

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

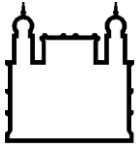
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Influência da alimentação sanguínea e da infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi na modulação da atividade enzimática e expressão gênica
de glicosídeo hidrolases de *Rhodnius prolixus***

Gerson Profeta de Souza

RIO DE JANEIRO

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Gerson Profeta de Souza

**Influência da alimentação sanguínea e da infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi na modulação da atividade enzimática e expressão gênica
de glicosídeo hidrolases de *Rhodnius prolixus***

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientador : Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT/ FIOCRUZ - RJ

S729 Souza, Gerson Profeta de

Influência da alimentação sanguínea e da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* na modulação da atividade enzimática e expressão gênica de glicosídeo hidrolases de *Rhodnius prolixus*/ Gerson Profeta de Souza – Rio de Janeiro: 2016.

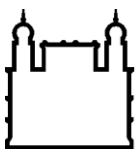
xviii, 118 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 89-99

1. *Rhodnius prolixus*. 2. Glicosídeo Hidrolases. 3. Digestão. 4. Doença de Chagas. I. Título

CDD: 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Gerson Profeta de Souza

**Influência da alimentação sanguínea e da infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi na modulação da atividade enzimática e expressão gênica
de glicosídeo hidrolases de *Rhodnius prolixus***

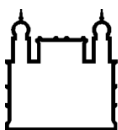
ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

Aprovado em: 26/08/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves - Presidente
Prof. Dr. Ednildo Machado - Titular /Revisor
Prof. Dra. Marilvia Dansa de Alencar - Titular
Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira - Suplente
Prof. Dra. Evelize Folly das Chagas - Suplente

Rio de Janeiro, 26 de Agosto de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA E DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EXPRESSÃO GÊNICA DE GLICOSÍDEO HIDROLASES DE *Rhodnius prolixus*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gerson Profeta de Souza

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária, endêmica no Brasil, onde diversos biomas ainda são favoráveis à instalação de vetores. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é naturalmente transmitido pelas fezes e urina de triatomíneos infectados. A espécie *Rhodnius prolixus* é um modelo muito utilizado em estudos fisiológicos de interação parasito-vetor, além de ser considerada um importante vetor da Doença de Chagas em alguns países do continente americano. As glicosídeo hidrolases (GHs) são enzimas responsáveis por realizar a hidrólise de ligações glicosídicas, e podem desempenhar papel importante na digestão de açúcares do sangue da alimentação. O estudo de enzimas que participam do processo de digestão torna-se um ponto importante a ser estudado, pois todo ciclo do *T. cruzi* ocorre no trato digestivo dos triatomíneos. Verificamos que ensaios contínuos podem ser utilizados para medidas de atividade de diferentes glicosidases, fornecendo algumas vantagens sobre a metodologia tradicionalmente utilizada. Através deste método determinamos o perfil de atividade enzimática de seis glicosidases (α -Glicosidase, β -Glicosidase, α -Manosidase, N-acetil hexosaminidase, β -Galactosidase e α -Fucosidase) no aparelho digestivo, ao longo da digestão de *Rhodnius prolixus*. Foram observados padrões distintos de atividade enzimática nos diferentes compartimentos estudados. Algumas glicosidases são induzidas após alimentação, mostrou-se também que na maioria dos tecidos o pico máximo de atividade encontra-se no 5º, 7º ou 9º dia após alimentação. α -Glicosidase mostrou-se majoritária na fração tecidual do intestino médio, apresentando concentrações muito superiores às demais GHs em qualquer parte do intestino. Na fração solúvel do intestino médio anterior esta glicosidase apresentou indução de 7,5 vezes 9 dias após alimentação. Estudos de expressão gênica revelaram que alguns genes são expressos de forma constante nos compartimentos estudados, conforme apresentado por RPRC007504, identificador de α -Fucosidase. Os genes de β -Galactosidase investigados são preferencialmente expressos no intestino médio posterior, e estes dados são coerentes com a alta atividade desta enzima neste compartimento. Observamos também que a infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* modula a atividade de Glicosídeo Hidrolases em diferentes compartimentos do triatomíneo em etapas distintas da digestão, sugerindo que o estudo destas enzimas pode fornecer informações a cerca de novos aspectos das interações parasito-vetor.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF BLOOD FEEDING AND EXPERIMENTAL INFECTION BY *Trypanosoma cruzi* IN MODULATION OF ENZYMATIC ACTIVITY AND GENE EXPRESSION OF GLYCOSIDE HYDROLASES IN *Rhodnius prolixus*.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gerson Profeta de Souza

Chagas disease is a parasitic infection endemic in Brazil, where many biomes are still favorable to vectors installation. The protozoan *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, is naturally transmitted by feces and urine of infected triatomines. Among the species described, *Rhodnius prolixus* is the model used for physiological studies of parasite-vector interactions, and is considered an important vector of Chagas disease in some countries in the Americas. The glycoside hydrolases (GHs) are enzymes responsible for hydrolysis of glycosidic bonds, and may play a role in the digestion of blood sugars as well as the interaction between the parasite and the triatomine digestive system. Because *Trypanosoma cruzi* life cycle inside the invertebrate host occurs exclusively in the gut, the study of enzymes that participate in digestion becomes an important issue to be studied. We found that continuous assays can be used for different glycosidase activity measures, providing some advantages over the method traditionally used. Through this method we determine the activity of six glycosidases (α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase, N-acetyl hexosaminidase, β -galactosidase and α -fucosidase) in the digestive tract along the digestion of *Rhodnius prolixus*. Distinct patterns of activity were observed in the different compartments. Some glycosidases are induced after feeding suggesting that these enzymes have a decisive role in triatomine digestion. Temporal analysis showed that in most tissues activity peaks is in the 5th, 7th or 9th day after feeding. α -glucosidase is the major glycosidase in midgut, with higher concentrations in tissue sample than in contents. In the contents of anterior midgut this glycosidase showed 7.5 fold induction 9 days after feeding indicating that soluble enzymes are likely to undergo changes in response to blood as well as membrane-associated proteins. Gene expression studies revealed that some genes are constitutively expressed, as shown by RPRC007504 (α -fucosidase). The β -galactosidase genes investigated are preferentially expressed in the posterior midgut, and these data are consistent with the higher activity of this enzyme in this compartment. The protozoan *Trypanosoma cruzi* modulates glycoside hydrolases activity in different compartments of the triatomine in different stages of digestion, suggesting that the study of these enzymes can provide valuable information for understanding new aspects of parasite-vector interactions.

*Dedico este trabalho a meus pais José Antonio e Helena (In memorian);
Aos meus irmãos Joice e Wilian, e por fim a minha querida... esposa ??? Jéssica Pereira, pessoas que sempre estiveram comigo nos momentos mais felizes e difíceis de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai José Antonio de Souza (In memorian) que mesmo não possuindo estudos foi a pessoa mais inteligente que conheci.

Aos meus queridos irmãos Joice Profeta e Wilian Profeta, pelo carinho e apoio incondicional, amo muito vocês.

Aos amigos Wagner Júdice, Kátia Mugnol e Ivarne Tersariol, pelo respeito e ensinamentos compartilhados, pessoas que participaram de modo importante para meu ingresso na pesquisa.

Aos amigos Fernando Genta e Marisa Momoli, pelo apoio, orientação, incentivo e confiança a mim depositada. Seres humanos incríveis que contribuíram para meu amadurecimento profissional e pessoal.

A toda instituição, agências de fomento e aos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço ao monstro Jéssica Pereira pelo amor, carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado. Sua ajuda e dedicação foram fundamentais para conclusão não só deste trabalho. Obrigado por me fazer tão feliz, independente das circunstâncias.

A todos acima meu muito obrigado e saibam que me espelho em cada um de vocês.

... O que é um Ser Humano? O que é um Homem? O que é uma Mulher?

Aristóteles disse no século IV A.C. que o Homem é um animal racional. Até hoje a gente usa isso: “O Homem é um animal racional”.

Pascal disse no século XVII: “O Homem é um organismo pensante”.

Fernando Pessoa tem a definição que eu mais gosto do Ser Humano: “O Homem é um cadáver adiado”...

... A ciência acredita que nós estamos em um Universo que tem, provavelmente, um formato cilíndrico e que provavelmente esse Universo apareceu há cerca de 15 bilhões de anos. Alguns falam em 13, outros em 18... Há 15 bilhões de anos houve uma expansão aceleradíssima de matéria e energia. Essa matéria se concentrou naquilo que nós, humanos, chamamos de estrelas e as estrelas se agruparam naquilo que nós, humanos, chamamos de galáxias.

A ciência calcula que em nosso Universo há por volta de 200 bilhões de galáxias. Não são 200 galáxias, são 200.000.000.000 de galáxias. Uma delas é a nossa, que fica na “porta de saída” do Universo, que é a Via Láctea e que nem é tão grande, ela tem apenas 100 bilhões de estrelas. Uma dessas estrelas é a nossa, que quando eu era criança a gente chamava de “estrela de quinta grandeza”, agora é chamada de “estrela anã”, que é o sol.

O que é o sol? O sol é uma estrelinha entre outras 100 bilhões (100.000.000.000) de estrelas, compondo uma única galáxia, entre outras 200 bilhões de galáxias em um dos Universos possíveis e que vai desaparecer. Em volta dessa estrelinha, que é o sol, giram massas planetárias sem luz própria (que são os planetas) e são 9, para ser mais exato, talvez 8. A terceira delas mais perto do sol é a Terra.

O que é a Terra? A Terra é um planetinha, que gira em torno de uma estrelinha, que é uma entre outras 100 bilhões de estrelas, compondo uma galáxia entre outras 200 bilhões de galáxias, em um dos universos possíveis e que vai desaparecer.

Veja como nós somos “importantes”!

Tem gente que acha que Deus fez tudo isso só pra nós existirmos aqui. Esse é um Deus “inteligente”, entende da relação “Custo x Benefício”. Ele faz bilhões de estrelas e galáxias só pra nós existirmos aqui. Tem gente que pensa ainda pior: Pensa que Deus fez isso tudo só para essa pessoa existir aqui. O tanto de dinheiro que ela carrega, o sotaque que ela usa, a religião que ela pratica, o cargo que ela tem dentro do banco ou da universidade, a cor da pele que ela tem...

... A ciência calcula que no nosso planetinha haja por volta de 30 bilhões de espécies, mas até agora só se classificou de 3 bilhões de espécies de vida diferente. Uma delas é a nossa, o Homo sapiens.

A nossa espécie é uma espécie entre 3.000.000.000 de espécies já classificadas, que vive em um planetinha, que gira em torno de uma estrelinha, que é uma entre outras 100.000.000.000 de estrelas, compondo uma única galáxia entre outras 200.000.000.000 de galáxias em um dos Universos possíveis e que vai desaparecer.

Essa espécie (Homo sapiens), em 2007, tinha 6.400.000.000 indivíduos. Um deles é você!

Quem és tu? Tu és um indivíduo entre outros 6.400.000.000 de indivíduos compondo apenas uma espécie entre outras 3.000.000.000 de espécies já classificadas, que vive em um planetinha, que gira em torno de uma estrelinha, que é uma entre outras 100.000.000.000 de estrelas, compondo uma única galáxia, entre outras 200.000.000.000 de galáxias, em um dos universos possíveis e que vai desaparecer!

Quem é você? Quem sou eu?

Quem sou eu pra achar que o único modo de fazer as coisas é como eu faço?

Quem sou eu pra achar que a única cor de pele adequada é a que eu tenho?

Quem sou eu para achar que o único lugar bom pra nascer é onde eu nasci?

Quem sou eu pra achar que o único sotaque correto é o que eu uso?

Quem sou eu pra achar que a única religião certa é a que eu pratico?

Quem sou eu? Quem és tu?

Tu és o “Vice-Treco” do “Sub-Troço”!

Mario Sergio Cortella

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – *Ammonium Persulfate* (Persulfato de Amônio)
BHI – *Brain Heart Infusion medium*
CAZY - *Carbohydrate Active Enzymes* (Enzimas Ativas sobre Carboidratos)
cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar
CG – Citosina-Guanina
CT – *Threshold cycle*
DMSO – *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
ds7504 – *double strand* RNA do gene 7504
dsGFP - *double strand* RNA associado ao template GFP
dsRNA - *double strand* de Ácido Ribonucléico (RNA)
DTUs - *Discrete Typing Units* (Unidades de Tipagem Distintas)
E.C. – *Enzyme Commission*
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GFP – *Green Fluorescent Protein*
GHs – Glicosídeo Hidrolases
GIPLs - Glicosilinositolfosfolipídeos
GS – Glândula Salivar
IMA – Intestino Médio Anterior
IMAcont – Fração solúvel do Intestino Médio Anterior
IMAep – Fração tecidual do Intestino Médio Anterior
IMPcont – Fração solúvel do Intestino Médio Posterior
IMPep – Fração tecidual do Intestino Médio Posterior
IP – Intestino Posterior
kDa - Kilodalton
MP – Membrana Peritrófica
MPMV – Membrana Perimicrovilar
pb – Pares de Base
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFAM – *Protein Families Database*

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

qPCR – *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real)

RIN – *RNA Integrity Number*

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – *Reverse Transcriptase – PCR* (Reação da Transcriptase Reversa seguida de PCR).

RT-qPCR – *Reverse Transcriptase – PCR* (Reação da Transcriptase Reversa seguida de PCR quantitativo).

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de SDS

SFB – Soro Fetal Bovino

TEMED – N’N’N’N’-Tetrametiletilenodiamina

TM – Temperatura de *Melting*

TUB - Tubulina

U – Unidade de Atividade Enzimática

ΔG – Energia Livre de Gibbs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Casa de pau-a-pique apresentando frestas que atuam como abrigo e local propício para proliferação do vetor.....	2
Figura 1.2 – Número estimado de imigrantes infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> vivendo em países não endêmicos.....	2
Figura 1.3 – Manifestações clínicas observadas em casos crônicos da Doença de Chagas.....	3
Figura 1.4 – Fotografia de Carlos Chagas.....	5
Figura 1.5 – Modelo esquemático de diferentes moléculas de superfície do <i>Trypanosoma cruzi</i> envolvidas na interação parasito-hospedeiro.....	7
Figura 1.6 – Diagrama esquemático apresentando variações nas mucinas de superfície do <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com seu ciclo biológico.....	8
Figura 1.7 – Ciclo biológico do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 1.8 – <i>Rhodnius prolixus</i> , um dos importantes vetores da Doença de Chagas.....	10
Figura 1.9 – Semelhança entre as espécies do gênero <i>Rhodnius</i> sp.....	11
Figura 1.10 – Diferentes estágios de desenvolvimento de <i>Rhodnius prolixus</i>	11
Figura 1.11 – Alimentação de <i>Rhodnius prolixus</i> através de aparato artificial.....	12
Figura 1.12 – Representação esquemática da diversidade de aparelhos digestivos encontradas em insetos.....	13
Figura 1.13 – Representação esquemática generalizada dos compartimentos intestinais de insetos, destacando glicoconjugados acoplados a membrana microvilar.....	16
Figura 1.14 – Representação esquemática das etapas da digestão.....	20
Figura 1.15 – Esquema representando a digestão de amido através da atuação de glicosidases.....	22
Figura 1.16 – Árvore Glicídica de algumas glicoproteínas presentes no sangue.....	22
Figura 3.1 – Estrutura dos substratos utilizados para ensaios de glicosidases.....	28
Figura 3.2 – Esquema utilizado para produção de <i>template</i> utilizado para síntese de dsRNA.....	34
Figura 4.1 – Curva padrão de metilumbeliferona em diferentes pHs.....	36
Figura 4.2 – Perfil de atividade enzimática utilizando ensaios contínuos.....	37
Figura 4.3 – Determinação dos volumes ideais de amostra de IMAep de <i>Rhodnius prolixus</i> para ensaios de GHs.....	38

Figura 4.4 – Medidas de atividade de glicosidases de uma mesma amostra utilizando a metodologia de ensaios contínuos e descontínuos.....	40
Figura 4.5 – Quantificação de glicosidases nas amostras de IMAep adquiridas de 90 insetos mantidos em jejum.....	41
Figura 4.6 – Frequência percentual da distribuição populacional de glicosidases em <i>Rhodnius prolixus</i>	42
Figura 4.7 – Perfil de atividade de α -Glicosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	44
Figura 4.8 – Perfil de atividade de β -Glicosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	45
Figura 4.9 – Perfil de atividade de N-acetil hexosaminidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	46
Figura 4.10 – Perfil de atividade de α -Manosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	47
Figura 4.11 – Perfil de atividade de β -Galactosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	48
Figura 4.12 – Perfil de atividade de α -Fucosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.....	49
Figura 4.13 – Comparação da atividade de GHs entre amostras de sangue e IMAcont de <i>Rhodnius prolixus</i>	50
Figura 4.14 – Atividade total de GHs produzidas pelo inseto durante a digestão, comparando a atividade de cada enzima entre compartimentos.....	51
Figura 4.15 – Demonstração da prevalência da atividade total de GHs nos diferentes tecidos digestivos do inseto.....	52
Figura 4.16 – Análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	54
Figura 4.17 – Alterações nas atividades de glicosidases devido a inativação do sistema complemento.....	55
Figura 4.18 – Perfil de Atividade Enzimática de Glicosídeo Hidrolases secretadas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em pH 4,5.....	58
Figura 4.19 – Perfil de Atividade Enzimática de Glicosídeo Hidrolases secretadas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em pH 7,2.....	59
Figura 4.20 – Perfil de Atividade Enzimática de Glicosídeo Hidrolases na fração celular de <i>Trypanosoma cruzi</i> em pH 4,5.....	59

Figura 4.21 – Perfil de Atividade Enzimática de Glicosídeo Hidrolases na fração celular de <i>Trypanosoma cruzi</i> em pH 7,2.....	60
Figura 4.22 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de α -Glicosidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	62
Figura 4.23 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de α -Manosidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	63
Figura 4.24 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de β -Glicosidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	64
Figura 4.25 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de β -Galactosidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	65
Figura 4.26 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de N-acetil hexosaminidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	66
Figura 4.27 – Efeito da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> na atividade digestiva de α -Fucosidase de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo da digestão.....	67
Figura 4.48 – Análise do padrão de expressão gênica de Glicosídeo Hidrolases através da técnica de RT-PCR.....	69
Figura 4.49 – Curva de eficiência da amplificação dos alvos utilizados para realização de RT-qPCR.....	70
Figura 4.50 – Nível de expressão gênica de compartimentos digestivos de <i>R. prolixus</i> , derivados das análises de RT-qPCR.....	73
Figura 4.51 – Acompanhamento temporal da expressão gênica ao longo da digestão do inseto.....	74
Figura 4.52 – Expressão relativa do gene RPRC007504 (α -fucosidase) acompanhada por RT-PCR após injeção de dsRNA.....	75
Figura 4.53 – Atividade enzimática de α -fucosidase avaliada nos diferentes compartimentos de insetos submetidos a injeção de dsRNA.....	76
Figura 5.1 – Representação esquemática do efeito da infecção com <i>T.cruzi</i> nas Glicosídeo Hidrolases envolvidas em diferentes etapas da digestão de <i>R. prolixus</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Volumes de reagentes empregados no preparo de gel de poliacrilamida.....	29
Tabela 3.2 – Iniciadores utilizados para análise do padrão de expressão gênica de Glicosídeo Hidrolases.....	31
Tabela 4.1 – Volumes de amostras empregadas nos ensaios referentes a cada tecido estudado frente às diferentes GHs.....	39
Tabela 4.2 – Atividades de glicosidases através da realização de ensaios contínuos e descontínuos.....	39
Tabela 4.3 – Comparação da atividade de GHs entre amostras de sangue e IMAcont de <i>Rhodnius prolixus</i>	50
Tabela 4.4 – Análise <i>in silico</i> da presença de glicosidases no genoma de <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Histórico	4
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4. <i>Rhodnius prolixus</i>	10
1.5. Sistema Digestivo de Insetos	12
1.5.1. Compartimentos Intestinais	14
1.5.2. Digestão em Hemípteros	17
1.5.3. Fases da digestão	19
1.6. Glicosídeo Hidrolases	20
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral	24
2.2. Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Manutenção de Insetos	25
3.2. Manutenção de Parasitos	25
3.3. Infecção experimental com <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.4. Obtenção de frações intestinais do inseto	26
3.5. Preparo de Amostras para avaliação de GHs Sangue	26
3.6. Preparo de Amostras para avaliação de GHs de <i>T.cruzi</i>	27
3.7. Ensaio de Atividade Enzimática	27
3.8. Quantificação de proteínas	29
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	29

3.10.	Desenho de iniciadores oligonucleotídicos (primers)	30
3.11.	Extração de RNA e Síntese de cDNA	32
3.12.	Análises de expressão gênica por PCR semi quantitativo	33
3.13.	Análises de expressão gênica por PCR quantitativo	33
3.14.	Silenciamento gênico	33
3.15.	Análises estatísticas	34
4.	RESULTADOS	36
4.1.	Padronização da Metodologia Empregada nos Ensaio Enzimáticos	36
4.2.	Determinação do perfil de atividades enzimáticas	43
4.3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida do conteúdo intestinal de <i>R. prolixus</i> ...	53
4.4.	Atividade de GHs em <i>R. prolixus</i> alimentados com sangue submetido à inativação do sistema complemento	55
4.5.	Infecções com <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
4.5.1.	Atividade de GHs no parasito	56
4.5.2.	Modulação da atividade de GHs em insetos infectados com <i>T. cruzi</i>	61
4.6.	Análises de Expressão Gênica	68
4.6.1.	PCR semi-quantitativo	68
4.6.2.	PCR quantitativo	70
4.6.3.	Eficiência dos primers	70
4.6.4.	Silenciamento por Injeção de dsRNA (RNAi)	75
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase Americana, é uma infecção parasitária debilitante, frequentemente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo todo, havendo aproximadamente 10 mil mortes todos os anos ocasionadas pelas manifestações clínicas da doença (WHO, 2016a). Além disso, tem sido sugerido que mais de 25 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção (WHO, 2016b).

A forma clássica de transmissão da Doença de Chagas ocorre através do contato de mucosas ou regiões lesionadas com as fezes e urina de triatomíneos infectados, insetos hematófagos que atuam como vetores da doença (FIOCRUZ, 2013).

Embora sua descoberta tenha ocorrido há mais de um século, a Doença de Chagas continua sendo considerada uma das principais endemias da América Latina. Esse fato pode ser atribuído principalmente a seu elevado impacto social e econômico (Guhl e Lazdins-Helds, 2007).

A doença de Chagas é considerada uma antroponose, doença primária de animais que pode ser transmitida ao homem (Coura, 2007; Neves, 2006). O vasto número de espécies de animais silvestres e domésticos capazes de atuar como reservatórios naturais do *T. cruzi* (Roque e Jansen, 2015) é um dos fatores que impossibilita a erradicação da doença (WHO, 2016a).

Além disso, a ação do homem sobre o ambiente com a progressiva e desorganizada urbanização em áreas rurais tem como consequência a destruição de habitat natural dos vetores e de seus reservatórios silvestres, fazendo com que estes sejam deslocados de seus nichos silvestres originais, levando a infestação de triatomíneos a áreas peridomiciliares e intradomiciliares (Argolo *et. al*, 2008).

Em países endêmicos alguns tipos de moradias, como casas de pau-a-pique, taipa, telhados feitos com folhas de palma e similares favorecem a instalação do vetor (Figura 1.1), permitindo uma maior ocorrência de insetos vetores em regiões menos favorecidas financeiramente (Argolo *et. al*, 2008; Coura e Viñas, 2010).



Figura 1.1 – Casa de pau-a-pique apresentando frestas que atuam como abrigo e local propício para proliferação do vetor. Fonte: Argolo, *et. al* 2008; Instituto IEPHA, 2012.

Mesmo a distribuição do vetor estando restrita ao continente americano (FIOCRUZ, 2016a), países do mundo todo podem ser comumente afetados por outros mecanismos de transmissão, ou pela migração de latino-americanos para outros continentes (Figura 1.2) (FIOCRUZ, 2013; Coura e Viñas, 2010).

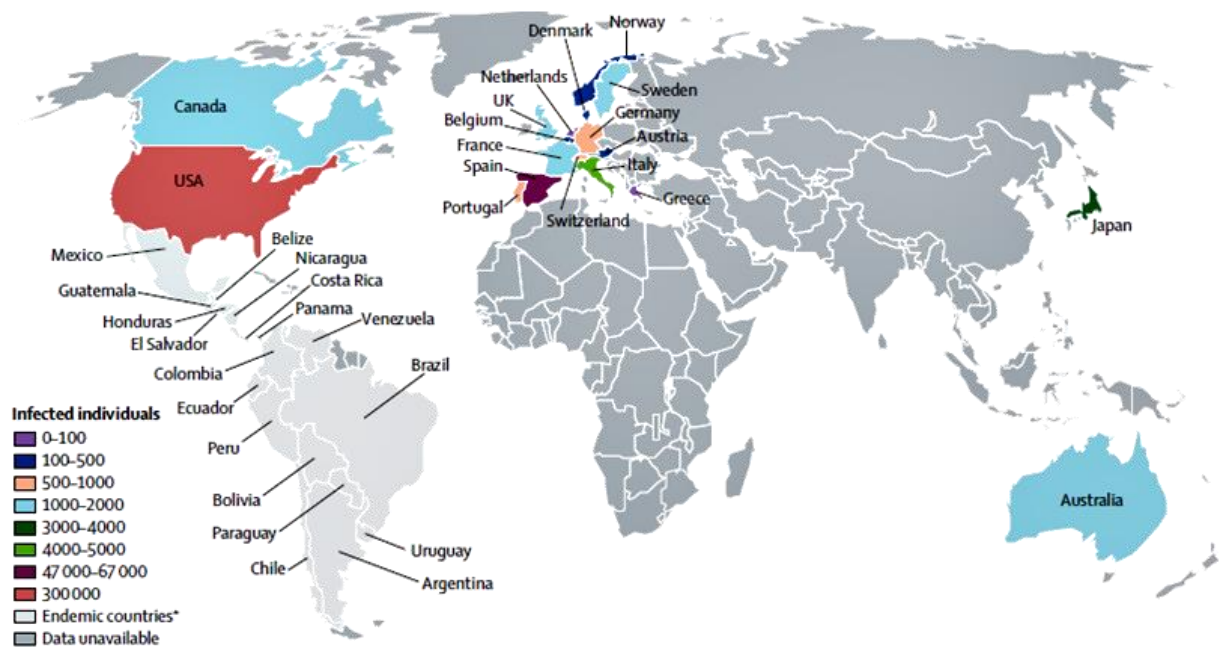


Figura 1.2 - Número estimado de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* vivendo em países não endêmicos. Fonte: Rassi Jr. *et al.*, 2010.

Outro fator que contribui para o elevado número de indivíduos infectados se deve a possibilidade de diferentes tipos de transmissão do *T. cruzi*, podendo ser ocasionada através de transfusões sanguíneas, ingestão de alimentos contaminados com o parasito, ou por via congênita. Também ocorrem mecanismos menos frequentes como acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e pelo leite materno, havendo ainda a possibilidade de

transmissão sexual, uma via teoricamente possível, porém extremamente rara (Rey, 2008; Carvalho *et. al*, 2009; Gonçalves *et. al*, 2012; FIOCRUZ, 2013; Martin *et. al*, 2015; WHO 2016a; FIOCRUZ, 2016a).

Um dos grandes problemas associados à doença de chagas se deve ao fato de promover severas consequências para saúde humana, deixando sérias sequelas em indivíduos que a contraíram, uma vez que, grande parte dos danos causados pelo parasito é irreversível (Barrias *et. al*, 2013).

Exemplos clássicos para estas situações são as incidências de cardiopatia chagásica e a dilatação de órgãos cavitários (Figura 1.3), que proporcionam ao indivíduo um enorme desconforto e a única solução se dá através de intervenção cirúrgica por meio de transplantes de órgãos (Coura e Viñas, 2010; Rey, 2008).

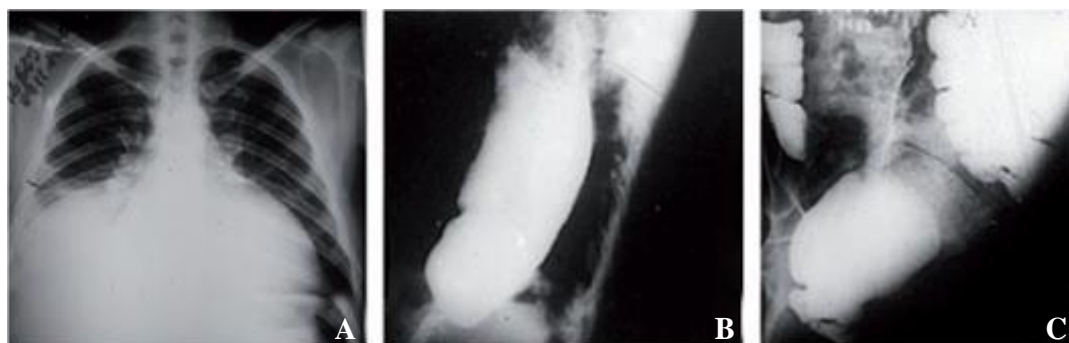


Figura 1.3 – Manifestações clínicas observadas em casos crônicos de Doença de Chagas. A- Dilatação de coração, B- Dilatação de Esôfago e C- Dilatação do Cólon. Fonte: Coura e Viñas, 2010.

Todo esse conjunto de fatores fez com que a Doença de Chagas se tornasse um importante problema social, apresentando grande relevância na saúde pública do Brasil, podendo se tornar uma grande ameaça à saúde global se não receber sua devida atenção (Coura e Viñas, 2010).

De acordo com a resolução WHA63.20 da *World Health Organization* algumas metas são propostas a serem atingidas para o controle da doença até o ano de 2020 (WHO, 2010), baseando-se na redução de triatomíneos em regiões intradomiciliar e peridomiciliar e realizando procedimentos que promovam maior controle e contribuam para a diminuição do risco das demais formas de infecção pelo parasito.

1.2. Histórico

No ano de 1907, Oswaldo Cruz designou o médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas para combater uma epidemia de malária no município de Lassance, Minas Gerais, onde desenvolveu estudos direcionados para as áreas de entomologia e protozoologia (Lewinsohn, 1981; FIOCRUZ, 2016b).

Durante este período, um inseto chamou a atenção de Carlos Chagas. Este se tratava de um triatomíneo, frequentemente encontrado na região, que apresentava hábitos noturnos e se alimentava de sangue, conhecido pela população local como barbeiro, devido ao fato de geralmente picar a face, área mais propensa a ficar descoberta (Lewinsohn, 1981).

Após examinar os insetos, Carlos Chagas encontrou um novo protozoário flagelado, o qual atualmente recebe o nome de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a seu orientador e amigo Oswaldo Cruz (Steverding, 2014; FIOCRUZ, 2016b).

Como forma de elucidar as informações quanto a este novo parasito, Chagas enviou alguns dos insetos encontrados para Manguinhos, onde Oswaldo Cruz os fez se alimentar de saguis livres de qualquer infecção (Coutinho e Dias, 1999; Steverding, 2014). Passado cerca de um mês após o envio dos insetos, Oswaldo Cruz comunicou a Chagas que havia encontrado formas do parasito no sangue de um dos animais que havia adoecido (Neto, 2008).

Posteriormente a essas descobertas, Chagas deu início a estudos referentes ao ciclo evolutivo do parasito e sua capacidade em infectar animais utilizados para testes experimentais (Lewinsohn, 1981). Além disso, o inseto encontrado passou a ser estudado minuciosamente, bem como a busca de outros hospedeiros que pudessem se infectar com as formas de *T. cruzi*.

Somente no ano de 1909, após verificar a presença de formas parasitárias no sangue de uma menina de 2 anos, em plena fase aguda, foi relatada a primeira observação da infecção em humanos (Lana, *et. al.*, 1995; FIOCRUZ, 2016b).

Este foi considerado um feito único na história da medicina, o que levou Carlos Chagas a se tornar membro extraordinário da Academia de Medicina, por tratar-se de uma descoberta complexa e brilhante, envolvendo não apenas a descrição de um agente etiológico, mas também de seus vetores, reservatórios e ciclo evolutivo da doença causada em decorrência da infecção pelo parasito, além da diferenciação dos estágios agudo e crônico da mesma (Lewinsohn, 1981; Coutinho e Dias, 1999; FIOCRUZ, 2016b).



Figura 1.4 – Fotografia de Carlos Chagas. Acervo da Casa Oswaldo Cruz, Fiocruz. Fonte: IBICT, 2016.

Anos após a descrição da nova doença realizada por Carlos Chagas, a importância de sua descoberta foi questionada uma vez que ainda não haviam evidências concretas quanto ao grau de extensão territorial acometida pela infecção por *Trypanosoma cruzi* (Coutinho *et al.*, 1999)

Entretanto, na década de 30, esta divergência científica foi esclarecida após a detecção de centenas de casos agudos descritos não apenas em todo o território nacional, mas também em diversos outros países do continente americano (Kropf, 2009).

No ano de 1935, foi criado em Manguinhos, Rio de Janeiro, por Evandro Chagas o Serviço de Estudos de Grandes Endemias, estimulando o desenvolvimento de investigações sobre a doença (Kropf, 2009). Atualmente, os estudos relacionados à compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença e nas interações parasito-hospedeiro continuam sendo realizados em diversas instituições de pesquisa científica pelo mundo todo.

1.3. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Diversas cepas de *T.cruzi* se comportam de maneiras distintas, além de apresentarem expressão diferenciada de proteínas de membrana (Maeda *et al.*, 2012; Freire-de-Lima *et al.*, 2012). Isso influencia a

patogenicidade do parasito (Málaga e Yoshida, 2001), e o estabelecimento de interações peculiares com os hospedeiros (Tonelli *et. al*, 2013; Souza, 2014).

O processo de adesão e reconhecimento é bastante complexo envolvendo uma série de moléculas presentes na superfície do parasito e na célula do hospedeiro (Colli e Alves, 1999; Souza, *et al.*, 2010).

O parasito possui em sua superfície celular um espesso glicocálix, constituído por proteínas altamente glicosiladas conforme mostrado na Figura 1.5 (Souza *et. al*, 2010; Cummings e Turco, 2009). Esses proteoglicanos possuem um papel fundamental para o parasito, atuando na adesão, infectividade, e até na evasão pelo parasito do sistema imune do hospedeiro (Freire-de-Lima *et. al*, 2012; Vermelho e Meirelles, 1994).

Todos os tripanossomatídeos apresentam em sua superfície celular um grande número de proteínas ancoradas por uma unidade de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ilgoutz e McConville, 2001). Além disso, um dos grupos de moléculas encontrados na superfície do parasito são as trans-sialidasas, proteínas responsáveis por remover ácido siálico da célula do hospedeiro e transferir para o parasito podendo auxiliar no escape pelo parasito do sistema imune do hospedeiro (Souza, *et. al* 2010).

Algumas moléculas de superfície parecem ser fundamentais para a internalização do parasito. Diversos trabalhos têm sugerido a participação das glicoproteínas GP82 e GP90 na invasão da célula hospedeira, sendo os genes dessas proteínas mais expressos na forma tripomastigota metacíclica do parasito (Cordero *et. al*, 2007).

As glicoproteínas GP35/50 não são tão relacionadas à invasão do parasito como as moléculas descritas acima, porém também encontram-se em abundância na superfície do *T.cruzi*, estando mais relacionadas com a proteção do mesmo frente a agentes externos (Souza, *et. al* 2010).

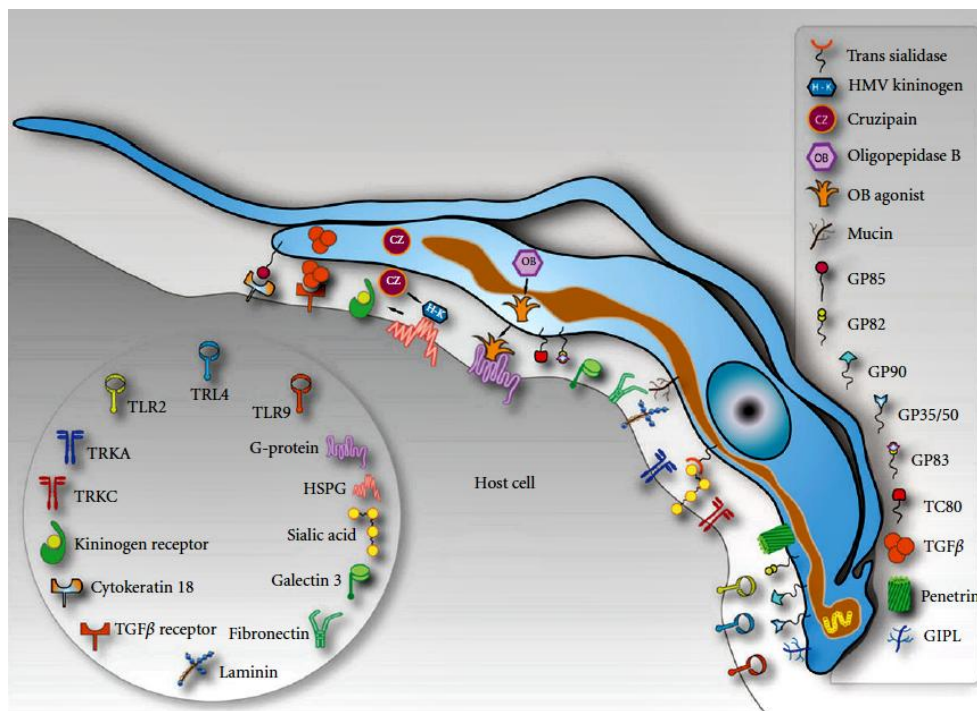


Figura 1.5 – Modelo esquemático de diferentes moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi* envolvidas na interação parasito-hospedeiro. Fonte: Souza, *et. al* 2010.

Devido ao fato do parasito apresentar uma ampla variabilidade genética, foi estabelecida uma divisão de acordo com as semelhanças genéticas das diferentes cepas, com intuito de promover um consenso nos estudos envolvendo o parasito além de facilitar a compreensão de questões de biologia básica, características epidemiológicas e seu potencial patogênico (Zingales, 2011).

A nomenclatura dos grupos de *T. cruzi* foi padronizada em 2009, onde se recomenda que as cepas sejam divididas em seis unidades de tipagem distintas - *Discrete Typing Unit* (DTUs), seguida pelo número romano correspondente, de I a VI (Zingales *et. al*, 2009; Perez *et. al*, 2014). Embora ainda pouco estabelecida, tem sido sugerida a existência de uma sétima DTU, a qual corresponde ao genótipo TcBat (Ramirez, *et al.*, 2014).

Todas as DTUs foram descritas com potencial de promover a Doença de Chagas, apresentando variações quanto a sua distribuição geográfica e ao desenvolvimento de manifestações crônicas da doença (Zingales, 2011). De acordo com Zingales (2011), cepas incluídas nas DTUs II e IV parecem apresentar uma maior capacidade de induzir a evolução de manifestações cardíacas e digestivas, sendo estas consideradas as mais patogênicas. Enquanto a DTU I parece não favorecer a evolução da doença em sua forma digestiva.

Além da ampla diversidade genética encontrada entre cepas, que contribui para as alterações na expressão de diferentes moléculas de superfície, o parasito apresenta variações em alguns glicoconjugados de membrana de acordo com seu estágio evolutivo (Souza, *et. al* 2010). Um exemplo descrito por Buscaglia e colaboradores (2006) mostra variações em mucinas (Figura 1.6), glicoproteína mais abundante na superfície do parasito, de acordo com o hospedeiro em que o *T. cruzi* se encontra (Buscaglia *et. al*, 2006).

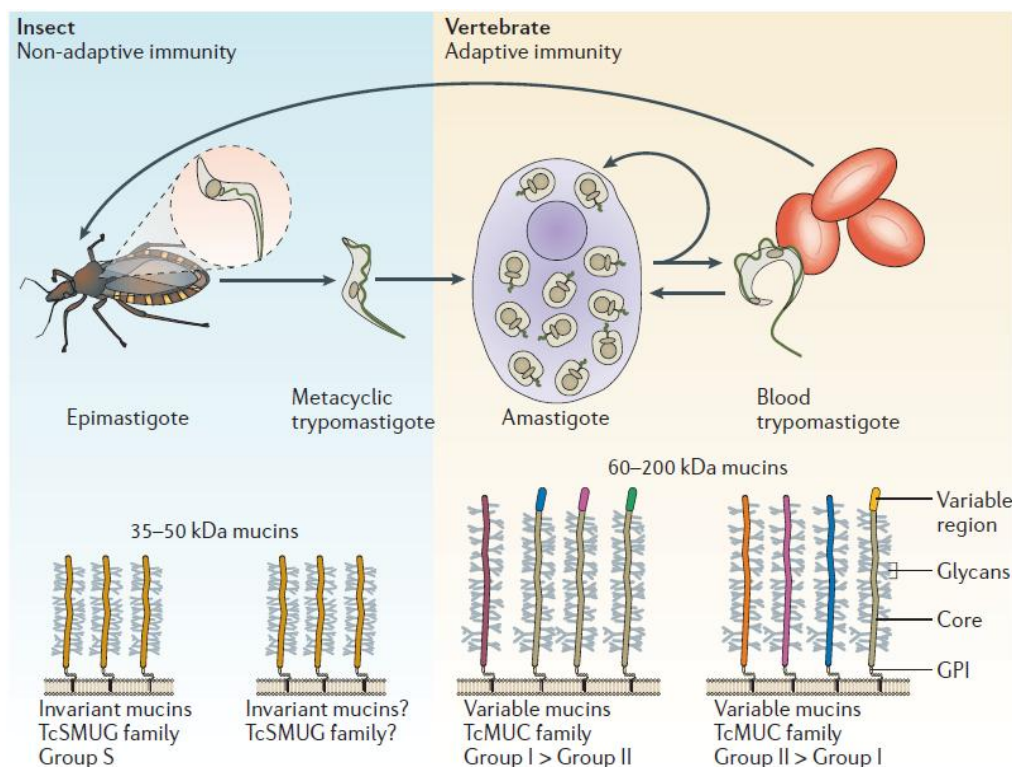


Figura 1.6 – Diagrama esquemático apresentando variações nas mucinas de superfície do *Trypanosoma cruzi* de acordo com seu ciclo biológico. Fonte Buscaglia *et. al*, 2006

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida que ocorre de modo heteroxênico, havendo a necessidade de um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado para que seu ciclo biológico seja completo (Figura 1.7) (Souza, 2014).

Formas distintas são encontradas em cada um dos hospedeiros, sendo que em hospedeiros invertebrados a infecção se inicia após a ingestão de sangue contaminado com formas tripomastigotas sanguíneas presentes no hospedeiro vertebrado contaminado com o parasito (Buscaglia *et. al*, 2006, Garcia, *et. al* 2006).

Ao alcançarem o intestino médio anterior do inseto, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas e migram para as regiões posteriores do intestino médio, onde se multiplicam por divisão binária e se aderem às membranas perimicrovilares através do flagelo (Garcia, *et. al* 2006).

No intestino posterior os parasitos se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, seguida de sua adesão à cutícula presente neste compartimento. Esta última é a principal forma eliminada junto às fezes e urina do vetor após um novo repasto sanguíneo, a qual corresponde à forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Garcia, *et. al* 2006; FIOCRUZ, 2016b).

Ao alcançar a corrente sanguínea o parasito pode invadir diferentes tipos celulares (Kelly, 2000), e no interior destas células se diferenciam em amastigotas, se multiplicam por fissões binárias sucessivas e, posteriormente, se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, rompendo a célula hospedeira e sendo liberados no espaço extracelular, podendo infectar novas células ou ser ingeridas por triatomíneos e assim dar continuidade ao ciclo (Buscaglia *et. al*, 2006; CDC, 2016).

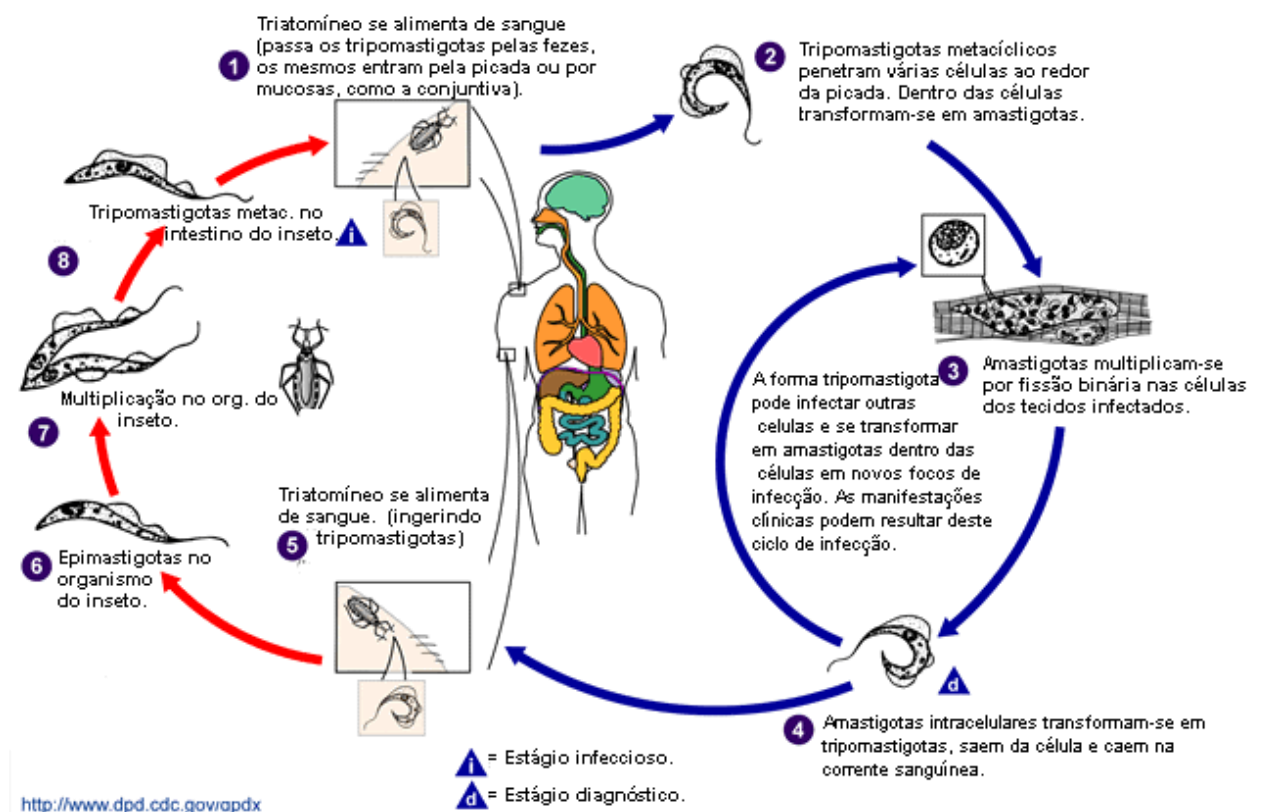


Figura 1.7 – Ciclo biológico completo do parasito *Trypanosoma cruzi*, ocorrendo parte no hospedeiro invertebrado e parte no hospedeiro vertebrado. Fonte: CDC, 2016

1.4. *Rhodnius prolixus*

Os transmissores do *Trypanosoma cruzi* são artrópodes da classe Insecta, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Schofield e Galvão, 2009; FIOCRUZ, 2016a).

Várias espécies de triatomíneos atuam como vetores da doença de Chagas em diferentes países da América. As espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* são consideradas as mais importantes, devido a suas características comportamentais (Jurberg *et. al*, 2015; Argolo *et. al*, 2008). Até o ano de 2015 foram descritas 148 espécies de triatomíneos, dentre as quais 65 são encontradas no território nacional (Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015).

Embora a Doença de Chagas possa ser transmitida por mais de uma centena de espécies de triatomíneos, a espécie *Rhodnius prolixus* (Figura 1.8) merece destaque por tratar-se do inseto modelo para estudos fisiológicos, de desenvolvimento e interação parasito-vetor (Azambuja e Garcia, 1997; Garcia e Azambuja, 1997; Ribeiro *et. al*, 2004).



Figura 1.8 – *Rhodnius prolixus*, um dos importantes vetores da Doença de Chagas. Fonte: INCTEM-UFRJ, 2016; WHO 2014.

R. prolixus pode ser considerado o principal vetor da doença de Chagas na Colômbia e Venezuela, e um importante vetor em algumas partes da América Central (Diotaiuti, 2008; FIOCRUZ, 2016a), apresentando um grande potencial de domiciliação, colonizando o interior de habitações.

A presença deste triatomíneo no Brasil ainda é um tema bastante controverso, uma vez que há registros de sua identificação no país, entretanto, alguns trabalhos sugerem que estes registros podem ser atribuídos a erros na identificação do triatomíneo devido a sua grande similaridade com outras espécies (Figura 1.9) (Gurgel-Gonçalves, *et. al*, 2008; Jurberg *et. al*, 2015; Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2015).

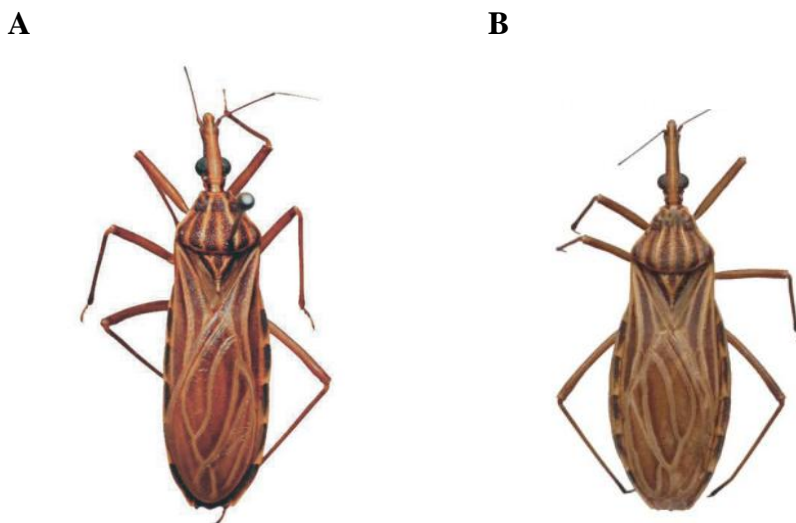


Figura 1.9 – Semelhança entre as espécies do gênero *Rhodnius* sp. **A** - *Rhodnius prolixus* e **B** - *Rhodnius robustus*. Fonte: Jurberg *et. al*, 2015.

Rhodnius prolixus sofre metamorfose incompleta (hemimetábolo) apresentando tempo de vida média de dois anos, apresentando grande capacidade vetorial, uma vez que tanto o macho quanto a fêmea são insetos hematófagos, capazes de suportar longos períodos em jejum (Buxton, 1930; FIOCRUZ, 2016a).

Durante seu ciclo de vida a fêmea adulta é capaz de colocar mais de uma centena de ovos, cada ovo originando uma ninfa que passará por cinco estágios ninfais até atingir a fase adulta, na qual o inseto possui asas e apresenta dimorfismo sexual (Figura 1.10) (Argolo, *et. al*, 2008).



Figura 1.10 – Diferentes estágios de desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*. As etapas de amadurecimento seguem na sequência (ovo, 1º instar, 2º instar, 3º instar, 4º instar, 5º instar e adulto macho). Fonte: Gerson Profeta.

Todos os estágios ninfais possuem os mesmos hábitos alimentares, alimentando-se de sangue (Figura 1.11) (Grimaldi e Engel, 2005; Balczun *et. al*, 2012, Díaz-Albiter *et. al*, 2016), o que faz com que as formas imaturas do inseto possuam o mesmo potencial para transmissão da Doença de Chagas (Garcia e Azambuja, 1991).

A muda de um estágio para o outro depende da ocorrência de um repasto sanguíneo. Na muda, a ninfa realiza a troca do exoesqueleto, possibilitando que o inseto aumente de tamanho (Argolo, *et. al*, 2008). Um triatomíneo é capaz de ingerir uma quantidade de sangue equivalente a até cerca de nove vezes o seu próprio peso em uma única alimentação (Friend *et al.*, 1965).

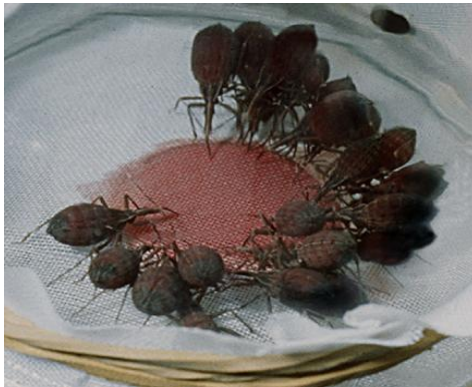


Figura 1.11 – Alimentação de *Rhodnius prolixus* através de aparato artificial. Fonte: Garcia *et. al*, 2006.

Outro fato de destaque sobre este triatomíneo é a descrição do transcriptoma intestinal e seu genoma sequenciado (Wilson, 2011; Mesquita *et. al*, 2015; Ribeiro *et. al*, 2014), o que contribui imensamente para uma melhor compreensão das interações que ocorrem dentro do aparelho digestivo do inseto durante a infecção, podendo resultar no desenvolvimento de novas estratégias para o controle da transmissão da Doença de Chagas baseadas na biologia do vetor (Huebner, 2006; *Rhodnius* Research Community, 2006; Taracena *et. al*, 2015).

1.5. Sistema Digestório de Insetos

Dentre as mais de 750 mil espécies de insetos já descritas (Vallet-Gely *et. al*, 2008) encontramos uma vasta gama de hábitos alimentares, sendo que para cada um destes há um sistema digestório apropriado (Figura 1.12), onde podemos observar a digestão ocorrendo em diferentes pHs, em sítios anatômicos distintos, bem como o envolvimento de diferentes enzimas (Billingsley e Downe, 1983; Engel e Moran, 2013).

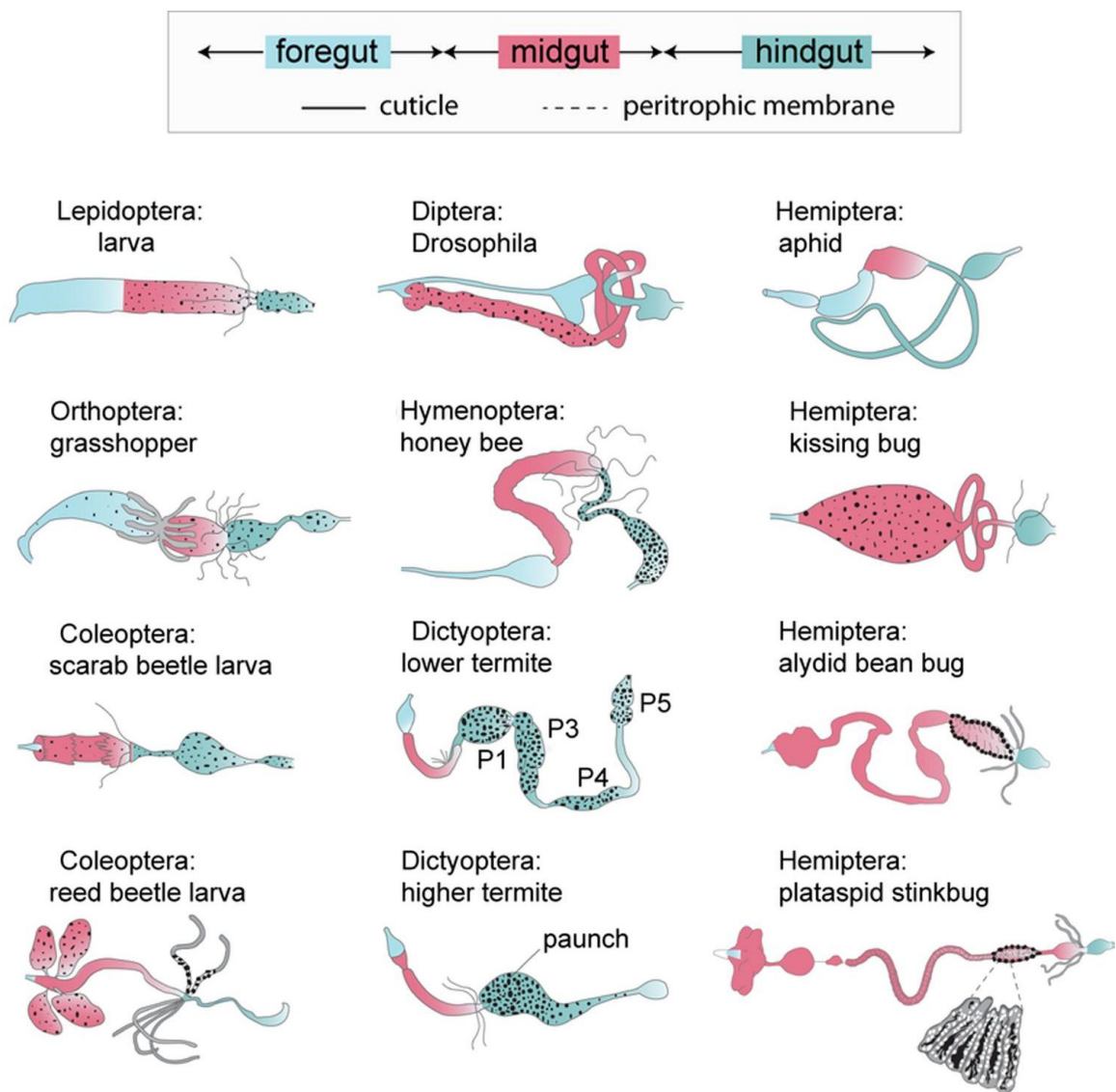


Figura 1.12 – Representação esquemática da diversidade de aparelhos digestórios encontrados em insetos. Adaptado de Engel e Moran, 2013.

O sistema digestório é uma das principais interfaces entre o inseto e o meio ambiente, o que contribui para que ele seja alvo de estratégias de controle. Além disso, a diversidade do grupo faz com que estes sejam considerados excelentes modelos de estudos do sistema digestório (Terra, 1988; Terra e Ferreira, 1994; Terra e Ferreira, 2005).

O estudo deste compartimento é uma ferramenta promissora não somente no que se refere ao entendimento do metabolismo digestivo e suas implicações, mas também para melhor compreensão de como ocorrem as interações desse órgão com diversos parasitos (Oliveira, *et. al*, 1999). Neste contexto, a digestão em insetos hematófagos tem sido estudada devido a sua grande importância na transmissão de doenças.

Durante o curso evolutivo dos artrópodes, a hematofagia surgiu diversas vezes, assim como várias adaptações comportamentais, anatômicas e fisiológicas associadas, as quais foram necessárias para melhor desempenho desse hábito alimentar (Black e Kondratieff, 2004). Essas adaptações podem ser caracterizadas como um processo complexo, que envolve a inibição da coagulação sanguínea, neutralização dos componentes do sistema imunológico presentes no sangue ingerido, e a digestão dos componentes presentes no sangue (Ribeiro, 1996; Kollien e Schaub, 2000; Valenzuela, 2004).

Os insetos hematófagos com a nova dieta passaram a transmitir parasitos de diversas espécies presentes no sangue de animais vertebrados, possuindo assim uma forte capacidade de evadir o sistema imunológico e infectar insetos. Dessa forma, dá-se continuidade ao seu ciclo biológico, e os parasitos podem ser transmitidos a um novo hospedeiro vertebrado a cada nova alimentação do inseto hematófago (Mejia *et. al.*, 2006).

De um modo geral, os insetos hematófagos ingerem altas quantidades de sangue em uma única refeição (Dansa-Petretski *et. al.*, 1995). Este fato acaba tornando-se um problema para o inseto, uma vez que o aumento de peso corporal afeta consideravelmente sua locomoção. De modo a solucionar esse problema, os vetores possuem processo digestivo e diurético altamente eficaz (Ribeiro, 1996).

Outro ponto a ser abordado quando nos referimos a insetos hematófagos é sua estreita associação com a microbiota intestinal (Silva *et. al.*, 2012). Embora o sangue seja um alimento rico em proteínas e aminoácidos essenciais, este ainda apresenta carência de alguns nutrientes. Assim, como mecanismo de suprir essas carências, triatomíneos apresentam em seu intestino bactérias do grupo dos Actinomicetos, por exemplo, *Rhodococcus rhodnii*, a qual é capaz de sintetizar os nutrientes necessários para complementação da dieta do inseto (Yassin, 2005).

1.5.1. Compartimentos Intestinais

O tubo digestivo de insetos, de um modo geral, pode ser dividido em três partes, sendo estas, Intestino Anterior, Intestino Médio e Intestino Posterior, onde cada uma destas é responsável por realizar funções específicas e participar de etapas distintas da digestão (Garcia *et. al.*, 2010; Terra *et. al.*, 1988; Kollien e Schaub, 2000).

Dentre as três porções, no que se refere à digestão, merece destaque o Intestino Médio, o qual é responsável pela maior parte da absorção de nutrientes, além de ser a principal região capaz de secretar enzimas digestivas para o lúmen. Entretanto, o Intestino Anterior desempenha

função crucial no que diz respeito a condução e armazenamento de alimentos. Além disso, pode-se atribuir ao Intestino Posterior a função de absorver água e compactar as fezes para que estas possam então ser eliminadas (Silva *et. al*, 2012).

Os epitélios dos Intestinos Anterior e Posterior são de origem embrionária ectodérmica, ambos sendo recobertos por cutícula, composta por varias camadas de cera e quitina, o que confere a estes compartimentos características muito próximas à impermeabilidade (Eisemann e Binnington, 1994).

No Intestino Médio da maioria dos insetos uma camada altamente organizada, rica em glicosaminoglicanos e quitina recobre toda sua extensão, a esta estrutura foi empregado o nome de membrana peritrófica, a qual protege fisicamente o intestino médio além de dividi-lo em duas porções, denominadas de espaço ectoperitrófico (espaço luminal entre a membrana peritrófica e epitélio) e endoperitrófico (onde se encontra o bolo alimentar) (Figura 1.13) (Lehane, 1997; Terra e Ferreira, 2012).

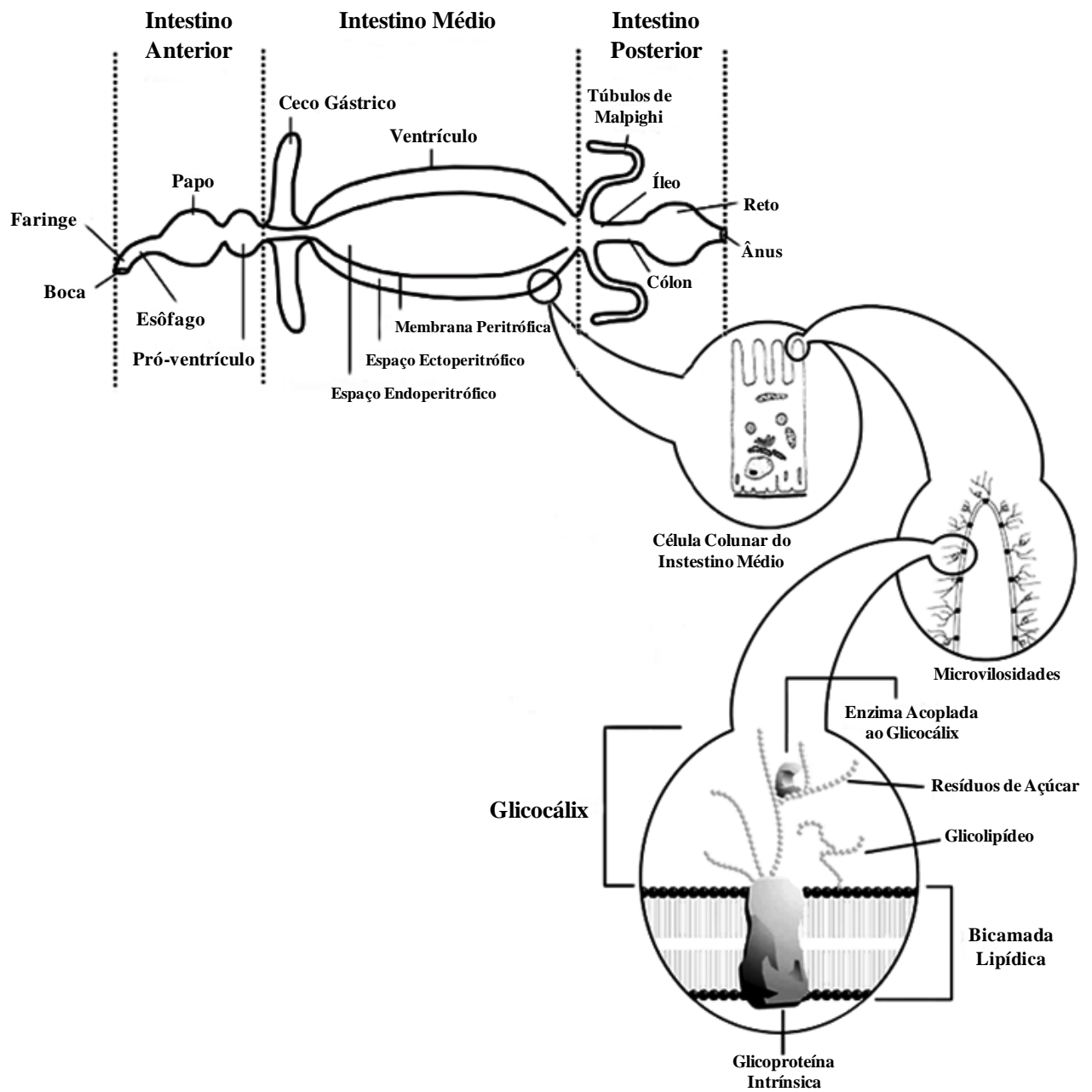


Figura 1.13 – Representação esquemática generalizada dos compartimentos intestinais de insetos, destacando glicoconjugados acoplados a membrana microvilar. Adaptada de Terra e Ferreira, 2012.

Tal divisão é um dos principais fatores pelos quais a digestão em insetos é tão eficiente. A divisão entre espaço endo e ectoperitrófico permite a compartimentalização das etapas da digestão (digestão inicial, intermediária e final). Isso aumenta a concentração local de enzimas e seus respectivos substratos e diminui a ligação inespecífica de enzimas a moléculas do alimento e ao epitélio intestinal, assim como a retroinibição por produtos da digestão.

Além disso, através da membrana peritrófica (MP) ocorre o estabelecimento do fluxo de líquidos entre os espaços ectoperitrófico e endoperitrófico, consistindo em um sistema de

“reciclagem” destas enzimas, o que reduz drasticamente a excreção de enzimas digestivas. Esse processo recebe o nome de circulação endo-ectoperitrófica, sendo um mecanismo de grande importância fisiológica, uma vez que a produção destas enzimas despende uma grande quantidade de energia (Terra, 1990).

Muitas são as funções que podem ser atribuídas à membrana peritrófica, podendo atuar como uma barreira física de proteção contra patógenos, bem como uma barreira química, participando ativamente do processo de detoxificação do heme em insetos hematófagos (Eisemann e Binnington, 1994; Devenport e Jacobs-Lorena, 2004; Lehane, 1997; Pascoa, *et. al*, 2002; Oliveira *et. al*, 1999; Mejia *et. al*, 2006).

1.5.2. Digestão em Hemípteros

Algumas características fisiológicas encontradas em hemípteros, parecem estar associadas a alterações adaptativas em decorrência de seus hábitos alimentares, dentre as quais destacam-se a redução do intestino anterior e da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Terra, 1990).

Uma das principais considerações a se fazer quando tratamos desta ordem é o fato destes insetos não possuírem membrana peritrófica, que participa da compartimentalização do processo digestivo (Goodchild, 1966; Silva *et. al*, 2004; Terra e Ferreira, 2005).

A ausência de membrana peritrófica nos Hemípteros tem sido atribuída a uma adaptação de seus ancestrais, que passaram a se alimentar de seiva de plantas. Esta mudança nos hábitos alimentares fez com que a digestão inicial de polímeros se tornasse desnecessária, uma vez que os mesmos estão, na grande maioria das vezes, ausentes ou encontram-se em baixas quantidades na seiva (Terra, 1988; Silva *et. al*, 2004).

Tal adaptação favoreceu o surgimento de um sistema de membranas bastante peculiar. Nela, é possível observar a presença de uma membrana plasmática revestindo as microvilosidades de células intestinais denominada membrana microvilar. Esta, por sua vez, é revestida por uma segunda unidade membranar denominada membrana perimicrovilar (MPMV), a qual desempenha algumas funções similares à da membrana peritrófica presente nas demais ordens de insetos (Burgos e Gutierrez, 1976; Gutierrez e Burgos, 1978; Terra, 1988).

Esta membrana é uma estrutura transiente, podendo ser encontrada em todos os estágios de amadurecimento do inseto, independente de seu estado nutricional. Entretanto, sua extensão

parece ser dependente da alimentação, encontrando-se aumentada em insetos alimentados (Lane e Harrinson, 1979; Damasceno de Sá *et. al*, 2007; Silva *et. al*, 2012).

As membranas perimicrovilar e microvilar delimitam um espaço fechado chamado de espaço perimicrovilar, que corresponde a uma separação existente entre as membranas, permitindo desta forma, que o processo digestivo ocorra de maneira compartimentalizada (Terra e Ferreira, 1994; Terra, 1988; Terra, 1990; Lane e Harrinson, 1979; Silva *et. al*, 1995; Ferreira *et. al*, 1988).

Uma vez que em insetos que apresentam digestão luminal as membranas perimicrovillares desempenham a função de compartimentalizar o processo digestivo, a esta estrutura tem sido atribuídas algumas funções, tais como prevenir ligações inespecíficas de hidrolases a materiais não digeridos, aumentar a eficiência na digestão, produzir monômeros alimentares próximos à superfície das membranas microvillares, de modo a favorecer sua absorção (Terra e Ferreira, 1994; Terra, 1990; Silva *et. al*, 2004; Silva *et. al*, 1995; Damasceno de Sá *et. al*, 2007).

É importante destacar a participação da MPMV na detoxificação do heme associada a síntese de hemozoína observada em hemípteros hematófagos (Oliveira *et. al*, 2007). O grupamento heme é essencial para a vida de muitos organismos (Ponka, 1999), porém, quando encontrado em seu estado livre atua como agente pró oxidante, auxiliando na formação de radicais livres que são extremamente danosos para o inseto, apresentando alta capacidade oxidativa, podendo se ligar facilmente a membranas biológicas, e desta forma, promover perturbações que poderiam comprometer seriamente o funcionamento celular (Oliveira *et. al*, 2000; Oliveira *et. al*, 1999; Ryter e Tyrrell, 2000; Pascoa, *et. al*, 2002).

A membrana perimicrovilar é a primeira estrutura a entrar em contato com o grupo heme liberado logo após a digestão da hemoglobina, o que leva a uma liberação elevada de heme no lúmen intestinal (Dansa-Petretski *et. al*, 1995).

Além disso, as membranas perimicrovillares estão diretamente relacionadas a processos de interação parasito-vetor. Estudos realizados com *Rhodnius prolixus* mostraram que alterações nessas estruturas prejudicam o desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* (Gonzalez *et. al*, 2006). Também tem sido descritas outras possíveis associações similares, onde a membrana perimicrovilar de insetos vetores pode interagir de maneira direta com outras espécies de parasitos (Romeiro *et. al*, 2003).

1.5.3. *Fases da digestão*

A digestão em insetos ocorre em três etapas que se seguem, digestão inicial, digestão intermediária, e digestão final, como uma linha de produção, sendo que em cada uma destas podemos encontrar diferentes enzimas, as quais são imprescindíveis para a geração de produtos que atuarão como substratos para as enzimas que participam nas fases seguintes do processo digestivo (Figura 1.14) (Terra e Ferreira, 1994; Terra e Ferreira, 2005).

As enzimas envolvidas nas etapas iniciais da digestão são geralmente encontradas no espaço endoperitrófico e apresentam baixo peso molecular. Tal característica confere a essas enzimas a capacidade de atravessar os poros da membrana peritrófica e, dessa forma, dar início ao processo de digestão. Tais enzimas são responsáveis pelo reconhecimento e clivagem de moléculas compostas por uma longa cadeia polimérica, tais como amido, celulose e proteínas presentes no alimento ingerido (Silva, 2012).

Após a hidrólise efetuada por enzimas da digestão inicial os produtos gerados pela degradação de polímeros (oligômeros) são reconhecidos e clivados novamente pelas enzimas de digestão intermediária. A ação dessas enzimas libera como produtos de reação monômeros ou dímeros (dissacarídeos e dipeptídeos), sendo estes substratos para as enzimas participantes das etapas finais da digestão, gerando então apenas monômeros passíveis de absorção pelo epitélio (Terra e Ferreira, 2004).

É importante ressaltar que muitas vezes as enzimas responsáveis por desempenhar papéis nas fases intermediária e final limitam-se ao espaço ectoperitrófico, sendo proteínas associadas à membrana plasmática dos enterócitos ou ao glicocálix. Essas enzimas ainda podem ser restritas às células intestinais, o que pode ser atribuído ao fato de possuírem maior massa molecular e serem maiores do que os poros da membrana peritrófica (Terra e Ferreira, 1994; Terra e Ferreira, 2005).

A inibição de enzimas de digestão inicial resulta na ausência de substratos para as demais enzimas e conseqüentemente a ausência de nutrientes essenciais para o inseto, como açúcares e aminoácidos. Além disso, muitas enzimas estão envolvidas na degradação da parede celular presente nos alimentos, tendo um papel fundamental para o aproveitamento dos componentes intracelulares, essenciais na alimentação do inseto (Terra e Ferreira, 1994). Juntos, estes fatores reforçam a importância de um melhor entendimento do sistema digestivo de insetos, bem como seu potencial para obtenção de novas técnicas para contenção dos mesmos onde se faça necessário.

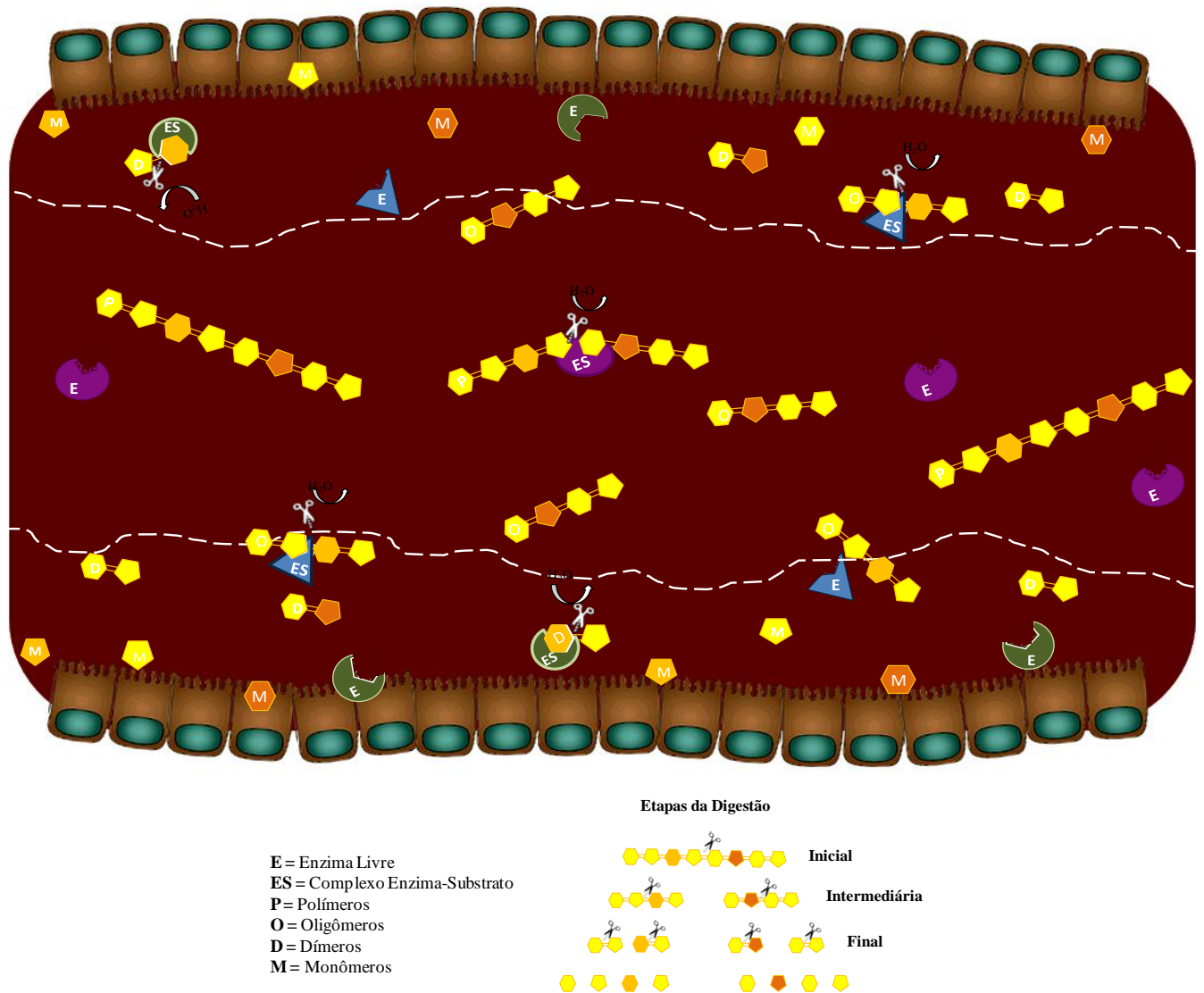


Figura 1.14 – Representação esquemática das etapas da digestão. As enzimas que participam das etapas iniciais estão representadas em roxo, etapas intermediárias em azul e etapas finais em verde. A membrana peritrófica está representada pela linha branca pontilhada, realizando a compartimentalização do processo digestivo. Fonte: Gerson Profeta.

1.6. Glicosídeo Hidrolases

Dentre as diversas enzimas encontradas no aparelho digestivo de insetos, destacam-se as Glicosídeo Hidrolases (GHs), também conhecidas como glicosidases. Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas em carboidratos e entre carboidratos e outras moléculas, como lipídeos e proteínas (Ribeiro e Pereira, 1984).

Glicosidases participam em diferentes vias metabólicas, atuando em processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, além de estarem envolvidas no processamento de glicoproteínas, oligossacarídeos, catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados, desempenhando funções fundamentais nos processos biológicos, como resposta imune e reconhecimento intercelular (Melo e Carvalho, 2006; Senger *et. al*, 2012).

Uma classificação simplificada dessas enzimas se baseia na especificidade frente aos substratos. Sua nomenclatura está frequentemente relacionada ao açúcar passível de hidrólise pelo qual a enzima apresenta maior preferência, podendo ainda ser classificada de acordo com a porção do substrato preferencialmente clivada. Enzimas que realizam a clivagem somente nas extremidades da cadeia são denominadas de exoglicosidases, enquanto enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas internas da cadeia recebem o nome de endoglicosidases (Ribeiro e Pereira, 1984; Sharon e Lis, 1982).

Outros critérios para classificação destas enzimas levam em consideração a similaridade entre as estruturas primárias, conforme descrito no banco de dados *CAZy – Carbohydrate Active Enzymes Database* (CAZY, 2015).

A classe das GHs (EC 3.2.1.-) é constituída por 135 famílias, sendo agrupadas enzimas que apresentam características semelhantes, como propriedades cinéticas e estruturais, mecanismo de catálise e geometria do sítio catalítico (Davies *et. al*, 2005; Henrissat, 1991).

A atuação destas enzimas muitas vezes ocorre de modo complexo, isso devido a grande diversidade estrutural de glicoconjugados, que na maior parte das vezes apresentam várias unidades de monossacarídeos conectadas entre si (Figuras 1.15 e 1.16) (Melo e Carvalho, 2006).

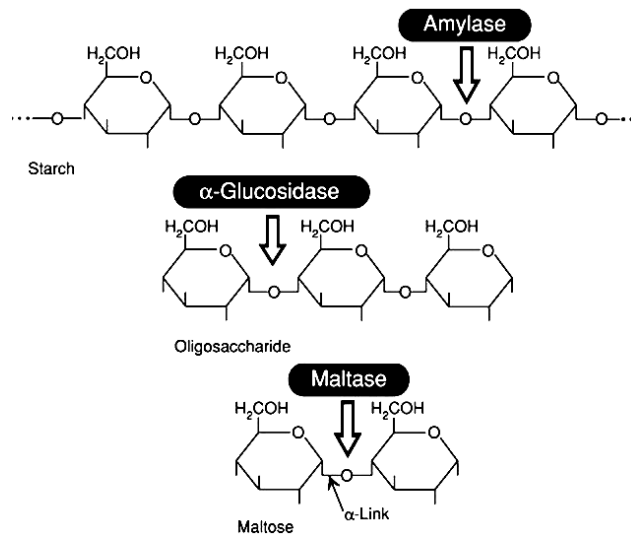


Figura 1.15 – Esquema representando a digestão de amido através da atuação de glicosidases. As setas indicam ligações passíveis de clivagem. Fonte: Adaptado de Terra e Ferreira, 2012.

Além disso, os carboidratos presentes nas glicoproteínas desempenham um importante papel biológico, podendo ainda contribuir para a estabilização da conformação da proteína (Sharon e Lis, 1982).

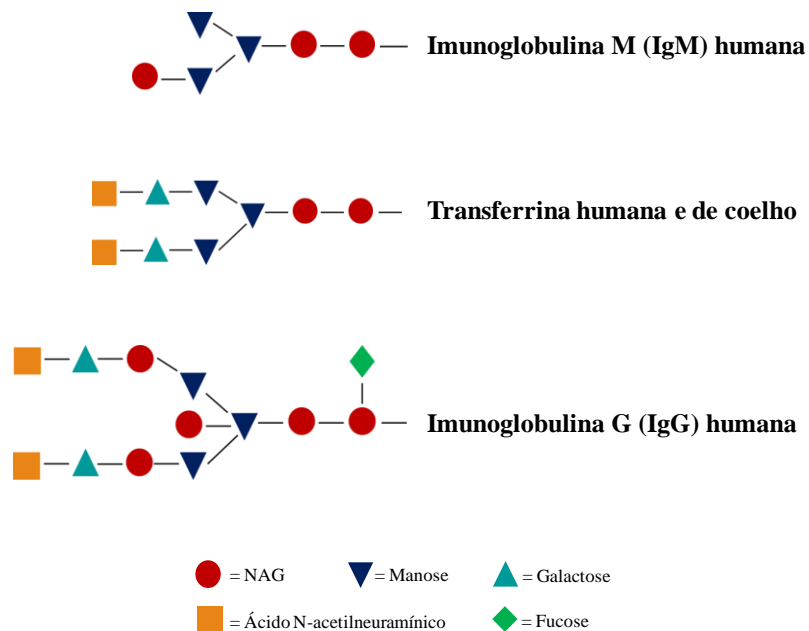


Figura 1.16 – Árvore Glicídica de algumas glicoproteínas presentes no sangue. Adaptado de Voet, 2014.

Os glicoconjugados, além de estarem presentes na alimentação do inseto são abundantes na superfície do parasito *Trypanosoma cruzi*, dentre os quais destacam-se glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs) e mucinas, que correspondem a estruturas com alto nível de glicosilação podendo ser compostos por resíduos de galactose, N-acetilglicosamina além de uma vasta quantidade de outros glicanos O ligados (Cummings e Turco, 2009; Acosta-Serrano *et. al*, 2001).

O mecanismo da degradação dessas moléculas tem sido alvo de poucos estudos embora se trate de um assunto de grande importância. Sendo assim, faz-se necessária uma análise mais aprofundada, de modo a contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de digestão de triatomíneos, além de uma melhor compreensão das interações que ocorrem entre carboidrases digestivas do inseto e açúcares de superfície do parasito.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar aspectos cinéticos e fisiológicos de glicosidases de *Rhodnius prolixus* na digestão de açúcares do sangue e na interação com *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Específicos

- Analisar atividades enzimáticas de glicosídeo hidrolases em diferentes compartimentos intestinais de *Rhodnius prolixus*;
- Estudar o efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* na modulação da atividade de glicosidases intestinais de *Rhodnius prolixus*.
- Estudar a expressão de genes de glicosídeo hidrolases e o efeito do silenciamento gênico sobre a atividade enzimática de α -Fucosidase através da técnica de RNA de interferência;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção de Insetos

Foram utilizados triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, provenientes da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz – LABFISI/ IOC. Os triatomíneos foram mantidos à temperatura de 27-28°C e umidade entre 65-75%.

A alimentação dos mesmos foi realizada por meio de sangue de coelho desfibrinado obtido do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ), empregando alimentador artificial conforme descrito por Azambuja e Garcia (1997).

3.2. Manutenção de Parasitos

O cultivo das cepas Dm28c e Y de *Trypanosoma cruzi* foi realizado efetuando repiques semanais em meio BHI suplementado com 20 % (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB), mantendo em estufa a uma temperatura controlada a 28°C (Garcia e Azambuja, 1997). Ambas as cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. Daniele Castro (LABFISI/IOC).

3.3. Infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

A infecção de *R. prolixus* com *T. cruzi* foi realizada utilizando insetos adultos machos empregando alimentação artificial com sangue de coelho desfibrinado, submetido a uma etapa de inativação do sistema complemento, contendo 1×10^6 de formas epimastigotas do parasito da cepa Dm28c por mililitro.

Para a inativação do sistema complemento, primeiramente foi realizada a separação do plasma da fração celular através de centrifugação a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos. O plasma obtido foi posteriormente submetido a aquecimento a 50°C em banho-maria durante 30 minutos. Após este processo, o plasma foi resfriado e então adicionou-se a este a fração celular anteriormente separada.

Este sangue foi então introduzido em alimentador artificial na presença ou ausência do parasito, conforme descrito acima. A infecção dos insetos foi acompanhada através de

microscopia de campo claro e as atividades enzimáticas foram monitoradas ao longo da digestão do sangue.

Como controle das infecções um grupo de insetos foi alimentado no mesmo dia, com o mesmo sangue desfibrinado e com sistema complemento inativado, sem a adição do parasito.

3.4. Obtenção de frações intestinais do inseto

Para obtenção das amostras foram realizados pools de 6 insetos. Todos os insetos foram anestesiados com gelo e dissecados em diferentes dias após a alimentação sanguínea (jejum, 2, 5, 7, 9, 12 e 14 dias após alimentação).

Diferentes partes do sistema digestório como, glândulas salivares (GS), intestino médio anterior (IMA), intestino médio posterior (IMP) e intestino posterior (IP) foram retiradas e homogeneizadas em solução salina 0,9% (p/v) fria com auxílio do macerador de tecidos *Pellet pestles* (Sigma, cat. num. Z359971).

A separação da fração solúvel e fração tecidual das amostras de IMA e IMP foi realizada através de centrifugação a 5000xg, utilizando centrífuga refrigerada a 4°C durante 5 minutos, sendo obtido sobrenadante (cont.) e pellet (ep.) após este processo (Houseman e Downe, 1981).

Essas amostras foram utilizadas para avaliação das atividades enzimáticas encontradas, empregando os diferentes substratos, nos diferentes compartimentos intestinais ao longo do processo de digestão do inseto.

Os volumes ideais de amostras a serem utilizados em cada experimento foram determinados através de diluições seriadas, os quais encontram-se disponíveis na tabela 4.1 no item 4.1, sendo o volume total de amostra na placa de 25 µL ajustado pela adição de solução salina nos casos em que se fizessem necessário. Sendo que nos casos em que o volume de amostra utilizado fosse inferior a 5 µL novas diluições foram realizadas com intuito de reduzir o erro experimental.

3.5. Preparo de Amostras para avaliação de GHs Sangue

Amostras do mesmo sangue empregado na alimentação dos insetos (sangue de coelho desfibrinado, obtidos junto ao CECAL/FIOCRUZ) foram submetidas a ensaios para detecção da atividade enzimática de glicosídeo hidrolases.

Para tanto, utilizou-se 25 μL de sangue total, o qual foi aplicado diretamente na placa de 96 poços, juntamente com 74 μL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5, 1 μL de substrato derivado de metilumbeliferil (específico para cada uma das glicosidases estudadas) a 0,1 mM, de modo a obter volume final de 100 μL , e o monitoramento das atividades procedeu-se conforme metodologia descrita no item 3.7.

3.6. Preparo de Amostras para avaliação de GHs de *T.cruzi*

Nos estudos de avaliação da atividade de glicosidases secretadas ou presentes na fração celular de *Trypanosoma cruzi*, foram empregados parasitos das cepas Dm28c ou Y.

A atividade de enzimas secretadas foi observada no sobrenadante obtido, após centrifugação a 1800 rpm, 4°C durante 15 minutos, da suspensão de parasitos cultivados em meio BHI suplementado com SFB.

Para a avaliação da atividade enzimática na fração celular, a lise dos protozoários contidos no pellet gerado após o processo de centrifugação foi realizada através do emprego de solução hipotônica fria (NaCl 10 mM), e com auxílio do macerador *Pellet pestles* (Sigma, cat. num. Z359971).

A verificação da atividade de GHs foi realizada empregando tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 ou PBS para observação de atividade em pH 7,2. Em todas as condições experimentais foram utilizados 25 μL de amostra, e os ensaios seguiram-se conforme descrito no item 3.7.

3.7. Ensaio de Atividade Enzimática

As amostras obtidas conforme descrito nos itens 3.4.-3.6. foram distribuídas em placas de 96 poços com um volume final de 100 μL , utilizando 74 μL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5, 1 μL de substrato metilumbeliferil específico para cada glicosidase (Figura 3.1) na concentração de 0,1 mM e 25 μL de amostra.

As atividades foram monitoradas utilizando substratos fluorogênicos, onde a hidrólise foi acompanhada através do monitoramento de intensidade de fluorescência, sendo $\lambda_{\text{Ex}} = 355 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Em}} = 460 \text{ nm}$, em espectrofluorímetro Molecular Devices SPECTRA max GEMINI XPS.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de maneira contínua durante 60 minutos a 30°C com leituras a cada minuto. Ao término deste período os valores de inclinação foram obtidos e convertidos em micro unidades de atividade enzimática (μ U), onde uma unidade (U) corresponde a quantidade de enzima responsável por processar 1 μ mol de substrato por minuto (IUBMB, 1992).

As estruturas dos substratos sintéticos fluorogênicos específicos para cada uma das glicosidases estudadas (α -Glicosidase, β -Glicosidase, α -Manosidase, N-acetil hexosaminidase, β -Galactosidase e α -Fucosidase) encontram-se disponíveis na figura 3.1.

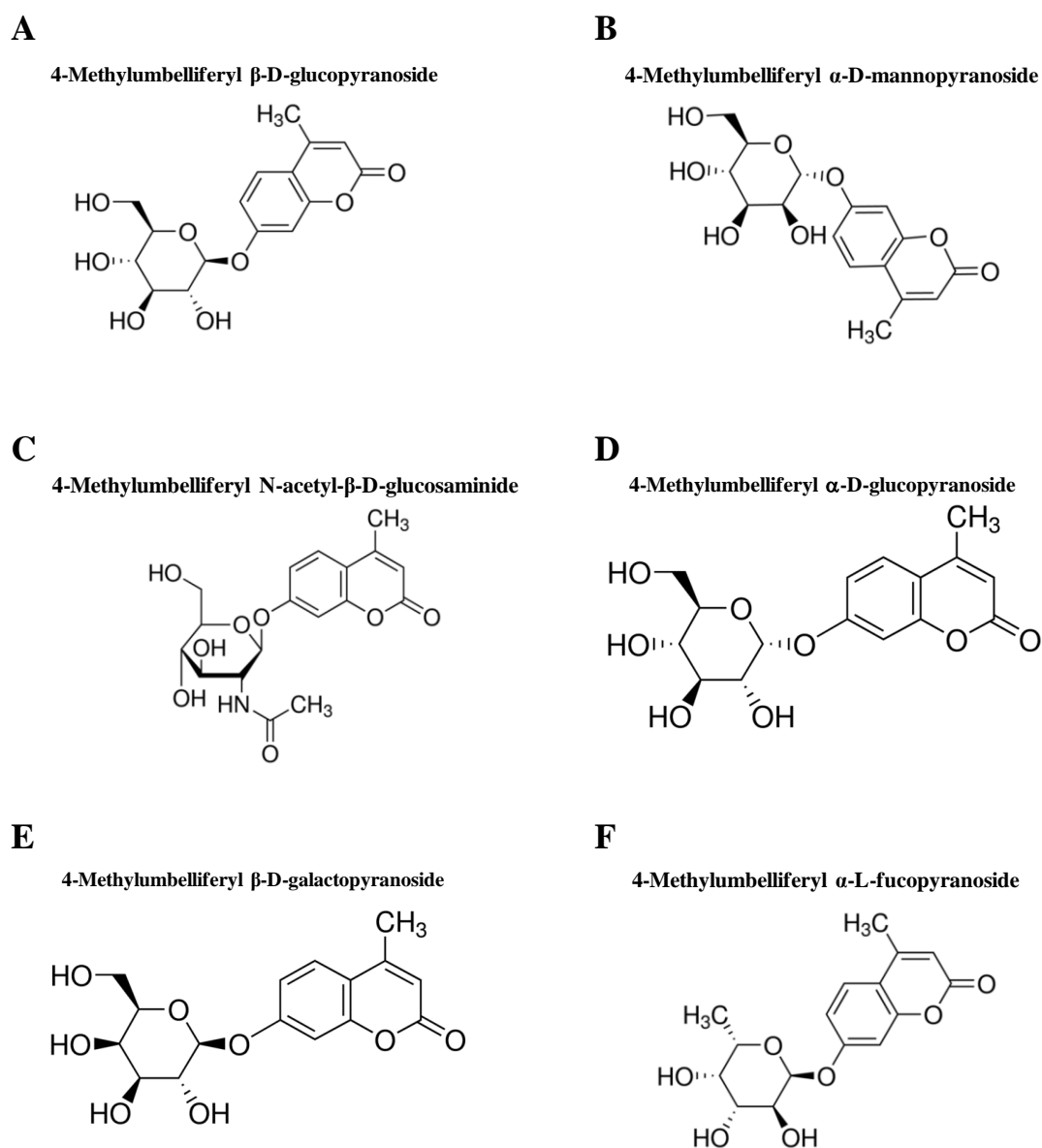


Figura 3.1 - Estrutura dos substratos utilizados para ensaios de glicosidases. **A**- β -Glicosidase, **B**- α -Manosidase, **C**-N-acetil hexosaminidase, **D**- α -Glicosidase **E**- β -Galactosidase, **F**- α -Fucosidase

3.8. Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos diferentes compartimentos intestinais foi obtida pela realização do método proposto por Bradford (1976), empregando como padrão solução de ovoalbumina a 0,2 mg/mL (Sigma Aldrich cat. num. A5503), para realização da curva padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro Molecular Devices SPECTRA max 190 em um comprimento de onda de 595 nm.

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após obtenção e preparo da amostra conforme descrito no item 3.4, foi realizada a quantificação de proteínas através do método de acordo com item 3.7. As amostras foram então preparadas de modo a obter entre 10 µg a 500 µg de proteínas totais. Foram adicionadas às amostras 5 µL tampão de amostra proposto por Laemmli (1970), 5 vezes concentrado, e o volume final ajustado para 25 µL.

As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida, o qual constitui-se da mistura de bis-acrilamida e acrilamida na proporção 1:29.

Para melhor análise das proteínas presentes na amostra foi utilizado gel de poliacrilamida a 10 % contendo SDS, conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 3.1 – Volumes de reagentes empregados para obtenção de 2 mini géis a 10%. Nesta porcentagem a malha do gel retém proteínas com peso molecular entre 14 e 205 kDa.

Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) 10 %		
	<i>Gel de Separação</i>	<i>Gel de Empilhamento</i>
Água Destilada	6,15 mL	6,10 mL
Bis/Acrilamida (1:29) 30% (p/v)	4,88 mL	1,33 mL
Tampão Tris 1,5 M pH 8,6	3,75 mL	-----
Tampão Tris 0,5 M pH 6,8	-----	2,5 mL
SDS 10 % (p/v)	150 µL	100 µL
APS 10 % (p/v)	75 µL	60 µL
TEMED	16 µL	16 µL

Após o preparo do gel, a cuba de eletroforese foi completada com a quantidade necessária de tampão de corrida constituído de 3,03 g de Tris; 14,4 g de glicina e 1 g de SDS, adicionando água destilada q.s.p. 1 litro.

Foram aplicados 25 μ L de amostra por poço, tendo como padrão de peso molecular Kaleidoscope[®] Biorad (cat. num.1610324). A corrida foi realizada em câmara fria, inicialmente a 100 V, até que as amostras alcançassem o gel de separação e posteriormente elevada para 120 V até o término da corrida.

Após a separação de proteínas os géis foram submetidos a coloração por nitrato de prata conforme Dunn e colaboradores (1994), Coomassie Brilliant Blue , ou corados pelo kit de detecção de glicoproteínas (GLYCOPRO - Sigma Aldrich), o qual se baseia nos métodos propostos por Zacharius e colaboradores (1969) e Jay e colaboradores (1990).

3.10. Desenho de iniciadores oligonucleotídicos (primers)

A escolha dos iniciadores empregados na análise de expressão gênica foi realizada baseando-se nos dados de transcriptoma de intestino do inseto anteriormente publicados pelo nosso grupo (Ribeiro, *et. al*, 2014).

Para desenho dos mesmos utilizou-se os softwares gratuitos online *Primer3* e *Beacon designer*, de acordo com Thornton (2011). Além da utilização de programas computacionais, fez-se necessário obedecer alguns critérios para um maior sucesso no desenho dos iniciadores, como, tamanho de 20 pares de base, temperatura de anelamento de 60°C, concentração de CG (citosina-guanina) igual ou superior a 50% e valores de Δ G próximos de zero.

A especificidade dos primers foi acompanhada *in silico* através do banco de dados *Vector Base*, através da ferramenta *BLAST*, e a confirmação da sequência desejada nos amplicons foi obtida por meio de sequenciamento realizado na plataforma de sequenciamento do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/FIOCRUZ).

A sequência dos iniciadores utilizados, bem como suas respectivas temperaturas de *melting* e percentual CG encontram-se disponíveis na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Iniciadores utilizados para análise do padrão de expressão gênica de Glicosídeo Hidrolases.

Descrição	ID Gene	Família	Sequência 5'-3'	Tm (°C)	pb	% CG	
Tubulina	TUB		TTTCTCGATCACTGCTTCC	F	60,4	20	50
			CGGAAATAACTGGGGCATAA	R	58,4	20	45
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GAPDH		GATGGCGCCCAGTACATAGT	F	62,5	20	55
			AGCTGACGGGGCTGTTATTA	R	60,4	20	50
RNA ribossomal 18S	18S		TCCTTCGTGCTAGGAATTGG	F	60,4	20	50
			GTACAAAGGGCAGGGACGTA	R	62,5	20	55
β-glicosidase	RPRC006985	GH 1	TATTCCATCTGGTCATGGCG	F	60,4	20	50
			GATTCCCTTCTGTGTGGCTT	R	60,4	20	50
β-glicosidase	RPRC009516	GH 1	AGAAGAACAGGGAGGTTGGA	F	60,4	20	50
			GCAGTGGCTCGTTTATTGTG	R	60,4	20	50
β-glicosidase	RPRC009519	GH 1	TTAGCCACAAACGGTGTCTC	F	60,4	20	50
			AACTGGAACAACCCTAAGCC	R	60,4	20	50
β-glicosidase	RPRC009530	GH 1	AGACTTAGGAGGTTGGCTGA	F	60,4	20	50
			CTCCGTAGCCGTCACTAATG	R	62,5	20	55
β-glicosidase	RPRC015451	GH 1	AGGACGAAAACCATCTTGGG	F	60,4	20	50
			TTCAGCAAGCCTCCAAATCC	R	60,4	20	50
Glicogen debranching enzyme	RPRC006247	GH 13	CACTTCTCCCTCTCTGAA	F	62,5	20	55
			GTAACCCGTTGCGAAATGTG	R	60,4	20	50
1,4 α-glucan branching enzyme	RPRC006918	GH 13	AACTGAGGAAGCAGGTGTTG	F	60,4	20	50
			TTCTTCTCCAACCATCGTCG	R	60,4	20	50
α-glicosidase	RPRC010194	GH 13	TACATCGCCCCTTGGTTATC	F	60,4	20	50
			GAGACATTCAGCCGTATCCA	R	60,4	20	50
α-amilase	RPRC012570	GH 13	AGCAGGAAGTACAAGATGGC	F	60,4	20	50
			GGTGGTCCTTGGTCTCTACT	R	62,5	20	55
α-glicosidase	RPRC012963	GH 13	TGGTGGACACTTATATGGGC	F	60,4	20	50
			TACTGGGAGCCATGTTTTGG	R	60,4	20	50
α-glicosidase	RPRC013046	GH 13	TGAGGTAATTGGACCGCATG	F	60,4	20	50
			GCCTTGTCTCACCATCCTTT	R	60,4	20	50
β-hexosaminidase	RPRC001875	GH 20	TCCAGATTCGCTTCGCCTA	F	60,2	19	52,6
			ACAAATGCTACACATCCCCA	R	58,4	20	45
β-hexosaminidase sub unidade β	RPRC003336	GH 20	AGCATTAGAAGCGTGGGATG	F	60,4	20	50
			ATCGTCCAGTCCAAGTCTCA	R	60,4	20	50
β-hexosaminidase sub unidade α	RPRC004672	GH 20	AGTGGCGAGATATGTGAAGG	F	60,4	20	50
			CCCAGTCTCCATTCGTCAAG	R	62,5	20	55
alanina amino transferase	RPRC006056	GH 20	TTTGCCTACAATGAGCGACT	F	58,4	20	45
			ACATAAACGAAGCCAGTTCCA	R	58,7	21	42,9
β-hexosaminidase sub unidade β	RPRC008125	GH 20	TATGGGTGGTATGAGGTGA	F	60,4	20	50
			TTTGC GTTGAAAGTTGCC	R	58	19	47,4
β-hexosaminidase	RPRC009566	GH 20	AAGGAGCACCACCAAAGT	F	57,6	18	50
			TGCCAACTTCCCTCTGTATG	R	60,4	20	50
β-hexosaminidase	RPRC013352	GH 20	GACGAGCCAAGAGTTTACCA	F	60,4	20	50
			CTACCCATTCAGCGATAGTGT	R	60,6	21	47,6
α-fucosidase	RPRC007504	GH 29	TAGCGTGCCAGAAATATCG	F	60,4	20	50
			TAATCGTCCATGCCCAATCG	R	60,4	20	50

α -glicosidase	RPRC002733	GH 31	CGGCTCCTGTTTTTGTATCA	F	58,4	20	45
			GGAAGGTAATCTCCACCCAC	R	62,5	20	55
α -glicosidase	RPRC003368	GH 31	GGGTTGTCCCAGCAATAGTT	F	60,4	20	50
			CCTCCGTAATGTTTGGCAGA	R	60,4	20	50
α -glicosidase	RPRC013370	GH 31	AAGGAGGAAATGTGGATGCG	F	60,4	20	50
			AGCGACACTGATGATATGCC	R	60,4	20	50
Rhomboid Protease	RPRC014288	GH 31	GGTACATAGATGGTGGCGTG	F	62,5	20	55
			GCGGCAATGAGAGCATAAAC	R	60,4	20	50
β -galactosidase	RPRC011517	GH 35	TCATTGCTCGCTGGTTTAGG	F	60,4	20	50
			GGGTCGTTCACTGGATAGC	R	62,3	19	57,9
β -galactosidase	RPRC011537	GH 35	GTACCTCAACCATACTGGCG	F	62,5	20	55
			GAGAAGGCTCGTGAAGACTC	R	62,5	20	55
α -manosidase	RPRC000597	GH 38	GCAGATTCCCCAGAAACATG	F	60,4	20	50
			TGTATAGACGGCAGAGGACT	R	60,4	20	50
α -manosidase	RPRC000924	GH 38	ACTACGGAGGACATCAGAGG	F	62,5	20	55
			CACCATCGCCAAAGAAATGC	R	60,4	20	50
α -manosidase	RPRC003657	GH 38	ATGGTGTCTATTGCCCTTGG	F	60,4	20	50
			GCACATTGGAGTCGTAAAGC	R	60,4	20	50
α -manosidase	RPRC004638	GH 38	GAATGGGACCAGCAGTACAG	F	62,5	20	55
			TCACGCATACGATTCCCTCAC	R	60,4	20	50
α -manosidase	RPRC007185	GH 38	GAAGAGAGAAACTGCCACC	F	62,5	20	55
			ATCATCTCCACAACGACTG	R	60,4	20	50
α -manosidase	RPRC011133	GH 38	CAGTGAATGAGGCAGGTGTA	F	60,4	20	50
			TTGTGGGTAGGTCTGGAAGT	R	60,4	20	50
Manosil oligosacarideo glicosidase	RPRC008468	GH 63	GCGTTGAGGCAAAAGGATTC	F	60,4	20	50
			AATGGGTCAAATCTCCAGGC	R	60,4	20	50
Trealase	RPRC012647	GH 63	CTGGAGAAAACGGATGGGTC	F	62,5	20	55
			CAGCGGACTGTAAAGCAATG	R	60,4	20	50

3.11. Extração de RNA e Síntese de cDNA

A expressão dos genes foi analisada por RT-PCR e RT-qPCR em diferentes tecidos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após a alimentação sanguínea.

Para realização destas análises, o RNA total foi extraído utilizando reagentes a base de fenol (Trizol® ou RNazol®), seguido da digestão com DNase (Ambion® TURBO DNA free™). As concentrações e integridade do RNA obtido foram avaliadas através do uso de Byoanalyzer® apresentando RIN próximo de 6,5 ou em Nanodrop® apresentando uma relação 260 nm /230 nm e 260 nm /280 nm próxima de 2.

Após a extração, verificação da integridade e quantificação do RNA foi realizada a síntese de cDNA empregando de kit SUPERSRIPT III (Invitrogen) de acordo com as instruções do

fabricante. O cDNA obtido foi quantificado com auxílio do Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific).

3.12. Análises de expressão gênica por PCR semi quantitativo

As reações de RT-PCR foram realizadas empregando o kit Go Taq® Polymerase (Promega). Para cada reação utilizou-se 0,1 µL de Taq polimerase, 1 µL primer *foward*, 1 µL primer *reverse*, ambos a 10 µM, 0,6 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL de cDNA 10 ng/µL, 0,4 µL dNTPs 10 mM e água q.s.p. 20 µL. As reações foram incubadas a 94°C durante 2 minutos, seguidos de 30 a 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C. Após o término dos ciclos a reação foi incubada por 5 minutos a 72°C.

O produto da reação foi aplicado em gel de agarose 2% (p/v), corado com brometo de etídio (1 mg/ml) e revelado com luz ultravioleta em transluminador E-Gel Imager (life technologies). Foram utilizados como controles positivos primers de genes constitutivos GAPDH, 18S e Tubulina (Paim *et. al*, 2012) e como controle negativo a ausência de cDNA.

3.13. Análises de expressão gênica por PCR quantitativo

As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando Mix Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied biosystems). Para cada reação de qPCR foram utilizados 7,5 µL de Mix Power SYBR® Green 2x, 0,9 µL de iniciador *foward* 5 µM, 0,9 µL de iniciador *reverse* 5 µM e 1 µL de cDNA 0,5 ng/µL, acertando o volume final para 15 µL com água livre de nucleases.

Após incubação por 10 minutos a 95°C, a amostra foi submetida a 40 ciclos de 20s a 95°C, 30s a 95°C e 30s a 60°C. Os valores de $\Delta\Delta CT$ obtidos foram utilizados para quantificação da expressão de cada gene, sendo empregados como normalizadores os genes de β -tubulina, GAPDH, e o gene Ribossomal 18S. As análises foram realizadas através do software *Expression Suite* (Applied biosystems).

3.14. Silenciamento gênico

Para produção de dsRNA os fragmentos dos transcritos de interesse foram amplificados através de PCR a partir do cDNA obtido como descrito anteriormente, utilizando iniciadores

específicos conjugados com 23 bases do promotor da T7 RNA polimerase. Os produtos de PCR foram utilizados como molde para a síntese dsRNA utilizando T7 RibomaxTM Express RNAi System (Promega).

A sequência 5'-TAATACGACTCACTATAGGN_(17-22 pb)-3', atua como promotora da enzima T7 RNA polimerase, fazendo-se necessária a utilização de primers invertidos, ou seja, um em que o promotor da T7 se localiza nas extremidades 3' associando-se a um primer do gene alvo na posição 5' na ausência de T7, enquanto outro primer faz o mesmo processo no sentido 5'-3', conforme representado na figura 3.2, para obtenção de um maior rendimento final, gerando dois produtos, os quais serão submetidos a síntese de RNA fita dupla (dsRNA).

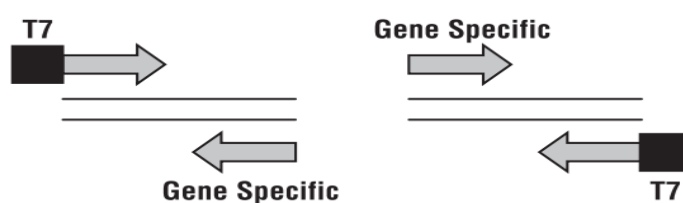


Figura 3.2 – Esquema utilizado para produção de *template* utilizado para síntese de dsRNA.

Para realização do silenciamento dos genes estudados foi realizada injeção do dsRNA na hemocele do triatomíneo (Araujo *et. al*, 2006). A escolha da concentração de dsRNA foi baseada em outros experimentos do laboratório, onde optamos por utilizar 1 µg por inseto. As injeções foram realizadas com auxílio do nanoinjetor DRUMMOND “NANOJECT II”.

O resultado do silenciamento foi observado 48 horas após as injeções, através da diminuição na expressão relativa do gene, monitorado através das técnicas de RT-PCR, através do software *Image J*, e atividade enzimática no tubo digestivo. Como controles foram utilizados insetos inoculados com dsRNA para a proteína exógena GFP (*Green Fluorescent Protein*).

3.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas de todos os dados obtidos foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.01, usando ANOVA para comparação entre os grupos experimentais e teste *t* para verificação da diferença em uma variável entre dois grupos experimentais. O mesmo programa foi utilizado para construção dos gráficos.

Teste de normalidade omnibus D'Agostinho & Pearson foram utilizados para verificação da distribuição Gaussiana para cada enzima. As enzimas que apresentaram uma distribuição

normal foram submetidas ao teste paramétrico t de Student não pareado. Enquanto em amostras que não foram observados distribuição de Gauss foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da Metodologia Empregada nos Ensaio Enzimáticos

Inicialmente desenvolvemos uma metodologia alternativa, empregando ensaios contínuos de determinação da atividade de glicosídeo hidrolases, apresentando vantagens sobre os métodos empregados atualmente. As medidas de atividade se basearam na detecção da fluorescência da metilumbeliferona em valores ácidos de pH, onde este composto apresenta uma resposta residual, porém detectável (Figura 4.1).

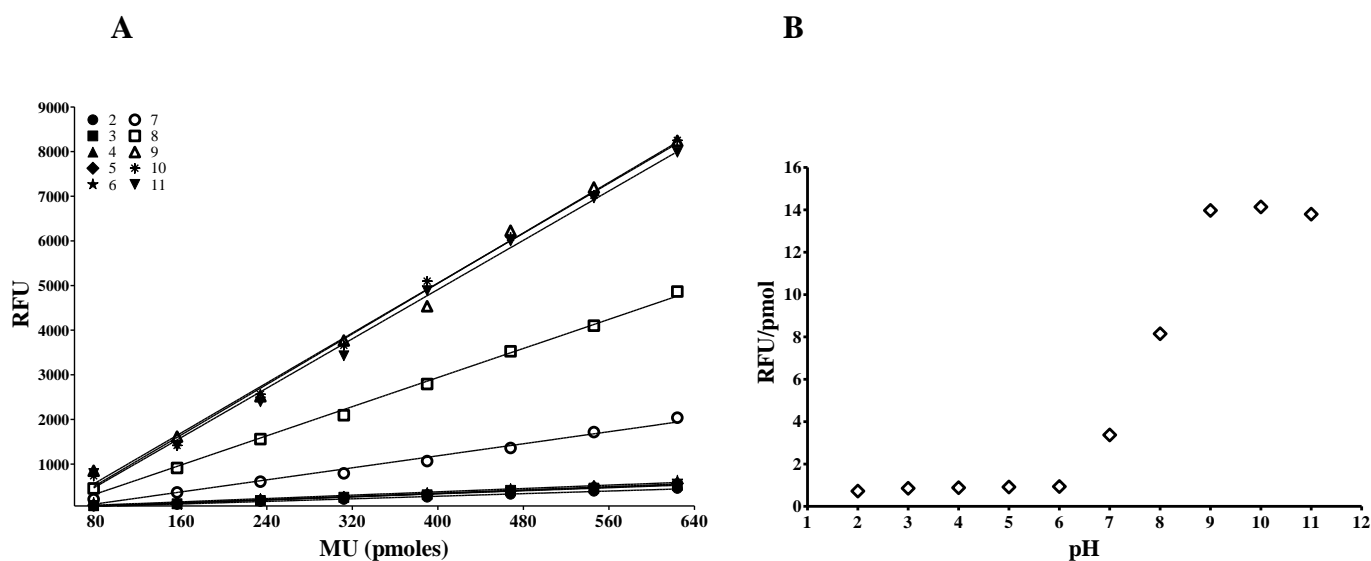


Figura 4.1. Curva padrão de metilumbeliferona em diferentes pHs. **A:** Variações da curva padrão de metilumbeliferona com pHs variando entre 2 a 11. **B:** Intensidade da resposta de fluorescência com ensaios entre pHs 2 a 11, apresentando aumento a partir do pH 7 se tornando estável a partir do pH 10.

Para testar a detecção da liberação da metilumbeliferona em meio ácido, foram realizados ensaios com substratos glicosídicos MU derivados e conteúdo intestinal de *R. prolixus*, em pH 4,5.

Todos os ensaios enzimáticos realizados com a nova técnica mostraram-se lineares (Figura 4.2-A-F). As estruturas dos substratos cuja hidrólise foi monitorada ao longo deste trabalho encontram-se disponíveis no tópico materiais e métodos, item 3.5, figura 3.1.

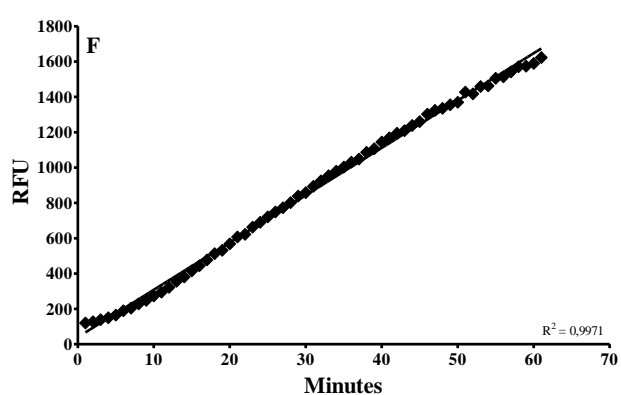
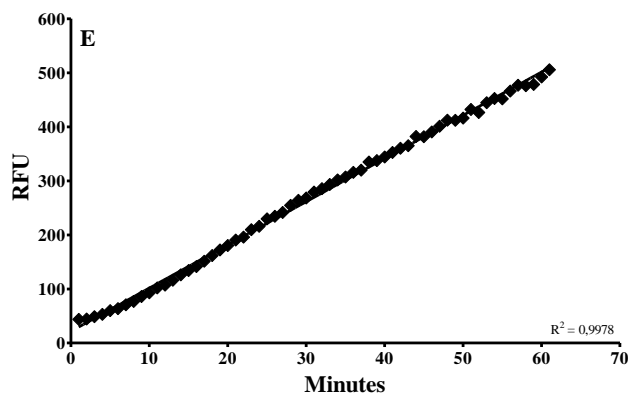
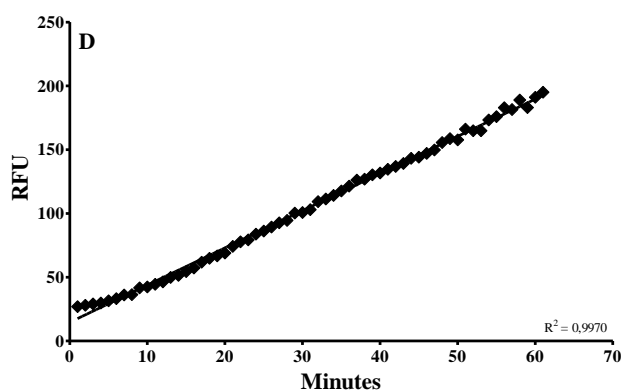
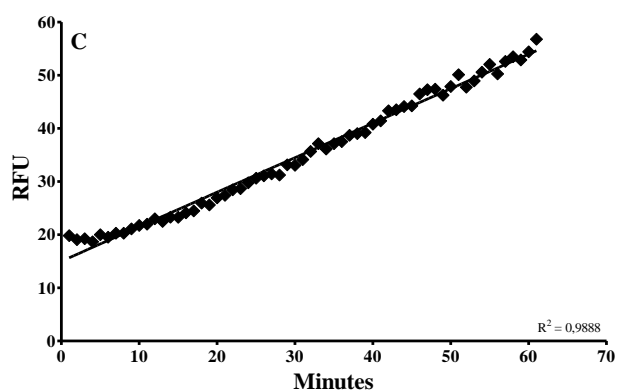
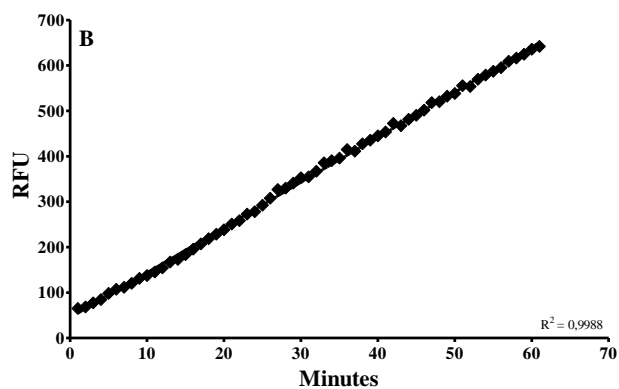
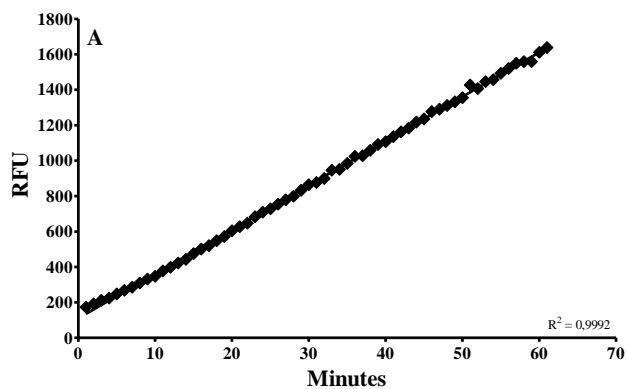


Figura 4.2 - Detecção de atividade enzimática utilizando ensaios contínuos. **A-** α -Glicosidase, **B-** α -Manosidase, **C-** β -Glicosidase, **D-** β -Galactosidase, **E-** N-acetil hexosaminidase, **F-** α -Fucosidase.

Em um segundo momento, decidimos padronizar as condições para medida de cada uma das atividades enzimáticas estudadas no intestino de *R. prolixus*.

Os volumes de amostras necessários para detecção da atividade de cada uma das enzimas foram determinados de acordo com a linearidade apresentada entre a concentração da amostra e a atividade detectada, conforme mostrado na figura 4.3 (A-F). Sendo escolhido o volume que se encontrava entre os pontos iniciais e finais da faixa linear, e nos casos onde se observou a tendência de um perfil hiperbólico foi realizada diluição da amostra para realização dos experimentos. Os mesmos critérios foram seguidos para determinação dos volumes empregados nos ensaios com todos tecidos avaliados no estudo. Os volumes de amostra referente a cada tecido estudado frente às diferentes GHs encontram-se disponíveis na tabela 4.1.

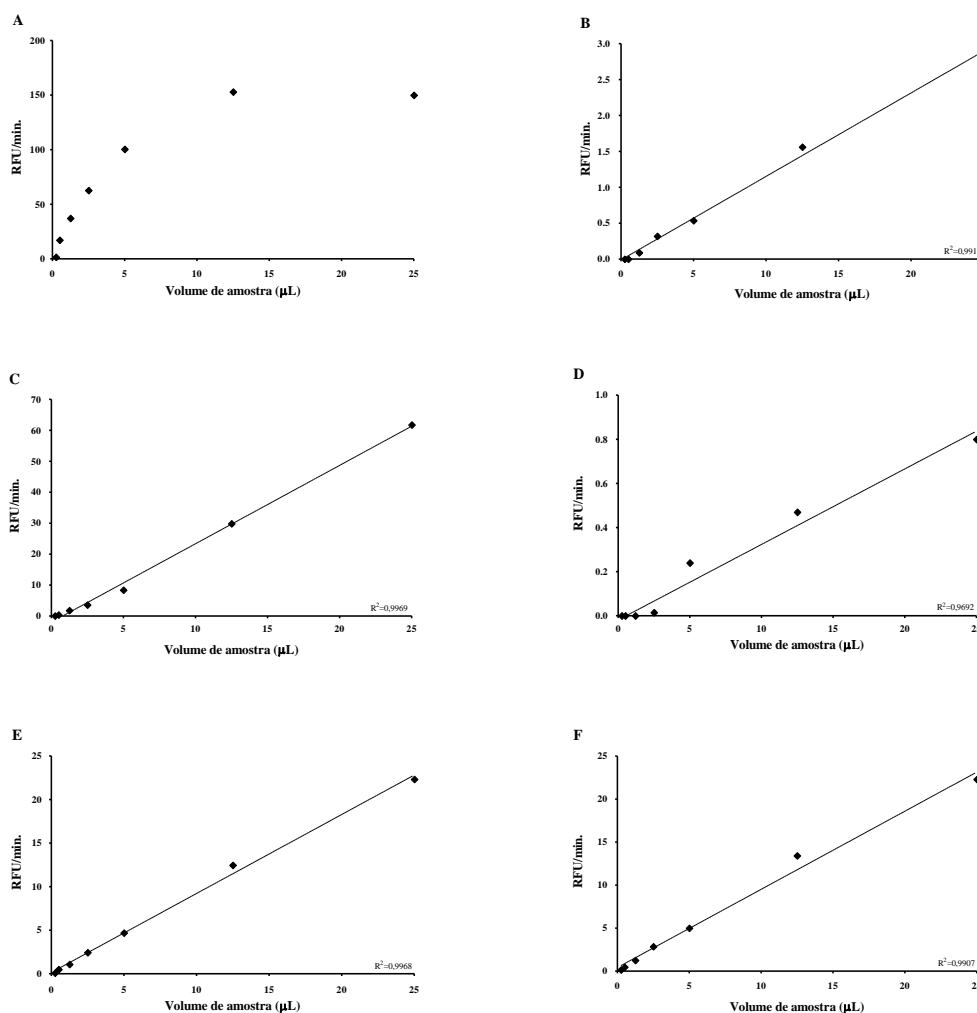


Figura 4.3- Determinação dos volumes ideais de amostra de epitélio do intestino médio anterior de *Rhodnius prolixus* 7 dias após alimentação, para ensaios de GHs. **A-** α-Glicosidase, **B-** α-Manosidase, **C-** β-Glicosidase, **D-** β-Galactosidase, **E-** N-acetil hexosaminidase, **F-** α-Fucosidase.

Tabela 4.1 – Volumes de amostras empregadas nos ensaios referentes a cada tecido estudado frente às diferentes GHs. Utilizando estes volumes, observou-se para todas condições ensaiadas proporcionalidade entre a concentração de enzima e a velocidade da reação. Estes volumes foram utilizados para todos os ensaios de determinação de atividade enzimática de *R. prolixus*.

	α -Glicosidase	β -Glicosidase	<i>N</i> -acetil hexosaminidase	α -Manosidase	β -Galactosidase	α -Fucosidase
GS	22 μ L	22 μ L	22 μ L	22 μ L	22 μ L	22 μ L
IMAC	1,25 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L	25 μ L	2,5 μ L	0,5 μ L
IMAE	2,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L	25 μ L	25 μ L	12,5 μ L
IMPC	25 μ L	12,5 μ L	2,5 μ L	12,5 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L
IMPE	2,5 μ L	25 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L	25 μ L	2,5 μ L
IP	25 μ L	25 μ L	5 μ L	25 μ L	25 μ L	5 μ L

* *GS* = Glândula Salivar; *IMAC* = Intestino Médio Anterior Conteúdo; *IMAE* = Intestino Médio Anterior Epitélio; *IMPC* = Intestino Médio Posterior Conteúdo; *IMPE* = Intestino Médio Posterior Epitélio; *IP* = Intestino Posterior.

A realização de ensaios fluorescentes contínuos de glicosidases torna a detecção destas enzimas mais fácil e confiável do ponto de vista experimental. Para validar essa técnica, as mesmas amostras foram submetidas a ensaios contínuos e descontínuos (interrupção e revelação em pH 10, com adição do tampão carbonato de sódio), obtendo-se os dados da tabela 4.2 e mostrados na figura 4.4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ensaios realizados nas duas condições.

Tabela 4.2 - Atividades de glicosidases através da realização de ensaios contínuos e descontínuos. Atividades expressas em microunidades, representadas como média de 4 réplicas experimentais (pool de 6 insetos) \pm SEM. Uma unidade corresponde a quantidade de enzima que processa 1 μ mol de substrato por minuto. Ensaios realizados com fração tecidual do intestino médio anterior de *R. prolixus* 7 dias após a alimentação, usando as condições contidas na tabela 4.1.

Substrato	Enzima	Contínuo (μ U/inseto)	Descontínuo (μ U/inseto)
4-MU α -D-glucopyranoside	α -glicosidase	1500 \pm 200	2500 \pm 400
4-MU α -D-mannopyranoside	α -manosidase	58 \pm 5	78 \pm 10
4-MU β -D-glucopyranoside	β -glicosidase	21 \pm 7	37 \pm 6
4-MU β -D-galactopyranoside	β -galactosidase	7 \pm 4	8 \pm 3
4-MU N-acetyl- β -D-glucosaminide	N-acetil-hexosaminidase	400 \pm 100	500 \pm 100
4-MU α -L-fucopyranoside	α -fucosidase	320 \pm 50	370 \pm 40

* 4-MU = 4-Methylumbelliferyl

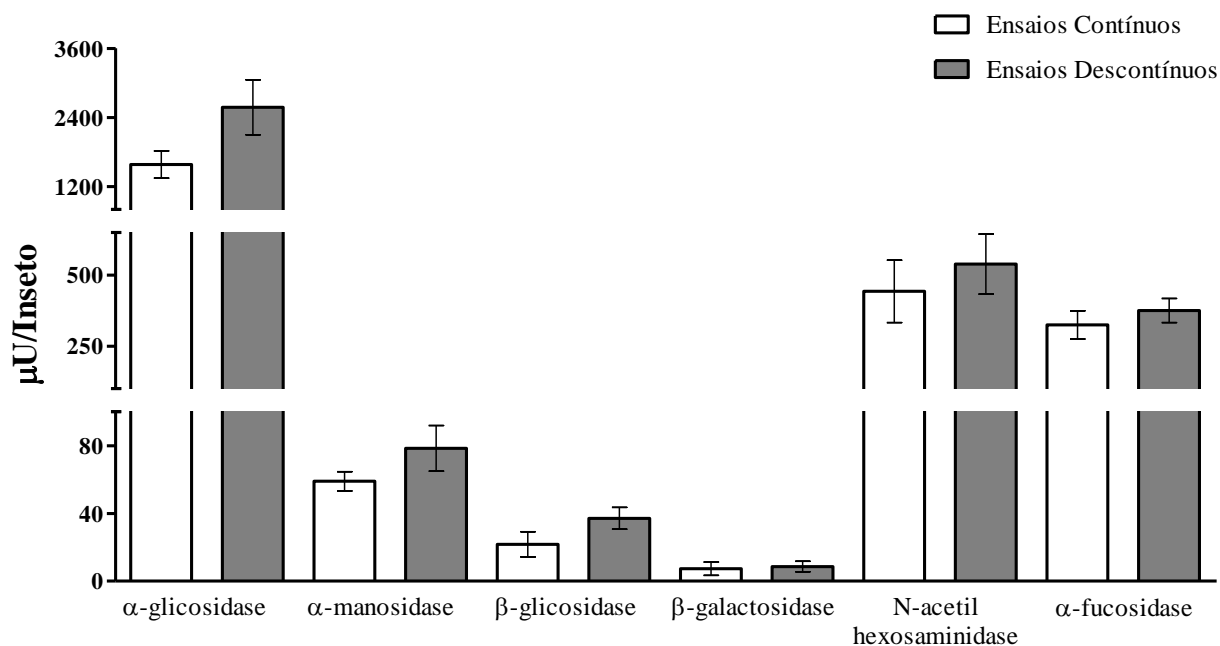


Figura 4.4 - Medidas de atividade de glicosidases de uma mesma amostra utilizando a metodologia de ensaios contínuos e descontínuos.

Após a validação, testamos a técnica de ensaios contínuos para o *screening* da atividade de glicosidases em 90 insetos de maneira individual em uma população de *Rhodnius prolixus* do nosso laboratório. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 4.5 e 4.6, utilizando o epitélio do intestino médio anterior como modelo (tecido com atividades significativas para todos os substratos testados).

Podemos observar uma grande variação nas atividades dentro da população estudada (Figura 4.5). Apesar da sincronização dos insetos (insetos de colônia, machos, com 40 dias de jejum) algumas atividades apresentam uma distribuição próxima da normalidade na população (figuras 4.6-A a 4.6-C), enquanto outros apresentam distribuições que fogem da curva normal (figuras 4.6-D a 4.6-F).

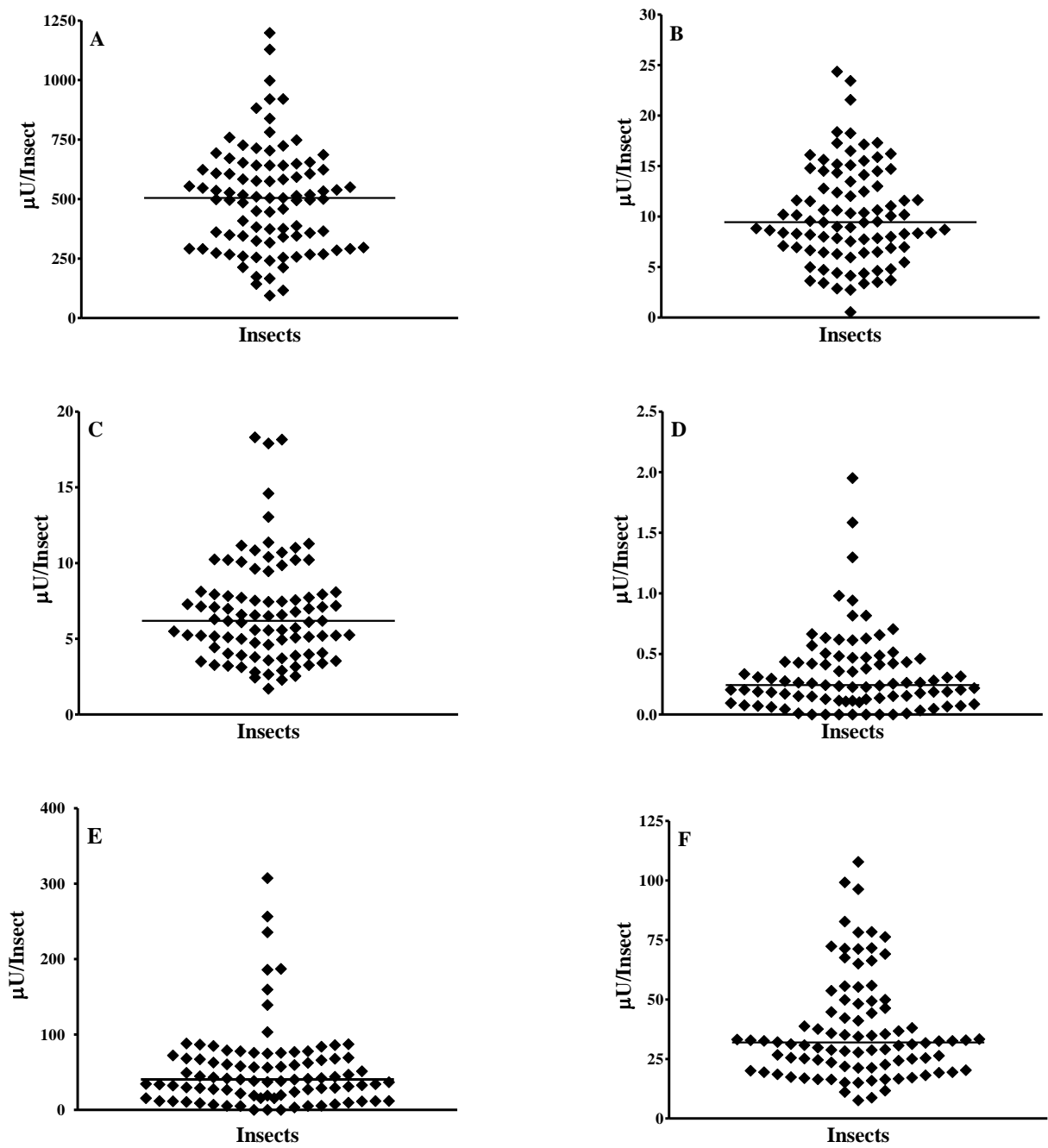


Figura 4.5 - Quantificação de glicosidases em $\mu\text{U}/\text{inseto}$ nas amostras de epitélio de intestino médio anterior adquiridas de 90 insetos machos mantidos em jejum. **A-** α -Glicosidase, **B-** α -Manosidase, **C-** β -Glicosidase, **D-** β -Galactosidase, **E-** N-acetil hexosaminidase, **F-** α -Fucosidase. Cada ponto representa a amostra obtida de um único indivíduo.

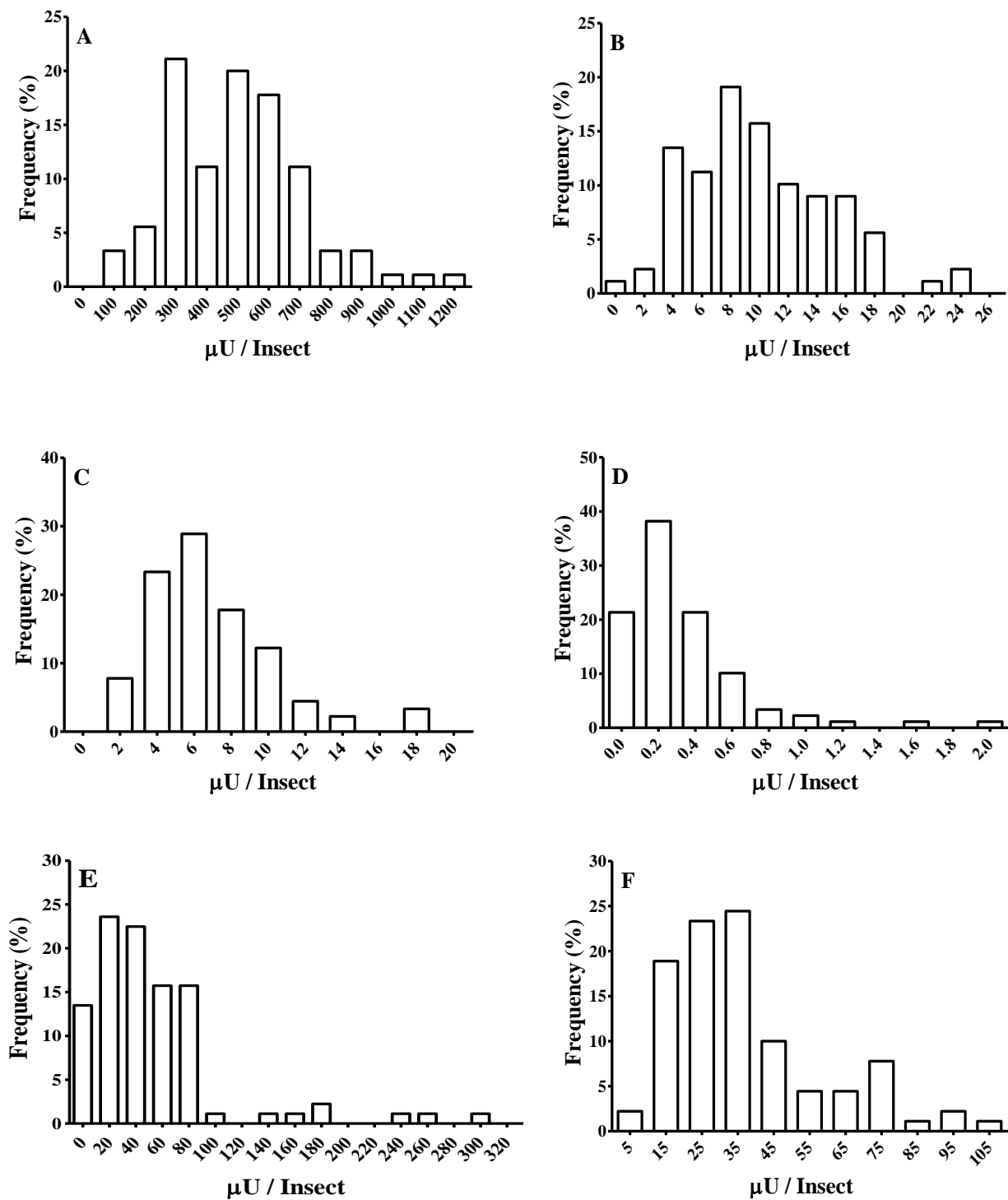


Figura 4.6 - Frequência percentual da distribuição populacional de glicosidases em *Rhodnius prolixus* machos. **A**- α -Glicosidase, **B**- α -Manosidase, **C**- β -Glicosidase, **D**- β -Galactosidase, **E**- N-acetil hexosaminidase, **F**- α -Fucosidase.

4.2. Determinação do perfil de atividades enzimáticas

Utilizando a técnica de ensaios enzimáticos contínuos descrito no item 3.5, detectamos as atividades de 6 enzimas (α -Glicosidase, β -Glicosidase, α -Manosidase, N-acetil hexosaminidase, β -Galactosidase e α -Fucosidase) em diferentes compartimentos do aparelho digestivo de *Rhodnius prolixus*, adultos, machos (glândula salivar - GS; intestino médio anterior - IMA; intestino médio posterior – IMP; e intestino posterior - IP). Sendo que nas amostras de IMA e IMP foram ainda separados o conteúdo luminal (Cont.) e o epitélio intestinal (Ep.). As atividades foram ensaiadas em insetos em jejum, e entre 2 e 14 dias após uma alimentação sanguínea saturante.

Os resultados são apresentados nas figuras 4.7 a 4.12 onde podemos ver que algumas enzimas em determinados compartimentos possuem atividade constante ao longo do tempo, como por exemplo β -Glicosidase na glândula salivar (figura 4.8) e outras apresentam uma clara indução ao longo da digestão do sangue, como observado para β -Galactosidase no epitélio de IMP (Figura 4.11).

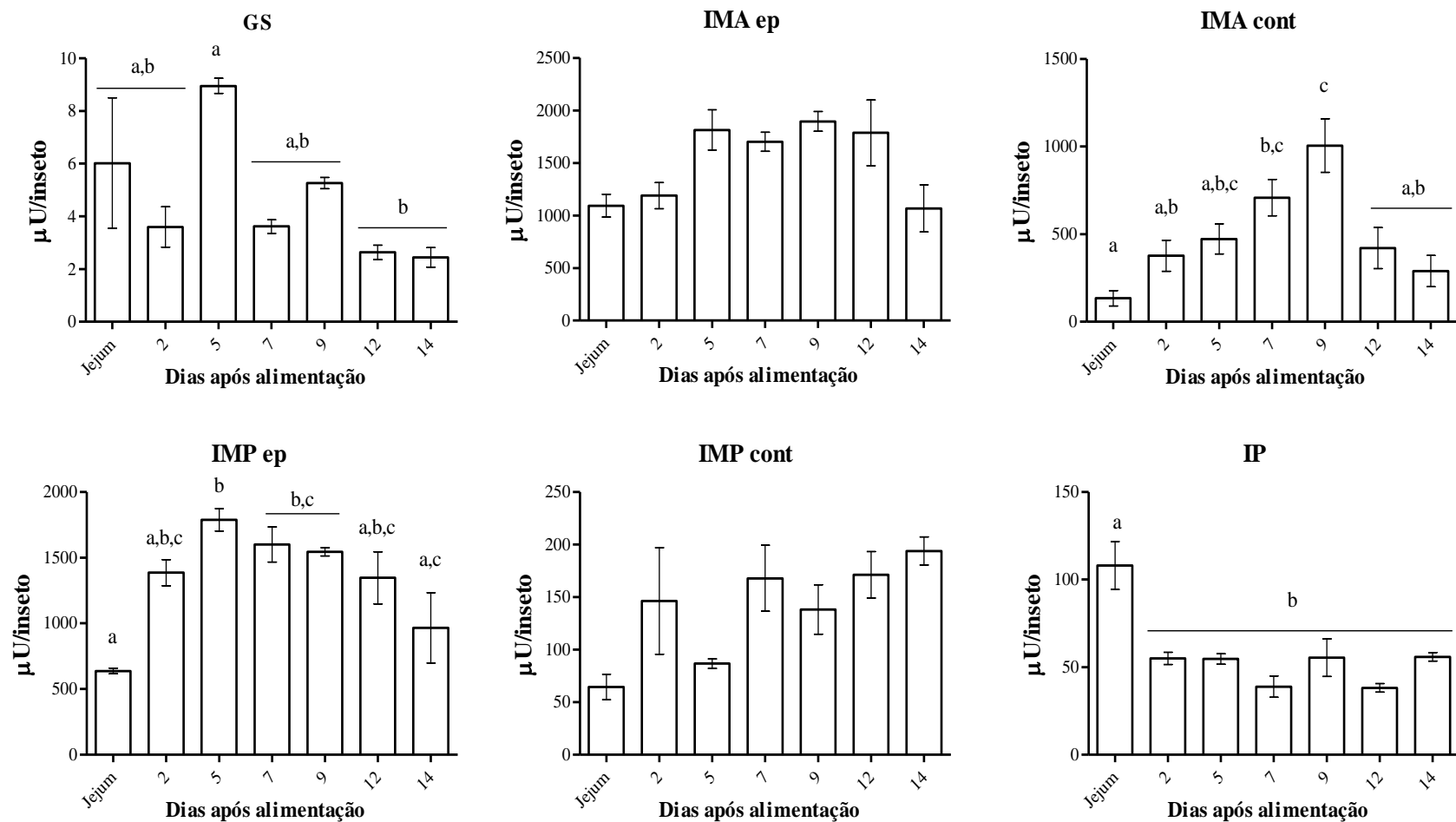


Figura 4.7 - Perfil de atividade de α -Glicosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, p < 0,05).

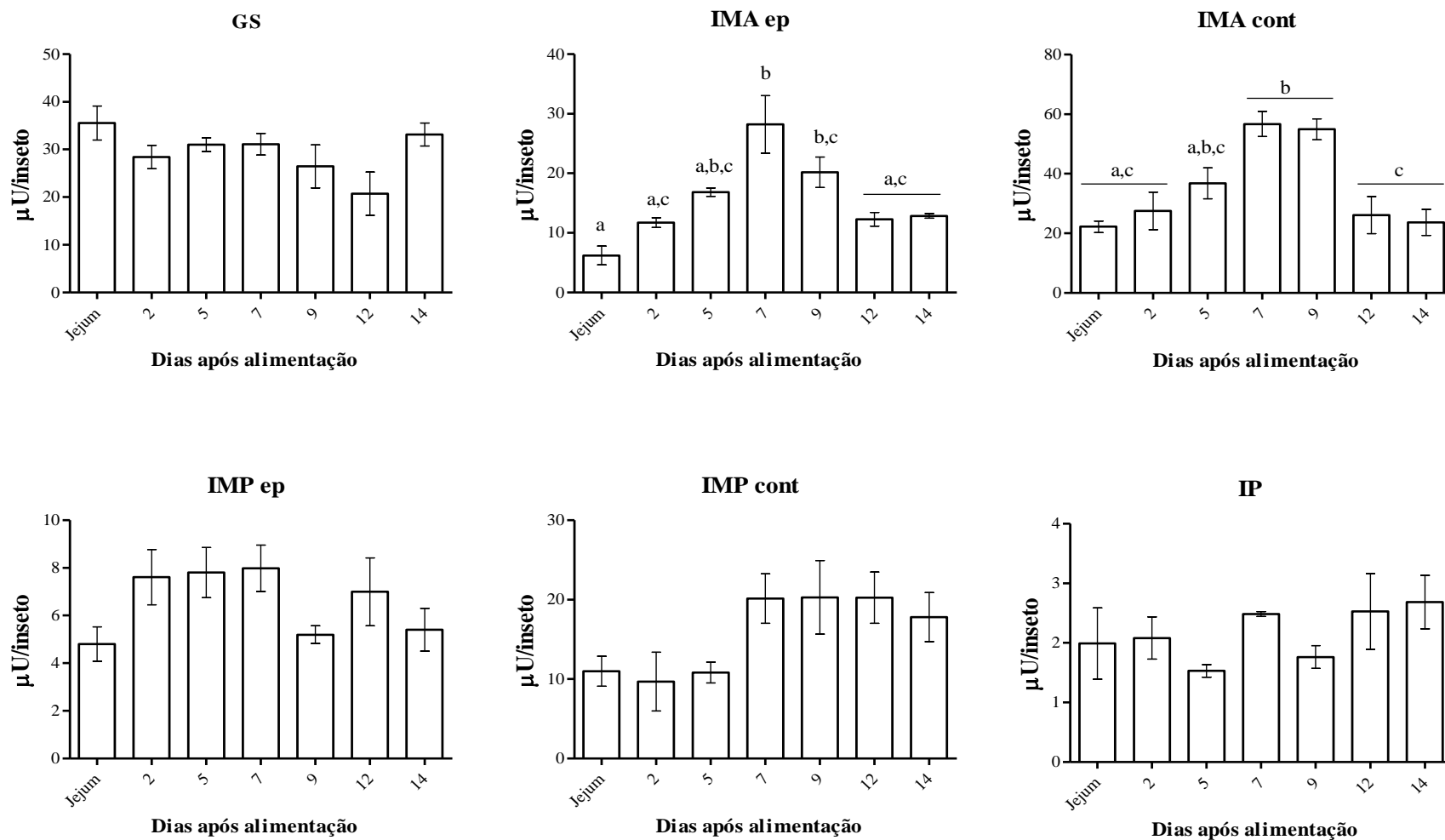


Figura 4.8 - Perfil de atividade de β -Glicosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

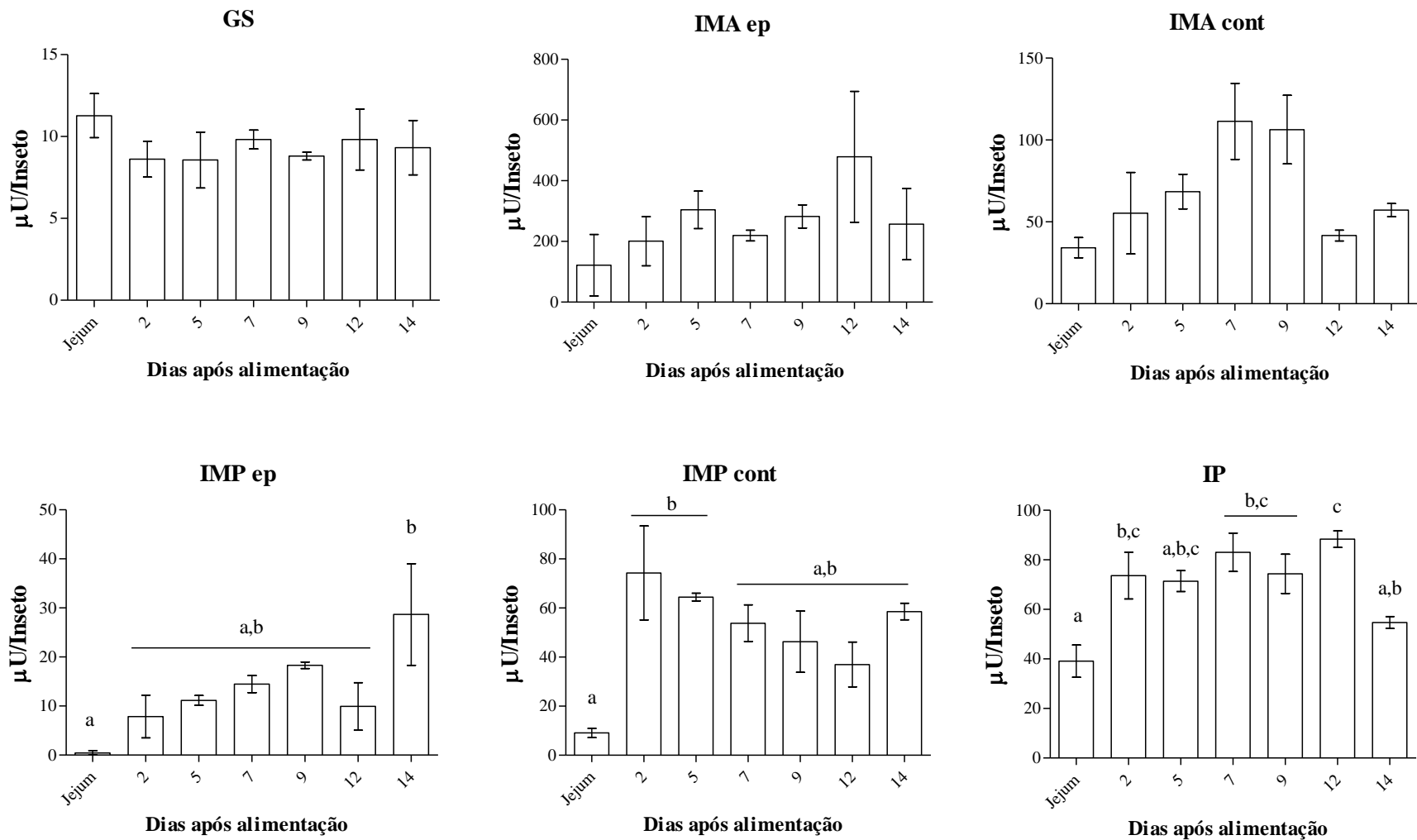


Figura 4.9 - Perfil de atividade de N-acetil hexosaminidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

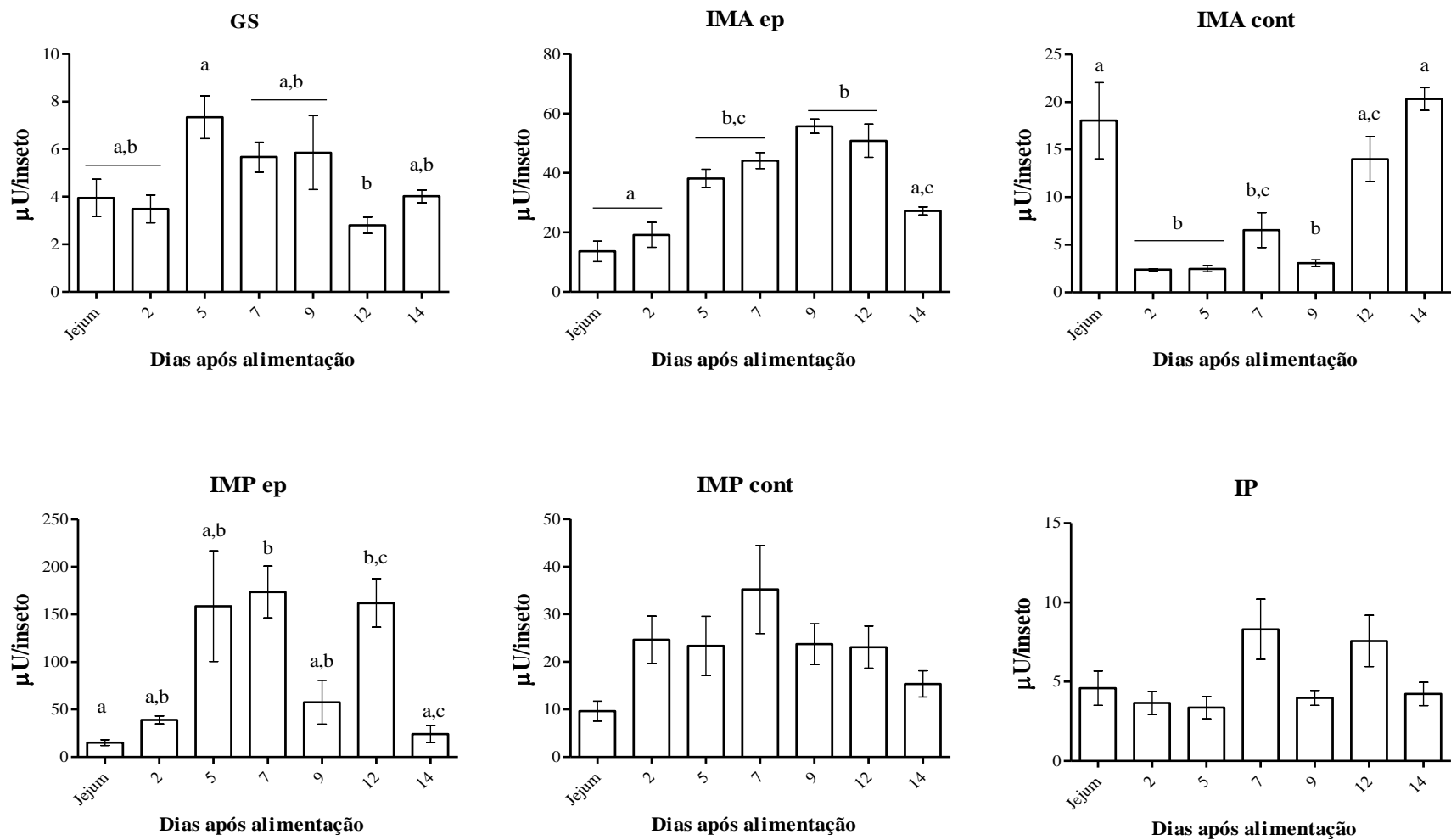


Figura 4.10 - Perfil de atividade de α -Manosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

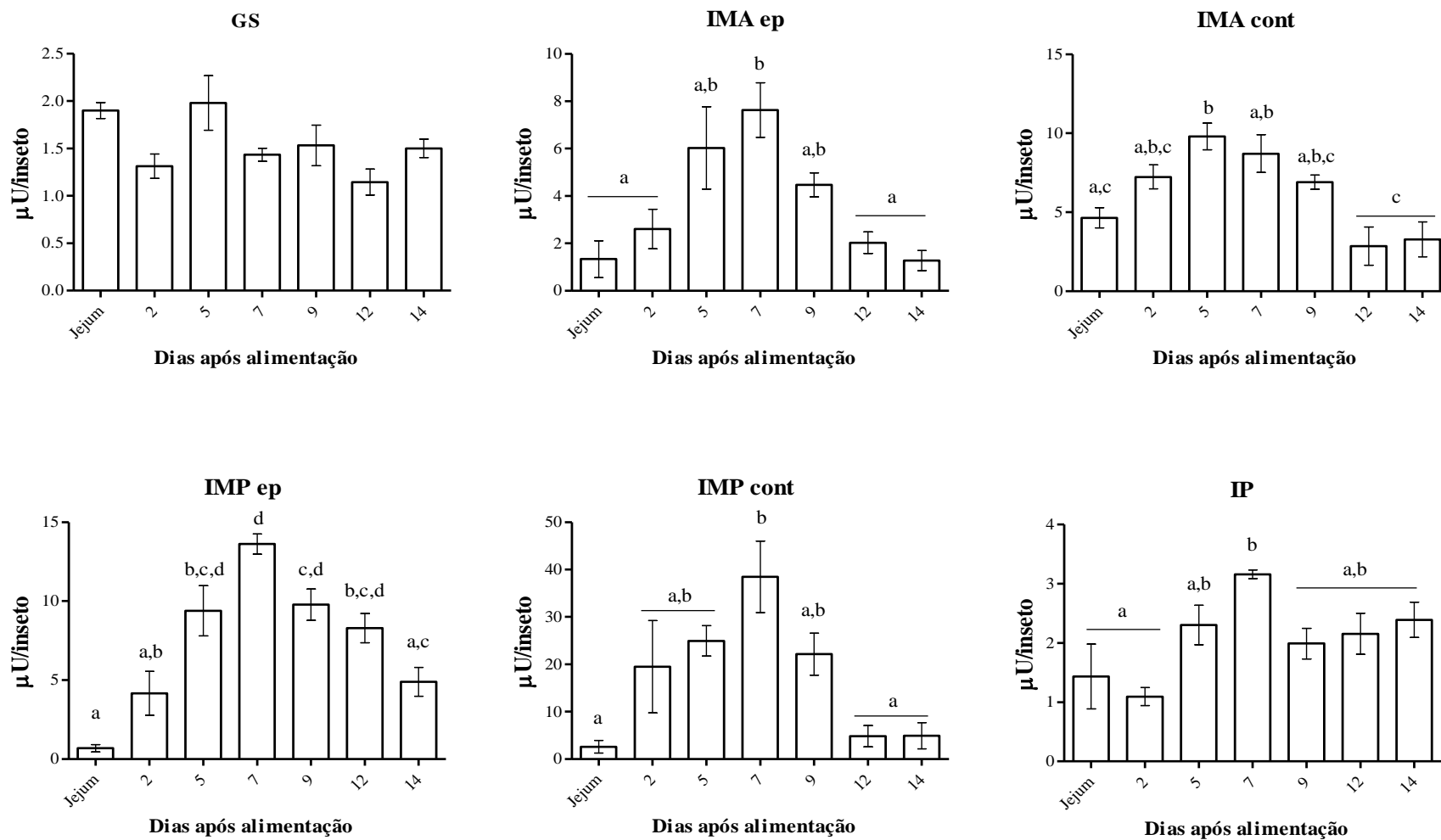


Figura 4.11 - Perfil de atividade de β -Galactosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

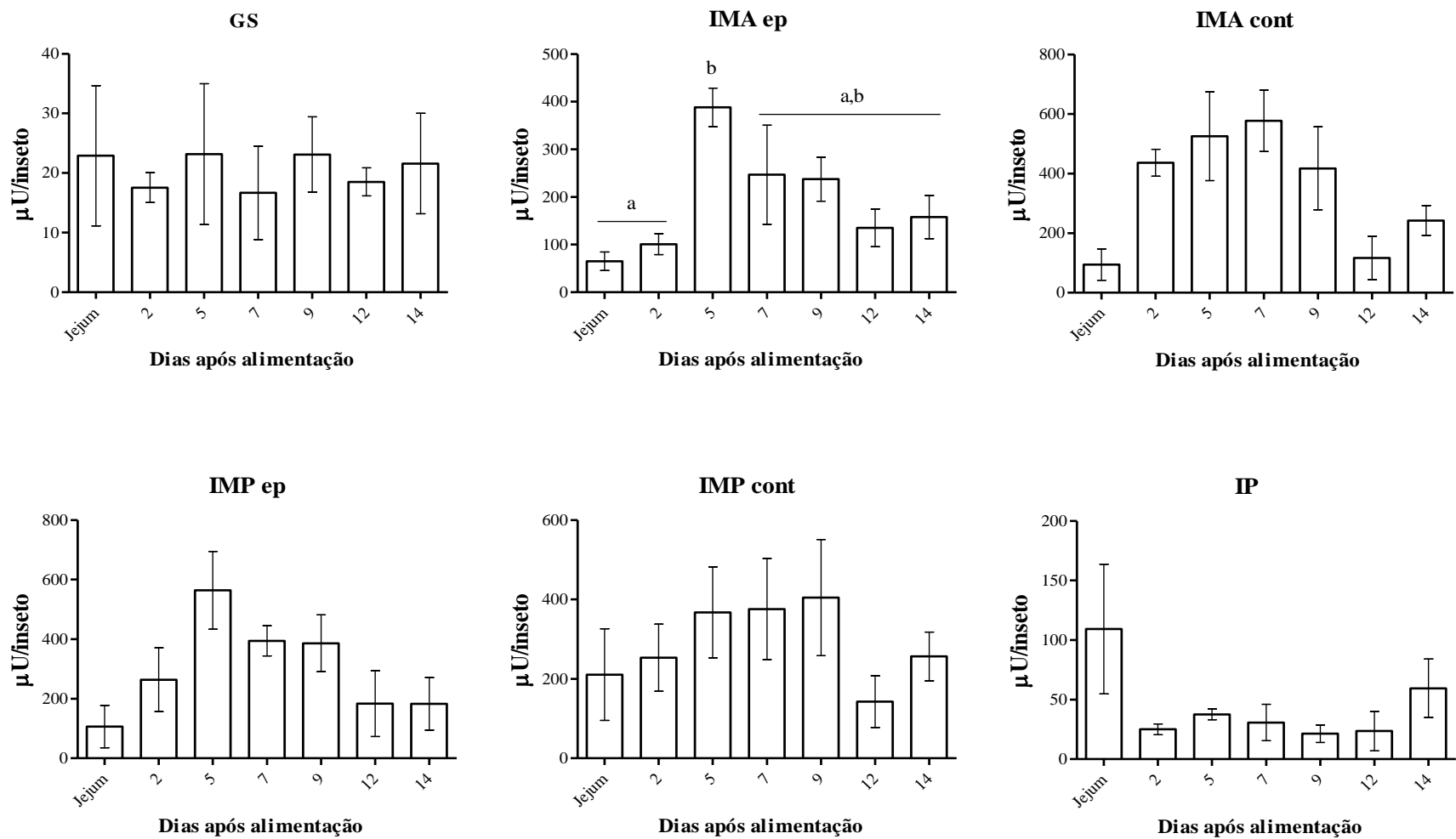


Figura 4.12 - Perfil de atividade de α -Fucosidase em diferentes tecidos digestivos do inseto (glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior) em diferentes dias após alimentação, onde jejum corresponde a insetos avaliados 30 dias após a alimentação. As barras assinaladas com diferentes letras (a,b,c) correspondem a conjuntos de valores estatisticamente diferentes entre si (ANOVA, $p < 0,05$).

Com intuito de confirmar se as atividades encontradas no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* eram de fato decorrentes de enzimas secretadas pelo inseto, foi realizada uma análise para verificação da presença das glicosidases estudadas no sangue empregado na alimentação do mesmo. Após a realização de ensaios de atividade enzimática com as seis glicosidases estudadas, utilizando insetos 2 dias após a alimentação, observamos a presença de concentrações mais elevadas de grande parte destas enzimas no conteúdo intestinal em relação à dieta (Tabela 4.3 e Figura 4.13). Entretanto, em casos onde as concentrações encontradas foram menores ou equivalentes àsquelas encontradas na alimentação, nós observamos uma indução destas enzimas ao longo da digestão (Figuras 4.10 e 4.11), especialmente na fração tecidual do intestino médio, sugerindo que estas atividades encontradas podem ser atribuídas à secreção de enzimas pelo inseto ao longo do seu processo digestivo.

Tabela 4.3 - Atividade enzimática encontradas no sangue e no conteúdo do intestino médio anterior de insetos 2 dias após alimentação. Os valores são referentes a ensaios realizados em pH 4,5.

Enzimas	$\mu\text{U/IMA cont.}$	$\mu\text{U/Dieta}$
α -Glicosidase	377 ± 89	1 ± 1
α -Manosidase	$2,4 \pm 0,1$	22 ± 13
β -Glicosidase	28 ± 6	1 ± 1
β -Galactosidase	7 ± 1	6 ± 3
N-acetil hexosaminidase	55 ± 25	2 ± 1
α -Fucosidase	437 ± 45	70 ± 19

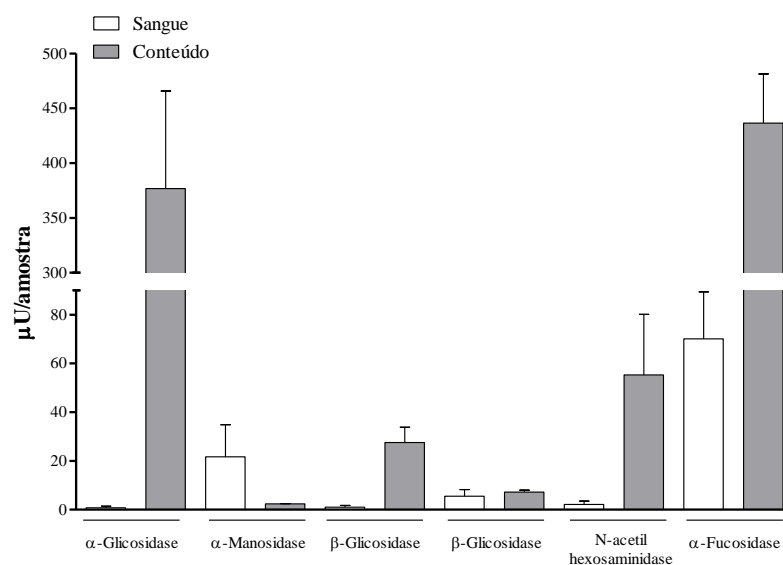


Figura 4.13- Comparação da atividade de GHs entre amostras de sangue e conteúdo do intestino médio anterior de *Rhodnius prolixus*, ensaios realizados com insetos 2 dias após alimentação, em pH 4,5, pH ótimo das glicosidases ensaiadas.

Após a determinação tecidual e temporal das glicosídeo hidrolases ao longo da digestão, decidimos comparar a atividade destas enzimas nos diferentes compartimentos estudados produzida ao longo da digestão sanguínea (somatória das atividades em diferentes dias após alimentação) (Figura 4.14).

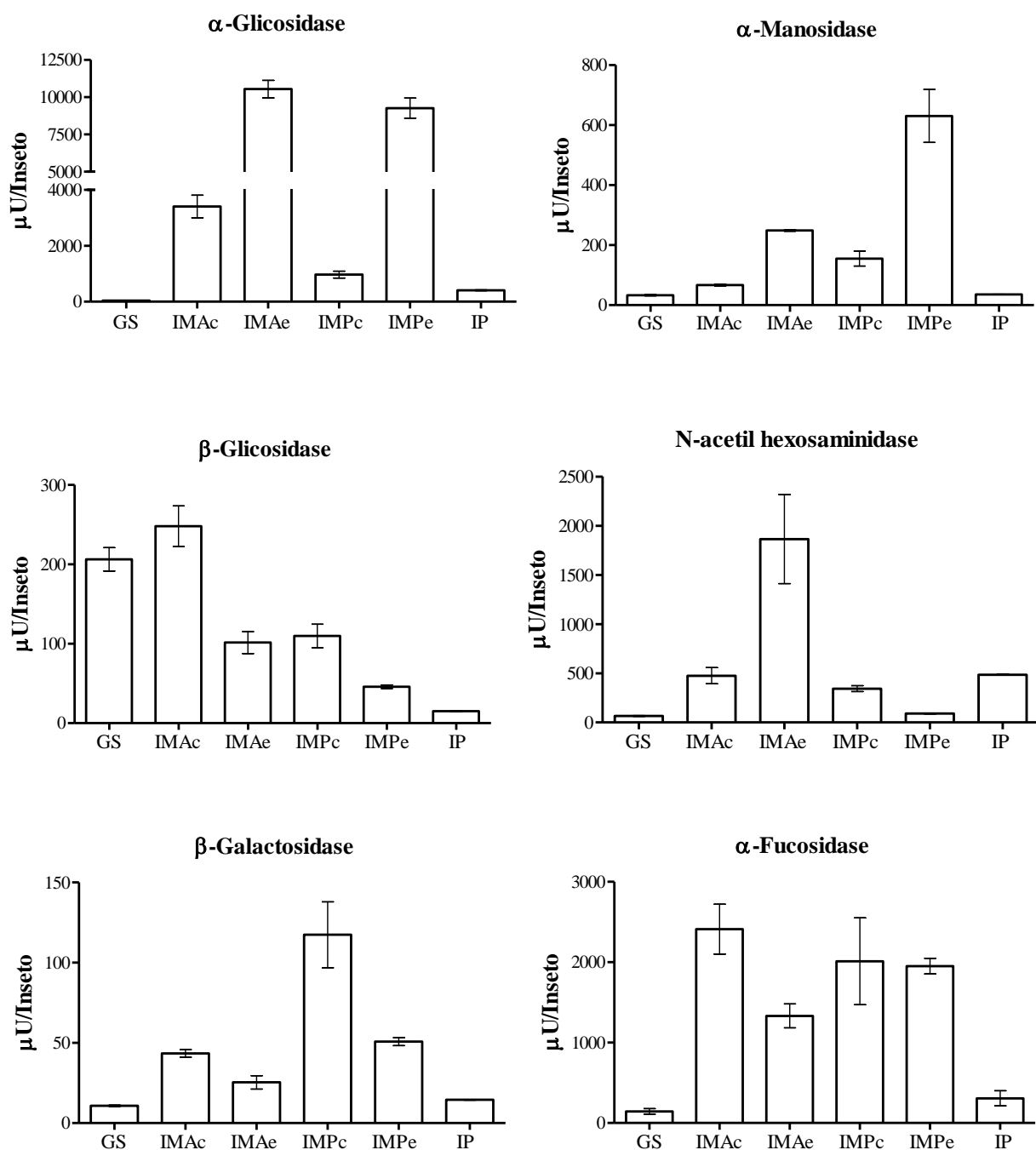
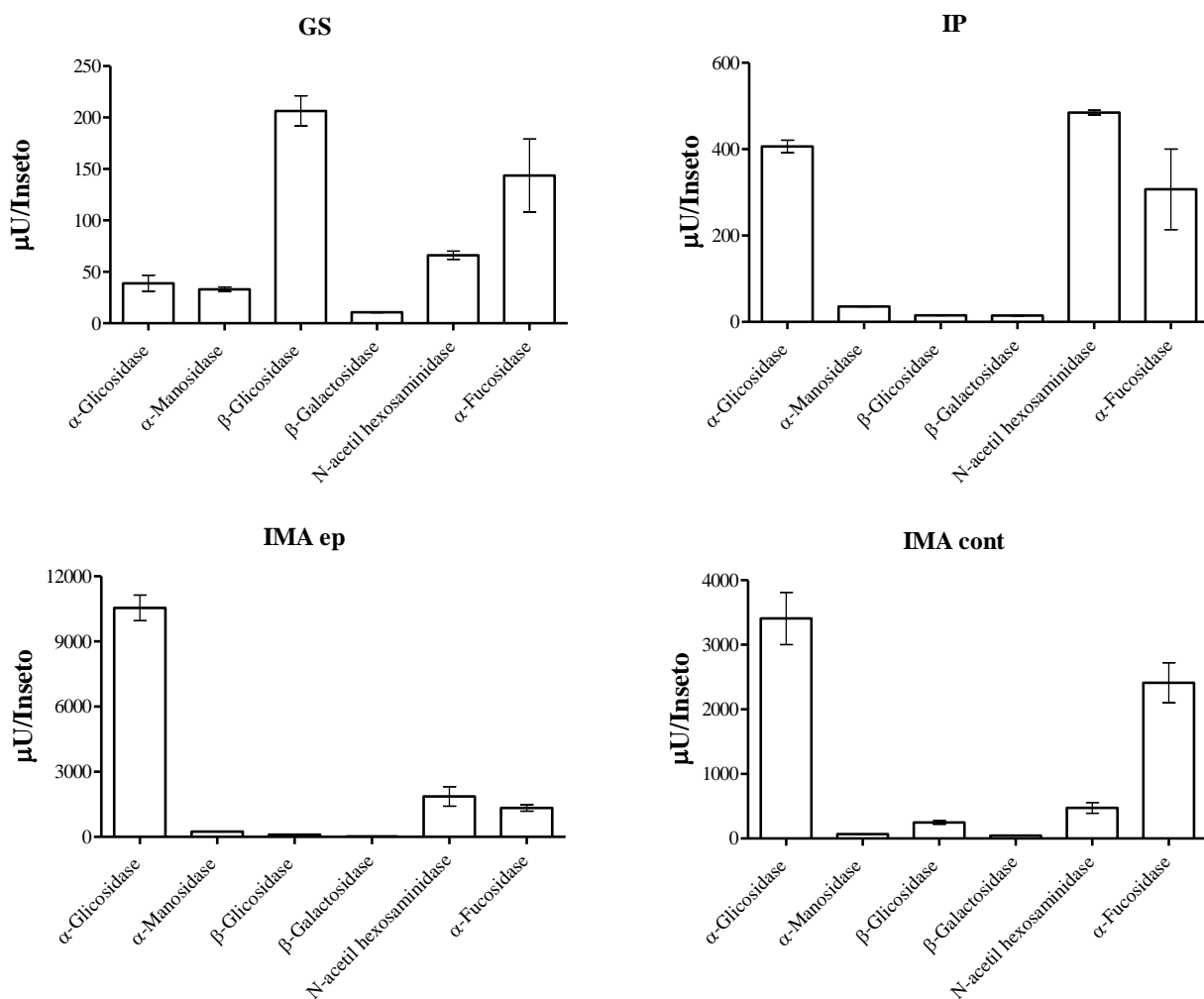


Figura 4.14 - Atividade total de Glicosídeo Hidrolases produzidas pelo inseto durante a digestão, comparando a atividade de cada enzima entre compartimentos. As atividades estão representadas como média de 4 réplicas experimentais (pool de 6 insetos) \pm SEM.

Com isso podemos observar a prevalência de algumas enzimas na fração tecidual (α -glicosidase, α -manosidase e N-acetil hexosaminidase) assim como de outras no conteúdo (β -glicosidase e β -galactosidase). α -fucosidase mostrou-se igualmente particionada nas duas frações intestinais. Além disso, foi possível observar melhor a distribuição dessas enzimas nos diferentes compartimentos do intestino, enquanto β -glicosidase e N-acetil hexosaminidase estão concentradas nas regiões anteriores do intestino, β -galactosidase e α -manosidase predominam nas regiões posteriores. α -glicosidase e α -fucosidase distribuem-se igualmente nas regiões anteriores e posteriores do intestino médio (Figura 4.14).

Com intuito de facilitar a observação da predominância de uma enzima em cada um dos tecidos estudados, os dados de atividade enzimática total das seis glicosidases são também apresentados em função do compartimento estudado, conforme pode ser observado na figura 4.15.



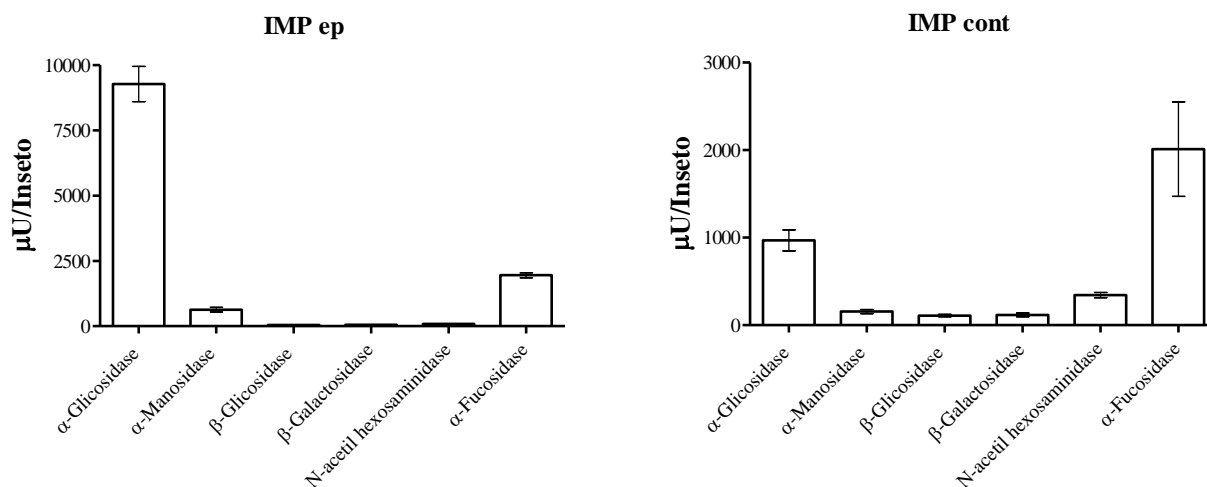


Figura 4.15- Atividade total de glicosidasas produzidas por machos de *R. prolixus* durante um ciclo de digestão, demonstrando a prevalência de diferentes GHs nos tecidos digestivos do inseto. As atividades estão representadas como média de 4 réplicas experimentais (pool de 6 insetos) \pm SEM.

Dessa forma pudemos observar a prevalência de β -glicosidase e α -fucosidase nas glândulas salivares, assim como a prevalência de α -glicosidase e α -fucosidase no intestino médio anterior e posterior. No intestino posterior (reto) α -glicosidase, N-acetilhexosaminidase e α -fucosidase são produzidas em maior quantidade (Figura 4.15).

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida do conteúdo intestinal de *R. prolixus*

Comparando-se os padrões das bandas, podemos observar que as amostras de IMA, apresentaram uma banda mais abundante, a qual também foi identificada nas amostras de sangue, possivelmente correspondente à albumina sérica. Além disso, verificamos que algumas glicoproteínas e proteínas minoritárias da dieta são digeridas no IMA, visto a redução gradual na intensidade de bandas ao longo da digestão (Figuras 4.16).

Através desses resultados nós observamos que em algumas moléculas a digestão da fração glicosilada e da fração proteica ocorre de forma simultânea, enquanto outras glicoproteínas parecem sofrer primeiramente a digestão de açúcares no IMA e a digestão proteica ocorrendo no IMP, visto pelo padrão de bandas encontrados em torno de 70 kDa.

Nas amostras de IMP, foi detectado o surgimento de algumas bandas de tamanho e intensidade diferentes em relação às amostras de sangue e IMA. Essas podem ser atribuídas a produtos gerados ao longo do processo digestivo, deixando nítido que a maior parte da digestão de proteínas ocorre no IMP.

Nós observamos ainda que algumas dessas proteínas são digeridas nas fases iniciais da digestão neste compartimento, visto que algumas destas bandas aparecem apenas 2 e 5 dias após alimentação (Figura 4.16D).

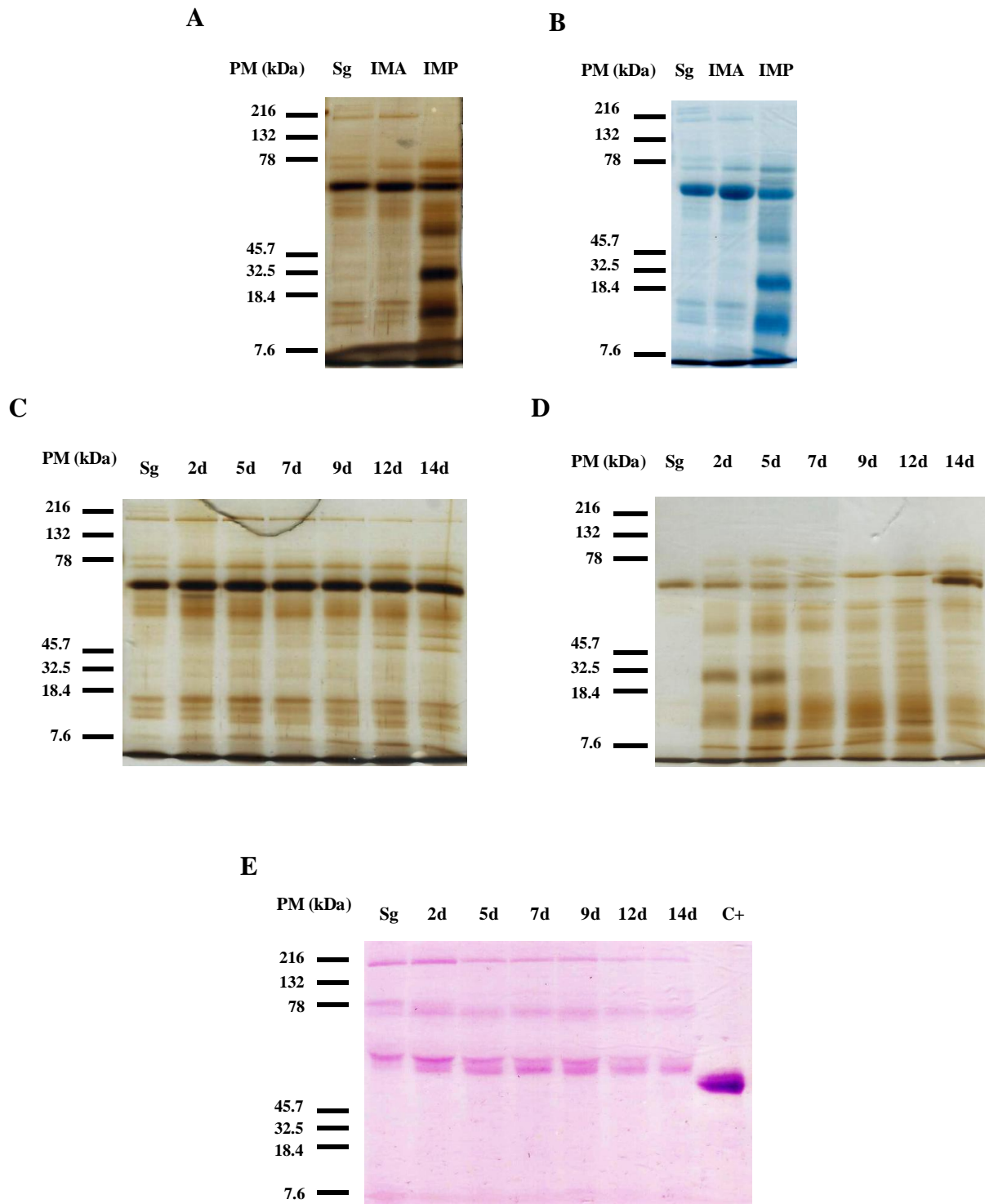


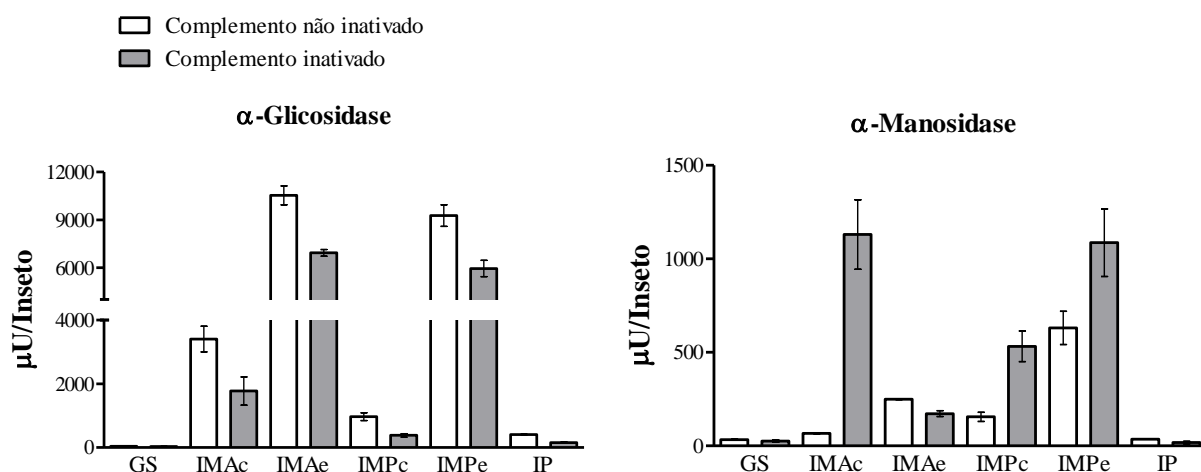
Figura 4.16 - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 10%, em condições desnaturantes, onde PM- Marcador molecular (kDa). **A** – Amostras de sangue e dos conteúdos de IMA e IMP 2 dias após alimentação, utilizando 10 μ g de proteínas totais, corado com nitrato de prata; **B** – Amostras de sangue, IMAcont e IMPcont 2 dias após alimentação, empregando 100 μ g de proteínas totais corado com coomassie blue. **C**- Amostras de sangue obtidas dos

conteúdos de IMA de *R. prolixus* em diferentes dias após alimentação, utilizando 10 µg/prot, corado com nitrato de prata **D** - Amostras de sangue e obtidas dos conteúdos de IMP de *R. prolixus* em diferentes dias após alimentação, utilizando 10 µg /prot, corado com nitrato de prata; **E** - Amostras obtidas do conteúdo de IMA mostrando a presença de glicoproteínas neste compartimento ao longo da digestão do inseto, empregando 500 µg de proteínas totais. Sg - Sangue usado para alimentação. IMAc e IMPc – Conteúdos do intestino médio anterior e posterior respectivamente. 2d - 14d: amostras obtidas entre 2 e 14 dias após a alimentação sanguínea. C+: Controle positivo de proteína glicosilada.

4.4. Atividade de GHs em *R. prolixus* alimentados com sangue submetido à inativação do sistema complemento

Após realizar a caracterização do padrão tecidual e perfil de atividade de GHs ao longo da digestão do inseto, nós realizamos ensaios enzimáticos em insetos alimentados com sangue previamente submetido ao processo de inativação do sistema complemento. Podemos observar claramente alterações na atividade de algumas das glicosidases estudadas em decorrência desta modificação na dieta do inseto (Figura 4.17).

Tais observações são de grande relevância, uma vez que este procedimento é uma etapa necessária para garantir o sucesso na realização de infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. Além disso, é um controle imprescindível para observação de alterações promovidas pela presença do parasito, conforme será demonstrado nos tópicos seguintes deste trabalho.



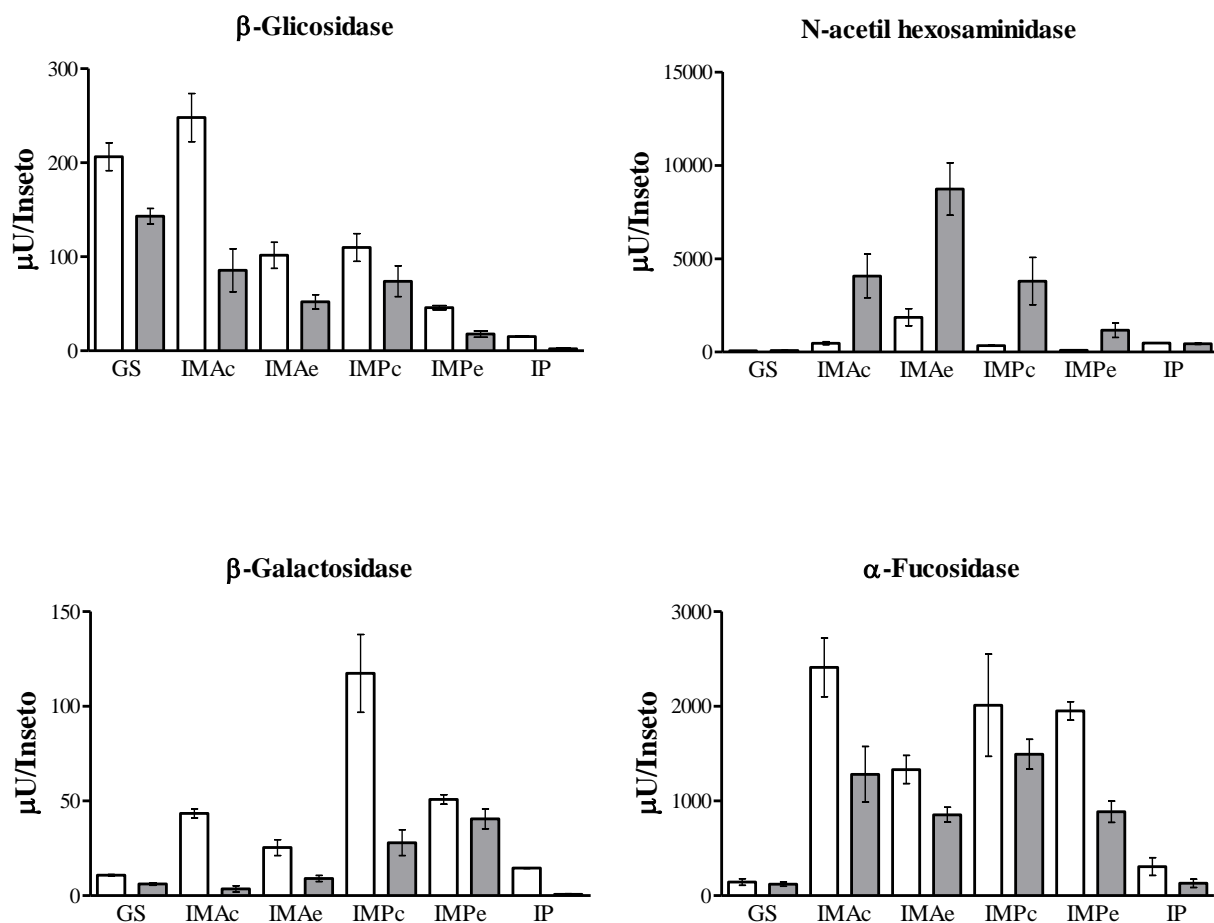


Figura 4.17 – Somatória das atividades de Glicosídeo Hidrolases produzidas pelo inseto ao longo da digestão, após alimentação com sangue submetido à inativação do sistema complemento. Como controle, outro grupo de insetos mantidos nas mesmas condições que o grupo experimental foi alimentado com o mesmo sangue sem a realização da inativação do sistema complemento. As atividades estão representadas como média de 4 réplicas experimentais (pool de 6 insetos) \pm SEM.

4.5. Infecções com *Trypanosoma cruzi*

4.5.1. Atividade de GHs no parasito

Para saber os efeitos que a infecção com *T. cruzi* causa nas atividades de glicosidases do vetor, foi necessário verificar se o parasito apresenta atividades enzimáticas que possam interferir nos ensaios. Uma busca nos genomas de *T. cruzi* e *R. prolixus*, baseados nos domínios PFAM das famílias de GHs, revelou que o *T. cruzi* possui poucos genes de GHs descritos (tabela 4.4), com apenas um representante das GHs da família 38 (α -Manosidase).

Tabela 4.4. Frequência de genes de glicosidases nos genomas de *Rhodnius prolixus* e *Trypanosoma cruzi* (Dados adquiridos em Ribeiro *et al.*, 2014; CAZY, 2015).

E.C.	Enzima	Familia (GH)	<i>R. prolixus</i>	<i>T. cruzi</i>
3.2.1.20	α -glicosidase	4	-	-
		13	3	-
		31	3	-
		63	-	-
		97	-	-
3.2.1.21	β -glicosidase	122	-	-
		1	5	-
		3	-	-
		5	2	-
		9	-	-
3.2.1.23	β -galactosidase	30	-	-
		116	-	-
		1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
3.2.1.24	α -manosidase	35	2	-
		42	1	-
		50	-	-
		59	-	-
		31	-	-
3.2.1.51	α -fucosidase	38	7	1
3.2.1.52	β -N-acetil hexosaminidase	92	-	-
		29	1	-
		3	-	-
3.2.1.113	α -manosidase	5	-	-
		18	-	-
		20	6	-
		84	-	-
		47	2	-

Uma vez que o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* apresenta várias lacunas, além das análises *in silico* optamos por realizar ensaios enzimáticos a fim de analisar se o parasito apresenta atividade destas enzimas. Para isso utilizamos duas cepas de *T. cruzi*, DM28c (TcI) e cepa Y (TcII), e avaliamos a atividade de enzimas secretadas e na fração celular, nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica em pHs 7,2 e 4,5.

Ensaio realizados em pH 4,5 (pH ótimo das glicosidases intestinais de *R. prolixus*) revelaram que *T. cruzi* das cepas DM28c e cepa Y não possuem atividades detectáveis de α -glicosidase secretada (figura 4.18), tanto nas formas epimastigota como tripomastigota metacíclica. O mesmo resultado foi observado para possíveis atividades secretadas em pH 7,2

(figura 4.19). Contudo, ensaios realizados em pH 7,2 revelaram atividades significativas na fração intracelular nas duas formas e cepas do parasito (figura 4.21).

Para α -Manosidase, foi observado, em pH 4,5, atividade na fração celular de formas epimastigotas da cepa Y, e uma atividade residual na forma tripomastigota das cepas DM28c e Y (figura 4.20B). Não foram detectadas atividades de α -Manosidase secretadas em ambos pHs ou em qualquer cepa. Também não foram detectadas em nenhuma das formas, cepas, frações ou pHs ensaiados, atividades de β -Glicosidase, N-acetil hexosaminidase, β -Galactosidase e α -Fucosidase (dados não apresentados).

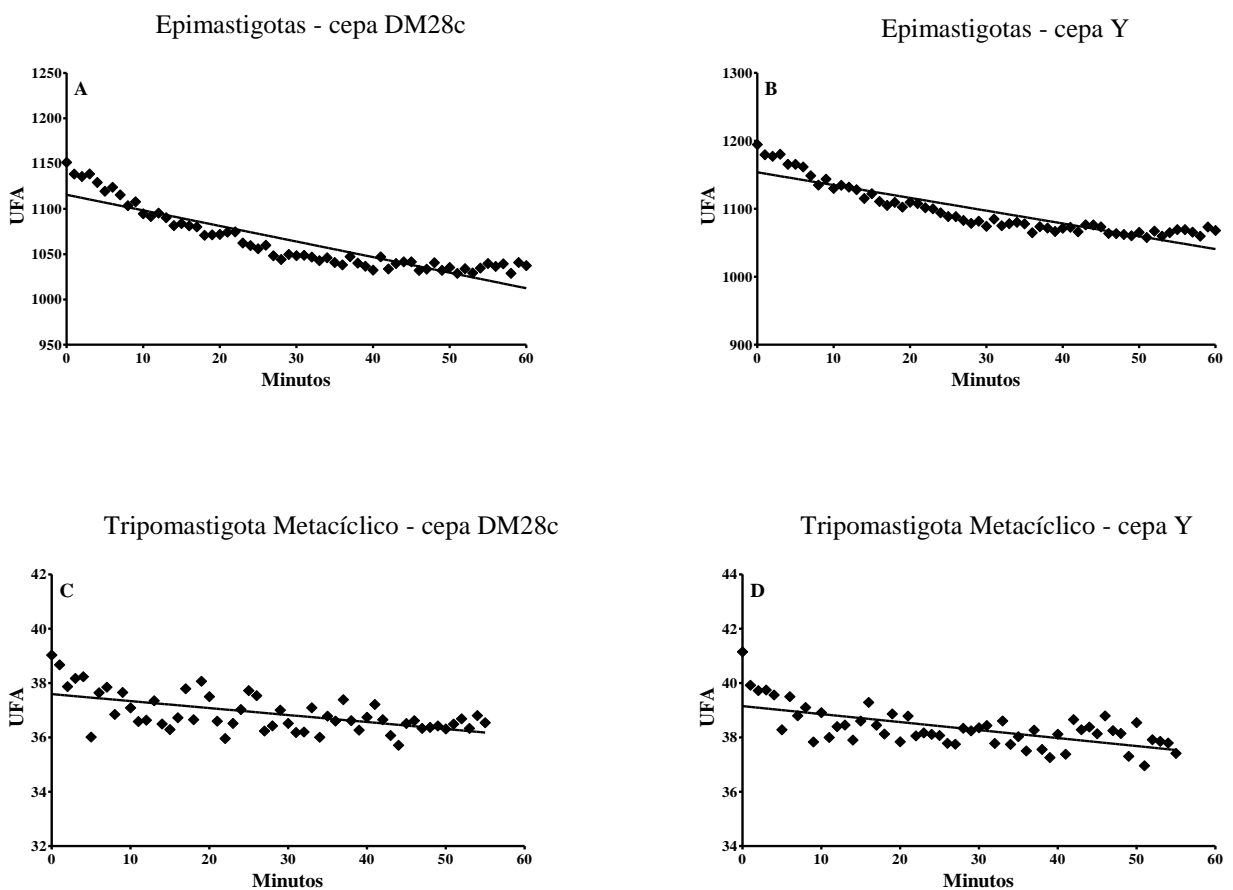


Figura 4.18 - Perfil de Atividade Enzimática de GHs secretadas de *Trypanosoma cruzi* em pH 4,5. **A:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa DM28c. **B:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa Y. **C:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa DM28c. **D:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa Y.

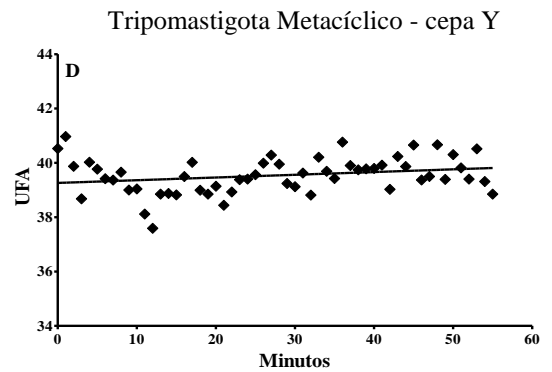
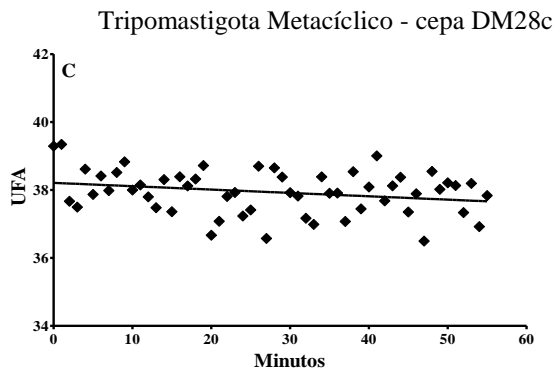
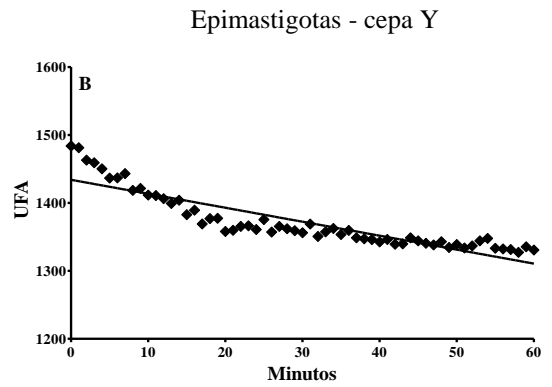
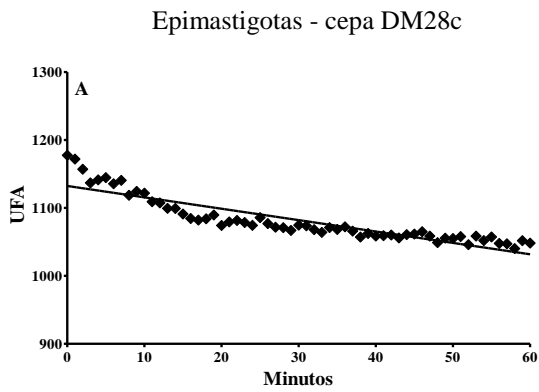
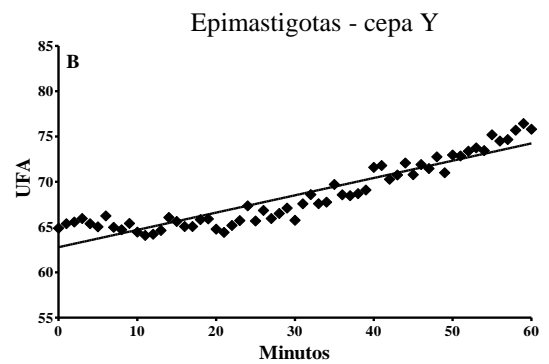
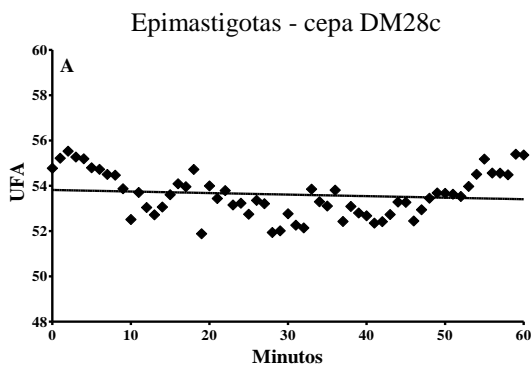


Figura 4.19 - Perfil de Atividade Enzimática de GHs secretadas de *Trypanosoma cruzi* em pH 7,2. **A:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa DM28c. **B:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa Y. **C:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa DM28c. **D:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa Y.



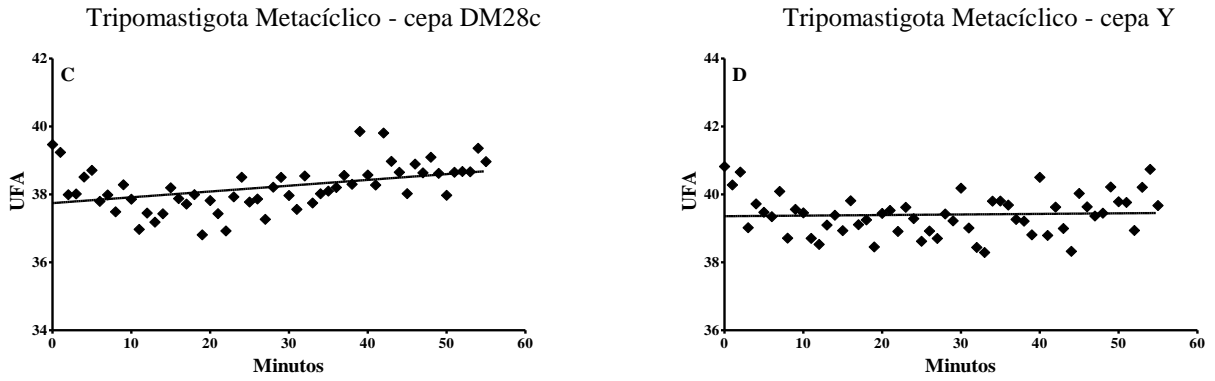


Figura 4.20 - Perfil de Atividade Enzimática de GHs na **fração celular** de *Trypanosoma cruzi* em **pH 4,5**. **A:** α -manosidase de formas epimastigotas da cepa DM28c. **B:** α -manosidase de formas epimastigotas da cepa Y. **C:** α -manosidase de formas tripomastigotas da cepa DM28c. **D:** α -manosidase de formas tripomastigotas da cepa Y.

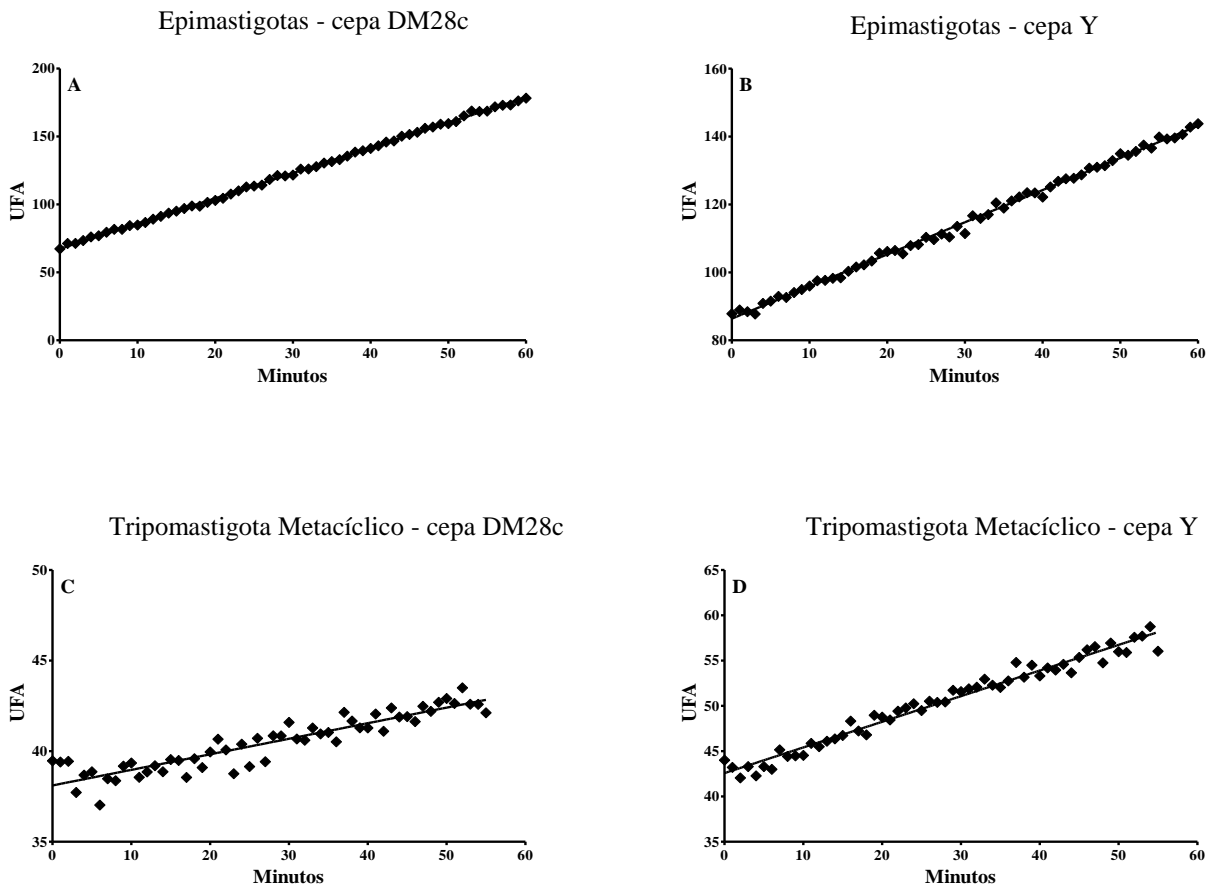


Figura 4.21 - Perfil de Atividade Enzimática de GHs na **fração celular** de *Trypanosoma cruzi* em **pH 7,2**. **A:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa DM28c. **B:** α -glicosidase de formas epimastigotas da cepa Y. **C:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa DM28c. **D:** α -glicosidase de formas tripomastigotas da cepa Y.

4.5.2. *Modulação da atividade de GHs em insetos infectados com Trypanosoma cruzi*

Utilizando a metodologia descrita no item 3.3, os insetos foram infectados e dissecados ao longo da digestão do sangue para o acompanhamento das atividades enzimáticas. As atividades foram ensaiadas em jejum, nas etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias) da digestão do inseto.

Os resultados são apresentados nas figuras 4.22 a 4.27 onde podemos observar que diferentes enzimas são moduladas pela infecção em compartimentos distintos de acordo com os estágios da digestão do triatomíneo. Mais especificamente, observamos uma modulação positiva de α -glicosidase na fração tecidual do intestino médio anterior na fase final da digestão (Figura 4.22), redução da atividade de β -glicosidase nas glândulas salivares na fase inicial (Figura 4.24), aumento de β -galactosidase no intestino posterior na fase final da digestão (Figura 4.25) e redução de α -fucosidase na fração tecidual do intestino médio anterior na fase intermediária (Figura 4.27). Não observamos alterações significativas nas atividades intestinais de α -manosidase (Figura 4.23) e N-acetil hexosaminidase (Figura 4.26) após exposição de *R. prolixus* a *T. cruzi*.

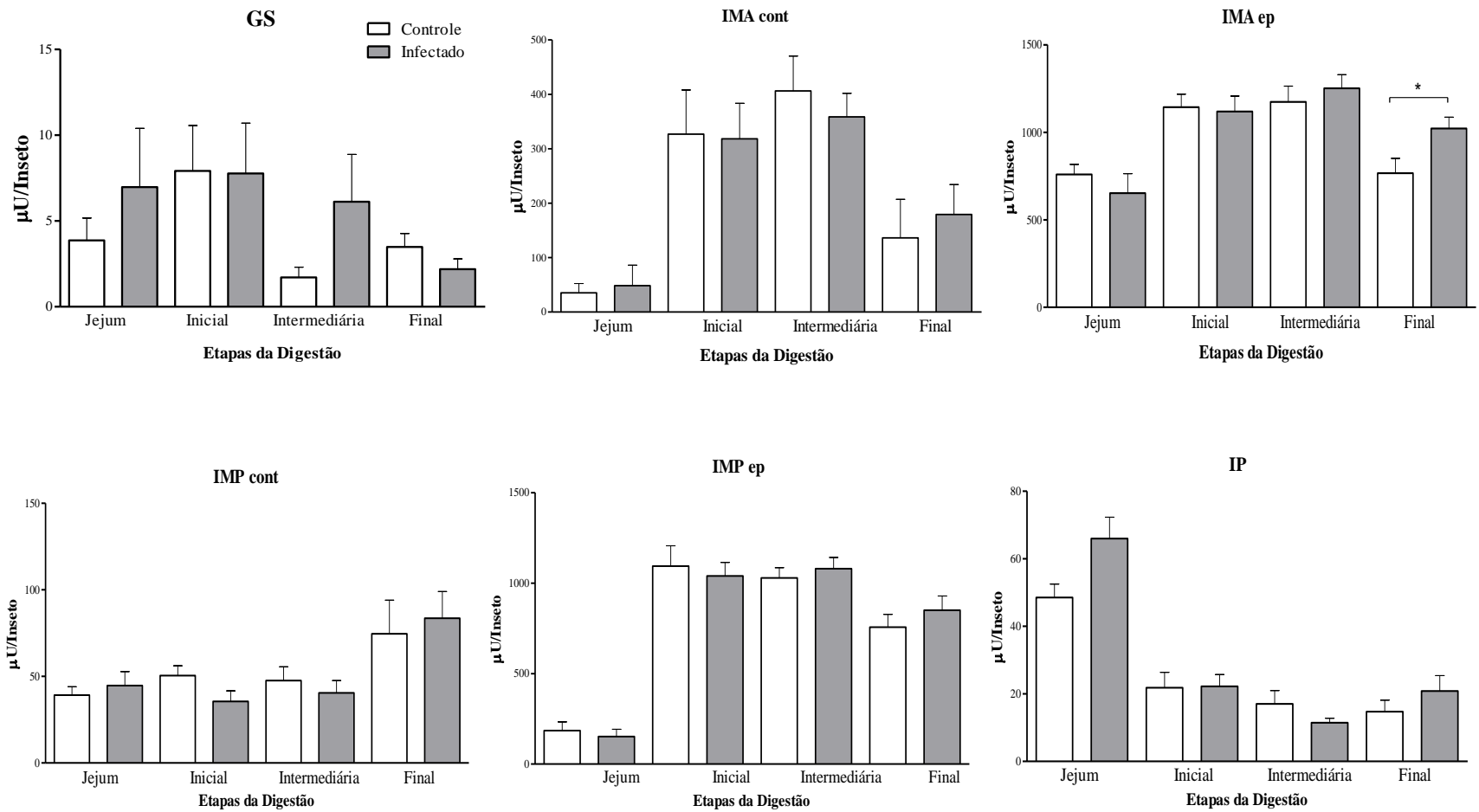


Figura 4.22- Perfil de atividade de α -Glicosidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

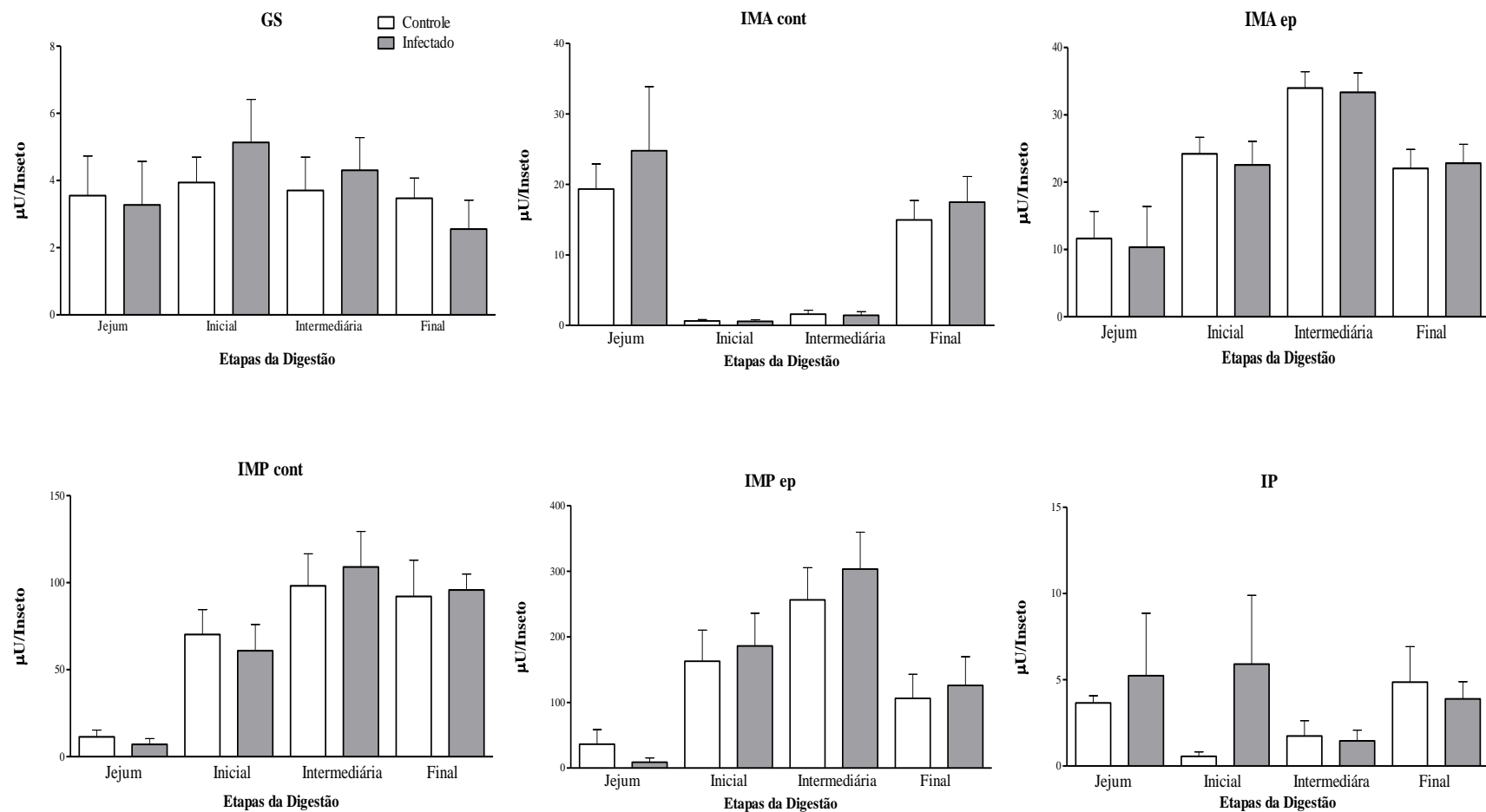


Figura 4.23 - Perfil de atividade de α -Manosidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

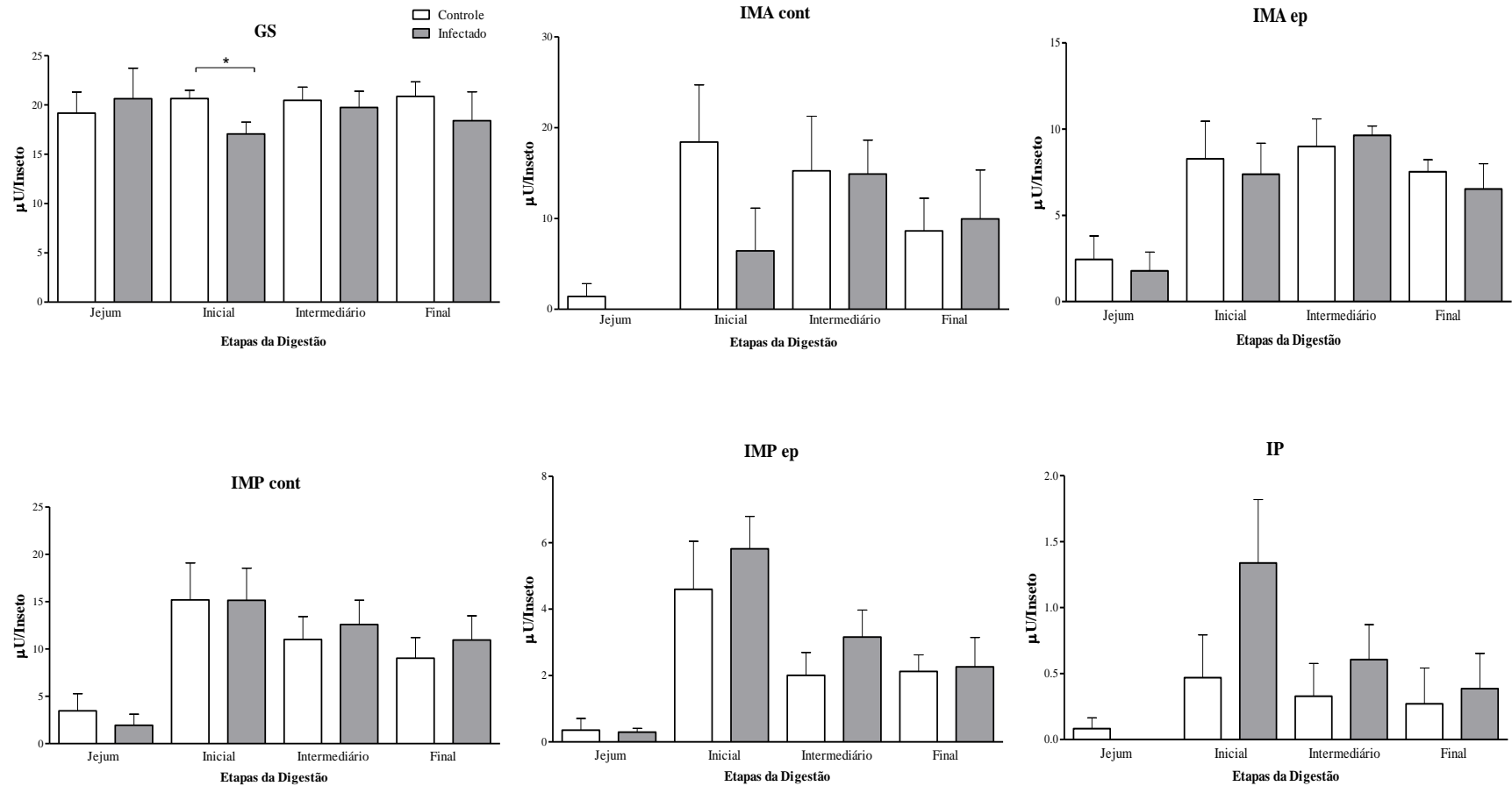


Figura 4.24 -Perfil de atividade de β -Glicosidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

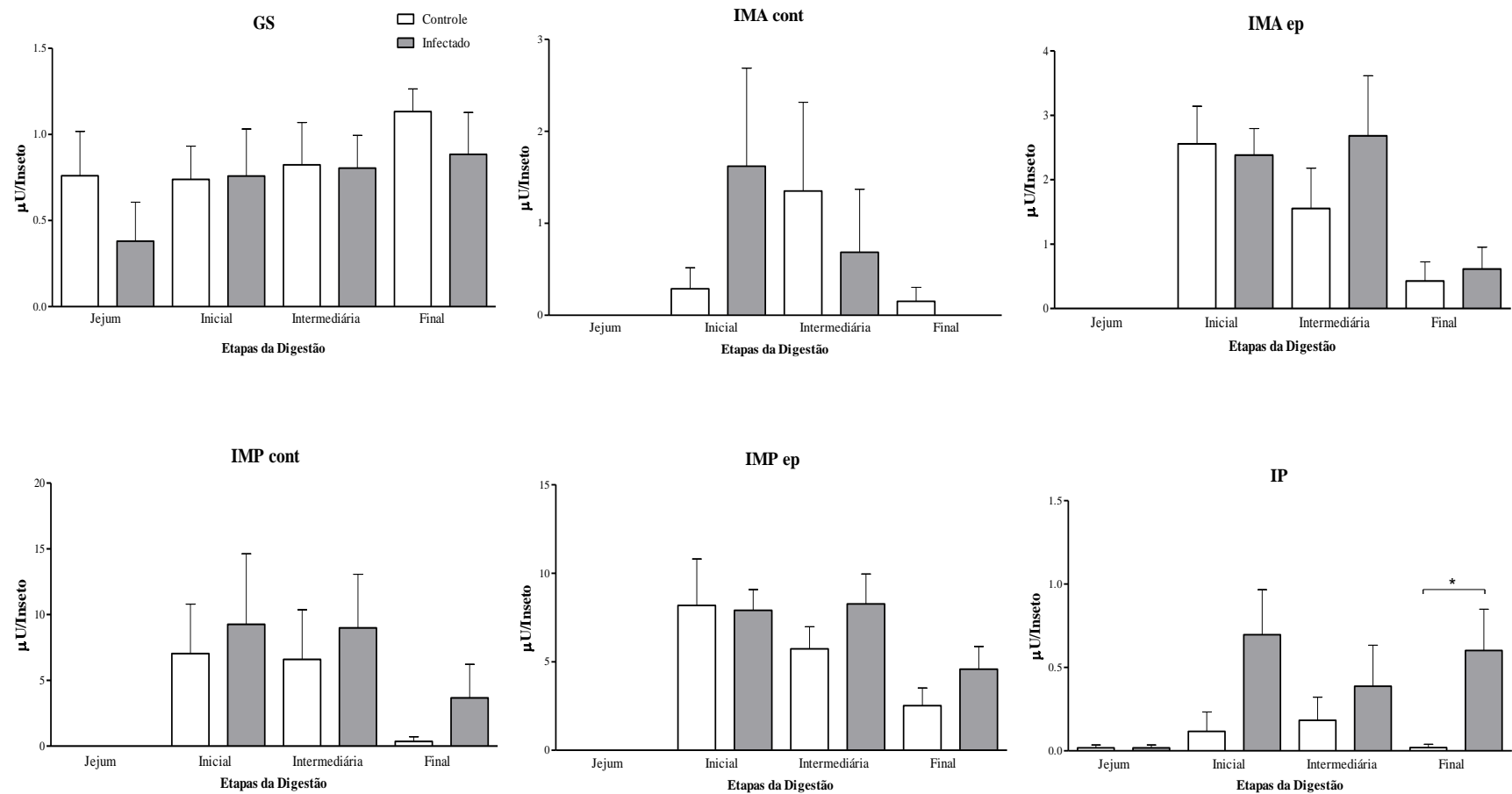


Figura 4.25- Perfil de atividade de β -Galactosidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

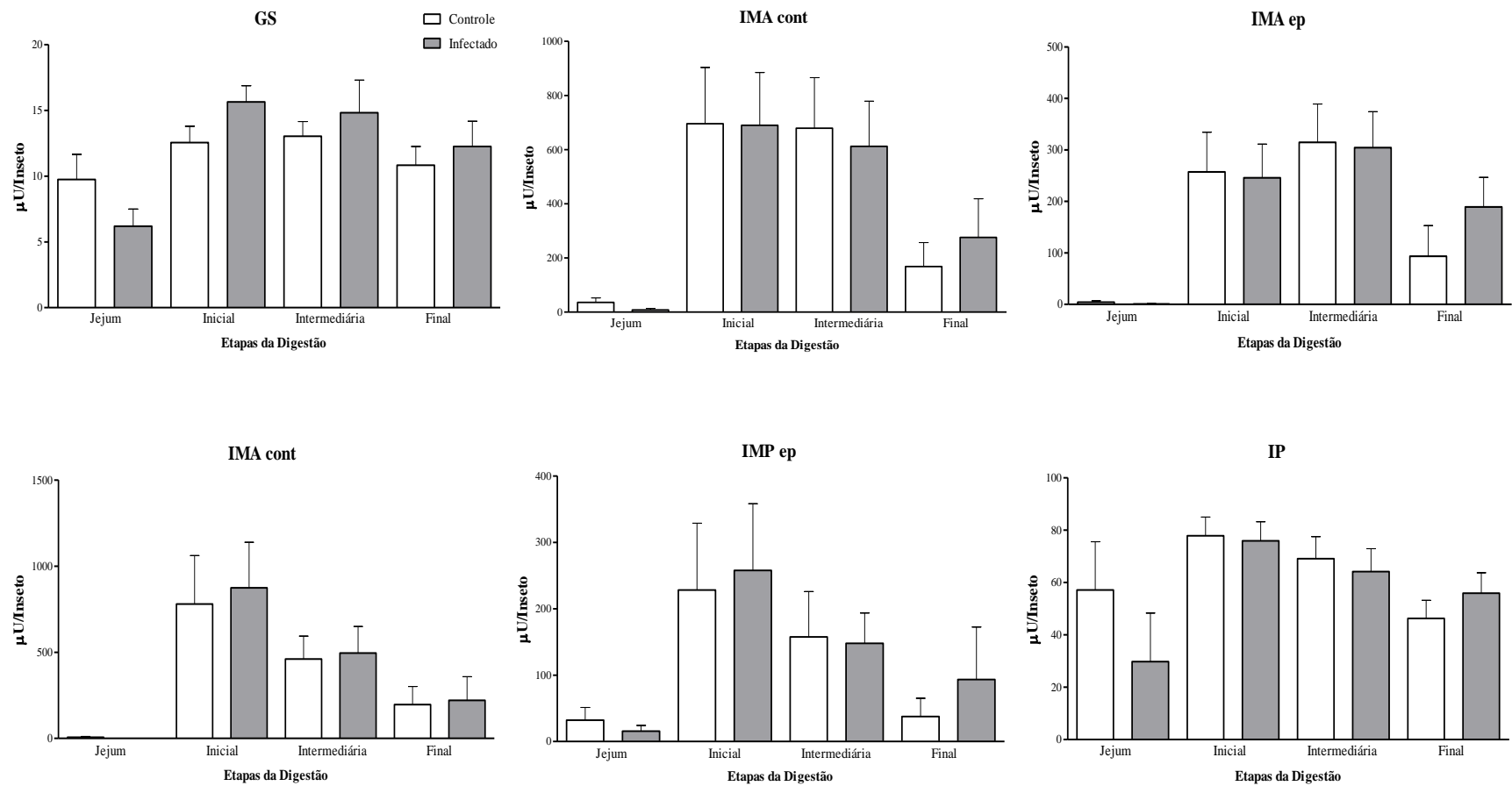


Figura 4.26 - Perfil de atividade de N-acetil hexosaminidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

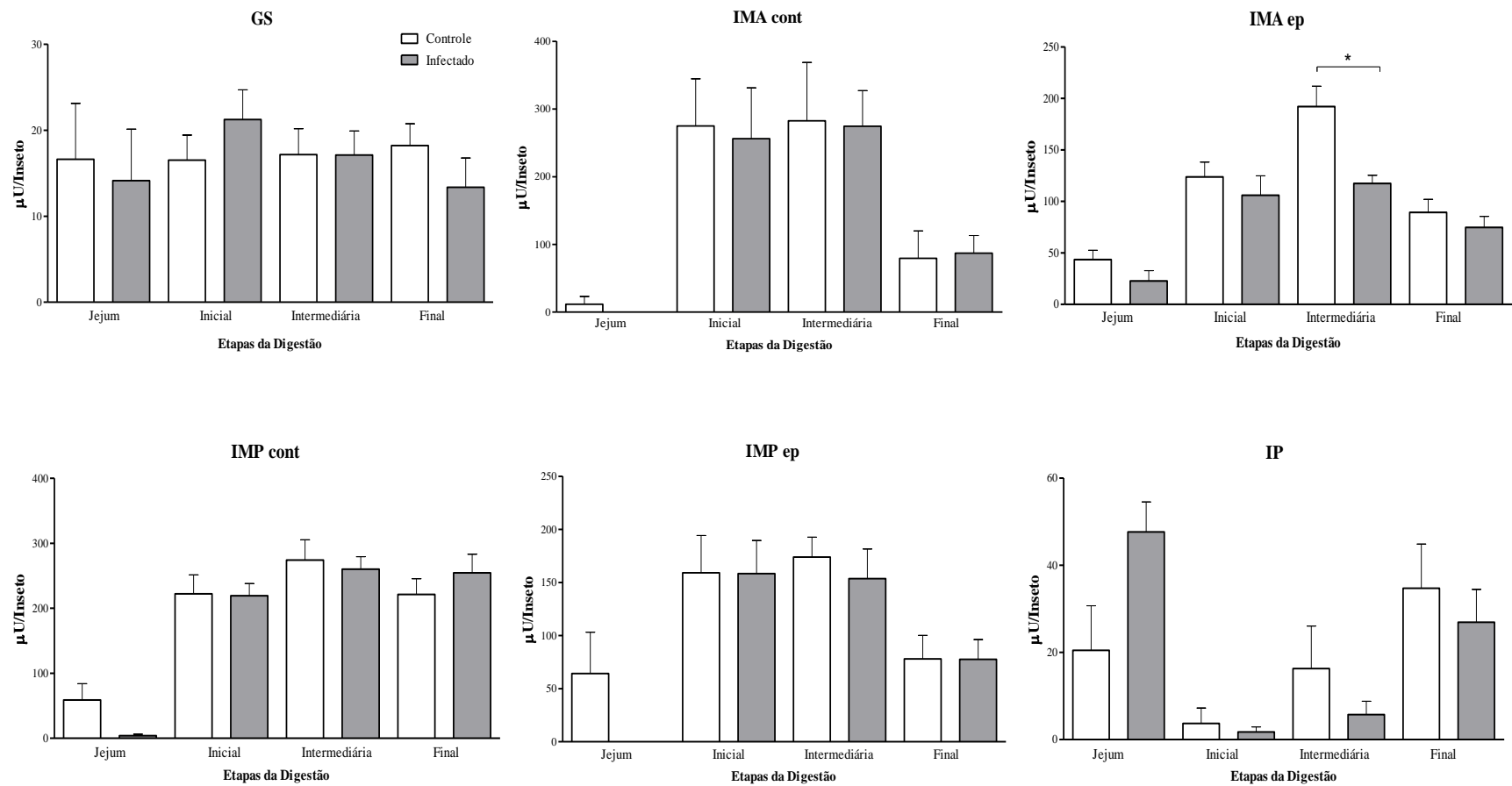


Figura 4.27 - Perfil de atividade de α -Fucosidase de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* em diferentes etapas da digestão. Etapas iniciais (2-5 dias), intermediárias (7-9 dias) e finais (12-14 dias).

4.6. Análises de Expressão Gênica

4.6.1. PCR semi-quantitativo

No presente trabalho 33 genes tiveram seus padrões de expressão analisados em diferentes compartimentos do aparelho digestivo de *R. prolixus*, empregando *pool* de amostras obtidas nos diferentes dias da digestão do inseto.

Inicialmente, os níveis de expressão foram analisados usando a técnica de RT-PCR semi-quantitativo, obtendo-se os resultados apresentados na figura 4.48. Alguns genes apresentaram-se igualmente expressos em todos os compartimentos (GS, IMA, IMP e IP), como observado para RPRC001346, RPRC001875, RPRC013352, RPRC003368, RPRC011517, RPRC011537 e RPRC008468.

Outros genes apresentaram uma expressão preferencial no intestino médio, como os genes RPRC009516, RPRC0012570, RPRC0014288, RPRC006918, RPRC012963, RPRC010194, RPRC004672, RPRC007504, RPRC002733. Outros ainda, não se mostraram expressos em nenhuma região do intestino como pode ser visto nos ensaios realizados com RPRC009530 e RPRC0015451, RPRC006985, RPRC006247, RPRC008125, RPRC006056, RPRC007185, RPRC000597 e RPRC000924.

Um outro padrão observado foi o de genes bastante expressos na GS, e no intestino médio anterior com pouca expressão no intestino médio posterior. Nessa categoria encontram-se os genes RPRC009519, RPRC003336, RPRC013370, RPRC011133, RPRC003657, RPRC004638 e RPRC012647.

Descrição	Família	Identificador	Tecido			
			GS	IMA	IMP	IP
β -Glicosidase	GH1	RPRC009516				
		RPRC009519				
		RPRC009530				
		RPRC015451				
		RPRC006985				
α -Glicosidase	GH13	RPRC013046				
		RPRC006918				
		RPRC012963				
		RPRC012570				
		RPRC006247				
		RPRC010194				
N-acetil hexosaminidase	GH20	RPRC003336				
		RPRC009566				
		RPRC004672				
		RPRC008125				
		RPRC006056				
α -Fucosidase	GH29	RPRC001875				
		RPRC013352				
α -Glicosidase	GH31	RPRC007504				
		RPRC013370				
		RPRC014288				
		RPRC003368				
β -Galactosidase	GH35	RPRC002733				
		RPRC011517				
α -Manosidase	GH38	RPRC011537				
		RPRC007185				
		RPRC011133				
		RPRC000597				
		RPRC003657				
Trealase	GH63	RPRC000924				
		RPRC004638				
		RPRC008468				
Genes Constitutivos	TUBULINA	RPRC012647				
		GAPDH				
Genes Constitutivos	18S					
Controle	-					

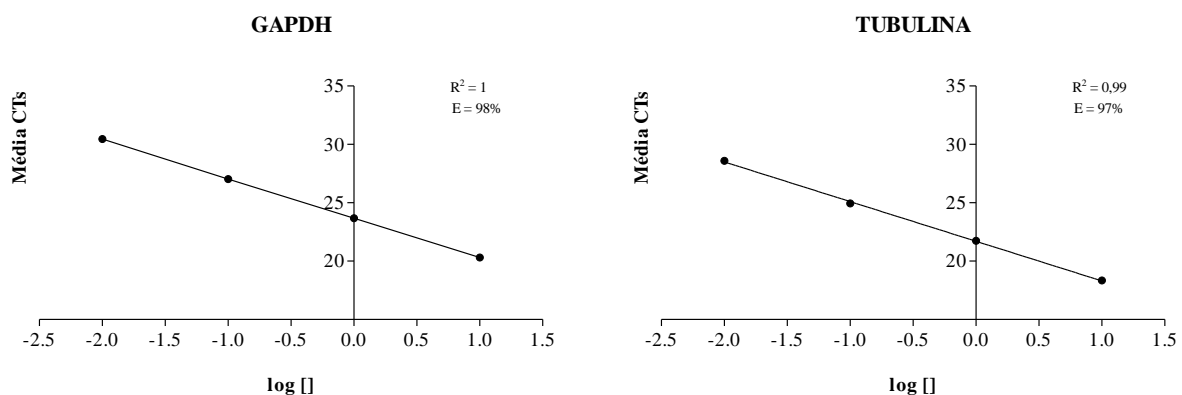
Figura 4.48 – Avaliação da expressão gênica de Glicosídeo Hidrolases em diferentes compartimentos do tubo digestivo de *R. prolixus* machos. Resultados representativos de 2 réplicas experimentais utilizando pool de amostras obtidas nos diferentes dias da digestão, empregando 3 insetos em cada replicata. As análises foram realizadas através da técnica de RT-PCR. RPRC: Identificadores dos genes correspondentes de *R. prolixus* na base de dados Vector base. GH: glicosídeo hidrolase. GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase. 18S: proteína ribossomal 18S. GS: glândulas salivares. IMA: intestino médio anterior. IMP: intestino médio posterior. IP: intestino posterior.

4.6.2. PCR quantitativo

A escolha dos genes a terem seu padrão de expressão estudada por PCR em tempo real (qPCR) foi baseado na indução das atividades enzimáticas ao longo da digestão nos compartimentos intestinais do inseto, e abrangência do maior número de genes dentro de uma mesma família de GHs. Assim sendo, escolhemos para melhor caracterização os genes RPRC009516 (β -Glicosidase - família GH1), RPRC009519 (β -Glicosidase - família GH1), RPRC007504 (α -Fucosidase - família GH29), RPRC011517 (β -Galactosidase - família GH35) e RPRC011537 (β -Galactosidase - família GH35).

4.6.3. Eficiência dos primers

Inicialmente testamos os primers e as concentrações de cDNA variando estas entre 0,01 a 10 ng/ μ L. A fórmula aritmética utilizada para o cálculo da eficiência foi $(10^{(-1/\text{slope})}-1)*100$, apresentando uma eficiência de 100% quando o slope for igual a -3,32. Sendo que para utilizar o cálculo de CT comparativo, as diferenças entre as eficiências não podem ser maiores que 10 % (Livak e Schmittgen, 2001).



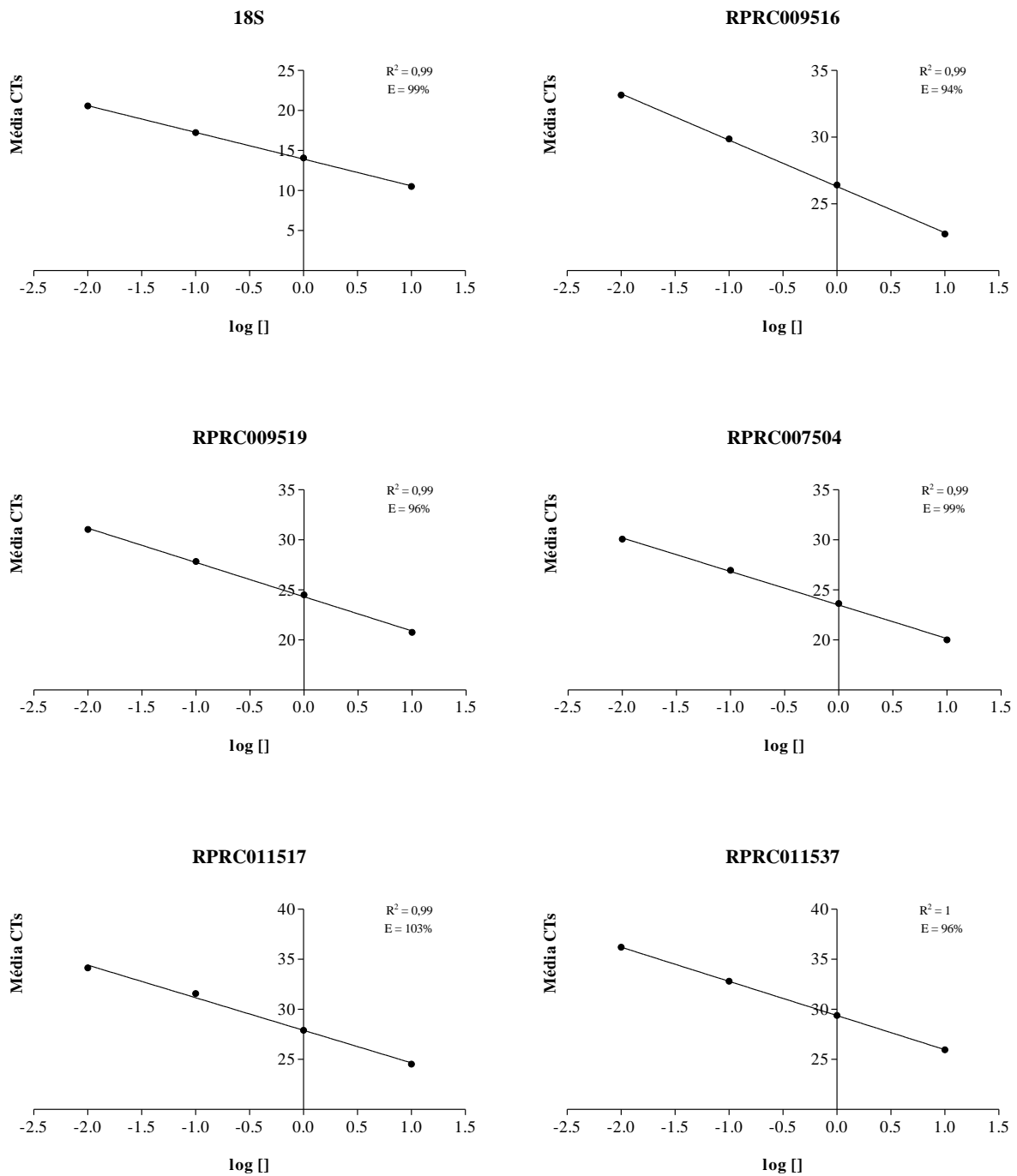


Figura 4.49 - Curva de eficiência da amplificação dos alvos utilizados para realização de RT-qPCR, obtida da relação entre CT e diferentes concentrações de amostras de cDNA.

Os dados de eficiência obtidos (Figura 4.49) fundamentaram a escolha da concentração de 0,5 ng/ μ L de cDNA para realização das reações de qPCR para todas as amostras testadas.

Utilizando-se essas condições, determinamos o padrão de expressão dos 5 genes escolhidos em diferentes compartimentos do intestino de *Rhodnius prolixus* (machos adultos,

pools de vários dias após alimentação sanguínea). Os dados obtidos sugerem que genes da mesma família, ou classe funcional como GH1, ou GH35, têm padrões de expressão mais parecidos entre si do que com genes de outras classes expressos no mesmo compartimento (GS, IMA, IMP e IP) (Figura 4.50).

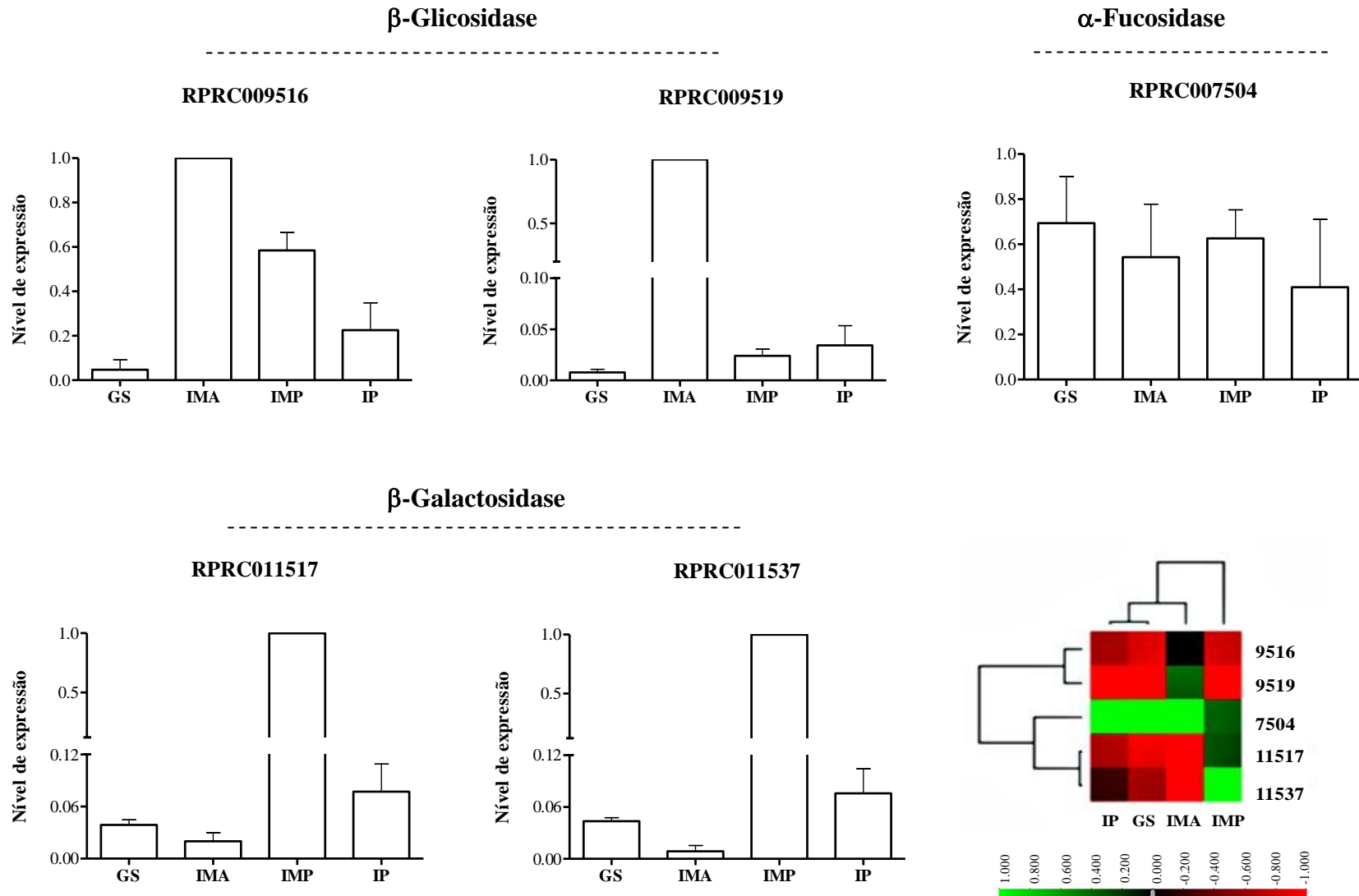


Figura 4.50 - Nível de expressão gênica nas glândulas salivares, intestino médio anterior, intestino médio posterior e intestino posterior, derivados das análises de RT-qPCR normalizados com GAPDH, 18S e Tubulina para diferentes genes de GHs. Análises contidas no heatmap mostram o agrupamento de genes de acordo com os níveis de expressão em cada tecido. Verde- mais expresso, vermelho- menos expresso. Os números na escala do heatmap (-1 a 1) referem-se a valores de expressão relativa normalizados pelo máximo.

Com os mesmos procedimentos foram determinadas as expressões relativas de 4 dos genes escolhidos (RPRC009516, RPRC007504, RPRC011517 e RPRC011537) no intestino médio posterior ao longo da digestão do sangue, em insetos em jejum e em diferentes dias após alimentação (Figura 4.51). O gene RPRC009519 é majoritariamente expresso no IMA e não foi analisado.

De uma forma geral, o gene RPRC009516 mostra um padrão oscilante ao longo dos dias, com picos de expressão no 2º e 9º após alimentação. O gene RPRC007504 parece apresentar uma supressão no 7º dia, enquanto que os outros 2 genes caracterizados (RPRC011517 e RPRC011537) mostram um pico máximo de expressão 9 dias após alimentação (Figura 4.51).

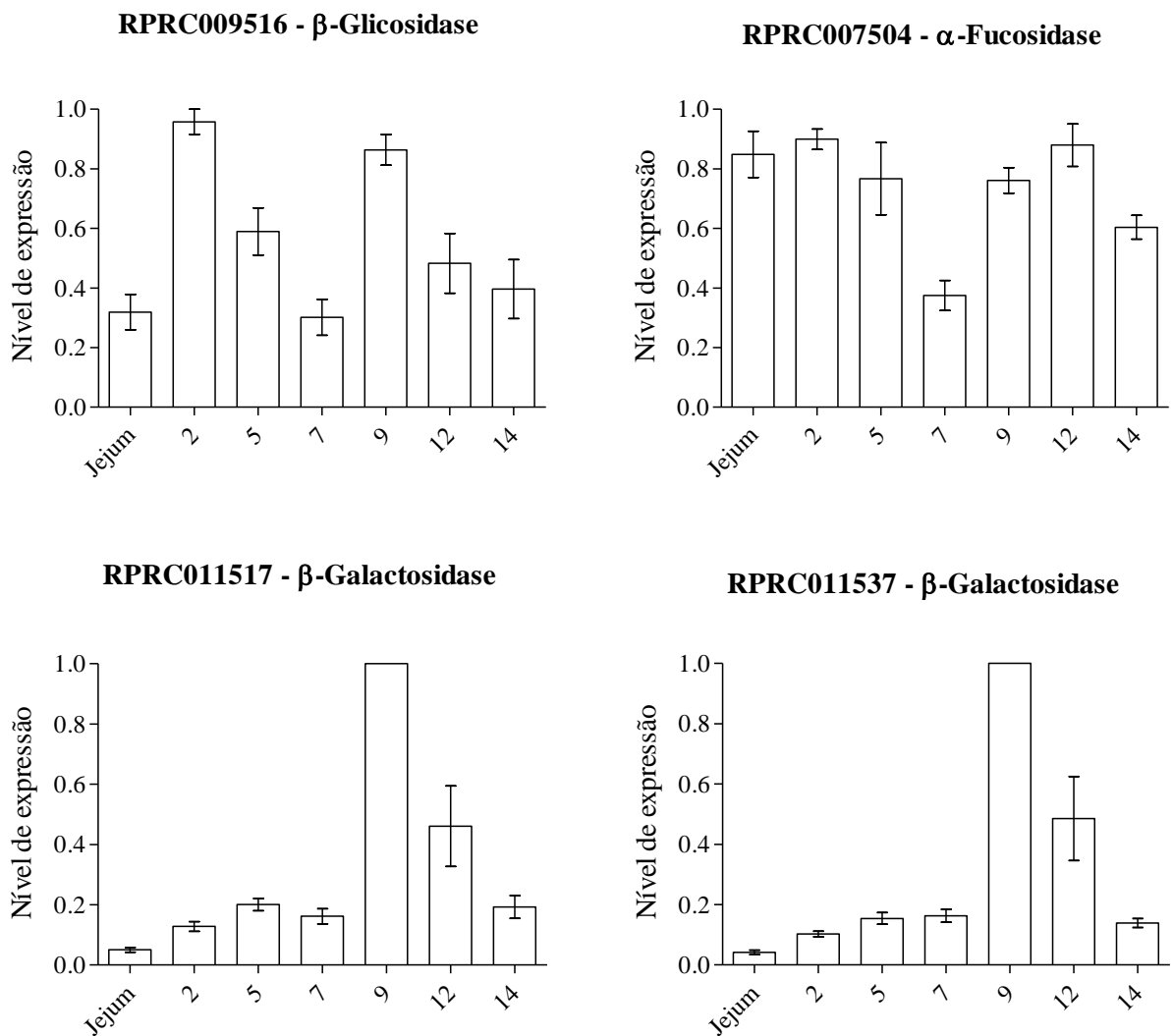


Figura 4.51 - Acompanhamento temporal da expressão gênica ao longo da digestão do inseto em amostras de intestino médio posterior derivado das análises de RT-qPCR normalizados com GAPDH, 18S e Tubulina.

4.6.4. Silenciamento por Injeção de dsRNA (RNAi)

Através da técnica de RT-PCR avaliamos a expressão do gene de α -fucosidase (RPRC007504) após a injeção de dsRNA correspondente a esse gene na hemocele de machos adultos de *R. prolixus* em jejum. A extração de RNA e síntese de cDNA foi realizada conforme descrito no item 3.10, a fim de obter concentrações mais elevadas de molde, para este ensaio foi utilizado todo aparelho digestivo de três insetos, verificando o resultado do silenciamento de maneira individual.

Os insetos foram dissecados 48 horas após as injeções de dsRNA e realizada a RT-PCR. A figura 4.52A mostra claramente uma menor intensidade das bandas nos insetos experimentais (ds7504), quando comparados com os insetos controle, que receberam o dsGFP. Estes dados foram analisados através do software *Image J*, onde a normalização dos dados foi realizada através da relação entre o gene de interesse e o gene constitutivo, GAPDH (Figura 4.52B).

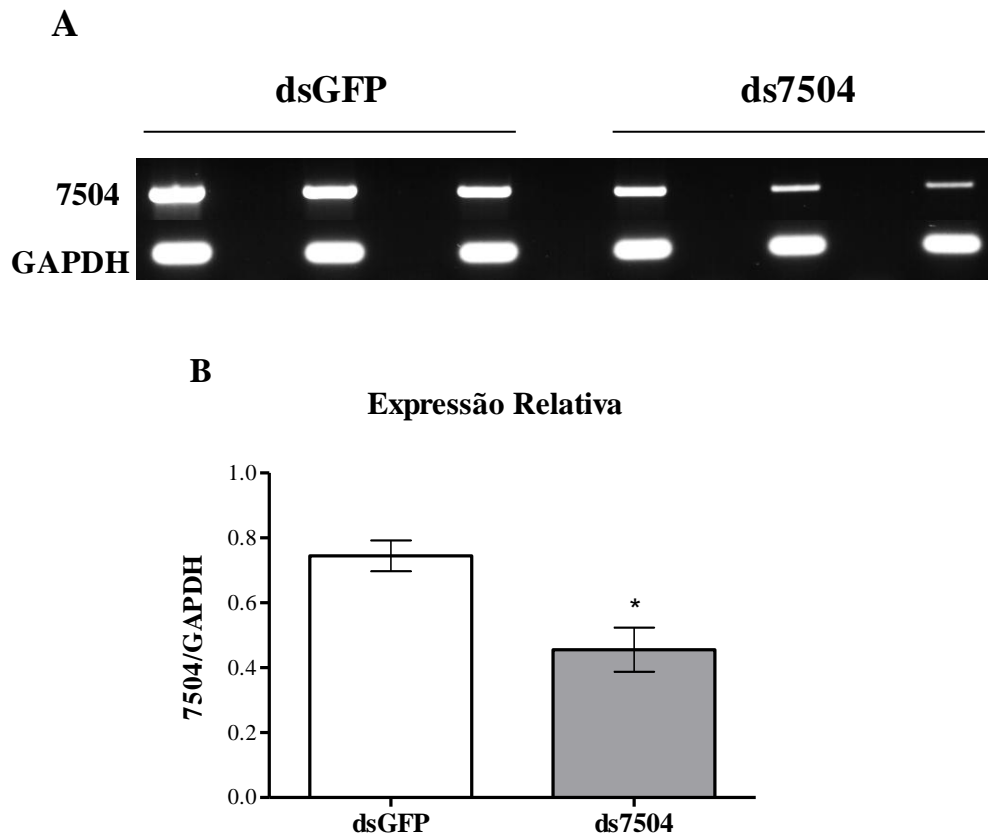


Figura 4.52 - Expressão relativa do gene RPRC007504 (α -fucosidase) acompanhada por RT-PCR após injeção de dsRNA. Injeções de dsGFP foram administradas como controle. **A**- Gel de agarose 2% (p/v) com brometo de etídio mostrando a intensidade das bandas. **B**- Densitometria de bandas apresentadas no gel de agarose realizadas através do software *Image J*.

Durante o intervalo de 48 horas, período entre a injeção de dsRNA e dissecação, não foi observada nenhuma alteração fenotípica macroscópica (p.ex. mortalidade).

Após a confirmação do silenciamento, a atividade de α -fucosidase foi avaliada em diferentes tecidos do inseto (Figura 4.53). Estes resultados mostram que o efeito do silenciamento foi mais pronunciado no IMAep onde observamos uma redução significativa na atividade desta glicosidase neste compartimento.

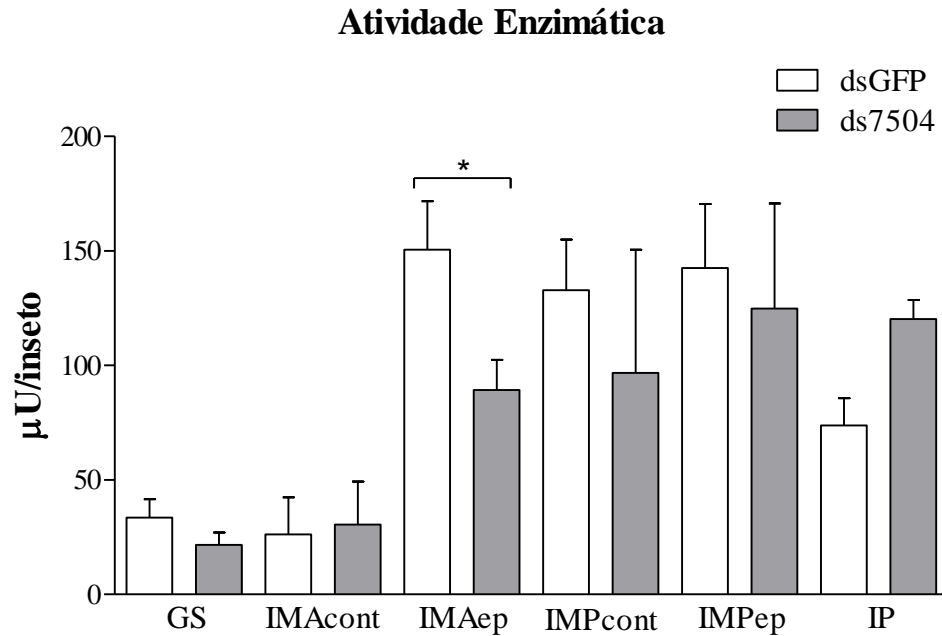


Figura 4.53 – Atividade enzimática de α -fucosidase avaliada nos diferentes compartimentos do sistema digestivo de insetos submetidos a injeção de dsRNA.

5. DISCUSSÃO

Nos métodos tradicionais empregados em ensaios de determinação da atividade de glicosidases utilizando substratos sintéticos (como derivados de nitrofenil ou metilumbeliferil) uma solução alcalina é adicionada com intuito de interromper a reação e aumentar a resposta (Scopes, 2002). Assim nós propusemos como alternativa o desenvolvimento de uma nova metodologia, com realização de ensaios contínuos.

Antes de iniciar os ensaios de atividade enzimática fez-se necessária a determinação dos volumes de amostras a serem utilizados para cada uma das enzimas, uma vez que a clivagem do substrato pode gerar produtos que dificultam a ligação enzima-substrato, atuando como inibidores da reação, ou como substratos alternativos (Maragoni, 2002; Genta *et. al*, 2007).

Em ambos os casos a clivagem do metilumbeliferil será comprometida, diminuindo a liberação de fluorescência. Este fenômeno pode ser observado nos ensaios realizados com α -Glicosidase (Figura 4.3A), onde o perfil hiperbólico da cinética indica a necessidade de diluição da amostra obtida a partir do epitélio do intestino médio anterior. Um perfil parecido foi encontrado nos ensaios com N-acetil hexosaminidase (IMAep e IP), β -Galactosidase (IMPcont) e α -Fucosidase (IMAep e IP) (dados não mostrados).

Em contrapartida, o oposto pode ser observado na figura 4.3D, onde encontrou-se a necessidade do emprego de um maior volume de amostra, para que a atividade de β -Galactosidase pudesse ser monitorada, visto sua baixa atividade neste compartimento.

Através desta técnica demonstramos que a menor fluorescência em pHs ácidos não é um impedimento para medidas de atividades destas enzimas (Tabela 4.2 e Figura 4.4), apresentando vantagens sobre os ensaios anteriormente descritos e ensaios colorimétricos (Eisenthal e Danson, 2002). Isso possibilita o emprego de um baixo volume e um elevado número de amostras distintas, permitindo a análise da variação individual das atividades na população em ensaios de alta vazão, como apresentado nas Figuras 4.5 e 4.6.

Além disso, esta técnica diminui o erro experimental de leitura, visto que nos ensaios descontínuos faz-se necessária uma maior manipulação das amostras e as leituras são pontuais. Nessas condições, muitas vezes um ponto fora da curva é o bastante para que ocorra o aumento do erro entre as replicatas experimentais.

Após a padronização do método a ser empregado nos estudos cinéticos, o perfil de atividade das GHs foi caracterizado em diferentes tecidos digestivos do inseto ao longo da digestão.

Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas (Ribeiro e Pereira, 1984), exercendo um possível papel na digestão de glicoproteínas do sangue, além de participarem de diversos processos bioquímicos fundamentais do metabolismo (Voet, 2013).

Diferentes padrões de atividade enzimática foram identificados ao longo da digestão: perfis constantes, de indução ou repressão foram observados para as seis glicosidases estudadas.

As enzimas α Glicosidase e α -Manosidase foram as únicas que apresentaram uma indução da atividade na glândula salivar, ambas apresentando pico máximo em 5 dias após alimentação.

As enzimas de membrana do intestino médio anterior N-acetil hexosaminidase e α -Glicosidase se mostraram constantes ao longo do processo digestivo, enquanto as enzimas que se mostraram mais ativas no 7º dia foram β -Glicosidase (4 vezes) e β -Galactosidase (6 vezes). No 5º dia verificou-se o aumento de atividade de α -Fucosidase (6 vezes) e no 9º dia α -Manosidase (4 vezes).

O conteúdo deste mesmo compartimento apresentou indução de 7,5 vezes para α -Glicosidase após 9 dias. Esses resultados indicam que tanto enzimas solúveis como enzimas de membrana são passíveis de sofrer alterações em resposta a alimentação, como descrito por Silva e colaboradores (2007), em amostras de epitélio do intestino médio do triatomíneo.

A enzima α -Manosidase possui maior atividade em jejum tendo uma diminuição de 8 vezes em sua atividade logo após a alimentação, retornando a sua atividade inicial após 14 dias (Figura 4.10). A partir destes dados duas hipóteses podem ser levantadas, sugerindo que o inseto possua um mecanismo de reserva desta enzima e que esta desempenhe papel fundamental nas etapas iniciais da digestão, ou ainda que substâncias presentes no sangue possam atuar como inibidores da mesma, a qual retorna a sua condição inicial em etapas mais tardias da digestão.

Nós observamos que no IMAcont, β -Glicosidase sofre indução de 2,5 vezes após 7 dias enquanto β -Galactosidase tem seus níveis aumentados 2 vezes 5 dias após alimentação.

As glicosidases α -Fucosidase e β -Glicosidase apresentaram padrões constantes de atividade no conteúdo e epitélio do intestino médio posterior. A enzima β -Galactosidase mostra uma indução de 20 vezes no epitélio e 15 vezes no conteúdo, ambos no 7º dia. α -Glicosidase e α -Manosidase apresentam aumento da atividade somente no epitélio, a qual corresponde a 2,8 e 11 vezes respectivamente.

No intestino posterior a α -Glicosidase mostrou-se mais ativa em jejum, apresentando uma redução de 50% da sua atividade após a alimentação. Neste mesmo compartimento as atividades de N-acetil hexosaminidase e β -Galactosidase dobraram no 7º dia após alimentação.

Nos casos onde observamos indução das atividades enzimáticas em frações solúveis é importante considerar a possibilidade de produção de enzimas pela microbiota intestinal. Sabe-se que a microbiota intestinal de triatomíneos sofre um aumento no número de bactérias de várias ordens de grandeza ao longo da digestão (Castro *et al.*, 2012). Esses seriam os casos de α -Glicosidase, β -Glicosidase e β -Galactosidase no intestino médio anterior e β -Galactosidase e N-acetil hexosaminidase no intestino médio posterior. Uma caracterização bioquímica mais detalhada dessas enzimas se faz necessária para elucidar essa questão.

Nas etapas iniciais da digestão do triatomíneo, o IMA encontra-se repleto de sangue, sendo assim fez-se necessária a confirmação de que as atividades encontradas no conteúdo deste compartimento em insetos dissecados 2 dias após alimentação são de fato conferidas à secreção no inseto e não provenientes da dieta.

A aquisição de enzimas digestivas do alimento é um fenômeno conhecido em outros grupos de insetos, como cupins, formigas, moscas e besouros (Martin, 1987).

Para isso foi verificada a presença de glicosidases no sangue, onde podemos observar que as enzimas α -Glicosidase, β -Glicosidase, α -Fucosidase e N-acetil hexosaminidase apresentam atividades muito inferiores na dieta quando comparadas com as atividades encontradas no conteúdo do intestino médio anterior (Figura 4.13).

Dentre as seis GHs estudadas no intestino de *R. prolixus*, duas apresentaram concentrações menores ou equivalentes àquelas encontradas na alimentação. α -Manosidase apresenta uma concentração de aproximadamente 2,4 μ U/IMAcont, a qual é inferior as concentrações encontradas na dieta, como mostrado na tabela 4.3. Contudo, a maior atividade desta glicosidase em *Rhodnius prolixus* encontra-se em jejum e 14 dias após alimentação do mesmo, períodos em há quantidades ínfimas de sangue neste compartimento como mostrado anteriormente na figura 4.10.

A enzima β -Galactosidase possui uma atividade no IMAcont muito próxima da atividade encontrada no sangue, contudo esta mostra-se induzida ao longo da digestão, apresentado um pico máximo de atividade no 5º dia após alimentação (Figura 4.11). Sendo assim, esses dados evidenciam que as atividades mensuradas são atribuídas à secreção destas GHs no inseto ao longo seu processo digestivo.

A concentração total destas glicosidases produzidas durante a digestão do inseto foi avaliada, onde observamos que α -Glicosidase possui atividade mais elevada nos epitélios do intestino médio seguido pelo conteúdo do IMA (Figura 4.14).

α -Manosidase possui atividade total mais elevada no epitélio do intestino médio posterior, seguido do epitélio do IMA, corroborando com dados da literatura em que esta enzima tem sido sugerida como estando associada a membrana microvilar de *Rhodnius prolixus* (Ferreira *et al.*, 1988).

β -Glicosidase apresenta atividades elevadas na glândula salivar e IMAcont, com atividade pelo menos 2 vezes maior que nos demais tecidos analisados. Nós observamos uma maior presença de N-acetil hexosaminidase no epitélio do IMA, sendo aproximadamente 25 vezes mais ativa em relação a glândula salivar, compartimento onde N-acetil hexosaminidase mostrou-se menos ativa (Figura 4.14).

A maior parte das atividades de β -Galactosidase e α -Fucosidase são encontradas na forma solúvel, visto as elevadas concentrações observadas nos conteúdos em relação aos demais compartimentos, sendo que as atividades mais baixas foram detectadas na GS e IP para ambas as enzimas.

Após analisarmos a atividade total de cada enzima em cada segmento, foram realizadas análises com intuito de facilitar a visualização de qual a glicosidase preponderante em cada um dos compartimentos.

Dessa forma foi possível verificar que na glândula salivar a maior atividade enzimática encontrada pode ser atribuída à β -Glicosidase, com atividade 20 vezes maior quando comparada à β -Galactosidase, a qual apresentou-se como a enzima com menor atividade neste tecido (Figura 4.15).

Nos epitélios do intestino médio anterior e posterior a α -Glicosidase mostrou-se majoritária, com concentrações muito superiores que as demais GHs nestes tecidos. Isso é claramente evidenciado na figura 4.15, e era esperado, uma vez que esta se trata de uma proteína anteriormente descrita por Ferreira e colaboradores (1988) como um marcador de membrana perimicrovilar. Essa membrana recobre toda a extensão do intestino médio, e foi demonstrada por Silva e colaboradores (2007) como sendo capaz de sofrer indução de seus níveis em resposta à alimentação.

No intestino posterior a N-acetil hexosaminidase foi a glicosidase que apresentou maior atividade, sendo as enzimas β -Glicosidase e β -Galactosidase menos ativas neste compartimento conforme pode ser verificado na figura 4.15.

Ao realizarmos a alimentação do inseto com sangue submetido ao processo de inativação do sistema complemento, observamos uma alteração na atividade de algumas glicosidases nos diferentes compartimentos estudados.

Verificamos que grande parte das glicosidases estudadas sofre redução de sua atividade, quando comparadas aos insetos alimentados com a dieta padrão (sangue desfibrinado, sem inativação do sistema complemento). Entretanto, o oposto foi observado ao avaliarmos a atividade de α -manosidase e N-acetil hexosaminidase presentes no intestino médio do inseto (Figura 4.17).

Estas modificações certamente podem ser atribuídas a alterações nas mais de 20 proteínas presentes no plasma submetido à inativação do complemento, a qual inclui uma etapa de aquecimento que poderia favorecer a exposição de sítios glicosilados específicos, uma vez que estas proteínas apresentam uma vasta gama de sacarídeos ao longo de sua estrutura (Muller-Eberhard, 1988). Isso demonstra que a atuação de glicosidases intestinais não somente ocorre de modo distinto ao longo do processo digestivo, mas que os açúcares da dieta podem contribuir de maneira importante para a atividade ou expressão destas enzimas.

Após demonstrado que a inativação do sistema complemento promove alterações significativas nas atividades das GHs do inseto, avaliamos se a exposição do inseto ao parasito causaria alterações nas atividades enzimáticas, visto que o *Trypanosoma cruzi* apresenta em sua superfície de membrana glicoconjugados que interagem diretamente com proteínas presentes no intestino do hospedeiro invertebrado (Buscaglia *et al.*, 2006).

Como controle foram realizadas análises *in silico* utilizando o banco de dados CAZY (2015) para verificar a presença de glicosidases no *Trypanosoma cruzi*, uma vez que diferentes glicosidases foram descritas em alguns tripanossomatídeos (El-Sayed *et. al.*, 2005).

Tais dados revelaram que apenas um gene de glicosidase pode ser encontrado no genoma do parasito, sendo este pertencente à família GH38, o qual corresponde à α -Manosidase, E.C. 3.2.1.24 (Tabela 4.4). Este dado é de extrema relevância para a avaliação de alterações nas atividades de glicosidases de *R. prolixus* após infecção com o parasito.

Visto que o genoma do *T.cruzi* ainda apresenta algumas lacunas, torna-se imprescindível a realização de ensaios para verificação da atividade das GHs estudadas. Esta avaliação foi

realizada nos pHs 4,5 e 7,2, utilizando as cepas de *T.cruzi* DM28c (TcI) e cepa Y (TcII) nos estágios de epimastigota e tripomastigota metacíclica. Tais dados revelaram a ausência de atividade de GHs secretadas em ambos pHs (Figuras 4.18 e 4.19), corroborando os dados mostrados na tabela 4.4.

Em contrapartida, os mesmos ensaios realizados para GHs intracelulares do parasito mostraram atividade de α -Manosidases de formas epimastigotas da cepa Y em pH 4,5 (Figura 4.20B), enquanto em pH 7,2 podemos observar atividade de α -Glicosidase independente da cepa ou estágio de diferenciação avaliado, havendo atividade mais pronunciada em formas epimastigotas de ambas as cepas (Figura 4.21). É importante ressaltar que não foram observadas atividades de GHs em nenhuma das condições avaliadas para as demais enzimas estudadas (dados não mostrados). É importante destacar que para o nosso conhecimento essa é a primeira descrição dessas duas glicosidases (α -glicosidase ou maltose, e α -manosidase) em *T.cruzi*.

Após a realização dos controles necessários para verificar alterações nas atividades das glicosidases de *R. prolixus* promovidas pela infecção com *T. cruzi*, determinamos o perfil de atividade enzimática em diferentes etapas da digestão.

Nossos resultados evidenciam que diferentes GHs são moduladas com a infecção em compartimentos distintos de acordo com os estágios da digestão do triatomíneo. Um bom reflexo disso pode ser observado pela redução da atividade de β -glicosidase na glândula salivar em etapas iniciais da digestão de insetos expostos ao parasito.

Estes resultados associados com dados da literatura que mostram uma grande variedade de genes com funções até o momento pouco compreendidas nos despertou uma enorme curiosidade, principalmente pelo fato de que este compartimento tem sido associado principalmente com a ingestão de alimentos (Ribeiro *et. al*, 2004), não interagindo com o parasito, o que nos fez considerar que o protozoário *Trypanosoma cruzi* modula as atividades de β -glicosidase na glândula salivar de um modo indireto.

No epitélio do intestino médio anterior, nas etapas finais da digestão, entre 12 e 14 dias após alimentação, foi observado um aumento da atividade de α -Glicosidase (Figura 4.22), que pode estar relacionada com alterações na membrana perimicrovilar do inseto.

Gonzalez e colaboradores (2006) demonstraram que modificações na membrana perimicrovilar dificultam a adesão do parasito. Logo, este aumento poderia ser um mecanismo de defesa do inseto contra o *Trypanosoma cruzi*. Outra hipótese seria uma estratégia do parasito para

aumentar sua superfície de contato com o hospedeiro invertebrado, uma vez que nessas etapas uma elevação da carga parasitária começa a ser observada (Ferreira *et. al.*, 2016).

Neste mesmo compartimento foi observada uma redução na atividade de α -Fucosidase nas etapas intermediárias da digestão, entre 7 e 9 dias após alimentação. Uma de nossas hipóteses é que isso possa estar relacionado com a liberação de inibidores dessas enzimas pelo *Trypanosoma cruzi* (Figura 4.27). Essa redução também pode ser resultado da modulação da expressão gênica pelo parasito, o que neste caso sugeriria não só um novo aspecto da relação parasito vetor, mas um papel importante dessa glicosidase nesse contexto.

No IP observamos um aumento de β - Galactosidase nas etapas finais da digestão, o que pode estar relacionada com a forma parasitária encontrada nessa região ou um possível remodelamento da cutícula devido à infecção. A segunda hipótese parece mais plausível, dada a ausência dessa enzima no genoma e nos extratos do parasito.

Esses dados mostram que a infecção por *T. cruzi* modula a atividade de glicosidases em *R. prolixus* e que, embora não estejam completamente elucidados os mecanismos envolvidos nesse processo, essas proteínas provavelmente interagem de alguma forma com o parasito. É importante destacar que glicoconjugados de superfície do *T. cruzi* como mucinas, GIPLs e diversas glicoproteínas são ricos em resíduos de galactose, N-acetilhexosamina, manose, (Vermelho e Meirelles, 1994; Previato *et al.*, 2004; Todeschini *et al.*, 2009; Mendonça-Previato *et al.*, 2013) sendo assim possíveis substratos para as glicosidases de *R. prolixus* descritas nesse trabalho. Os efeitos do parasito nas atividades de glicosidases intestinais do vetor são sumarizados na figura 5.1.

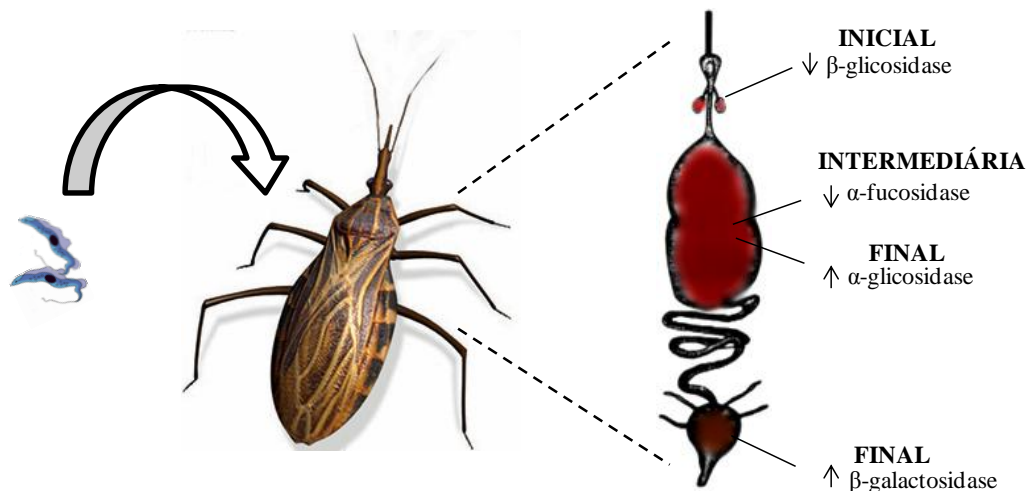


Figura 5.1- Representação esquemática do efeito da infecção com *T.cruzi* nas Glicosídeo Hidrolases envolvidas em diferentes etapas da digestão de *R. prolixus*.

Após realizar a detecção bioquímica das glicosidases de *R. prolixus* ao longo de seu processo digestivo, nós decidimos verificar se a expressão de genes associados a estas enzimas apresentariam padrão similar ao longo deste processo, e se algumas glicosidases poderiam ser majoritariamente expressas em determinados tecidos.

Para tanto, estudos de expressão dos genes destas glicosidases através da técnica de PCR foram realizados, revelando que alguns genes são expressos em todos os compartimentos estudados, como pode ser observado pelo gene RPRC007504, que codifica α -Fucosidase (GH29), assim como encontrado para RPRC001875, o qual corresponde a um gene de N-acetil hexosaminidase (GH20).

Os genes de α -Glicosidase RPRC012570 (Família GH13), RPRC002733 e RPRC014288 (Família GH31) são preferencialmente expressos no intestino médio anterior, enquanto que os genes de β -Galactosidase RPRC011517 e RPRC011537 (GH35) e α -Manosidase RPRC011133 (GH38), são preferencialmente expressos no intestino médio posterior (Figura 4.48).

Os genes de β -Glicosidase RPRC009530 e RPRC015451 (GH1), N-acetil hexosaminidase RPRC009566 (GH20), α -Manosidase RPRC007185 (GH38) e α -Glicosidase RPRC006247 (GH13) não se apresentaram expressos no tubo digestivo de *Rhodnius prolixus*, sugerindo que a expressão destes genes possa ocorrer em outros compartimentos do inseto, uma vez que a confirmação da sua existência foi realizada através da amplificação a partir de DNA genômico (dados não mostrados).

Os identificadores RPRC008125 (GH20) e RPRC000597 (GH38) não foram amplificados nos ensaios realizados tanto com o DNA genômico quanto com o cDNA, indicando um possível erro no desenho ou síntese destes primers, ou mesmo na predição gênica.

Mesmo se tratando de uma técnica semi-quantitativa, observamos que a intensidade das bandas apresentadas pelos identificadores RPRC011517 e RPRC011537 são coerentes com a atividade de β -Galactosidase encontrada no intestino médio posterior. Esta correlação também foi observada com o gene RPRC009519 que codifica β -Glicosidase, apresentando banda mais intensa assim como maior atividade no intestino médio anterior e glândula salivar.

A fim de quantificar os níveis de expressão gênica, alguns genes foram selecionados e estudados com a técnica de RT-qPCR, sendo a escolha dos genes baseada nos ensaios enzimáticos e no número de genes pertencentes a uma mesma família.

Seguindo estes critérios escolhemos genes de enzimas com maior indução ao longo da alimentação do inseto (β -Galactosidase, genes RPRC011517 e RPRC011537), sendo este um

forte indicativo de que esta enzima possui um papel essencial no processo de digestão. Além disso, optamos por analisar a expressão do gene RPRC007504, uma vez que este é o único gene da família que codifica α -Fucosidase.

Os genes RPRC009516 e RPRC009519 de β -Glicosidase da família GH1 também foram empregados nas análises, sendo estes os genes dessa família com maior expressão no intestino médio.

Após a seleção dos genes a serem investigados foi realizada a padronização das melhores condições a serem utilizadas nestes experimentos seguindo as especificações sugeridas em *The MIQE Guidelines* (Bustin *et. al*, 2009), como a determinação da concentração de cDNA e otimização dos primers. Coincidentemente foram estabelecidos as mesmas concentrações de iniciadores para todos os genes escolhidos, 300 nM do primer *Foward* e 300 nM do primer *Reverse*. A validação dos primers foi realizada variando as concentrações de cDNA, afim de determinar os valores de *slope* e de R^2 para cálculo das eficiências dos pares de primers (Figura 4.49) (Livak e Schmittgen, 2001).

Corroborando os dados da PCR semi-quantitativa, os genes RPRC011517 e RPRC011537 apresentaram um alto nível de expressão no intestino médio posterior, do mesmo modo que o gene RPRC007504 que codifica α -Fucosidase se mostrou constante entre os tecidos estudados.

O gene RPRC009519 apresentou uma expressão mais elevada no intestino médio anterior, sugerindo que este seja um dos genes responsáveis pela elevada atividade enzimática neste tecido. O gene RPRC009516 mostrou a expressão levemente maior no intestino médio anterior. Contudo, o mesmo não foi observado por PCR semi-quantitativo, possivelmente devido a diferença de sensibilidade entre as técnicas.

As análises contidas no *heatmap* mostram o agrupamento de genes com similaridade nos níveis de expressão, as quais curiosamente levaram ao agrupamento de genes pertencentes a uma mesma família, sugerindo a ausência de especialização tecidual. Tal afirmação se torna mais evidente quando observamos o agrupamento dos genes RPRC011517 e RPRC011537 (GH35), os quais se mostram mais expressos no intestino médio posterior.

O mesmo tipo de agrupamento pode ser observado para os genes RPRC009516 e RPRC009519 (GH1), nos permitindo considerar que não há um único gene responsável pela expressão dessa atividade em cada compartimento estudado (Figura 4.50).

Utilizando o intestino médio posterior foi realizada a análise do padrão temporal, onde o gene RPRC007504 não apresentou alterações ao longo do processo de digestão, assim como nos diferentes tecidos conforme citado anteriormente.

O perfil gráfico exposto pelos iniciadores RPRC011517 e RPRC011537 é similar, visto que ambos apresentam pico máximo de expressão no 9º dia após alimentação, mostrando um decaimento crescente nos dias 12 e 14 após alimentação (Figura 4.51).

É interessante observar que o aumento da atividade enzimática de β -Galactosidase ocorre no 7º dia após alimentação, contudo, esta não apresenta diferença estatística entre os dias 7 e 9, mostrando o mesmo decaimento crescente no 12º e 14º dia, conforme demonstrado anteriormente nos dados de atividade enzimática. Dessa forma, os dados obtidos são compatíveis com a hipótese de que genes da família GH 35 (possivelmente RPRC011517 e RPRC011537) seriam responsáveis pela produção da atividade de β -galactosidase presente no intestino médio de *R. prolixus*.

Após realizar as análises do padrão tecidual e temporal dos genes das glicosidases descritas, optamos por realizar o silenciamento do gene RPRC007504, identificador de α -Fucosidase, uma vez que famílias onde são encontrados um elevado número de genes dificultariam a correlação da expressão gênica com as atividades enzimáticas.

O RNA de interferência (RNAi) tecnologia utilizada para realização do silenciamento gênico, é uma importante ferramenta na qual a redução seletiva da expressão de um determinado gene nos permite analisar função dessas proteínas (Araújo *et. al*, 2006).

Através dessa técnica obtivemos uma redução de 30% nos níveis de expressão gênica de α -Fucosidase em insetos silenciados, quando comparados ao grupo controle submetido a injeção de dsGFP (Figura 4.52). A atividade enzimática foi monitorada nos diferentes compartimentos do inseto, sendo observada uma redução significativa da atividade desta glicosidase no epitélio do intestino médio anterior do triatomíneo (Figura 4.53).

Sendo assim, uma vez que o silenciamento desta glicosidase foi previamente estabelecido, tornam-se facilitadas investigações sobre o grau de comprometimento que a diminuição da expressão e consequentemente da atividade desta enzima poderia conferir sobre a fisiologia do inseto e sobre o estabelecimento do *T. cruzi*. Além disso, os dados sugerem fortemente que RPRC007504, da família GH 29, é responsável pela síntese da atividade de α -fucosidase presente no intestino médio de *R. prolixus*.

6. CONCLUSÕES

Ensaio contínuo podem ser utilizados para medidas de atividade de diferentes glicosidases, fornecendo resultados de alta confiabilidade. Empregando esta metodologia foi possível verificar que algumas enzimas apresentam uma distribuição próxima da normalidade na população de *Rhodnius prolixus* enquanto outros apresentam distribuições que fogem da curva normal.

Diferentes glicosidases como β -glicosidase, β -galactosidase, α -glicosidase, α -fucosidase, α -manosidase e N-acetil hexosaminidase são induzidas após alimentação sanguínea em *R. prolixus*.

A digestão de glicoproteínas e proteínas minoritárias se inicia no intestino médio anterior de *R. prolixus*, indicando que esse compartimento também é capaz de realizar parte do processo digestivo.

A digestão da fração glicosilada e da fração proteica de alguns glicoconjugados ocorre de forma simultânea, enquanto outras glicoproteínas parecem sofrer primeiramente a digestão de açúcares no IMA.

A atividade de algumas glicosidases intestinais sofre alterações em decorrência da inativação do sistema complemento, indicando que componentes da dieta contribuem de maneira importante para a atividade destas enzimas.

Trypanosoma cruzi das cepas DM28c e Y possui atividades detectáveis de α -glicosidases em pH 7,2 na fração intracelular nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica do parasito.

A infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* modula a atividade de Glicosídeo Hidrolases em diferentes compartimentos do triatomíneo em etapas distintas da digestão.

O perfil de expressão gênica de β -galactosidase no aparelho digestivo de *Rhodnius prolixus* mostra que genes pertencentes a uma mesma família possuem padrão de expressão mais parecidos entre si.

O silenciamento do gene RPRC007504 sugere que essa sequência está relacionada à produção da atividade intestinal de α -Fucosidase em *R. prolixus*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I.C.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The Mucin-like Glycoprotein Super-Family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and Biological Roles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114: 143–150, 2001.
- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. *Doença de Chagas*, 2013 (FIOCRUZ, 2013). Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em 14 de junho de 2016.
- ARAÚJO, R.N., SANTOS A.; PINTO, F.S.; GONTIJO, N.F.; LEHANE, M.J.; PEREIRA, M.H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 683–693, 2006.
- ARGOLO A.M., FELIX M., PACHECO R. & COSTA J. *Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil*. Editora Imperial Novo Milênio, PIDC, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S. Care and Maintenance of Triatomine Colonies. In: CRAMPTON, J. M.; BEARD, C. B.; LOUIS, K. eds. (Org.). *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a Methods Manual*. p. 56-64. 1997.
- BALCZUN, C.; SIEMANOWSKI, J.; PAUSCH, J.K.; HELLING, S.; MARCUS, K.; STEPHAN, C.; MEYER, H.E.; SCHNEIDER, T.; CIZMOWSKI, C.; OLDENBURG, M.; HOHN, S.; MEISER, C.K.; SCHUHMANN, W.; SCHAUB, G.A. Intestinal Aspartate Proteases TiCatD and TiCatD2 of the Haematophagous Bug *Triatoma infestans* (Reduviidae): Sequence Characterisation, Expression Pattern and Characterisation of Proteolytic Activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 42: 240–250, 2012.
- BARRIAS, E.S.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry Into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in Immunology.* 4: 1-10, 2013.
- BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can J Zool.* 61: 2574–2586, 1983
- BLACK, W.C.; KONDRATIEFF, B.C. Evolution of Arthropod Disease Vectors. In: Marquardt, W.C. (eds.) *Biology of Disease Vectors*. 2nd edition. California 2004.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976.
- BURGOS, M.H., GUTIERREZ, L.S. The Intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the Midgut. *J. Ultrastr. Mol. Structr. Res.* 57: 1-9, 1976.

BUSCAGLIA, C.A.; CAMPO, V.A.; FRASCH, A.C.; Di NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 229-236, 2006.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 55: 611-622, 2009.

BUXTON, P.A. The Biology of the Blood-Sucking Bug *Rhodnius prolixus*. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*. 78: 227-236, 1930.

CARVALHO, L.O.; ABREU-SILVA, A.L.; HARDOIM, D.J.; TEDESCO, R.C.; MENDES, V.G.; DA COSTA, S.C.; CALABRESE, K.S. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int. J. Exp. Path.* 90: 52-57, 2009.

CASTRO, D.P.; MORAES, C.S.; GONZALEZ, M.S.; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *Plos One*. 7(5): e36591, 2012.

CAZY - *Carbohydrate-Active Enzymes Database* (CAZY, 2015). Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em 07 de outubro de 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (CDC, 2016). *Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) – Biology, Life Cycle*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em 17 de junho de 2016.

COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant Glycoconjugates on the Surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94: 37-49, Rio de Janeiro, 1999.

CORDERO, E.M.; GENTIL, L.G.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, J.L.; YOSHIDA, N.; ANEZ, N.; SILVEIRA, J.F. Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during in vivo metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica*, 105:87-91, 2008.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102: 113-122, Rio de Janeiro, 2007.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 465: 56-57, 2010.

COUTINHO, M.; DIAS, J.C.P. A Descoberta da Doença de Chagas. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*. 16: 11-51. 1999.

COUTINHO, M.; FREIRE J.R.O.; DIAS, J.C.P. The Noble Enigma: Chagas' Nominations for the Nobel Prize. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1: 123-129, Rio de Janeiro, 1999.

CUMMINGS R; TURCO S. Capítulo 40: Parasitic Infections. In: Varki A, et al. (eds). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

DAMASCENO DE SÁ, J.; CARNEIRO, C.N.B.; DAMATTA, R.A.; SAMUELS, R.I.; TERRA, W.R.; SILVA, C.P. Biphasic Perimicrovillar Membrane Production Following Feeding by Previously Starved *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Journal of Insect Physiol.* 53: 592–600, 2007.

DANSA-PETRETSKI, M.; RIBEIRO, J.M.; ATELLA, G.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Antioxidant Role of *Rhodnius prolixus* Heme-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 5: 270 (18): 10893-10896, 1995.

DAVIES, G.J.; GLOSTER, T.M.; HENRISSAT, B. Recent Structural Insights into the Expanding World of Carbohydrate-active Enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 15: 637-645, 2005.

DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. In: Marquardt, W.C. (eds.) *Biology of Disease Vectors*. 2nd edition. California 2004.

DÍAZ-ALBITER, H.M.; FERREIRA, T.N.; COSTA, S.G.; RIVAS, G.B.; GUMIEL, M.; CAVALCANTE, D.R.; PAVAN, M.G.; GONZALEZ, M.S.; MELLO, C.B.; DILLON, V.M.; BRUNO, R.V.; GARCIA, E.S.; LIMA, M.M.; CASTRO, D.P.; DILLON, R.J.; AZAMBUJA, P.; GENTA, F.A. Everybody Loves Sugar: First Report of Plant Feeding in Triatomines. *Parasites & Vectors*. 9:114, 2016.

DIOTAIUTI, L.; OLIVEIRA, M.A.; SANTOS, J.P. *Triatomíneos*. Colaboradores: GUARNERI, A.A.; VITTA, A.C.R.; AZEREDO, B.V.M.; BELISÁRIO, C.J.; PESSOA, G.C.D.; DIAS, J.C.P.; BARBOSA, S.E. Belo Horizonte, p.271, 2008.

DUNN, M.J.; CRISP, S.J. Detection of proteins in polyacrylamide gels using an ultrasensitive silver staining technique. In: WALKER, J.M. *Methods in Molecular Biology: Analytical Protocols for Peptides and proteins*. Humana Press, Totowa, 113-118, 1994.

EISEMANN, C.H., BINNINGTON, K.C. The Peritrophic Membrane: Its Formation, Structure, Chemical Composition and Permeability in Relation to Vaccination Against Ectoparasitic Arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24: 15-26, 1994.

EISENTHAL, R.; DANSON, M.J. (Eds.), *Enzyme Assays: A Practical Approach*, second ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 2002.

EL-SAYED, M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; ANDERSSON, B. *et. al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. 309: 409-415, 2005.

ENGEL, P.; MORAN, A.N. The Gut Microbiota of Insects – Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiol Rev.* 37: 699-735, 2013.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; GARCIA, E. S.; TERRA, W. R. Digestive Enzymes Trapped Between and Associated with the Double Plasma Membranes of *Rhodnius prolixus* Posterior Midgut Cells. *Insect Biochemistry*. 18: 521-530, 1988.

FERREIRA, C.R.; KESSLER, R.L.; LORENZO, M.G.; PAIM, R.M.M.; FERREIRA, L.L.; PROBST, C.M.; ALVES-SILVA, J.; GUARNERI, A.A. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*. 2016.

FREIRE-DE-LIMA, L.; OLIVEIRA, I.A.; NEVES, J.L.; PENHA, L.L.; ALISSON-SILVA, F.; DIAS, W.B.; TODESCHINI, A.R. Sialic Acid: A Sweet Swing Between Mammalian Host and *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*. 3:356, 2012.

FRIEND, WG. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stål. *Can. J. Zool.* 43: 125-132, 1965.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. (FIOCRUZ, 2016a). *Doença de Chagas*. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_chagas.htm>. Acesso em 16 de junho de 2016.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. (FIOCRUZ, 2016b). *A Descoberta da Tripanossomíase Americana*. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/hist-descoberta.html>>. Acesso em 16 de junho de 2016.

GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores Conhecidos no Brasil. In: GALVÃO, C. *Vetores da doença de chagas no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015, pp. 88-170. Zoologia: guias e manuais de identificação, 2015.

GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P. Infection of triatomines with *Trypanosoma cruzi*. In: CRAMPTON, J. M.; BEARD, C. B.; LOUIS, K. (Org.) Molecular biology of insect diseases vectors: *A methods manual*. London: Chapman & Hall, p. 146-155. 1997.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and Interactions of *Trypanosoma cruzi* within the Insect Vector. *Parasitology Today*, 7: 240-244, 1991.

GARCIA, E.S.; GENTA, F.A.; AZAMBUJA, P.; SCHAUB, G.A. Interactions between Intestinal Compounds of Triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*. 10: 499-505, 2010.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53:11-21, 2007.

GENTA, F.A.; DUMONT, A.F.; MARANA, S.R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The interplay of processivity, substrate inhibition, and a secondary substrate binding site of an insect exo- β -1,3-glucanase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1774(9): 1079-1091, 2007.

GONÇALVES, R.G.; GALVÃO, C.; MENDONÇA, J.; COSTA-NETO, E.M. *Guia de Triatomíneos da Bahia*. Editora UEFS, Feira de Santana, 112 p., 2012.

GONZALEZ, M.S.; HAMED, A.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; NOGUEIRA, N.F.S.; DE SOUZA, W.; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; MELLO, C.B. Antiserum Against Perimicrovillar Membranes and Midgut Tissue Reduces the Development of *Trypanosoma cruzi* in the Insect Vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 114: 297-304, 2006.

GOODCHILD, A.J.P. Evolution of the Alimentary Canal in the Hemiptera. *Biol. Reviews* 41: 97-140, 1966.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. *Evolution of the insects*. New York: Cambridge University Press. 772 p., 2005.

GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J.K. *Reporte Sobre la Enfermedad de Chagas*. World Health Organization, Geneva, 96 p., 2007.

GURGEL-GONÇALVES, R.; ABAD-FRANCH, F.; FERREIRA, J.B.; SANTANA, D.B.; CUBA, C.A. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brasil? *Acta Trop.* 107: 90-98, 2008.

GUTIERREZ, L.S., BURGOS, M.H. The Intestine of *Triatoma infestans*. II. The Surface Coat of the Midgut. *J. Ultrastr. Mol. Struct. Res.* 63: 244-251, 1978.

HENRISSAT, B. A Classification of Glycosyl Hydrolase Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem J.* 280 (Pt 2): 309-316, 1991.

HOUSEMAN, J.G.; DOWNE, A.E.R. Exoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem.* 11(5): 579-582, 1981.

HUEBNER, E. (Huebner, 2006). *Vector Base*. An Invitation and Background Information regarding the *Rhodnius* Genome Sequencing Project, 2006. Disponível em: <<http://rprolixus.vectorbase.org/Other/News/?id=41>>. Acesso em 20 de junho de 2016.

ILGOUTZ, S.C.; McCONVILLE, M.J. Function and assembly of the Leishmania surface coat. *International Journal for Parasitology*, 31: 899-908, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA. (IBICT, 2016). Canal Ciência, Portal de Divulgação Científica e Tecnológica. *Notáveis – Carlos Chagas*. Disponível em: <http://www.canalciencia.ibict.br/notaveis/carlos_chagas.html>. Acesso em 17 de junho de 2016.

INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. *IEPHA/MG Informa: Todo Dia Ainda é Dia de Índio*, 2012. Disponível em: <<http://www.iepha.mg.gov.br/banco-de-noticias/1070-iephamg-informa-todo-dia-ainda-e-dia-de-indio>>. Acesso em 15 de junho de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIA E TECNOLOGIA – ENTOMOLOGIA MOLECULAR. (INCT/EM-UFRJ, 2016). *Rhodnius prolixus (alimentação)*. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/fotos/rhodnius-prolixus/rhodnius-prolixus-alimentacao/view>>. Acesso em 17 de junho de 2016.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB, 1992). Enzyme Nomenclature. *Academic Press*. San Diego, 1992.

JAY, G.D.; CULP, D.J.; JAHNKE, M.R. Silver Staining of Extensively Glycosylated Proteins on Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels: Enhancement by Carbohydrate-Binding Dyes. *Anal. Biochem.* 185:324-330, 1990.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J.M.S.; MOREIRA, F.F.F; DALE, C.; CORDEIRO, I.R.S; LAMAS, V.D. JR.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.S. *Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas)*, 2ª edição, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015

KELLY, J.M. A B-Cell Activator in Chagas disease. *Nature Medicine.* 6: 865-866, 2000.

KROPF, S.P. *Doença de Chagas, Doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962*. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today.* 9: 381-387, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.

LANA, M.; CHIARI, C.A.; CHIARI, E.; MOREL, C.M.; GONÇALVES, A.M.; ROMANHA, A.J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol Res.* 82: 257-260, Minas Gerais, 1995.

LANE, N.J., HARRINSON, J.B. An Unusual Cell Surface Modification: A Double Plasma Membrane. *J. Cell Sci.* 39: 355-372, 1979.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42, 525-550, 1997.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas's disease (American trypanosomiasis). *Journal of the Royal Society of Medicine.* 74(6): 451-455, 1981.

LIVAK, K. J & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative genes expression data using real time quantitative PCR and 2^{-ΔΔ}CT method. *Methods* 25: 402-408, 2001.

MAEDA, F.Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell Signaling During *Trypanosoma cruzi* Invasion. *Frontiers in Immunology.* 3:361, 2012.

MÁLAGA, S.; YOSHIDA, N. Targeted Reduction in Expression of *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity. *Infect. Immun.* 69: 353-359, 2001.

MARANGONI, A.G. *Enzyme kinetics: A modern approach*. Editora Wiley-Interscience, 2002.

MARTIN, D.L.; LOWE, K.R.; MCNEILL, T.; THIELE, E.A.; ROELLIG, D.M.; ZAJDOWICZ, J.; HUNTER, S.A.; BRUBAKER, S.A. Potential Sexual Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Mice. *Acta Tropica.* 149:15-18, 2015.

MARTIN, M.M. *Invertebrate-microbial interactions: Ingested fungal enzyme in Arthropod Biology* 1ed. Comstock Publishing Associates, Ithaca, 1987.

MEJIA, J.S., BISHOP, J.V., TITUS, R.G. Is it Possible to Develop Pan-Arthropod Vaccines? *Trends in Parasitology*. 22: 367-370, 2006.

MELO, E.B.; CARVALHO, I. α e β -Glucosidases como Alvos Moleculares para Desenvolvimento de Fármacos. *Quim. Nova*. 29: 840-843, 2006.

MENDONÇA-PREVIATO, L.; PENHA, L.; GARCEZ, T.C.; JONES, C.; PREVIATO, J.O. Addition of α -O-GlcNAc to threonine residues define the post-translational modification of mucin-like molecules in *Trypanosoma cruzi*. *Glycoconjugate Journal*. 30(7):659-666, 2013.

MESQUITA, R.D.; VIONETTE-AMARAL, R.J.; LOWENBERGER, C.; MONTEIRO, F.A.; MINX, P.; SPIETH, J.; CARVALHO, A.B.; PANZERA, F.; LAWSON, D.; TORRES, A.Q.; RIBEIRO, J.M.C.; SORGINE, M.H.F.; WATERHOUSE, R.M.; MONTAGUE, M.J.; ABAD-FRANCH, F.; BEZERRA, M.A.; OLIVEIRA, P.L.; *et. al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an Insect Vector of Chagas disease, Reveals Unique Adaptations to Hematophagy and Parasite Infection. *PNAS*. 112: 14936-14941, 2015

MULLER-EBERHARD, H.J. Molecular Organization and Function of The Complement System. *Ann. Rev. Biochem.* 57:321-47, 1988.

NETO, V.A. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. 1ªed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

NEVES, D.P. *Parasitologia Dinâmica*. 3ª ed., cap. 61, p. 465-468. Editora Atheneu, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, M. F.; SILVA, J. R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; LINS, U.; BRAGA, C. M. S.; MASUDA H, OLIVEIRA, P. L. Haem detoxification by an isect. *Nature*. 400: 517-518, 1999.

OLIVEIRA, M.F., GANDARA, A.C.P., BRAGA, C.M.S., SILVA, J.R., MURY, F.B., DANSA-PETRETSKI, M., MENEZES, D., VANNIER-SANTOS, M.A. OLIVEIRA, P.L. Heme Crystallization in the Midgut of Triatomine Insects. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol*. 146: 168-174, 2007.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; SOUZA, W.; BRAGA, C.M.S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Haemozoin Formation in the Midgut of the Blood-Sucking Insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Letters*. 477: 95-98, 2000.

PAIM, R.M.; PEREIRA, M.H.; DI PONZIO, R.; RODRIGUES, J.O.; GUARNERI, A.A.; GONTIJO, N.F.; ARAÚJO, R.N. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BioMed Central*. 5: 128, 2012.

PASCOA, V., OLIVEIRA, P.L., DANSA-PETRETSKI, M., SILVA, J.R., ALVARENGA, P.H., JACOBS-LORENA, M., LEMOS, F.J.A. *Aedes aegypti* Peritrophic Matrix and Its Interaction With Heme During Blood Digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 32: 517-523, 2002.

PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Chagas Disease: the Challenge of Polyparasitism? *Trends in Parasitology*. 30:176-182, Australia, 2014.

PONKA, P. Cell Biology of Heme. *Am. J. Med. Sci.* 318: 241-256, 1999.

PREVIATO, J.O.; WAIT, R.; JONES, C.; DOS REIS, G.A.; TODESCHINI, A.R.; HEISE, N.; PREVIATO, L.M. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure , biosynthesis and immunobiology. *Advances in Parasitology*. 56: 1-41, 2004.

RAMIREZ, J.D.; HERNANDEZ, C.; MONTILLA, M.; ZAMBRANO, P.; FLOREZ, A.C.; PARRA, E.; CUCUNUBA, Z.M. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to Tcbat Genotype. *Zoonoses and Public Health*. 61: 477-479, Colombia, 2014.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas Disease. *The Lancet*. 375: 1388–402, 2010

REY, L. *Parasitologia*. 4ªed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

RHODNIUS RESEARCH COMMUNITY. (*Rhodnius* Research Community, 2006). *Vector Base*. The Case for Sequencing the Genome of the Blood-Feeding Hemipteran Insect *Rhodnius prolixus*, 2006. Disponível em: <http://rprolixus.vectorbase.org/sections/Docs/org_docs/rprolixus/RhodniusSeq.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2016.

RIBEIRO, J.M.C. Common problems of arthropod vectors of disease. In: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (eds.) *The Biology of Disease Vectors*. 1st edition, Colorado: Colorado University, 1996.

RIBEIRO, J.M.C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M.A.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; VALENZUELA, J.G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 34: 61-79, 2004.

RIBEIRO, J.M.C.; GENTA, F.A.; SORGINE, M.H.F; LOGULLO, R.; MESQUITA, R.D.; OLIVEIRA, P.L.; *et al.* An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8: e2594, 2014.

RIBEIRO, J.M.C.; PEREIRA, M.E.A. Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem*. 14: 103-108, 1984.

ROMEIRO, A.; LEAL, L.H.M.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M. Interaction of *Leptomonas wallacei* with the Intestinal Tract of its Natural Host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J. Inverteb. Pathol*. 82: 41-49, 2003.

ROQUE, A.L.R.; JASEN, A.M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, pp. 75-87. Zoologia: guias e manuais de identificação, 2015.

RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. 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, 2000.

SCHOFIELD, C.J., GALVÃO, C. Classification, Evolution, and Species Groups Within the Triatominae. **Acta Trop.** 110 (2-3): 88-100, 2009.

SCOPES, R.K. Enzyme Activity and Assays. **Encyclopedia of life sciences**, 2002.

SENGER, M.R.; GOMES, L.C.; FERREIRA, S.B.; KAISER, C.R.; FERREIRA, V.F.; SILVA-Jr., F.P. Kinetics Studies on the Inhibition Mechanism of Pancreatic α -amylase by Glycoconjugated 1H-1,2,3-triazoles: A New Class of Inhibitors with Hypoglycemic Activity. **Chembiochem.** 13: 1584-1593, 2012.

SHARON, N.; LIS, H. Glycoproteins: Research Booming on Long-ignored Ubiquitous Compounds. **Mol. Cell Biochem.** 42: 167-187, 1982.

SILVA C.P.; LEMOS, F.J.A.; SILVA J.R. Digestão em Insetos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

SILVA, C.P., RIBEIRO, A.F., GULBENKIAN, S., TERRA, W.R. Organization, Origin and Function of the Outer Microvillar (Perimicrovillar) Membranes of *D. peruvianus* (Hemiptera) Midgut Cells. **J. Insect Physiol.** 41: 1093-1103, 1995.

SILVA, C.P., SILVA, J.R., VASCONCELOS, F.F., PETRETSKI, M.D.A., DAMATTA, R.A., RIBEIRO, A.F., TERRA, W.R. Occurrence of Midgut Perimicrovillar Membranes in Paraneopteran Insect Orders with Comments on Their Function and Evolutionary Significance. **Arthrop. Struct. Develop.** 33: 139-148, 2004.

SILVA, J.R.; MURY, F.B.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.; SILVA, C.P.; DANSA-PETRETSKI, M. Perimicrovillar Membranes Promote Hemozoin Formation Into *Rhodnius Prolixus* Midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** 37: 523–531, 2007.

SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*–host cell interaction. **Frontiers in Immunology.** 2014.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, Rio de Janeiro, 2010.

STEVERDING, D. The History of Chagas Disease. **Parasites & Vectors.** 7:317, 2014.

TARACENA, M.L.; OLIVEIRA, P.L.; ALMENDARES, O.; UMAÑA, C.; LOWENBERGER, C.; DOTSON, E.M.; PAIVA-SILVA, G.O.; PENNINGTON, P.M. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. **PLoS Negl Trop Dis.** 9: e0003358, 2015.

- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier Oxford, v.4, p.171-224, 2005.
- TERRA, W.R. Evolution of Digestive Systems of Insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 181-200, 1990.
- TERRA, W.R. Physiology and Biochemistry of Insect Digestion: an Evolutionary Perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734, 1988.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect Digestive Enzymes: Properties, Compartmentalization and Function. *Comp. Biochem. Physiol.* B 109, 1-62, 1994.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. Capítulo 11. In: GILBERT, L.I. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, p. 365-418, 2012.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: Gilbert L.I.; IATROV, K.; GILL, S. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*. Vol 4. Biochemistry and Molecular Biology. Oxford: Elsevier. In Press, 2004.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; GARCIA, E.S. Origin, Distribution, Properties and Functions of the Major *Rhodnius prolixus* Midgut Hydrolases. *Insect Biochemistry*. 18: 423-434, 1988.
- THORNTON, B.; BASU, C. Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. v. 39, n. 2, p.145-154, 2011.
- TODESCHINI, A.R.; ALMEIDA, E.G.; AGRELLOS, O.A.; JONES, C.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. α -N-acetylglucosamine-linked-O-glycans of sialoglycoproteins (Tc-mucins) from *Trypanosoma cruzi* Colombiana strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104: 270-274, 2009.
- TONELLI R.R., COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Selection of Binding Targets in Parasites Using Phage-Display and Aptamer Libraries *in vivo* and *in vitro*. *Frontiers in Immunology*. 3: 62-77, São Paulo, 2013.
- VALENZUELA, J.G. Blood Feeding Arthropod Salivary Glands and Saliva. In: Marquardt, W.C. (eds.) *Biology of Disease Vectors*. 2nd edition, California, 2004.
- VALLET-GELY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial Strategies to Overcome Insect Defences. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 302-313, 2008.
- VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N.L. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-Host Cell Interaction: Possible Biological Model – a Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1:69-79, Rio de Janeiro, 1994.
- VOET, D.; VOET, J.G. Açúcares e Polissacarídeos. Capítulo 11. In: VOET, D.; VOET, J.G. *Bioquímica*. 4^a ed., Artmed, Porto Alegre, 2013.

WILSON, D. (Wilson, 2011). *Vector Base. Rhodnius prolixus* preliminary gene set, 2011. Disponível em: <<http://rprolixus.vectorbase.org/Other/News/?id=150>>. Acesso em 12 de junho de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO, 2010). *Control Strategy*. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/strategy/en/>>. Acesso em 15 de junho de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO, 2014). *Neglected Tropical Disease*. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/>. Acesso em 28 de fevereiro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO, 2016a). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 13 de junho de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO, 2016b). *Chagas disease*. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/home_more/en/>. Acesso em 13 de junho de 2016.

YASSIN, A.F. *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1575-1579, 2005.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein Staining Following Electrophoresis on Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 30:148-152, 1969.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: Um Parasita, Dois Parasitas Ou Vários Parasitas da Doença de Chagas? *Revista da Biologia.* 6b: 44-48, São Paulo, 2011.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAVRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054, Rio de Janeiro, 2009.