

ALPHA-GLUCOSIDASE DE *Aedes aegypti* E SEU POTENCIAL DE DETOXIFICAÇÃO DE HEME

Lugon M.D.¹, Mury F.B.², Dansa-Petretski M.³

¹UENF/Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, magda_dl@hotmail.com

²UENF/Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, fmury@uenf.com.br

³UENF/Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, marilvia@uenf.com

Resumo - Em *Rhodnius prolixus*, uma α -glucosidase da membrana perimicrovilar parece estar envolvida na formação de Hemozoína (Hz) que, neste inseto, ocorre em pH ácido. Em *Aedes aegypti* a detoxificação de heme é realizada no intestino médio posterior, pela associação à matriz peritrófica, sendo o pH do intestino médio posterior de *Ae. aegypti* básico. O objetivo deste trabalho é investigar se α -glucosidases presentes no trato digestivo de *Ae. aegypti* também apresentam atividade de cristalização de heme *in vitro* e se esta atividade é dependente de pH. Nossos dados mostram que o extrato protéico de epitélios de intestinos médios de *Ae. aegypti* catalisa *in vitro* a formação de cristais de heme, que analisados por FTIR mostraram-se muito similares a Hz. Além disso, esta atividade de formação dos cristais de heme, a partir de extrato protéico de epitélios de intestinos médios, ocorre também em pH ácido, com pico em pH 4,5, sugerindo que o lúmen intestinal não apresenta condições fisiológicas compatíveis com essa atividade.

Palavras-chave: hematofagia, pH, epitélio intestinal

Área do Conhecimento: Bioquímica

Introdução

Insetos hematófagos se alimentam do sangue de vertebrado, digerem a hemoglobina e liberam heme no lúmen intestinal. A liberação de heme é tóxica por gerar espécies reativas de oxigênio que promovem a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Halliwell & Gutteridge, 1992). Por isso, os insetos apresentam mecanismos detoxificantes do heme, que em *Ae. aegypti* caracteriza-se pela associação do mesmo à matriz peritrófica (Pascoa *et al.*, 2002). Mury *et al.* (2009), mostraram que a α -glucosidase do epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* atua na síntese de Hz, um cristal de heme que representa uma primeira barreira contra os efeitos tóxicos do grupamento heme neste inseto (Oliveira *et al.*, 1999).

O objetivo deste trabalho foi investigar se α -glucosidases presentes no trato digestivo de *Ae. aegypti*, são capazes de promover a cristalização de heme.

Metodologia

Ae. aegypti da linhagem Rockefeller foram obtidos de uma colônia presente no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), UENF. Os ovos foram espalhados em um recipiente com água e ração de camundongo moída. A ração foi adicionada até o estágio pupal, em que as pupas foram transferidas para uma gaiola para a emergência dos adultos. Estes foram mantidos nas gaiolas com solução aquosa de sacarose 10%. Os insetos foram alimentados com sangue de camundongo para postura de ovos ou para a realização dos experimentos.

Epitélios de intestinos médios foram obtidos por dissecação dos insetos, homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador do tipo “Potter Elvehjem”, seguido por repetidas sessões de lavagem em água destilada e congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. As proteínas foram extraídas por incubação das amostras com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NP-40, 0,1%, imidazol 5 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM, *overnight* sob agitação a 4°C. Logo após, foram centrifugadas a 20000xg por 30 min, aproveitando-se somente o sobrenadante.

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de dosagem por BCA (Smith, *et al.*, 1985).

No ensaio de síntese de cristais de heme (Slater & Cerami, 1992, com modificações) as reações foram realizadas para 1 mL de volume final do tampão acetato de sódio 0,5 M, pH 4,8. Foram utilizados 12 µg de proteínas. Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução de hemina (SIGMA – USA) 10 mM em NaOH 0,1N. As amostras foram mantidas por 24h em uma estufa a 28°C.

Baseado no método descrito por Sullivan *et al.* (1996), com modificações, o material obtido pela reação de síntese *in vitro* foi centrifugado a 15000xg, para extração dos cristais de heme. A extração foi realizada em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,2) + SDS 2,5 %. Após a extração, os cristais resultantes foram centrifugados, ressuspensos em 1 mL de NaOH 0,1 N e agitado por 20 minutos a temperatura ambiente. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro MINI/UV-1240 (SHIMADZU) a 400 nm. As dosagens de heme foram feitas a partir de uma curva padrão com hemina bovina comercial diluída em NaOH 100mM.

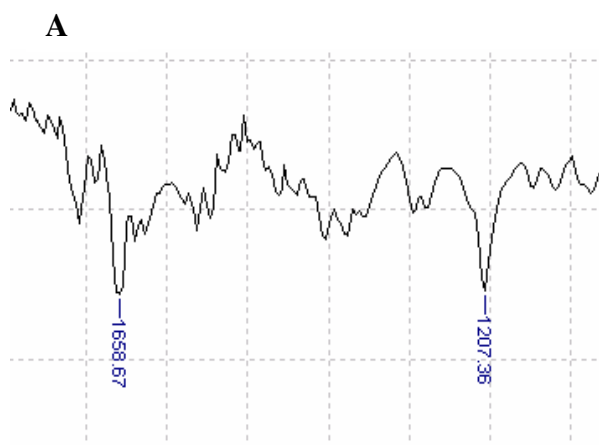
As amostras submetidas à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram secas no SpeedVac. Em seguida adicionou-se uma pequena quantidade de KBr,

agitando por alguns segundos. O conteúdo desta mistura foi submetido a uma pressão de 10 toneladas para a formação das pastilhas em KBr. As amostras foram analisadas sob vácuo no espectrômetro Magna 550 Nicolet.

O extrato protéico obtido a partir de epitélios de intestinos médios foi incubado com o substrato da enzima α -glucosidase. A atividade da mesma foi medida indiretamente pela quantificação de *p*-nitrofenolato, resultante da hidrólise de *p*-nitrofenil α D-glicosídeo 5 mM em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5. O *p*-nitrofenolato absorve luz em 410 nm.

Resultados

Extratos protéicos de epitélios de intestinos médios de fêmeas adultas alimentadas com solução aquosa de sacarose 10% ou com sangue de camundongo foram submetidos ao ensaio de cristalização de heme. O resultado foi analisado através de FTIR. A análise mostrou os picos característicos de Hz, 1210 cm⁻¹ e 1660 cm⁻¹ (Figura 1 A e B).



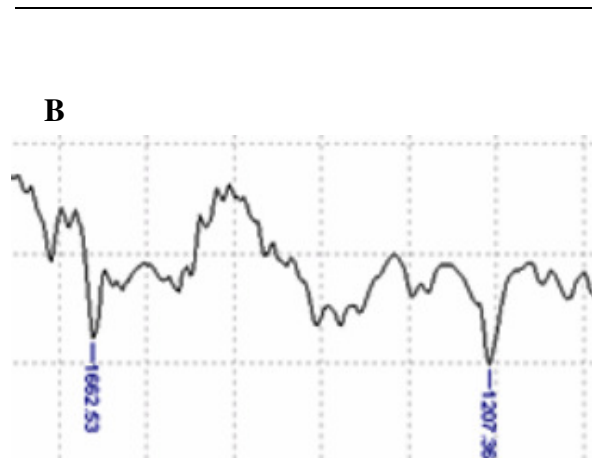


Figura 1 – Análise por FTIR dos cristais de heme formados *in vitro* a partir de extrato protéico de epitélios de intestinos médios de fêmeas alimentadas com solução aquosa de sacarose (A) e de fêmeas alimentadas com sangue (B).

Foram realizados também ensaios de cristalização de heme *in vitro* com variações de pH, a fim de verificar a faixa de pH em que ocorre formação de cristais de heme. Para isso, foram testados extratos protéicos de epitélios de intestinos médios de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue. Foram utilizados extratos protéicos de epitélios intestinais de *R. prolixus* e de membranas de eritrócitos de coelho, como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Foi observada uma maior atividade de cristalização de heme em *Ae. aegypti* em pH ácido (pH 4.0 – 5.6) (Figura 2).

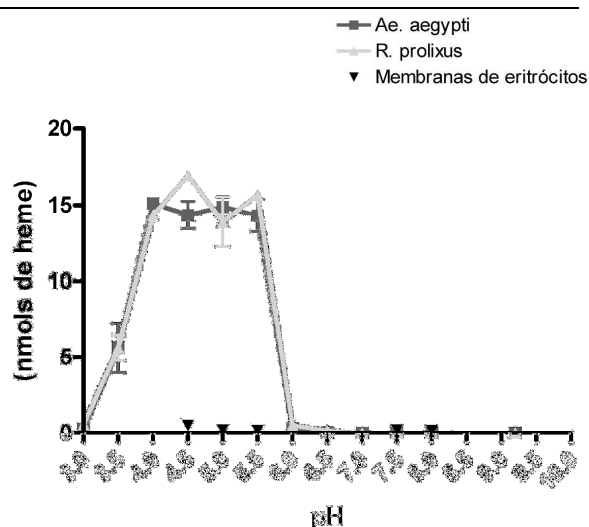
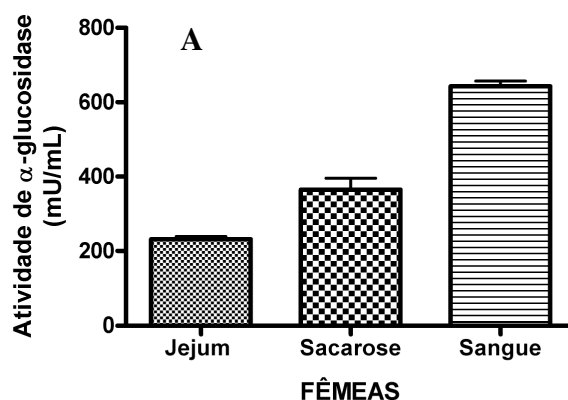


Figura 2: Formação de cristais de heme em diferentes valores de pH. Extratos protéicos de membranas eritrocíticas, de intestinos médios posteriores de *Ae. aegypti* e de intestinos de *R. prolixus* foram incubados por 24h em diferentes condições de pH, juntamente com hemina.

Foram realizados ensaios comparativos de atividade da enzima e de cristalização de heme com extratos protéicos de epitélios de intestinos médios de fêmeas alimentadas apenas com solução aquosa de sacarose, alimentadas com sangue de camundongo e em jejum, a fim de analisar o efeito da dieta na atividade de α -glucosidase e na síntese de cristais de heme (Figura 3 A e B).



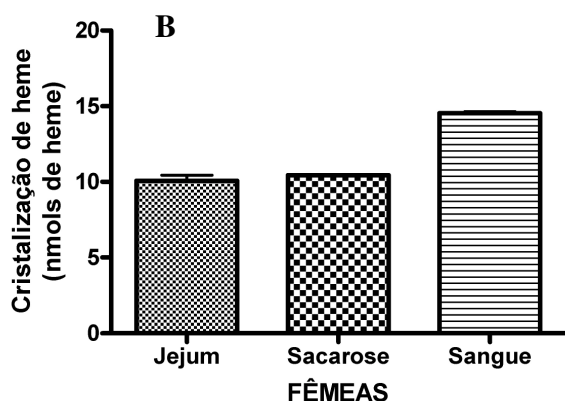


Figura 3: Efeito da dieta na atividade de α -glucosidase (A) e na cristalização de heme (B). Na atividade de cristalização de heme foram usados 12 μ g de extrato protéico de epitélios de intestinos médios posteriores.

Discussão

A análise por FTIR (Figura 1) mostrou que tanto extrato protéico de epitélios de intestinos médios de fêmeas alimentadas com sangue quanto de fêmeas alimentadas com solução aquosa de sacarose, quando submetidos ao ensaio de cristalização de heme *in vitro* apresentam picos característicos de Hz (1210 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}), como já verificado para *R. prolixus* (Oliveira *et al.*, 1999).

Para a formação de Hz a partir de monômeros de heme, 50% dos grupamentos de ácido propiônico do heme devem estar desprotonados, o que ocorre em valores de pH iguais ao pK_a dos propionatos, entre 4,8 – 5,0. Estes valores coincidem com a faixa de pH do vacúolo digestório de *Plasmodium* (Ridley *et al.*, 1995), onde esta estrutura foi descrita pela primeira vez, e do intestino médio de *R. prolixus* (Oliveira *et al.*, 1999). Em contrapartida, o lúmen do intestino médio posterior de *Ae. aegypti*, região em que ocorre formação de matriz peritrófica após

alimentação sanguínea, apresenta pH básico (Corena *et al.*, 2005). Com isso, buscamos analisar a influência do pH na formação de cristais de heme *in vitro* em *Ae. aegypti*. Foi possível observar que a cristalização de heme *in vitro* ocorre, preferencialmente, em pH ácido entre 4.0 e 5.6 (Figura 2), sugerindo que o lúmen intestinal deste inseto não apresenta condições fisiológicas compatíveis com a atividade de síntese de Hz.

Heme é uma molécula regulatória versátil e é conhecida por regular processos celulares como diferenciação, transcrição e processamento pós-traducional em diferentes sistemas (Thomas *et al.*, 1984). Verificou-se em trabalhos anteriores que heme é capaz de aumentar a atividade e expressão da α -glucosidase em *R. prolixus* (Mury *et al.*, 2009). Baseado nisso, extratos protéicos de epitélios de intestinos médios de fêmeas de *Ae. aegypti* em jejum, alimentadas com solução aquosa de sacarose e com sangue foram testados em ensaios de atividade de α -glucosidase e de síntese de cristais de heme *in vitro*. Como pode se analisado na figura 3, extratos protéicos de fêmeas alimentadas com sangue apresentaram maior atividade de α -glucosidase e de síntese de cristais de heme em relação aos extratos de fêmeas em jejum e alimentadas com solução aquosa de sacarose.

Conclusão

Cristais de heme formados *in vitro* a partir de extratos protéicos de epitélios de intestinos médios de fêmeas alimentadas com sangue de camundongo e de fêmeas alimentadas com solução aquosa de sacarose, quando analisados por FTIR apresentaram picos característicos de Hz (1210 cm^{-1} e 1660 cm^{-1}). Entretanto, a cristalização de heme *in vitro* em *Ae. aegypti* ocorre principalmente em pH ácido entre 4.0 e 5.6, o que, a princípio, descarta a possibilidade de síntese de Hz *in*

vivo neste sistema nos moldes observados para o *R. prolixus*.

Fêmeas alimentadas com sangue apresentam maior atividade da enzima α -glucosidase e maior potencial de cristalização de heme se comparadas às fêmeas em jejum e alimentadas com solução aquosa de sacarose.

Referências

CORENA, M., VANEKERIS L., SALAZAR M. I., BOWERS D., FIEDLER M. M., SILVERMAN D., TU C., LINSER P. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. **The J. of Exp. Biol.** v.208 p.3263-3273, 2005.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. **FEBS.** v.307 p.108-112, 1992.

MURY F.B., SILVA J.R., FERREIRA L.S., SANTOS LF, SOUZA-FILHO G.A., SOUZA-NETO J.A., RIBOLLA P.E., SILVA C.P., NASCIMENTO V.V., MACHADO O.L., BERBERT-MOLINA M.A. e DANSAPETRETSKY, M. Alpha-glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug: an evolutionary history. **Plos One.** 4(9):e6966, 2009.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, J.R.; DANSAPETRETSKY, M.; SOUZA, W.; LINS, U.; BRAGA, C.M.S.; MASSUDA, H. e OLIVEIRA, P. L. Haem detoxification by an insect. **Nature.** v.400 p.517-18, 1999.

PASCOA, V., OLIVEIRA, P. L., DANSAPETRETSKY, M., SILVA, J. R., ALVARENGA, P. H., JACOBS-LORENA, M., LEMOS, F. J. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** v.32 p.517-523, 2002.

RYDLEY, R. G.; DORN, A.; MATILE, H. e KANSY, M. Haem polymerization in malaria – Reply. **Nature.** v.378 p. 138-139, 1995.

SLATER, A. F. e CERAMI, A. Inhibition by choroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature.** V.355 p.167-169, 1992.

SULLIVAN, J.R.D.J.; GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. Haemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science.** v.271 p.219-221, 1996.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; GARCIA, E. S. Carbodiimide-reactive carboxil groups at the active site of na insect midgut trehalase. **Biochim Biophys. Acta** v.571 n.1 p.79-85, 1979.

THOMAS, NS; MATTS, RL; PETRYSHYN, R & LONDON, IM Distribution of reversing factor in reticulocyte lysates during active protein synthesis and on inhibition by heme deprivation or double-stranded RNA. **PNAS** 81(22): 6998-7002, 1984.