC  
CACATCTAGCTAGCGAATGTCAGATATTTAGAGTCCAAAATGATGGTCCAAAACCTGGTGTGGTTAC  
TGTATGATACTTGTGGTCTAACTGCTGAAATTGAACTGAAGAACATTTACAGGCCCTCAGGCATCAAT  
TGAATAGTGTATATTACCAGCGCAAAGATTGCTGAATTTTACTGTGGACATAAAGAAAAGTGTAG  
CGGAATTCAGTGATAGATGTTACAAGAGTGAACCTGCAAGAAATCCGGCTGTCAGGGATGAATGTAGG  
TTGAAAGTAATACAGGATCCTCTTTATGAGAGGTTAAAATCAACTGTTGATTTGGAGTTAGCAGTAAAT  
TCGTATAATATATAGAAGTGATTGTTTCGATGAGGACACAAGAAAAAGAAAATGTACTGAAAGTTTT  
AAAAACGTTTGGAAACAATTGAATGATGTTATCCAAAAGAAATGACGACCAATTTACAAGCGGCCGT  
TGAAAATATCGTAGCGAATGTCAGATATTTAGAGTCCAAAATGATGGTCCAAAACCTGGTGTGGTTAC  
AGCGAAAAGTCCGTTGGTGGCCAGATACTTTGTTGATTGGAAAGCTACTAGTGAAGATGCAATGTTCAA  
CAATTATGAAGGAGCATTCAATTATGGCACATAACGGTTGGGTAATGGATCATGATCCGTTGCAGGACTT  
TGCCCAACCGGGATCTAATGTCTATTTAAGAAGAGAACTCATACCTGGACTGATAGCGTCAAATTAAG  
GTACGGCGATAAAAAGAGAAGATTGTCCATATTTATGGGATCGTATGGATCGCTATGTTTCAGAGACTGC  
TCGAATATTCGATGGTATTTCGATTGGATAATTGCCATTCAACACCAATTCATGTAGCTCAGTATTTATTA  
GATTCAGCAAGAGCAATTAACCAGATCTTTATGTAGTACTGAACTGTTTACTAACCCTGATTTGACA  
GATAATGTGTTTGTCAACAAATTAGGGATCACTTACTTATGATCAGGGAATGTATGTCGCTGGGATTC  
CATGAAGTATTAATGGTTCAGTTTATAGATTTGGCGGTTGGTCAATTGGTTCGCTTTACCGCTAGAAATTG  
CTGCAGCTAAGATTGCACATGCTCTGTTTATGGATCAAACCCATGATAATCCTTCGCTGTCAAGGTGC  
GCAGTGTGTTTATGTTGCTACCTTCGTCGGCGCTGGTCTGTATGGCTGCTTGTGCAGTTGGCTCTACAA  
TGGGCTATGACCAGTTGGTACCTCATCAGGATTCGTTGATCAAGTTGATAGAGAAAATTGTTTGTGTA  
CCAGACAAAATCCACGTACATTGGATTGAGTTTTACTGTTTCGCTCACAATTCATTCGGTTGGCCAGACTG  
CAGCACAGAGAACGGTGGTATAGGTAAGGGAATCACCGTGGATGGAATTGCACATAGCGTAATCCTGG  
AAGCTTGGCTCAAACGCATAGATAATAAACCTTGGCATGCCAGAATTAATCAGTTTAAAAAGAAATC  
CAATTAATTAATGGTTCAGTTTATAGATTTGGAATTAAGTGAAGGAAGGAATCACTAGAGGAGTGC  
ACGATGGCTCGAATTGCACCATGCGGACACACTTCTACCAGAATCGATCTGACAAAAGCTTTTAAACCT  
GGATCAGTTT**AGCTATTAGAATTATAAAC**AGGACAAATGCTCGAGAAGCTGCAGCTAAACTTTACAG  
AGATATCATAAAGAATTTTAGATCAAGCACTTCAAATTTAAATTTGATCCACATGAATCATATATT  
GTACAAATGTAGTGAAGAAGAAGAAGGCGGATCTTATGATGTTCCAAATTTTGGAAAATGTTCTATTG  
TGGATTACAAGGAATTATGTCAGTATTAGAAAAAGTTTTTAAAAATGAAGACATAGGACATCCAATTTG  
TGATAATATTAGGAATGGACCATGGCTAGGAGAATACACTGTTAATCGATTGAAGAGAGTCCGCGCGCA  
CTAGTAACTGGGTCAGCTAATAGAAGAGAATTTAAAGCTGGTGAACAATTAACCTCGGGGTTATCGA  
CCCTGGGGTATCTATAGGGTACTGAGTCAAGTATACCAAGCTGTTATTAGATCACTAATGTTACTAATG  
TCTGATTTTATTAAGAACGGTGATGAGTTTACCAAGGAATTAGCTTTAATATCGATTGATGTTGGC  
GCAGTAGCATCCGCTCCACTTCCCTCCCTCTCTGAAAGGATTTACCTCCAAAACCTTGATGCCAGGAAA  
CCGTCTGTTACTTTAGCCGAGGTTTACCACATTTTCGCAACGGGTTACATGAGATCTTGGGGTTCGAGAT  
ACCTTTATTTCAATTGAGAGGATTACTGTTAATCACTGGACGTTTTGATGAAGCCAGATACTTGATATTGG  
GCTATGGAGCTGTCTACGGCATGGTCTGATACCTAATCTTCTGAATGGTGTGATCTTAATCCAAGAT  
ATAATGTGAGAGTCTGTTGGTGGTGGTTACATTAATTAAGAGATTGTAATAAAGATTGGTGGCGGACG  
GATATAATATCCTAAATGAACCTGTGAACAGATTATTTCCAAAACAACGATGCGGAGAAAACCAGAATTC  
CAGGAACAATACTCCATGACGTTATGCAAGAAGCTTTGAATGCCACTTCCAAGGTTTATGCTTTAGG  
GAAAGGAATGCCGATTAGCTATAGATCAGCACATGACCAGCAATGGCTTTGACAATCAAATGGTGT  
CCATCCAAAACAGGATTTGTATTTGGTGGGAATCAATGGAATTTGGAACATGGATGGACAAGATGG  
GCAGCAGCAATGAAGCCGGCACTCTGGGACGTCCTGCTACTCCTAGAGACGGTGCTGCCGTGGAGATA  
GTCGGCTTTCAATGGCTATAGTCTCTGGCTGGATAGTGTATCACCTCATCAGTATCCGCACATTTGAG  
TTACTAGAGTTACAAAATCTGGTGAACAATCTCATGGACCTGGGAAGATTGGGTGAATAGAATAAAG  
AGTAATTTTGAACAGAATTCTACATCCCGCTAGAAGAAAGACGCGATACGAAGAATGAGAACGATAA  
ATATGTACATAAGAGAGGAATCTACAAGGATACTTGTGGAGCTTCAACCATGGTCTGATTATAGACT  
AAGACCAAATTTCTTGTGCTATGGTAGTGAATGGTTATGGCCAACTGGTTATTATCTTCGATCATT

TTGAAAACATGTGAACATAGTAGTGATAGTGTGAAAAGACAAGAAAATGGTTGGGAAGACTTTGGTC  
TACATTGCGTAGCTCAGATTGGCAGGCCTGCCAGAGCTCACTAATGAGAATGGTGCTCACTGTCCGGA  
TGCATGTCCCACACAAGCTTGGTCGGCCGCTTCAATCCTAGAGAGCTGA

## Anexo 2

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase B de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

ATGGTAGATCCATTAATGCCATCCACAATGGGAAATCCAGAAAGAATTGAAGACTTTAAACAGGTGGA  
TCCACGATACGGCAACGTAGACAGTGTGAAGAAAGTATTGTCTGCTCTGAAACTTCAATTGAGCATCAA  
TGGAGGTTACAGCGTGGACGTGGAATGAAGATAGAAAACAGTATTACCTTCATCAGTTTAAATGCCACAC  
AGCCTGATTTGAATTTTAAAAATCCAGAAATGATTGAATACTTTTTCTGACGTATTCAAAATGGTGGCTTG  
ATCTTGGCTTGAGTGGTATCCATGTTGATAAAGGTGGATTTCTTATTTGAAAGTCTCAATTATACTGACGA  
**AGCCATCAACAACATCATCCCTGGCACAGTGCACGATGAATATGATTTTTTCAGGCACACTAATACAA**  
GAGACTTGCCAGAATTAGTTGGTGTAAATTAACAATGGGCAGCTGTGGTTAAAAATTCATCAGGTGTAT  
TTTCTATAAATGGGGTGGCAGATAACGAAGAGTTTACTTACTAATACATCGCCCGTTGGTTA  
TCAAGAATGGTAACTTGACGGTTGAACTATTGGAGAAGTAGATCAACCTTGGATACGGCTGAATGTCT  
CACCGACATGATGCTACTATTGCCTGGACTTTAGTTGTACCCAGTGGAACTGAACTCGGTCTGAATCCT  
GGTTCAATCTTCCCTTGGGATCATTCTAATAGTAATGCAGGGTTTACTACAGCCAACCTACATGGAAG  
AACTGCCTAGTAATTATCTTGAATCAACGTAGAAAAAGAGAAGGTGCAAAATGGATAGTTACTATAA  
TACATTTAAGAGTCTAGTTAAGGAAAGAGCTTCACCTTCTATAGTACATGGTACTACAGAAACTGCTGT  
CATTAAATCTACCGTTTTTCGATTTACCAGTT**GAAAAGTGGTAATCCCGG**ATATCTGATAGCGTTCA  
ACCTTGAGCCTAAGGAAAAAGTCGTGAACCTAAGCAACATGAAGCACGTGCCCGAAGAGCTTACCGTT  
ATAGCTAGATCAAAACAACCTCTGAAACAGTTGCCATTAAG

## Anexo 3

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase C de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

ATGTCCAGATATCATTATTATGCTGCAGTATTGTTCTGTTCTGTGTATTACTGTCTGTTGTAACTGTCT  
AGAGTGGTACGATAGTAAAGTATTATATCAGATTTACCCAAAATCTTTGCCGATTCTGACGGCAATGG  
CATTGGCGATTTAAAAGGTATAATAAATAAAGCGCAGTATCTGAAGGATCTAGGAATAGGAGCAGTCT  
GGTTGTCGCCGATTTTCCAATCTCCTATGAAGGATAATGGATACGATATTTCAAATTACACTGCCATTGA  
TCAAGTATACGGTACTCTGAATGATTTCAAAGAATTAATAAAAAAAGTTTCATGATTTAGGCATAAAAAGT  
TTTACTAGATCTCGTACCAAATCATAACAAGCGATGAACATAAGTGGTTTTGTGGATTCTATTAATAAAAA  
AAATGGAAAAGAAGATTACTATGTTCTGGGTTGATCCAGACAAAATGAGTCCCCTGGATTTTTGCCACC  
AAATAATTGGGTTTCTTGTGGGAGGAAGTGCCTGGACTTACAATGAAAATCGCCAACAATATTATCT  
ACATCAATTTGCAAGCTATCAACCTGATCTAAACTACCATAAATCCTAAAAGTATTAGAAGAAATTAAGAA  
CGTTATGAGATACTGGTTAGATATCGGAGTAGATGGTTTTAGAGTTGATGCTGTTCCATTTTTGGTTGAA  
GATAAAGAAGTATCAGAAGATCAAATACAAGGATGTACTGATGTTAATTCATATAACTGTTTTAGG  
CACGATAAGACAAAGAATTTAAAAGAAACATAACAATATACTTAGGGAAATGGGTACTGTTTTGAAGA  
AAATAAATACAAGGACCAACCAAGAAAACTTTTCTAGAAAGCATATACTACTTTGAATGATACCATTAA  
ATATTATTCTAAACATGCTACGCCATTTAATTTAATCTTCTATTATTGACTCGAGATGTGAATGCAACA  
GAGGTTGAAAAACTTTTTAAAAGATTGGACAGACGTTTTACAAAAGAAAACAGAACTATCTGGGTGAC  
TGGAAATCACGATAATCCACGTATTGGAATAAAATGGGTGAAGATATGATTGATGCTGTAAGCATGCT  
CTCATTTATGGCACCAGGAAACACGGTTACCTACTACGGTGAGGAAATCGGCATGGT**GGACACTTATA**  
**TGGGCAGAAACTATAAATCTGATCCCAGAAATCCAGAGAGAACGCCTATGCAATGGAACAGTAATACT**  
AGTGCAGTTTTTCAAACATAACCAAAACATGGCTCCAGTAAATCCTAATTACTGGGATATAAA**TCAA**  
**GAAAAGAAGCCGCAGATAAGAAGAGTCATTTGACTATTTATAAGAGTTTGGTTGAATTACAAAATGA**  
TATAATTGAAGATAGCAACTATACTACACATATACTGGCGCTTATGTATTCGCTTTGAAGAGAGCGAA  
TCATTTATTGGTTATCAATTTAGATGATAGAGATCAAGAGGTAAATTTAACCAAAATTCATGATTTACA  
AGCAACTCTCAAAGTGAAGATATCATGATTGAATGAAAGCGTTACAGAAGGGGACGAAATTAATAATAG  
CAGATAAATTTGGTATGAGACCAAGAAGTGGAGTTATTTTATACAATTCAGCCGTTATGAATACAATCT  
CAATTCTGCTGATAATTGGCCTGTCATTTCTACATTCCTTGATT

#### Anexo 4

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase D de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

ATGGGAGGTAAGTTATCATCTATGGATCCTATGCATGTGGAGGTTCCAGAATTAAGAGGCCATTTGGAA  
AGAGATCCTTATTTAAAGCCATTTGAAAGAGAATTCAGAAGGAGATATGCAGTGTTTATGGATTCATTG  
GACAAAATAGAGAATGATTTGGGTGGTGTGAAAACCTTTGTACATTCCTACAAAAAATTTGGAATTCAT  
GTCAACATCGATAACTCAATAGACTGTCAAGAGTGGGCACCTGGTGCAGTGCAGCTCTATTTAATCGGA  
CAATTTAATAACTGGGATCGCACAAAGCCATCCATACGTGAAGCATGATTTTGGAAATTTGGAAGTTGCAC  
ATACCTCCGAATCTTGACGGTACCGCACAAATAAACCATTTGTCAGAAATAAAGATAGCAGTAAGAAC  
CACAAATGGCGTATTAGTAGATCGTATTTCTCCTTGGGCCACATATGTCGTTAAACCCCAAAAACCTGA  
AGGCTTGAATTATAAGCATCTGTTTTGGAACCCTAGTCCGACCCAGAAATATCTTACGAAAGAAAGGAG  
GCCTAAAAAACCTGATACTCTCCGAATATATGAATGTCACATTGGTATTGCTACTAGTGAACACAAAGT  
AGGAACATACTCCGAATTTGCAAAAGAAATCGTTCGAAGATTGTTAAACTTGGCTATAACGCTGTTCA  
GATTATGGCAATTATGGAACATGCCTATTACGGTAGTTTTGGATATCAAGTTACAAGTTTTTTTGTCTGCT  
TCAAGCCGTTATGGGACACCTGAAGAATTAACAATTAATAGATGAATGCCATAAAAAATGGTTTGTAT  
GTATTACTAGACATAGTACATTCACATGCTTCTAAAAATGTATTGGATGGATTGAATGAGTTTGTATGGA  
ACAGATTGCGTGTACTTTTCATTCAGGAAGTAGAGGAACGCATCCTTTATGGGACAGCCGCTTTTTGAT  
TATTCACAAATTGAAGTTCAACGTTTTCTTTTGTCTAATTTATGTTGGTATTATGAAGAATATGGATTTG  
ATGGATTCAGATTTGATGGTGTAAACATCTATATTGT**ACCACAGCAGAGGAATGGAAT**CATTTGGAGAC  
TACAATGACTATTTCCGGTCTAAATGTAGACAATGATGGACTAACTTATTTAATGCTAGCAAATATGTTT  
TGCACAAATTTATATCCTAATGCAATTACAATAGCAGAGGATGTTTCAGGAATGCCTGGGTTATGTCGTC  
CAACTGAGGAAGCAGGTGTTGGTTTTCGATTATCGTTTTGGCAATGGCTATTCCTGATAAATGGATTGAAT  
TGCTGAAGACAAAAAGGGATGAAGATTGGAATGTAGGAAATATAGTACATACATTATCTAATCGACGA  
TGGTTGGAGAAGAATATTGCTTATTGTGAATCTCATGATCAGGCTTTAGTAGGAGATAAAACTATTGCC  
TTTTGGCTAATGGATAAGGAAATGTATACGGGGATGTCTCTTATTTATGGTTTCGAACGATATTATTGAA  
AGAGGCATAGCTCTTCATAAAAATTATAAGATTAATAACTCACGCTCTCGGAGGAGAGGCCACTTAAAC  
TTCATGGGTAATGAATTTGGACATCCTGAATGGCTTGATTTTCTCGAGAAGGTAACCTCAGAATCATAT  
CAGTACGCTCGCAGACAATGGAATCTTGTTGATGACCTACATTGAGATATAAAGAATTAATGAATTT  
GATATTGCAATGAATCATTTAGATATGAAATTTAACTGGCTTGATC**ATTACCAGGATACGTGAGCAG**  
GAAACATGAAGAATAAAGTAATAGTTTTTGAGAGAGCTGGACTCTTATTTGCCTTCACTTTCACTT  
GACCAAAAAGTTTTCTGGTTACCGGGTTGGTGTAAATGAATCAGGAGTATTTCAATGCTGCTCAATTC  
AGATGAAAAGAAATTTGGTGGCCATGATAGGCTGAATATGGCAACGAAATTTGCTACTCACAATATCC  
CATTGCTGGTAGACAATTTTCGTTTCAGATTTACATTCCATCTAGAGTAGCTCTAGTTTTTTGCCCGAGT  
T

#### Anexo 5

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase E de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

ATGGTTATTTACAAGCTCTGCCTAATGTTTTATCTATTTTGTGTTTTAATTTCAATAAAAAATGTCAT  
CTGTCAAGATAATATAATAGTTCATCTGTTTCGAGTGGAAATTCATGATATTGCCAGAGAATGTAGAGA  
ATTTTTAGGACCTTATGGATATCATGGTGTTCAGGTATCTCCCGTTAATGAATACGCAATTTCCGAAGG  
AGACCTGGTCTGAGAGATATCAACATTTTCTTATAAAAATTATATCCAGATCGGGAAATGTGGAGGAG  
TTTTTTGCTATGGTTCAAGCATGCAATAAGGCAAAATGTCACAGTTTACGTAGATGTTGTATTTAATCATA  
TGAGTGGCCACGCTTTCACCTGGAGCTAAAGGAATTTGGTGGTAGTACGGCGGATACTAAAAATAAATATT  
ATCCAGCTGTACCGTACGCTTATAAGAACTTTCATAAGACTTGGCAGATCCTAAGTTATCAGGATGCCC  
AACAGGTTTCGTAACCTGTGAACCTGATGGACTCCATGATTTAGACCATTCTCAGCTTTATGTAAGGAAGA  
AAGTAATTAATTTAAATACATTGCTGAAACTAGGAGT**TGGAGGCTTTAGGGTTGATG**CAGCGAA  
ACATATGTGGCCAGCCCAACTAAAGGAAATATATGATCAACTGGATGATTTAAGCACTGATGCTGGATT  
TTCAGCTGGAAGTAGGCCTTTTATTTATCAAGAAGTAATTTGATTATGGTGGAGAAGCTATAAAAAGCTAC  
AGAATATACTGACTTTGGACATGTCACGGAATTCAGATATGGCATAGAGTTGAGCAGAGCCTTCCGGG  
GTAAAAATCTACTAAAATGGCTGAGGAGTTTTGGTCTGATTGGAAATTTAATGCCGAGTAAGTCTGCC  
TCGTATTCATTGATAATCATGACACACAAAGATCTGGAGGTGATTTCTAACTTATAAAGATAGCAGGA  
AGTACAAGATGGCAGTTGGATTTATGCTTAGCTGGCCATATGGCACAAAACGTGTAATGTCCAGCTTTG  
ATTTTTCTAGTAGAGACCAAGGACCACCTCATAATCCAGCATGACCATCAAAGATGTGACCATAAATC  
CAGATATGACTTGT**AATAATGGTTGGATATGTGAAC**CATAGATGGAGGCAAAATTTAATCAATGGTTGG  
ATTTTCAACATTTGTAAGGAACGTTTTGTTGAGAATTTTGGGATAATGGAAGCAATCAAATTTGCTTA  
TTGTAGAGGAAACAAAGGATTTATAGCAATCAACGGTAAATAAATTATGATTTAAATCAAACATTAATGAC  
CTGCTTACCAGCCGGATTGTATTGTGATATCATCTCAGGGCTTAAAGCGTGAACATAAATGTACTGGGAA  
ATCGGTTGAAGTTGACGACAATGAAAAAGCTCAAATTCACCTGTCTACTCATGATGAAGATGGAATTTCT  
TGCGATACATATCCAATCAAGGCTGGAATCGATCAGAAATTTAGGAGGGGTGCTGACTCTATTGTGTA  
CTATAAA



## Anexo 6

**Sequência de nucleotídeos da  $\alpha$ -glucosidase F de *R.prolixus*.** A sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR estão em negrito.

GACTTCGTGCCCAACCATTCGAGTAATCTGCACGATTGGTTCATTAATCGGAGAACAAGGTGGCCGG  
TTATGAGGACTACTACGTCTGGGAGGATGGTAAGCCGAATCCGGCCGGTGGGCGAAATCTACCACCCA  
ACAATTGGATTCAAGCATTCCGAGGAAGTGCCTGGCAATGGAGTGACACAAGGAACCAGTACTATCTG  
CATCAGTTTACTGTCTGGGCAGCCAGATCTTAACTATCGCAATCCAAAGGTGGTGCAGGAGATGAAAGA  
TATCCTTACATTCTGGCTGGATAAAGGGGTCGATGGGTACGAATCGATGCCGTTCCGACGCTGTACGA  
AGATACTCAGCTACGGGAT**TGAGCCAGCGAGTGGTCT**GACGGAAGACACGGAGGATACAACTGTCTG  
CTCCATATCTACACCCAAGATTTACCCGAAACCGTCGAAATGGTGTACGAATGGCGAGAGTTGGTGGAT  
GCGTATCAACGGGAGCATGGTGGGGACACGAGAGTCATCATGACGGAAGCGTACTCTTCGTTAGAAAT  
CATCCAAACCTACTATCAAAGCGCGAGTGGTCTGGGATCGCACATGCCGTTCAATTTCCGCATCAT  
CACCGAACTGAACGAACAATCGAAACCCTCGGATTACGTGAAGGTGGTTCAGGATTGGATGAGCATCG  
TCCCGGCTGGCAATGTTCC**TAAGTGGTCTGGGCAAT**CACGAT