

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

*Rhodnius prolixus*: EFEITOS DO TRIFLUMURON SOBRE A  
REPRODUÇÃO E SISTEMA IMUNE E CARACTERIZAÇÃO DE  
ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE CORPO GORDUROSO.

BIANCA MONTEIRO HENRIQUES SANTOS

Rio de Janeiro  
Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Bianca Monteiro Henriques Santos*

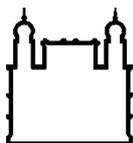
***Rhodnius prolixus*: Efeitos do triflumuron sobre a reprodução e sistema imune e caracterização de atividade proteolítica de corpo gorduroso.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

**Orientador:** Profa. Dra. Patrícia de Azambuja Penna

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: BIANCA MONTEIRO HENRIQUES SANTOS***

***Rhodnius prolixus: EFEITOS DO TRIFLUMURON SOBRE A REPRODUÇÃO E SISTEMA IMUNE E CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE CORPO GORDUROSO.***

**ORIENTADOR: Profa. Dra. Patrícia de Azambuja Penna**

**Aprovada em: 11/03/2014**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Carlos Roberto Alves - Presidente (IOC)**

**Prof. Dr. Ademir Jesus Martins Jr. (IOC)**

**Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (UFF)**

**Prof. Dra. Milane de Souza Leite (UFRJ)**

**Prof. Dra. Marli Maria Lima (IOC)**

Rio de Janeiro, 11 de Março de 2014

Dedico aos meus pais  
e ao meu irmão

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dra. Patrícia Azambuja, por ter me aceitado como aluna e me dado a oportunidade de entrar em seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Fernando Genta, por ter me acolhido de forma tão repentina. Agradeço por todo auxílio e tempo cedido para tornar este trabalho possível.

Aos meus pais, Maria e Laenio, e ao meu irmão, Guilherme, pelo amor e incentivo nas minhas escolhas e decisões. Nada seria possível sem vocês.

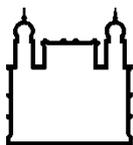
Ao Pedro pelo amor, carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos por toda ajuda e companhia durante esta trajetória, e à todos que de alguma forma fizeram parte deste processo.

À FIOCRUZ, Capes, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

Agradeço também aos amigos pelos momentos de descontração que tornaram esta caminhada mais leve.

“Every flight begins with a fall, the crow said.”  
George R. R. Martin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

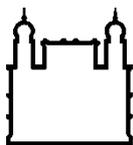
***Rhodnius prolixus*: Efeitos do triflumuron sobre a reprodução e sistema imune e caracterização de atividade proteolítica de corpo gorduroso.**

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Bianca Monteiro Henriques Santos**

Foram realizados estudos para avaliar a eficácia do triflumuron, um inibidor de síntese de quitina, na alteração da biologia reprodutiva de fêmeas adultas de *R. prolixus* por tratamento oral, tópico ou contínuo (por contato). Todos os tratamentos utilizados foram capazes de induzir altos níveis de mortalidade associados a baixos níveis de ovipostura e redução da eclosão de ovos. O composto também mostrou ter influência sobre o sistema imune humoral, através da ativação do sistema profenoloxidase, assim como também resultou em alterações da digestão e/ou excreção destes insetos. Estas observações indicam o triflumuron como um potente inibidor do desenvolvimento em fêmeas adultas de *R. prolixus* e o credenciam para o uso em programas integrados de controle vetorial de triatomíneos transmissores da doença de Chagas. Em outra etapa do trabalho, o foco foi direcionado a proteases de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus*, de onde foram caracterizadas duas proteases, uma cisteína proteinase, com propriedades catalíticas semelhantes a catepsinas L ou B, e uma metaloproteinase cujas funções, apesar de não confirmadas, mostram não fazer parte da cascata ativadora do sistema profenoloxidase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

***Rhodnius prolixus*: Effects of triflumuron on the reproduction and immune system and characterization of the proteolytic activity from the fat body.**

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Bianca Monteiro Henriques Santos**

The efficiency of triflumuron, an inhibitor of chitin synthesis, in the reproductive biology of *Rhodnius prolixus* was studied through feeding, topic application or continuous exposure. All treatments induced, in a dose dependent manner, high mortality, low oviposition and eclosion of first instar nymphs. The drug showed effects in the insect humoral immune system, activating the prophenoloxidase system, and in digestion and excretion. These observations show triflumuron as a potent developmental inhibitor in *R. prolixus* adult females and accredit it for the use in integrated control programs of hematophagous triatomines, vectors of Chagas disease. Besides that, biochemical and physiological characterization of adult male fat body proteases showed two activities, one cistein proteinase, possibly a cathepsin L or B, and a metalloproteinase, which does not participate in the activation of the prophenoloxidase cascade.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. A Doença de Chagas .....	1
1.2. O <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	3
1.3. O sistema imune dos insetos .....	4
1.4. Proteases.....	5
1.4.1. Proteases ativadoras do sistema profenoloxidase .....	6
1.5. Interação entre <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	8
1.6. O sistema reprodutor feminino de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	9
1.7. Controle de insetos .....	11
1.7.1. O Triflumuron .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1. Objetivo Geral .....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	17
3.1. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	17
3.2. Tratamento com triflumuron .....	17
3.2.1. Oral .....	17
3.2.2. Tópico .....	17
3.2.3. Contínuo.....	17
3.3. Atividade fenoloxidásica em insetos de 5º estágio tratados com triflumuron	18
3.4. Medição de oócitos e observação de morfologia interna de fêmeas tratadas com triflumuron .....	18
3.5. Pesagem de fêmeas tratadas com triflumuron.....	18
3.6. Quantificação de quitina dos tecidos de fêmeas tratadas com triflumuron	19
3.6.1. Preparação dos tecidos.....	19

3.6.2.	<i>Preparação de amostra para quantificação de quitina</i> .....	19
3.6.3.	<i>Quantificação de quitina</i> .....	20
3.7.	Atividade proteásica .....	20
3.7.1.	<i>Preparação de amostra para ensaio de atividade proteásica</i> .....	20
3.7.2.	<i>Preparação de substrato fluoróforo para ensaio de atividade proteásica</i> 21	
3.7.3.	<i>Ensaio de atividade proteásica</i> .....	21
3.8.	Ensaio preliminar de atividade proteásica em hemolinfa e corpo gorduroso 21	
3.9.	Ensaio comparativo entre amostras de intestino lavadas ou não lavadas 22	
3.10.	Efeito do congelamento .....	22
3.11.	Efeito do pH sobre atividade proteásica.....	22
3.12.	Variação da atividade proteásica após alimentação .....	22
3.13.	Ensaio de atividade proteásica sob efeito de inibidores ou ativador 23	
3.14.	Efeito de íons metálicos .....	23
3.15.	Recuperação de atividade enzimática em pH 8 após tratamento com íons metálicos.....	23
3.16.	Ensaio de atividade enzimática após eletroforese (Zimografia) ....	24
3.17.	Comparação das atividades proteásicas no corpo gorduroso e no intestino médio posterior.....	24
3.18.	Cromatografia de filtração em gel .....	25
3.19.	Ensaio de inibição nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel .....	25
3.20.	SDS-PAGE.....	25
3.21.	Ativação <i>in vitro</i> do sistema profenoloxidase de <i>R.prolixus</i> .....	26
3.21.1.	<i>Atividade fenoxidásica na hemolinfa</i> .....	26
3.21.2.	<i>Atividade proteásica de homogenato e meio de incubação</i> .....	27

3.22. Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com microorganismos .....	27
3.22.1. Manutenção de culturas de <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Macias e <i>Ustilago sp.</i>	27
3.22.2. Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Macias ou com <i>Ustilago sp.</i> .....	27
3.22.3. Atividade proteásica em corpo gorduroso e hemolinfa de insetos inoculados	28
3.23. Quantificação de proteína .....	28
3.24. Análise estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
4.1. Efeitos do triflumuron em <i>Rhodnius prolixus</i> .....	29
4.1.1. Efeitos do triflumuron sobre a reprodução e mortalidade de fêmeas de <i>R. prolixus</i> .....	29
4.1.2. Efeitos do triflumuron sobre a quantidade de quitina presente em diferentes tecidos de fêmeas <i>Rhodnius prolixus</i> .....	36
4.1.3. Efeitos do triflumuron sobre a fisiologia de <i>Rhodnius prolixus</i> ....	38
4.1.4. Efeitos do triflumuron sobre o sistema imune de ninfas de 5º instar de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	41
4.2. Caracterização da atividade proteásica presente em corpo gorduroso de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	43
4.2.1. Ensaio preliminares de atividade proteásica .....	43
4.2.2. Efeito do pH, congelamento e lavagem do tecido sobre a atividade proteásica no corpo gorduroso .....	45
4.2.3. Efeito de inibidores e de ativador na atividade proteásica .....	49
4.2.4. Efeito de íons sobre a atividade proteásica de corpo gorduroso em pH 8,0	51
4.2.5. Ensaio de atividade em gel após eletroforese em poliacrilamida (Zimografia)	54
4.2.6. Cromatografia de filtração em gel .....	57

4.2.7. Variação no padrão de atividade proteásica ao longo dos dias após a alimentação sanguínea .....	63
4.2.8. Efeitos da inoculação de microorganismos na atividade proteásica do corpo gorduroso e hemolinfa.....	65
4.2.9. Ativação in vitro do sistema fenoloxidase com laminarina .....	69
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1. Efeitos do triflumuron em <i>Rhodnius prolixus</i> .....	72
5.2. Caracterização bioquímica e fisiológica das proteases de corpo gorduroso de machos adultos de <i>R. prolixus</i> .....	78
5.2.1. Atividade proteásica ativa em pH 4,5.....	79
5.2.2. Atividade proteásica ativa em pH 8,0.....	83
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema reprodutor feminino de <i>Rhodnius prolixus</i> . Fonte: Atella et al., 2005.....	10
Figura 2. Avaliação dos efeitos do tratamento oral e tópico com 1 µL triflumuron (Starycide®) sobre o desenvolvimento dos oócitos de fêmeas adultas de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	35
Figura 3. Quantidade de quitina na carcaça de fêmeas adultas de <i>Rhodnius prolixus</i> sete dias após o tratamento oral ou tópico com 1µL de triflumuron (Starycide®)..	37
Figura 4. Efeito do tratamento tópico e oral com triflumuron (Starycide®) sobre o peso de fêmeas adultas não acasaladas de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo de 16 dias após alimentação .....	39
Figura 5. Morfologia interna ilustrativa de fêmeas de <i>Rhodnius prolixus</i> em aumento de 10x. Controle (A), tratada oralmente (B) e tratada topicamente (C), evidenciando os ovários (OV), o intestino médio anterior (IMA), o intestino médio posterior (IMP) e o intestino posterior (IP).....	40
Figura 6. Avaliação do efeito do triflumuron sobre a atividade fenoloxidase. .	42
Figura 7. Comparação da atividade proteásica em corpo gorduroso e hemolinfa.....	44
Figura 8. Efeito do pH sobre atividade proteásica no corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA.. ....	46
Figura 9. Avaliação do efeito do congelamento sobre a atividade proteolítica .....	47
Figura 10. Comparação de atividade (mU/animal) em amostras de corpo gorduroso lavada de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> em solução salina 0,9% ou não. ....	48
Figura 11. Avaliação do efeito de inibidores e ativador..	50
Figura 12. Efeito da incubação com íons metálicos.....	52
Figura 13. Recuperação de atividade proteásica com íons metálicos. ....	53
Figura 14. <i>Ensaio de atividade em gel após eletroforese</i> . ....	55
Figura 15. Comparação de atividade em corpo gorduroso e intestino médio de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> em pH 4,5 ou pH 8,0. ....	56
Figura 16. Atividade proteásica nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	58

Figura 17. Relação linear entre o logaritmo da massa molecular dos padrões ou das atividades de interesse e o parâmetro $V_e/V_0$ .....	59
Figura 18. SDS-PAGE, eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%.....	60
Figura 19. Atividade proteásica em pH 4,5 nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> incubadas com diferentes inibidores de proteases..	61
Figura 20. Atividade proteásica em pH 8,0 nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> incubadas com diferentes inibidores de proteases. ....	62
Figura 21. Perfil de atividade proteásica no corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> ao longo dos dias após alimentação sanguínea.....	64
Figura 22. Efeitos da inoculação de microrganismos sobre a atividade proteásica de corpo gorduroso.....	66
Figura 23. Efeitos da inoculação de microrganismos sobre a atividade proteásica da hemolinfa. ....	67
Figura 24. Atividade fenoxidásica em hemolinfa de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculados com suspensão <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Macias ou <i>Ustilago</i> sp ou somente PBS (*, $p < 0,05$ ).....	68
Figura 25. Atividade fenoxidásica em hemolinfa de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> incubada com homogenato de corpo gorduroso (CG) ou meio (PBS) onde este tecido foi incubado durante 30 minutos, ambos contendo ou não laminarina (Lam). ....	70
Figura 26. Atividade proteásica em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 (A) e tampão EPPS 0,2 pH 8,0 (B) em homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> e em meio (PBS) onde este tecido foi incubado por 30 minutos.....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tratamento oral com doses entre 0,1 e 10 $\mu$ L de Starycide<sup>®</sup> por mL de sangue de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%). .....30

Tabela 2. Efeito do tratamento tópico de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* com doses entre 0,1 e 10  $\mu$ L triflumuron na apresentação comercial Starycide<sup>®</sup> sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%). .....32

Tabela 3. Efeito do tratamento contínuo de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* com doses entre 0,1 e 10  $\mu$ L triflumuron na apresentação comercial Starycide<sup>®</sup> sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%). .....34

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**20E:** 20-hidroxiectidisona

**AMP:** Peptídeos antimicrobianos (Anti Microbial Peptides)

**BFU:** Benzofeniluréia

**cAMP:** Adenosina cíclica monofosfato (cyclic Adenosine Mono Phosphate)

**CG:** Corpo gorduroso

**DMSO:** Dimetilsulfóxido (Dimethyl sulfoxide)

**DOPA:** Dihidroxifenilalanina (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine)

**DDT:** Diclorodifeniltricloroetano (dichlorodiphenyltrichloroethane)

**DTT:** Ditiotreitól (Dithiothreitol)

**E64:** Trans-epoxisuccinil-L-leucylamido (4-guanidino) butano (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane)

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

**EPPS:** Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinopropanosulfônico (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid)

**HJ:** Hormônio juvenil

**HL:** Hemolinfa

**IGR:** Reguladores de crescimento de insetos (insect growth regulator)

**IMA:** Intestino médio anterior

**IMP:** Intestino médio posterior

**IP:** Intestino posterior

**MBTH:** Monohidrato de HCl 3-metil-benzo-2-tiazolona hidrazona

**MCA:** Ácido metilcoumarínico (metilcoumarin acid)

**OV:** Ovários

**PAMP:** Padrão molecular associado a patógeno (Pathogen Associated Molecular Pattern)

**PAP:** Proteinase ativadora de profenoloxidase (Prophenoloxidase Activating Protein)

**PBS:** Salina Tamponada em Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (Phenylmethanesulfonyl fluoride)

**PO:** Fenoloxidase (Phenol Oxidase)

**PPAF:** Fator ativador de profenoloxidase (ProPhenoloxidase Activating Factor)

**PPO:** Profenoloxidase (ProPhenolOxidase)

**SDS:** Dodecilsulfato de sódio (Sodium Dodecyl Sulphate)

**PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis)

**SEM:** Erro padrão da média (Standard error of the mean)

**WHO:** Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

**Z-Phe-Arg-MCA:** Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, Hydrochloride

## 1. INTRODUÇÃO

*Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) é uma das espécies vetoras mais eficientes do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico causador da Doença de Chagas, além de ser também vetor do *Trypanosoma rangeli*.

Assim como outros triatomíneos, o *R. prolixus* é um inseto hematófago em ambos os sexos e em todos seus estágios imaturos, de hábitos principalmente noturnos. Seu desenvolvimento se classifica como hemimetábolo, devido à sua metamorfose incompleta, já que suas características permanecem relativamente constantes (Wigglesworth 1934). Através de ecdises, o *R. prolixus* passa por cinco estágios ninfais, chegando ao estágio adulto após a 5ª muda.

A ecdise em *R. prolixus* ocorre em intervalos regulares após a alimentação, que tem caráter não contínuo. Dessa forma, apenas um repasto sanguíneo é capaz de desencadear a muda, agindo como regulador de processos metabólicos e hormonais (Buxton 1930, Wigglesworth 1934 e Lent 1946). Há a liberação do exoesqueleto seguido pelo crescimento do inseto, cuja regulação se dá por dois hormônios, a ecdisona e o hormônio juvenil (Riddiford 1994 e Riddiford et al. 2001).

A espécie provavelmente evoluiu a partir de formas ancestrais de outros Rhodniinis na região da Amazônia ou próximo a mesma, se tornando altamente adaptado a ambientes domésticos e peridomésticos, principalmente na região dos llanos na Venezuela e na Colômbia (Schofield e Galvão 2009). Acredita-se que a espécie não seja inicialmente originária da região da cidade de San Salvador, onde foi primeiramente encontrada em 1915 (Neiva 1915). Ela foi provavelmente acidentalmente liberada em El Salvador, de onde se propagou para Guatemala, Honduras, Nicarágua, Costa Rica e sul do México, o que explicaria sua distribuição geográfica descontínua, porém, vasta (Zeledón 2004).

Além disso, o *R. prolixus* vem sendo usado como modelo de estudo fisiológico, além de estudos com abordagens epidemiológica e parasitológica. Isso se deve à sua tolerância a processos cirúrgicos e por seus processos reprodutivos e de desenvolvimento dependerem de apenas do sinal iniciado pela hematofagia. Além disso, é de fácil manutenção em laboratório e tem uma grande importância na transmissão da Doença de Chagas (Davey 2007).

### 1.1. A Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma endemia genuinamente americana que acomete milhões de latino-americanos sem perspectiva imediata de tratamento efetivo (WHO, 2002). A doença humana foi primeiramente descrita por Carlos Chagas no município de Lassance em Minas Gerais (Chagas 1909). Chagas (1909) não só a descobriu, como também identificou seus processos patogênicos. Ele também identificou o agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, os insetos vetores e alguns hospedeiros silvestres. Emanuel Dias (1934) posteriormente completou a descrição da enfermidade com a fase do ciclo biológico deste protozoário no inseto vetor.

Desde sua primeira descrição em 1909, a importância da tripanossomíase americana foi destacada por Chagas, que já em 1911 buscava chamar a atenção para a vasta disseminação da doença na América do Sul (Chagas 1911). Apesar disso, no início dos anos 90 a Doença de Chagas foi citada pelo World Bank como a parasitose mais séria na América Latina e com impactos socioeconômicos maiores que os impactos das outras infecções parasitárias combinados (World Bank 1993). Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (WHO) estimou que entre 16 e 18 milhões de pessoas estariam infectadas, incluindo ainda mais 100 milhões em risco de infecção (WHO 1991).

Devido a iniciativas em larga escala de controle da transmissão vetorial da doença, assim como o melhoramento da triagem do sangue proveniente de doações, as estimativas são de que os números baixaram para em torno de 11 milhões ao final do século XX (Schmunis 1999). No entanto, ainda não é possível afirmar que a transmissão da doença foi eliminada, já que há ainda elevados números de casos de transmissão vetorial. Além do mais, muitos dos locais endêmicos ainda não desenvolveram programas de intervenção e vigilância adequados, fazendo com que haja o risco de ressurgência ou aumento da transmissão, principalmente em casos de colonização de novas áreas onde a doença não é considerada endêmica (Dias et al. 2002).

O agente etiológico da Doença de Chagas, o parasita *T. cruzi*, compreende um grupo de parasitas circulantes entre humanos, insetos vetores e animais reservatórios silvestres e domésticos, apresentando diferenças morfológicas e funcionais dependendo do seu estágio dentro do ciclo evolutivo. Seu ciclo evolutivo é complexo, apresentando formas epimastigotas no intestino médio do inseto vetor assim como amastigotas dentro das células do hospedeiro mamífero. Além disso, há também a forma tripomastigota metacíclica no vetor e tripomastigotas sanguíneas no

mamífero que são infectivas, porém, sem capacidade reprodutora (Garcia e Azambuja 1991).

## 1.2. O *Trypanosoma rangeli*

O *T. rangeli* é, assim como o *T. cruzi*, um tripanossomatídeo encontrado em humanos, em triatomíneos e em outros animais domésticos ou silvestres considerados reservatórios. A espécie pertence ao subgênero *Herpetosoma* e, em contraste com o *T. cruzi*, é transmitido através da picada de seu hospedeiro invertebrado, já que é capaz de invadir e sobreviver na hemocele, se diferenciar e formar infectantes na glândula salivar do mesmo, como foi visto por Watkins em 1971.

Apesar de conseguirem danificar a superfície do epitélio do intestino médio do triatomíneo, por onde atravessam se movendo pelo citoplasma até atingir a região basal para alcançar a hemocele, como descrito por Oliveira e Souza (2001), a taxa de penetração é baixa, figurando menos que 10%, segundo Hecker et al. (1990).

Porém, Machado et al. (2001) observou que dos *R. prolixus* permitidos a se alimentarem em camundongos infectados com *T. rangeli* cepa Macias, em torno de 33% apresentaram infecção na hemolinfa e, entre esses, 100% apresentaram infecção na glândula salivar. Considerando que os valores variaram de acordo com a combinação entre cepa e espécie de triatomíneo, a habilidade de invadir a hemocele depende tanto deste quanto da cepa do *T. rangeli* em questão, devido à complexa relação entre o parasito e o vetor. Em parte este fato se explica pela heterogeneidade das cepas isoladas em diferentes regiões geográficas, mas também há o aspecto da coevolução destes organismos, já que a atividade tripanolítica já foi descrita na hemolinfa destes insetos por Gregório e Ratcliffe (1991) e Mello et al. (1995).

Quando infectados com *T. rangeli* em suas glândulas salivares, estes insetos apresentam menor quantidade de proteínas totais em suas glândulas e menor atividade anticoagulante (Garcia et al. 1994). Além do mais, estes insetos perfuram a pele do hospedeiro mais vezes e são capazes de sugar menos sangue e em menor velocidade, quando comparados a insetos não infectados (Garcia et al. em 1994), o que facilitaria a transmissão do *T. rangeli* para o hospedeiro vertebrado.

Desta maneira, o *T. rangeli* tem sido estudado no contexto epidemiológico da doença de Chagas, uma vez que é frequentemente encontrado infectando humanos

na América Latina, mesmo que esta espécie seja apatogênica para o hospedeiro vertebrado (Guhl e Vallejo 2003). Sua importância se dá devido à possibilidade de produzir infecções mistas nos vetores em algumas áreas do continente, dificultando a diferenciação morfológica (Vallejo et al. 1988). Nos mamíferos hospedeiros, o *T. rangeli* pode gerar reações sorológicas cruzadas, complicando o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* (Guhl e Marinkelle 1982, Guhl 1985 e 1987) com consequências práticas na epidemiologia da tripanossomíase americana.

### 1.3. O sistema imune dos insetos

Devido à sua capacidade de invasão da hemocele do inseto, o *T. rangeli* desenvolveu inúmeras maneiras de evadir o sistema imune do vetor invertebrado, que é, de forma geral, semelhante ao sistema imune inato de vertebrados, já que não apresenta resposta imune adquirida e, portanto, também não possui linfócitos T ou B (Marmaras e Lampropoulou 2009).

Além da cutícula quitinosa que age como barreira física, impedindo a invasão de microrganismos (Stanley et al. 2009), os insetos possuem mecanismos de respostas humoral e celular, que dependem de receptores capazes de reconhecer compostos específicos na superfície de microrganismos ou produzidos por eles, como padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs). Os PAMPs mais conhecidos são os componentes de parede celular, como os lipossacarídeos de bactérias Gram-negativas, o ácido lipoteicóico e os peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas,  $\beta$ -1,3-glucanas de fungos e glicosilfosfatidilinositol de protozoários (Ashida, 1990; Teixeira et al. 2002). O reconhecimento acontece através de receptores conservados evolutivamente, e entre estes os mais conhecidos pertencem a família Toll (Lazzaro 2008; Marmaras e Lampropoulou 2009).

A resposta celular é mediada por hemócitos circulantes e inclui encapsulação, formação de nódulos, microagregação de hemócitos e fagocitose de patógenos, quando o microrganismo é internalizado e destruído pela célula fagocítica (Lavine e Strand 2002). A nodulação se inicia com a degranulação de hemócitos e ativação do sistema profenoxidase (Ratcliffe e Gagen 1976; Söderhäll, 1999), seguida por adesão dos nódulos nos órgãos do inseto que culmina com a atividade fagocítica dos plasmatócitos (Ratcliffe e Rowley 1979).

Já a imunidade humoral inclui, além de fatores de reconhecimento de microrganismos invasores; peptídeos antimicrobianos (AMPs). São pequenos

peptídeos catiônicos produzidos principalmente pelo corpo gorduroso e liberados para hemolinfa (Bulet et al. 1999), como atacinas, cecropinas e, as mais importantes, defensinas. Também participam do sistema imune inato espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio reativo, prostaglandinas, como os eicosanóides, enzimas do tipo lisozimas e o sistema profenoloxidase (PPO).

É importante considerar que os dois sistemas, humoral e celular, não agem de maneira isolada. Acredita-se que proteínas secretadas na hemolinfa têm ação opsonizante, melhorando a capacidade de ligação ao microrganismo do hemócito, agindo assim como uma conexão entre os sistemas humoral e celular (Strand 2008).

A enzima fenoloxidase (PO) é liberada na forma de zimogênio (profenoloxidase, ou PPO), cuja ativação é feita por uma serina protease, conhecida como protease ativadora de profenoloxidase (PAP) ou fator ativador de profenoloxidase (PPAF). O sistema PPO é ativado através do reconhecimento de PAMPs que leva a clivagem proteolítica de PPO produzindo PO, e esta catalisa a oxidação de tirosina em dihidroxifenilalanina (DOPA), que sofre nova oxidação resultando em compostos altamente reativos e tóxicos, como quinonas. As quinonas são precursoras do polímero de melanina, que é depositada na superfície de locais de ferimentos, parasitos encapsulados e nódulos de hemócitos produzindo uma barreira física que impede ou retarda o crescimento do microrganismo invasor (Li et al. 2003; Cerenius e Söderhäll 2004; Cerenius et al. 2008). Além disso, o processo de melanização é crucial para o processo de pigmentação e esclerotização da cutícula após a ecdise (Cerenius & Söderhäll, 2004; Andersen, 2005).

Todos esses processos são sujeitos a regulação hormonal e dependem do estágio em que o inseto se encontra. Em *R. prolixus* a regulação da cascata PO pelo hormônio juvenil já foi demonstrada por Nakamura et al. em 2007 e em 2010, Genta et al. demonstraram que a PO é expressa principalmente no intestino médio, no corpo gorduroso e na hemolinfa destes insetos, estando sob controle da ecdisona nos últimos dois tecidos.

#### 1.4. Proteases

As proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas entre os aminoácidos de proteínas e pertencem ao grupo das peptidases (hidrolases peptídicas EC 3.4). Podem ser do tipo endopeptidases (EC 3.4.21–24), ou seja, capazes de quebrar as ligações entre aminoácidos não terminais. Estas se dividem

em quatro principais subclasses segundo o resíduo catalítico essencial localizado em seu sítio ativo, que é a base para seu mecanismo catalítico. Esses são passíveis de identificação através do uso de reagentes específicos e do efeito que o pH tem sobre a atividade.

As serina proteinases (EC 3.4.21) possuem uma serina e uma histidina em seu sítio ativo. As cisteína proteinases (EC 3.4.22) têm um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e são inibidas por compostos constituídos por mercúrio. Aspártico proteinases (EC 3.4.23) tem pH ótimo abaixo de 5 devido ao envolvimento de um resíduo carboxila na catálise. Metaloproteinases (EC 2.3.24) necessitam de um íon metálico no centro catalítico.

Incluídas entre as peptidases estão também as exopeptidases capazes de hidrolisar somente o aminoácido amino-terminal (aminopeptidases, EC 3.4.11) ou carboxi-terminal (carboxipeptidases, EC 3.4.16–18) e também as dipeptidil hidrolases (EC 3.4.13), cuja atividade é específica para dipeptídeos (Yoshimi Yamamoto e Takahashi 1993; Terra e Ferreira 2005).

Em *R. prolixus*, o MEROPS (banco de dados de peptidases) lista até o momento seis proteases descritas, duas cisteína proteinases pertencentes ao clã CA e família C1, três serina proteinases, uma pertencente ao clã PA e família S1 e duas ao clã SR e família S60, e uma treonina proteinase pertencente ao clã PB e à família T1.

#### 1.4.1. *Proteases ativadoras do sistema profenoloxidase*

Devido à natureza tóxica dos produtos finais do sistema profenoloxidase (PPO), sua ativação é altamente regulada tanto espacialmente quanto temporalmente (Cerenius et al. 2008). A ativação inicial do sistema se dá através da ligação de proteínas de reconhecimento do inseto aos PAMPs. Porém, a ativação completa da via, com a clivagem da profenoloxidase (zimógeno) em fenoloxidase, depende de proteases, as quais se tornam ativas na presença de produtos provenientes de microrganismos e cuja atividade pode depender de outros fatores, como os inibidores de proteases (Cerenius e Söderhäll 2004).

A ativação que se dá por uma cascata de proteases específicas vem sendo caracterizada e seus componentes purificados em alguns insetos, como, por exemplo, em *Bombyx mori* cuja enzima terminal da cascata de ativação foi descrita como uma mistura de isoenzimas compostas de cadeias leves e pesadas (Satoh et al. 1999). Assim como Aspan e Söderhäll, em 1991, no crustáceo *Pacifastacus*

*leniusculus* já haviam observado quatro proteases ativadas na presença de  $\beta$ -1,3-glucana, sendo que duas eram capazes de ligar à profenoloxidase de forma específica

Em larvas do coleóptera *Holotrichia diomphalia*, Lee et al. (1998a, 1998b) conseguiram identificar duas proteases terminais de ativação do sistema, sendo que quando a profenoloxidase era incubada com uma ou outra a ativação não era observada, indicando que para que o sistema fosse ativado era necessária a presença de ambas as enzimas. Mais recentemente o mesmo tipo de atividade proteolítica foi descrita em outros insetos, como nas larvas das mariposas *Manduca sexta* (Ji et al. 2004; Felföldi et al. 2011) e *Samia cynthia ricini* (Bao, Yamano, and Morishima 2007) e, mais recentemente, em *Drosophila melanogaster* (An et al. 2013). Em todos os casos as atividades têm sido caracterizadas como serina proteases, porém, o mesmo estudo e caracterização ainda não foi realizado em *R. prolixus* ou outras espécies de triatomíneos.

No entanto, em insetos as atividades proteolíticas não estão restritas à ativação do sistema profenoloxidase. Também são comumente encontradas no trato digestivo, assim como na hemolinfa e no corpo gorduroso, por exemplo. Em Heteroptera, diferentemente do que é geralmente observado nos demais insetos, não há proteases tipo tripsina no intestino. Dessa forma, a digestão de proteínas se dá por cisteína e aspártico proteases principalmente. Estima-se que a presença dessas enzimas se deve a perda das enzimas tipo tripsina após adaptação a alimentação de seiva ocorrida em Homoptera, os prováveis ancestrais dos hemípteros, e a subsequente readaptação a alimentação proteica em alguns destes insetos, através da mobilização das enzimas lisossomais (revisado por Terra et al. 1994).

Da mesma forma, enzimas tipo cisteína proteinases são comumente encontradas em insetos, dentre elas as catepsinas L são descritas normalmente ligadas ao processo de remodelamento do corpo gorduroso durante início da muda. Recentemente, Zhai e Zhao (2012) descreveram o envolvimento de catepsinas L reguladas por 20-hidroxiecdisona na transformação de granulócitos em megagranulócitos para a entrada destas células no corpo gorduroso de *Helicoverpa armigera* durante o processo de degradação deste tecido através de apoptose.

Já as catepsinas B também são descritas durante o processo de muda e metamorfose, como descrito em *B. mori* por Shiba et al. (2001) e por Lee et al. (2009). Essas enzimas estão normalmente envolvidas na morte celular programada

das células do corpo gorduroso durante a muda dos insetos. Porém, estão também envolvidas na degradação de proteínas do vitelo durante o processo de embriogênese na mesma espécie (Yamamoto e Takahashi 1993), assim como o mesmo já havia sido sugerido em *Drosophila* (Medina et al. 1988) e em *R. prolixus* (Oliveira et al.1989).

#### 1.5. Interação entre *Rhodnius prolixus* e *Trypanosoma rangeli*

O triatomíneo se torna infectado pela ingestão de sangue de animal infectado com *T. rangeli*, em geral, de roedores silvestres. Uma vez ingerido, no trato digestivo, o parasita se desenvolve aumentando a população, em intensa divisão como epimastigotas (Vallejo, 1998). Uma das características biológicas relevantes desse flagelado é a capacidade de invasão da hemocele, através da penetração do parasito na parede epitelial do intestino médio, como citado anteriormente. Livre na hemolinfa, ou associado a células, continua a multiplicação e finalmente invade as glândulas salivares onde se diferencia para tripomastigota metacíclico. A duplicação do *T. cruzi* se restringe ao trato digestivo (intestino médio) sendo que a eliminação das formas infectantes ocorre através das fezes, após passagem pelo intestino posterior e metaciclogênese. Em trabalhos recentes Azambuja et al. (2004; 2005) mostraram que a *Serratia marcescens* isolada da microbiota bacteriana intestinal de *R. prolixus*, era capaz de lisar epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Posteriormente, os autores associaram o efeito lítico à adesão da bactéria a membrana do parasita por intermédio do reconhecimento de uma adesina denominada fimbriae Tipo I manose sensível (Castro, Seabra, et al. 2007; Castro, Moraes, et al. 2007).

Azambuja et al. (1991; 1999); Gomes et al. (1999); Garcia et al. (2004a; 2004b) demonstraram a capacidade do *T. rangeli* de alterar a resposta imunológica de *R. prolixus* quando epimastigotas obtidos de cultura eram inoculados na hemocele ou introduzidos pela alimentação, destacando-se dentre as respostas de defesa alteradas, o sistema de melanização e de formação de nódulos.

A partir da década de 90, alguns autores demonstraram o potencial de inúmeros inibidores da biossíntese de eicosanóides sobre as respostas de defesas celulares e humorais em insetos inoculados com bactérias (Miller et al. 1994; Downer et al. 1997; Miller e Stanley 2001). Garcia et al (2004a) demonstraram que dexametasona, um inibidor de fosfolipase A2, indometacina, um inibidor da ciclooxigenase e um inibidor não específico de lipoxigenase inibem a formação de

nódulos e bloqueiam a ativação do sistema profenoloxidase em *R. prolixus* desafiados com *T. rangeli*, o que acarreta o aumento da infecção por parasitas nos insetos tratados. O ácido araquidônico resultou na diminuição da infecção pelo parasito *T. rangeli* quando o composto era injetado em insetos tratados previamente com dexametasona, acarretando, portanto, na reversão da imunodepressão (Garcia et al. 2004a)

Além do mais, Garcia et al. (2004a) demonstraram que as vias dos eicosanóides estão envolvidas nas reações de microagregação dos hemócitos em hemolinfa de *R. prolixus*, e pesquisas sobre as interações entre este triatomíneo e o protozoário *T. rangeli* ( Garcia et al. 2004b) sugerem que a infecção oral por esses parasitas de alguma maneira inibe a liberação de ácido araquidônico para a biossíntese dos eicosanóides. Estes autores encontraram que o tratamento de ninfas de *R. prolixus* com ácido araquidônico no terceiro dia pós-infecção aumentava as reações de microagregação devido à presença do parasita, diminuindo o número de parasitas em circulação.

#### 1.6. O sistema reprodutor feminino de *Rhodnius prolixus*

O ovário do *R. prolixus* é do tipo telotrófico meroístico, cujas células nutridoras ficam confinadas ao ápice de cada ovaríolo conectadas aos oócitos em desenvolvimento por cordões tróficos fibrilares nutritivos (Wigglesworth 1972) (Figura 1). Sendo composto por dois hemi-ovários conectados a um oviduto comum, cada hemi-ovário é formado por sete ovaríolos. Durante a oogênese os folículos brotam do trofário, sofrem crescimento prévitelogênico através de transferência citoplasmática e então começam a vitelogenese, quando tem seus volumes aumentados por absorção de proteínas do vitelo (Atella et al. 2005). A vitelogenese é um processo que envolve a produção de proteínas precursoras do vitelo, como a vitelogenina, por um tecido extra-ovariano (Postlethwait e Giorgi 1985; Raikhel and Dhadialla 1992), o corpo gorduroso, e secreção destas na hemolinfa (Raikhel et al. 1990, Tufail et al. 2004). No caso do *R. prolixus*, a vitelogenina também é produzida por células foliculares e células do trofário (Atella et al. 2005).

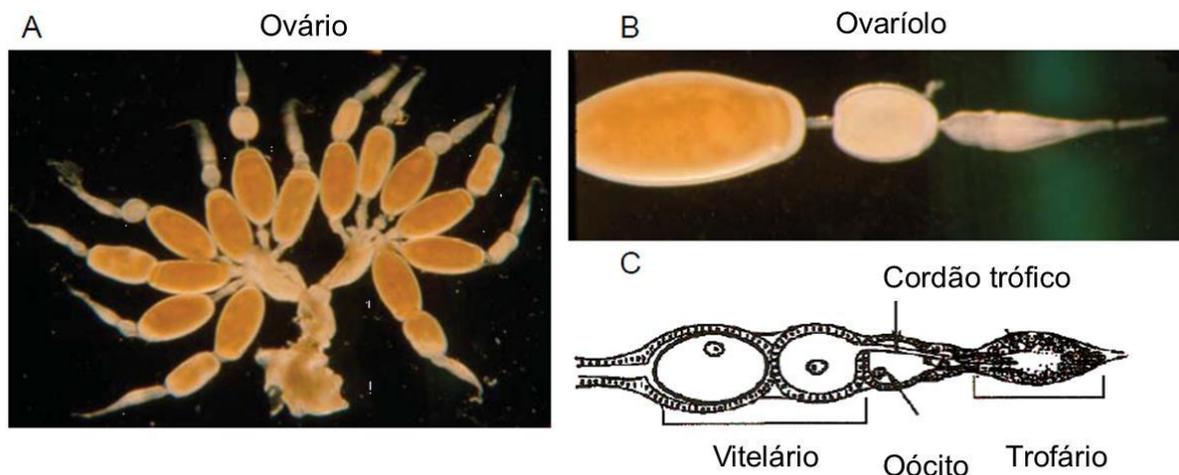


Figura 1. Sistema reprodutor feminino de *Rhodnius prolixus*. Fonte: Atella et al., 2005.

O vitelo é composto por proteínas, lipídios, açúcares e outros componentes armazenados dentro do oócito, principalmente na forma de vitelina. Esta, durante a embriogênese, será mobilizada para o desenvolvimento do embrião e, em alguns casos, da ninfa de primeiro estágio (Postlethwait e Giorgi 1985, Oliveira et al. 1989; Atella et al. 2005). Após a vitelogênese, há a síntese do córion e os oócitos maduros são mantidos no cálice até fertilização e oviposição (Bouts et al. 2007).

A regulação da oogênese em insetos pelo hormônio juvenil foi primeiramente relatada por Wigglesworth em 1936. Coles (1965) demonstrou a influência deste hormônio sobre o corpo gorduroso para induzir a produção de vitelogenina em *R. prolixus*, agindo também sobre as células foliculares. Estas, abrindo espaços que permitiam que a vitelogenina entrasse em contato com o oócito (Davey 1982). O hormônio juvenil (HJ) é produzido no *corpus allatum*, o qual é controlado pelo sistema nervoso. Em fêmeas adultas, o HJ é secretado em resposta à estimulação por cópula através de fatores secretados pela espermateca (Mundall e Engelmann 1977; Davey 1987) e, também em ninfas, à distensão abdominal gerada durante a alimentação (Davey 1987), quando há ativação de receptores associados aos músculos intersegmentares (Anwyl 1972) ou aos músculos do tergito (Maddrell 1964) levando a liberação do hormônio protoracicotrópico. Porém, evidências sugerem que a presença de proteínas provenientes da alimentação também é necessária para induzir a oogênese (Garcia e Azambuja, 1985).

Além do hormônio juvenil, há evidências de que a oogênese é controlada por eicosanóides, através da modulação dos níveis de cAMP nos folículos ovarianos (Medeiros et al. 2002; 2009). Sua ação regulatória do acúmulo de vitelo juntamente

com seu papel nas respostas imunes (Garcia et al. 2004b; Figueiredo et al. 2008; Merchant et al. 2008) indicam um possível ligação entre as cascatas de sinalização relacionadas à gametogênese e ao sistema imune (Medeiros et al. 2009). Por outro lado, alguns autores consideram a ação da ecdisona como essencialmente antagônica à ação do hormônio juvenil (Lezzit e Gilbert 1969), sendo capaz de inibir a oogênese e a oviposição de forma dose-dependente (Garcia et al. 1979)

### 1.7. Controle de insetos

Os inseticidas começaram a ser desenvolvidos com o objetivo de aumentar o aproveitamento e a qualidade das safras com o controle de insetos associados à agricultura, à necessidade do controle de uma variedade de insetos vetores de doenças (Sparks 2013).

A pesquisa relacionada ao desenvolvimento de novos compostos inseticidas remete ao final da 2ª Guerra Mundial com o surgimento dos primeiros inseticidas orgânicos sintéticos, os organoclorados, como o DDT, e os organofosforados. A partir deste ponto, em 1960 houve o pico na produção de inseticidas, seguido por uma contínua redução nas décadas seguintes devido ao aumento da regulamentação sobre a segurança e preocupação com o meio ambiente, assim como o surgimento de insetos resistentes aos compostos usados (Sparks 2013).

Dentre os inseticidas clássicos da segunda geração, sendo a primeira composta por arsênico e cianeto de hidrogênio, se encontram os pioneiros organoclorados e organofosforados, cujos modos de ação incluem o desequilíbrio entre os íons de sódio e potássio nos axônios e a inibição da enzima colinesterase, respectivamente. Além destes, existem os carbamatos que, assim como os organofosforados, inibem a colinesterase, resultando em uma contínua ativação do sistema nervoso devido à acumulação de acetilcolina. E também os piretróides, que agem mantendo abertos os canais de sódio presentes nas membranas neuronais (O'Brien 1966; Boyer et al. 2012).

Inclusive foi através da aplicação doméstica de piretróides que se deu o desenvolvimento do programa de redução da transmissão vetorial da Doença de Chagas nos países do Cone Sul da América do Sul. Isso ocorreu pela eliminação do *Triatoma infestans*, um dos mais importantes vetores da doença devido à sua alta prevalência em ambientes domésticos (Schofield e Dias 1999). O sucesso do programa chegou a resultar na declaração formal em 2006 da erradicação da

transmissão da tripanossomíase americana por *T. infestans* no Brasil (Schofield et al. 2006).

Com o crescimento da necessidade do desenvolvimento de programas de manejo integrado de pragas, surgiu a necessidade da criação de alternativas menos tóxicas ao homem, aos animais não alvos e ao ambiente. Este controle integrado inclui vigilância entomológica, redução de criadouros, controle químico e biológico, manejo da resistência a inseticidas, assim como campanhas de educação voltadas à população (Rose 2001).

Neste contexto surgiram os reguladores de crescimento de insetos (IGRs, insect growth regulators), que são compostos que agem interferindo no desenvolvimento dos insetos. Os IGRs podem ser agonistas de ecdisteróides, análogos a hormônio juvenil ou inibidores de síntese de quitina. Têm alta seletividade por causa de seu estreito espectro de atividade, baixa toxicidade a mamíferos e, portanto, são compatíveis com o manejo integrado (Ayalew 2011). No entanto, ainda representam uma pequena fatia do mercado de inseticidas, figurando apenas 5% do mercado global (Sparks 2013).

Os agonistas de ecdisteróides levam ao surgimento de um inseto juvenóide, já que criam um hiperecdisonismo, levando a efeitos e sintomas de uma ecdise precoce, incluindo a inibição da alimentação. A produção de juvenóides, portanto, evita danos maiores às plantas ou novas picadas a hospedeiros vertebrados. Os análogos a hormônio juvenil, assim como o próprio hormônio, impedem a metamorfose do inseto, ou seja, impede a muda do estágio de ninfa para adulto. Já os inibidores de síntese de quitina afetam a capacidade do inseto de produzir quitina, e incluem dois tipos: buprofezina/ciromazina e as benzofeniluréias (BFUs), dentre as quais se enquadra o triflumuron (Dhadialla et al. 2005).

#### 1.7.1. O Triflumuron

O triflumuron (1-(2-clorobenzoil)-3-(4-trifluoromethoxi fenil)ureia) é um dos compostos inibidores de síntese de quitina classificados como benzofeniluréias (BFUs). As BFUs foram descobertas por acidente durante pesquisa por herbicidas na empresa farmacêutica holandesa Philips-Duphar. O composto inicial apresentou baixa atividade herbicida, no entanto, os insetos que se alimentaram das plantas tratadas apresentaram dificuldades durante a ecdise. A partir deste ponto houve uma intensa movimentação de pesquisa, resultando na primeira BFU comercial, o

diflubenzuron, um análogo do triflumuron (Graf 1993). Por seu alvo ser a quitina componente do exoesqueleto do inseto, ao invés do sistema nervoso como era comum nos inseticidas clássicos, acreditou-se que seria menos provável o surgimento de resistência a este tipo de composto (Doucet e Retnakaran 2012).

A quitina é um polissacarídeo composto por resíduos  $\beta$ -1,4-N-acetil- D-glicosamina que se apresenta em duas formas cristalinas:  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina. Existe ainda uma terceira formada por uma combinação de  $\alpha$  e  $\beta$ . As cadeias  $\alpha$  são arranjadas de forma anti-paralelas, sendo assim muito estáveis, e são as formas mais abundantes, estando presente na cutícula dos insetos, no exoesqueleto de outros artrópodes e nas paredes celulares de fungos (Lotmar e Picken, 1950; Carlstrom 1957; Rudall e Kenchington, 1973).

A síntese de quitina é um processo complexo que ocorre nas células polarizadas da epiderme, por onde os precursores entram pela lâmina basal a partir da hemolinfa, sendo que a polimerização ocorre de fato na membrana plasmática apical. A biossíntese ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, e a fibrila de quina sofre exocitose e é montada nesta superfície (Doucet e Retnakaran 2012).

De forma geral, os inibidores da síntese de quitina têm ação principalmente sobre as formas jovens dos insetos, tornando-as incapazes de realizar a próxima muda em razão de deficiências em sua nova cutícula (Tunaz e Uygun 2004). Além do exoesqueleto, outras estruturas quitinosas também podem ser afetadas, como a matriz peritrófica e os ovos (Lim e Lee 1982; Soltani 1984; Soltani e Soltani-Mazouni 1992). Além da interferência na síntese de quitina, as BFUs provocam uma série de efeitos secundários como a fago inibição (Parween 1998), redução da longevidade (Vasuki 1992), más formações anatômicas (Vasuki e Rajavel 1992), menor atividade de vôo e comprometimento da prole (Amir e Peveling 2004).

Em outros estudos, observou-se que culicídeos vetores tratados ingeriam menos sangue que os não tratados. Em fêmeas de culicídeos alimentadas diretamente com o BFU, foi observada redução da ovoposição, além de menor viabilidade dos ovos (Vasuki 1999). O mesmo foi observado em lepidópteros por Sáenz-de-Cabezón et al. (2006). Mello et al. (2008) demonstrou que no caso do *R. prolixus*, o triflumuron resultou em forte atividade inibidora do desenvolvimento em ninfas de 5<sup>o</sup> estágio, aumentando a mortalidade e inibindo a muda dos insetos sobreviventes para adulto, de forma dose-dependente.

Apesar da atividade deste composto e de seus análogos já ter sido largamente testada e descrita, o seu modo de ação é incerto. Entre os inibidores de síntese de quitina, apenas alguns tiveram o modo de ação esclarecido, dentre estes estão os nucleotídeos de pirimidina que agem interferindo no sítio catalítico da quitina sintase. Acredita-se que as benzofeniluréias tenham um modo de ação semelhante, bloqueando algum passo pós catalítico da síntese de quitina (Van Leeuwen et al. 2012).

Cohen e Casida (1982) descreveram que as benzofeniluréias inibem de forma eficiente a incorporação de açúcares na cadeia de quitina em formação, porém, apesar de serem capazes de inibir a síntese em insetos, culturas de tecido e de células, estes compostos não tem a mesma atividade em sistemas sem células (Cohen e Casida 1980; Mayer et al. 1980; Cohen 1985; Zimoch et al. 2005). Esta observação levou a conclusão de que a ação está realmente relacionada ao processo pós catalíticos (Merzendorfer 2013).

Desta forma, é possível que a explicação esteja no transporte de N-acetilglucosamina através das membranas (Mitsui et al 1984), na atividade enzimática de degradação de quitina ou da esclerotização da cutícula (Ishaaya e Casida 1974; Ishaaya e Ascher 1977), ou no controle hormonal das atividades de transcrição (Mitlin et al. 1977; DeLoach et al. 1981; Soltani 1984)

Merzendorfer (2012) levantou a possibilidade de que alterações na composição proteica da cutícula, assim como a perda de microfibrilas de quitina poderiam contribuir para as mudanças estruturais da quitina na presença de benzofeniluréias. No entanto, recentemente Abo-Elghar et al. (2004) observou que as benzofeniluréias tem semelhanças estruturais com a sulfoniluréia e, portanto, teria ação sobre os receptores de sulfoniluréia, cuja função regulatória tem ação inibitória em canais de potássio, levando a abertura de canais de cálcio.

Abo-Elghar et al. 2004 viram ainda que a glibenclamida, outro composto capaz de se ligar ao receptor de sulfoniluréia e usado no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (Akasaka et al. 2006), tem atividade inseticida semelhante àquela observada em insetos tratados com diflubenzuron.

Portanto, a alteração dos canais de potássio causada por estes ligantes poderia levar a mudanças no potencial de membrana e na homeostase de cálcio, fazendo com que a secreção de proteínas durante a formação de cutícula seja afetada (Merzendorfer 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

O estudo de novos compostos que afetam a sobrevivência dos triatomíneos é de grande relevância devido ao caráter epidemiológico da doença de Chagas, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, uma infecção que acomete cerca de 8 milhões de pessoas no mundo. No Continente Americano, *Rhodnius prolixus* tem sido incriminado como um dos principais transmissores do parasito, além de ser o principal vetor do *Trypanosoma rangeli*.

O presente projeto teve o intuito de ampliar o conhecimento da fisiologia da reprodução de *R. prolixus* por meio de tratamentos com triflumuron bem como compreender a modulação do sistema PPO causada pelo tratamento com o composto, assim como desvendar elementos básicos da biologia e da fisiologia deste inseto.

A manipulação do sistema imunológico pelo tratamento dos triatomíneos com drogas poderá servir de modelo de estudo para controle do desenvolvimento do inseto e do parasito, uma vez que algumas drogas, tais como os inibidores da síntese de quitina, apresentam-se como promissoras alternativas aos inseticidas clássicos. Da mesma forma, a caracterização bioquímica das enzimas de corpo gorduroso poderá embasar novos estudos sobre a fisiologia deste inseto.

Finalmente, os resultados gerados neste projeto poderão ser aplicados em investigações voltadas ao controle de outros insetos vetores.

### 3. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do triflumuron sobre a sobrevivência, reprodução e sistema profenoxidase de *R. prolixus* e caracterizar as atividades proteolíticas de corpo gorduroso destes insetos.

#### 2.2. Objetivos Específicos

Determinar os efeitos do triflumuron na mortalidade de fêmeas de *R. prolixus*, na postura e eclosão de ovos;

Quantificar o efeito do triflumuron sobre a quantidade de quitina presente em diferentes tecidos de fêmeas de *R. prolixus*;

Verificar o efeito do triflumuron no peso e morfologia intestinal de fêmeas adultas de *R. prolixus*;

Observar os efeitos do triflumuron sobre o sistema profenoxidase de ninfas de 5<sup>o</sup> instar de *R. prolixus*;

Caracterização bioquímica parcial da atividade proteásica em corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus*;

Avaliar a influência da alimentação sanguínea e da inoculação de *T. rangeli* cepa Macias e *Ustilago* sp. na atividade proteolítica de corpo gorduroso.

## 4. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI), localizado no Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz – Rio de Janeiro. O triflumuron foi utilizado em sua forma comercial Starycide® SC 480 produzido pela Bayer, composto por 48% de ingrediente ativo.

### 3.1. *Rhodnius prolixus*

Os experimentos foram realizados com machos adultos, fêmeas adultas, ou ninfas de 5<sup>o</sup> instar, escolhidos aleatoriamente, provenientes da colônia mantida pelo Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI), localizado na Fiocruz, RJ. Neste local, os insetos são mantidos em temperatura controlada de aproximadamente 27°C e são alimentados com sangue desfibrinado de coelho periodicamente através de um aparato de alimentação artificial, segundo a metodologia de Azambuja e Garcia (1997).

### 3.2. Tratamento com triflumuron

Em todos os casos os insetos tratados foram mantidos em placas de Petri, na proporção dez fêmeas para cada macho não tratado, até o fim do experimento em 30 dias, no qual a mortalidade e os ovos postos e/ou eclodidos eram contabilizados. Os insetos do grupo controle, foram manipulados de forma semelhante, porém não sofreram nenhum tipo de tratamento.

#### 3.2.1. Oral

Triflumuron, em sua apresentação comercial Starycide® sc 480, foi fornecido a fêmeas adultas não acasaladas nas doses 0,1µL, 1µL, 5µL e 10µL por mililitro de sangue desfibrinado de coelho através de aparato artificial, segundo a metodologia de Azambuja e Garcia (1997).

#### 3.2.2. Tópico

Triflumuron, em sua apresentação comercial Starycide® sc 480, foi aplicado diretamente na cutícula da região dorsal do tórax de fêmeas adultas não acasaladas nas doses 0,1µL, 1µL, 5µL e 10µL.

#### 3.2.3. Contínuo

Doses de 0,1µL, 1µL, 5µL e 10µL por cm<sup>2</sup> foram aplicadas uniformemente em papel filtro (J Prolab, qualitativo, 40 x 40cm, 80g, referência 3013-3) usado como

substrato em placa de Petri de 9 cm<sup>2</sup>. Após evaporação por 24 horas, os insetos recém alimentados, foram colocados nas placas, na proporção de 10 fêmeas para cada macho, e mantidos até o fim do experimento (30 dias).

### 3.3. Atividade fenoxidásica em insetos de 5º estágio tratados com triflumuron

Para avaliação do sistema de ativação da fenoxidase, amostras de hemolinfa foram coletadas com microcapilares de 10 µL em diferentes intervalos após a alimentação. O sangue alimentar continha, ou não, doses crescentes de triflumuron, em sua apresentação comercial Starycide® sc 480, diluídas a 20 % em H<sub>2</sub>O milli-Q. Alíquotas de 25 µl das amostras de hemolinfa diluídas apropriadamente foram misturadas a 10 µL de tampão hipotônico de cacodilato de cálcio (0,01 M cacodilato de sódio, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4), para medição de atividade fenoxidásica espontânea, ou solução de tripsina 1µg/mL, para medição de atividade fenoxidásica total e incubadas a 37°C por 20 minutos. As dosagens de fenoxidase foram iniciadas com a adição de 25µL de solução saturada de L-DOPA (4 mg/mL) e a formação de DOPA-cromo foi medida por espectrofotometria (SpectraMax – 190, Molecular Devices) a 490nm de absorbância em leitor de microplaca a 37°C ao longo de 60 minutos após o início da reação (Genta et al., 2010).

### 3.4. Medição de oócitos e observação de morfologia interna de fêmeas tratadas com triflumuron

Oócitos de fêmeas tratadas oralmente, através da adição de 3µL de triflumuron, na apresentação comercial Starycide® sc 480, por mililitro de sangue desfibrinado de coelho, ou topicamente, com aplicação de 3µL do produto da região dorsal do inseto recém alimentado, foram medidos 5 dias após a realização do tratamento com o composto pelo uso da ferramenta de análise do Photoshop CS6 Extended ou ImageJ, usando papel milimetrado como referência de escala. Quantidade e comprimento dos oócitos foram contabilizados. Fêmeas do grupo controle não sofreram tratamento. Neste mesmo momento após o tratamento foi realizado registro da morfologia interna das fêmeas para efeitos de comparação da influência do triflumuron sobre este aspecto. Em ambos os casos foi utilizado microscópio estereoscópio Leica MZ6 em aumento 10x.

### 3.5. Pesagem de fêmeas tratadas com triflumuron

Fêmeas não acasaladas alimentadas com sangue desfibrinado de coelho contendo 1µL de triflumuron, na apresentação comercial Starycide® sc 480, por mililitro ou tratadas topicamente, através da aplicação de 1µL do composto sobre o dorso do inseto logo após a alimentação foram pesadas ao longo de 15 dias e a alteração do peso foi contabilizada. Fêmeas do grupo controle não receberam o composto.

### 3.6. Quantificação de quitina dos tecidos de fêmeas tratadas com triflumuron

#### 3.6.1. *Preparação dos tecidos*

Amostras de reto e intestino foram homogeneizadas em 1mL de H<sub>2</sub>O deionizada (mili-Q, Millipore, EUA) (com uso de homogeneizador motorizado (Sigma, Z359971), amostras de oócitos e carcaça foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em 1mL e 2 mL de H<sub>2</sub>O deionizada, respectivamente. Todos os grupos consistiram em três pools de três tecidos de fêmeas tratadas ou controle.

#### 3.6.2. *Preparação de amostra para quantificação de quitina*

Um volume de 200µL das amostras foram centrifugadas a  $21 \times 10^3$  g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 200µL de solução 3% de SDS (dodecilsulfato de sódio) e incubado a 100°C por 15 minutos. Após resfriamento os tubos foram recentrifugados (a  $21 \times 10^3$  g por 5 minutos), o sobrenadante novamente descartado, o precipitado foi lavado com 200µL H<sub>2</sub>O deionizada e ressuspendido em 150µL de KOH (1,2g/mL). As amostras foram então aquecidas a 130°C durante 1 hora. Após novo resfriamento, foram adicionados 400µL de etanol 75% e os tubos foram mantidos no gelo por 15 minutos. Após incubação, 60µL de suspensão de Celite 545 (sobrenadante da solução 1g em 12,5mL de etanol 75%, deixada em repouso por 2 minutos) foi adicionado aos tubos. Amostras foram centrifugadas e lavadas com 600µL de etanol 40% e de H<sub>2</sub>O mili-Q. O precipitado contendo quitosana insolúvel pode ser armazenado a 4°C até o momento do ensaio.

O precipitado foi ressuspendido em 125µL de H<sub>2</sub>O deionizada tendo sido preparado também um tubo controle contendo somente 125µL de H<sub>2</sub>O. Foram adicionados 125µL NaNO<sub>2</sub> 5% e 125µL KHSO<sub>4</sub> 5% em todos os tubos os quais foram incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação

(1500g, por 2 minutos a 2°C), duas alíquotas de 150µL do sobrenadante foram retiradas para análise em duplicata. Foram adicionados 50µL de sulfamato de amônio 12,5% e 50µL de MBTH (monohidrato de HCl 3-metil-benzo-2-tiazolona hidrazona) fresco e os tubos foram incubados a 100°C por três minutos. Após resfriamento, foi adicionado 50µL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,83% em cada tubo e estes foram incubados por 25 minutos. 200µL das soluções finais foram transferidos para uma microplaca e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 650nm (adaptado de Lehmann e White 1975).

### 3.6.3. *Quantificação de quitina*

Para a curva padrão, foram utilizados volumes crescentes de quitina coloidal (3,3µg/µL), preparada a partir de quitina em pó (Sigma) segundo Genta et al., 2006, entre 20 e 200µL completando os volumes para 200µL com H<sub>2</sub>O quando necessário. Para quantificação de quitina nas amostras de insetos, 200µL da preparação de amostra foram então processadas segundo o tópico 3.6.2 de quantificação de quitina.

Os valores de absorvância obtidos a 650nm foram transformados em µg de quitina utilizando a curva analítica construída a partir da quitina coloidal.

## 3.7. Atividade proteásica

### 3.7.1. *Preparação de amostra para ensaio de atividade proteásica*

Para os diferentes tecidos ensaiados foram padronizadas diferentes formas de preparação de amostra.

#### 3.7.1.1. *Corpo gorduroso*

Através de dissecação de machos adultos, foram coletados “pools” de corpo gorduroso relativo a três insetos, para ensaios avaliação de atividade proteásica neste tecido. Nos ensaios nos quais houve inoculação prévia dos insetos, cada pool de corpo gorduroso era retirado de 3 insetos, enquanto nos demais ensaios era constituído de amostras de 5 insetos. Os tecidos foram homogeneizados com uso de homogeneizador motorizado (Sigma, Z359971) em 200µL de H<sub>2</sub>O deionizada. As amostras foram centrifugadas a  $21 \times 10^3 g$  a 4°C por 10 minutos e então o sobrenadante foi coletado e diluído duas vezes para o ensaio.

#### 3.7.1.2. *Hemolinfa*

Para avaliação de atividade proteásica na hemolinfa, as amostras foram coletadas com uso de microcapilares de 5µL através do corte da pata de machos adultos. As amostras foram diluídas em H<sub>2</sub>O deionizada na proporção 1 para 8, no caso do ensaio preliminar de atividade, ou 1 para 20 no caso dos ensaios com insetos inoculados.

#### 3.7.1.3. Intestino médio posterior

Para efeitos de comparação, pools de três amostras de intestino médio posterior foram coletados através de dissecação de machos adultos e homogeneizados em 200µL de H<sub>2</sub>O deionizada. As amostras foram centrifugadas a  $21 \times 10^3 g$  a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e então diluído duas vezes com água deionizada.

#### 3.7.2. Preparação de substrato fluoróforo para ensaio de atividade proteásica

Para revelar a atividade proteásica nos tecidos em questão foi utilizado o substrato Z-Phe-Arg-MCA (Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, Hydrochloride, Bachem) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração estoque de 0,4mM. Nos ensaios usou-se uma concentração final de 10µM (Morita et al., 1977).

#### 3.7.3. Ensaio de atividade proteásica

Para verificar a atividade proteásica nos tecidos estudados, foram ensaiados 25µL de preparação de amostra em 170µL de tampão acetato de sódio 0,2M (pH 4,5) ou em 170µL de tampão EPPS 0,2M (pH 8,0). A reação foi iniciada com a adição de 5µL do substrato Z-Phe-Arg-MCA.

A atividade foi determinada através da detecção da formação de ácido metilcoumarínico (MCA), a partir da hidrólise do substrato, em comprimentos de onda de excitação  $\lambda_{ex}$  380nm e emissão  $\lambda_{em}$  460nm em um fluorímetro (SpectraMax - Gemini XPS, Molecular Devices) a 30°C durante o período de 60 minutos (Morita et al, 1977).

Os valores de fluorescência obtidos nestes comprimentos de onda foram transformados em pmoles de MCA a partir de curva analítica construída a utilizando entre 0 e 500 pmoles de MCA. Uma unidade enzimática (U) foi definida como quantidade de protease necessária para liberar 1 µmol de MCA por minuto.

### 3.8. Ensaio preliminar de atividade proteásica em hemolinfa e corpo gorduroso

Preliminarmente, a fim de determinar em qual tecido se encontram as maiores atividades proteolíticas tendo como padrão o substrato Z-Phe-Arg-MCA, as preparações de amostra de hemolinfa e de corpo gorduroso foram ensaiadas segundo a metodologia citada no item anterior.

### 3.9. Ensaio comparativo entre amostras de intestino lavadas ou não lavadas

Amostras de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus* foram, ou não, lavadas em solução de NaCl 0,9 % (p/v) antes da homogeneização para eliminação de possíveis proteases contaminantes provenientes de outros órgãos, através da repetida introdução deste tecido na solução.

Após as lavagens, foi feita a preparação padrão de amostra e a medição da formação de composto fluorescente foi medida segundo item de medição de atividade proteásica.

### 3.10. Efeito do congelamento

Para determinar o efeito do congelamento e descongelamento do corpo gorduroso sobre a atividade proteásica deste tecido, as preparações de amostra foram ensaiadas segundo o item 3.8.3 e então congeladas durante o período de uma hora. As amostras foram então descongeladas e ensaiadas novamente da mesma forma. Então a atividade residual foi calculada a partir da correlação com a atividade da protease não submetida ao congelamento, esta sendo considerada como 100% da atividade enzimática.

### 3.11. Efeito do pH sobre atividade proteásica

Com intuito de verificar o pH ótimo para as atividades enzimáticas de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus*, foram utilizados diversos tampões.

As atividades foram ensaiadas segundo o item 3.8.3, substituindo os tampões descritos por acetato de sódio pH 3,6, 4 e 5; citrato fosfato pH 4, 5, 6 e 7; fosfato de sódio pH 6 e 7; MES pH 5, 6 e 7; cacodilato de sódio pH 7 e 8; EPPS pH 7, 8 e 9; Tris pH 8 e 9 e glicina pH 9 e 10, todos em concentração 0,2 M.

### 3.12. Variação da atividade proteásica após alimentação

Para analisar a atividade proteásica em corpo gorduroso ao longo dos dias dos machos adultos de *R. prolixus*, os insetos foram dissecados para coleta de corpo

gorduroso em jejum e após dois, cinco, sete e nove dias após alimentação sanguínea de acordo com o item 3.1.

As preparações de amostras frescas foram ensaiadas no mesmo dia da dissecação de acordo com o item 3.8.3 referente ao ensaio de atividade proteásica.

### 3.13. Ensaio de atividade proteásica sob efeito de inibidores ou ativador

Visando caracterizar a atividade proteásica de corpo gorduroso, preparações de amostra foram incubadas a 30°C durante 30 minutos na presença de EDTA 100µM, EDTA 10mM, pepstatina A 10nM, pepstatina A 10µM, E64 100µM, PMSF 50µM, PMSF 10mM, fenantrolina 100µM ou ditioneitol (DTT) 10mM (valores referentes à concentração final na incubação).

Para revelar a atividade remanescente nestas condições, a mistura de reação foi completada para obtenção de um volume final de 195µL, adaptando os volumes descritos no item 3.8.3, antes da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA, para realização do ensaio.

A atividade residual foi representada como fração da atividade de protease não submetida a tratamentos (controle), sendo esta considerada 100% da atividade enzimática.

### 3.14. Efeito de íons metálicos

Para analisar a atividade proteásica sob efeito de íons, as preparações de amostras de corpo gorduroso foram incubadas durante 30 minutos com soluções de CaCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM, 1mM e 100µM, CoCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM, 1mM, 100µM e 10µM, CuCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM, 1mM, 100µM, 10µM e 1µM, MgCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM e 1mM, MnCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM, 1mM, 100µM e 10µM, ZnCl<sub>2</sub> 100mM, 10mM, 1mM, 100µM, 10µM e 1µM (concentrações finais) em tampão EPPS 0,2 M pH 8 a 4°C.

Para revelar a atividade remanescente nestas condições a mistura de reação foi completada para obtenção de um volume final de 195µL, adaptando os volumes descritos no item 3.8.3, antes da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA, para realização do ensaio.

A atividade residual foi representada como fração da atividade de protease não submetida a tratamentos, sendo esta considerada 100% da atividade enzimática.

### 3.15. Recuperação de atividade enzimática em pH 8 após tratamento com íons metálicos

As preparações de corpo gorduroso foram incubadas a 30°C durante 30 minutos na presença de EDTA 100µM ou fenantrolina 100µM em tampão EPPS 0,2 M pH 8 e então incubadas por mais 30 minutos a 30°C, após a adição de 20µL de solução de CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ou ZnCl<sub>2</sub> resultando nas concentrações finais de 100µM, 1 mM, 10µM, 1mM, 10µM e 10µM respectivamente.

O ensaio de atividade foi então realizado de acordo com o item 3.8.3, ajustando o volume da solução tampão para obtenção de um volume final de 195µL da mistura de reação antes da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA.

A atividade residual foi representada como fração da atividade de protease não submetida a tratamentos, sendo esta considerada 100% da atividade enzimática

### 3.16. Ensaio de atividade enzimática após eletroforese (Zimografia)

Para identificação da atividade proteásica estudada após eletroforese em gel de poliacrilamida, preparações de amostra de intestino médio posterior, para efeitos de amostra controle, e de corpo gorduroso foram misturadas individualmente em tampão de amostra 3x (glicerol 10 % (v/v), SDS 0,75 % (p/v), azul de bromofenol 0,05 % (p/v), β-mercaptoetanol 5 % (v/v), Tris/HCl 0,19 M pH 6,8) e então aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (p/v). A corrida foi realizada durante aproximadamente 1h a 150V.

Os géis foram lavados três vezes em tampão acetato de sódio 0,02 M pH 4,5 ou tampão EPPS 0,02 M pH 8 sob agitação durante 15 minutos e cada gel foi então incubado durante 12 horas a 30°C sobreposto com papel filtro embebido em substrato Z-Phe-Arg-MCA 1mM. A atividade foi revelada em foto documentador com luz ultravioleta (E-Gel Imager, Life Technologies). A banda de atividade é identificada pela presença de fluorescência gerada pela ação proteásica formando ácido metilcoumarínico (MCA) como produto da reação.

### 3.17. Comparação das atividades proteásicas no corpo gorduroso e no intestino médio posterior

Para o ensaio, 25µL das preparações de amostra de intestino médio posterior ou corpo gorduroso foram adicionadas a 170µL de tampão acetato de sódio pH 4,5 ou EPPS pH 8,0, ambos 0,2 M. A reação foi iniciada pela adição de 5µL de substrato Z-Phe-Arg-MCA. A formação de ácido metilcoumarínico (MCA) foi medida em comprimentos de onda de excitação λ<sub>ex</sub> 380nm e emissão λ<sub>em</sub> 460nm em um

fluorímetro (SpectraMax - Gemini XPS, Molecular Devices) a 30°C durante o período de uma hora (Morita et al, 1977).

### 3.18. Cromatografia de filtração em gel

Um volume de 500 µL da preparação de amostra de corpo gorduroso, na proporção de uma amostra de tecido (proveniente de um inseto) para 40 µL de H<sub>2</sub>O, foram aplicados em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM. Frações de 0,5 mL do eluente foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL por minuto.

Para revelar as frações de interesse, cada fração do eluente foi ensaiada segundo o ensaio de atividade proteásica (item 3.8.3).

A eluição das atividades de interesse foram comparadas com a eluição das seguintes proteínas de massa molecular conhecida (padrões): Blue dextran (2000 kDa), Citocromo C (12,4 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Albumina (66 kDa), Álcool desidrogenase (150 kDa) e Beta-amilase (200 kDa). Para cálculos de massa molecular relativa usou-se a relação linear entre o logaritmo da massa molecular e o parâmetro  $V_e/V_0$ , onde  $V_e$  é o volume de eluição da proteína de interesse e  $V_0$  é o volume de eluição do blue dextran (GE Healthcare 2010).

### 3.19. Ensaio de inibição nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel

Alíquotas das frações contendo atividade proteásica (25µL de cada) foram incubadas com EDTA 100µM, pepstatina A 10nM, E64 100µM, PMSF 50µM ou fenantrolina 100µM durante 30 minutos a 30°C em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 ou em tampão EPPS 0,2 M pH8. A reação foi então conduzida de acordo com o item 3.8.3 adaptando-se os volumes dos tampões para resultar em um volume final de mistura de razão de 195µL antes da adição do substrato.

A atividade residual das frações com atividade proteolítica foi representada como fração da atividade submetida a tratamentos, sendo esta considerada 100% da atividade enzimática.

### 3.20. SDS-PAGE

As frações da cromatografia de filtração em gel contendo atividade proteásica foram reunidas, correspondendo às frações 31 e 32 (atividade em pH 4,5) e frações 27, 28 e 29 (atividade em pH 8). Os dois materiais foram combinados com tampão

de amostra 3x (glicerol 10 % (v/v), SDS 0,75 % (p/v), azul de bromofenol 0,05 % (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % (v/v), Tris/HCl 0,19 M pH 6,8), incubadas por 3 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poli-acrilamida 12% (p/v). A corrida foi realizada durante aproximadamente 1h a 150V.

O gel foi então corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1% (p/v) em Metanol:Ácido acético:H<sub>2</sub>O (40:10:50) e descorado com o mesmo solvente. As massas moleculares relativas foram calculadas de acordo com a relação linear entre logaritmo da massa molecular dos padrões e a migração relativa a linha de frente no gel (Stryer, 1996). Foram usados os padrões fosforilase B (97,4kDa), albumina sérica bovina (66,2kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina de soja (SBTI, 21kDa) e Lisozima (14,4kDa).

### 3.21. Ativação *in vitro* do sistema profenoloxidase de *R.prolixus*

#### 3.21.1. Atividade fenoloxidásica na hemolinfa

Para avaliação da ativação da atividade fenoloxidásica *in vitro*, inicialmente amostras de corpos gordurosos foram incubadas em microtubos de 1,5 mL contendo PBS ou laminarina 1% (p/v) em PBS durante 30 minutos a 30°C.

As amostras de tecido foram então retiradas dos respectivos meios de incubação e homogeneizadas em 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O deionizada. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a  $21 \times 10^3 g$  a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e diluído duas vezes. O meio nos quais os tecidos foram incubados também foram recolhidos.

Amostras de hemolinfa (10 $\mu$ L) foram combinadas com 25 $\mu$ L de meio de incubação (PBS), meio de incubação contendo laminarina (1%), homogenato de corpo gorduroso ou homogenato de corpo gorduroso incubado em laminarina, e com 10 $\mu$ L de tampão cacodilato de cálcio (10 mM ácido cacodílico + 10 mM CaCl<sub>2</sub>) pH 7,4. A mistura foi incubada por 30 minutos a 30°C.

Os ensaios de fenoloxidase foram iniciados com a adição de 15  $\mu$ L de solução saturada de L-DOPA (4 mg/mL) e a formação de DOPA-cromo foi medida por espectrofotometria a 490nm de absorbância em leitor de microplaca (SpectraMax – 190, Molecular Devices) a 37°C ao longo de 60 minutos. Controles contendo somente 10  $\mu$ L de preparação de hemolinfa e 10 $\mu$ L de tampão cacodilato de cálcio pH 7,4 foram incubados por 30 minutos com 15  $\mu$ L de solução tripsina 1 mg/mL antes da adição do substrato, para medição da atividade fenoloxidásica total (Gomes et al., 1999).

### 3.21.2. Atividade proteásica de homogenato e meio de incubação

Para analisar o efeito da presença de laminarina na liberação das proteases para o meio de incubação, a atividade proteásica nos homogenatos de corpo gorduroso e nos meios de incubação, ambos contendo ou não laminarina (preparados como descrito no item anterior), foi determinada segundo o ensaio padrão de atividade enzimática descrito no item 3.8.3.

## 3.22. Inoculação de *Rhodnius prolixus* com microorganismos

### 3.22.1. Manutenção de culturas de *Trypanosoma rangeli* cepa Macias e *Ustilago* sp.

A cultura de *Trypanosoma rangeli* cepa Macias foi gentilmente cedida pela Profa. Suzete Gomes, da Universidade Federal Fluminense. Os parasitos foram mantidos em meio BHI (brain heart infusion) suplementado com 20 % (v/v) de soro fetal bovino inativado a 27°C. As formas epimastigotas curtas, usadas para inoculação, foram obtidas na fase de crescimento log dos parasitos, que acontece até o 7º dia da cultura (Whitten et al., 2001).

Leveduras do gênero *Ustilago* sp. foram cedidas pelo Dr. Rod Dillon (Universidade de Lancaster, Reino Unido) e mantidas em laboratório em meio Sabouraud. As leveduras foram cultivadas em meio líquido sob 75 rpm de agitação a 30°C por até 24h, para obtenção de cultura de leveduras durante a fase log de crescimento, a qual neste estado era utilizada para inoculação em *R. prolixus*,

### 3.22.2. Inoculação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias ou com *Ustilago* sp.

Para inoculação dos insetos (machos adultos), 1 mL de cada cultura contendo microorganismos vivos foi centrifugado, a 700 g para *T. rangeli* cepa Macias e a  $21 \times 10^3$  g para *Ustilago* sp., ambos por 10 minutos sendo os precipitados lavados três vezes em 1 mL de PBS.

As concentrações das células foram normalizadas de acordo com a densidade óptica (OD) em espectrofotômetro (SpectraMax – 190, Molecular Devices), comprimento de onda 600 nm, para 1 unidade de absorbância, usando PBS como branco.

Após normalização, 1  $\mu$ L das culturas em PBS, das culturas em PBS diluídas dez vezes, ou simplesmente PBS para efeito de controle, foram inoculados com auxílio de uma micro seringa de Hamilton de 10  $\mu$ L na inserção da coxa do segundo par de patas, no 5º dia após alimentação sanguínea. Também foi acompanhado um grupo controle que não sofreu nenhum tipo de inoculação ou tratamento.

### 3.22.3. *Atividade proteásica em corpo gorduroso e hemolinfa de insetos inoculados*

Amostras de hemolinfa e de corpo gorduroso de *R. prolixus* inoculados com PBS, *T. rangeli* cepa Macias ou *Ustilago* sp. foram coletadas 24, 48 horas ou 7 dias após os tratamentos em questão e preparadas segundo os protocolos descritos acima. O ensaio também incluiu grupo controle que não sofreu nenhum tipo de inoculação. As amostras foram então ensaiadas para atividade proteásica segundo o item 3.8.3.

A atividade relativa foi descrita através da comparação com a atividade da protease dos insetos não submetidos à inoculação, e foi considerada como 100% da atividade enzimática.

### 3.23. Quantificação de proteína

Para determinação da quantidade de proteínas das amostras foi utilizado o método de Bradford (1976), que consiste na detecção da ligação do corante Coomassie Blue G-250 com os grupos funcionais básicos ou aromáticos de proteínas após dois minutos da mistura de reação ser iniciada. A leitura é feita por espectrofotometria (SpectraMax – 190, Molecular Devices) a 595nm, comprimento de onda que é absorvido pelo corante ligado à proteínas. Foi utilizada albumina de ovo para confecção da curva padrão.

### 3.24. Análise estatística

A análise estatística, ANOVA e teste-t pareado, foi feita através do software GraphPad Prism 6. Foi utilizado o critério de 0,05 de significância, e os resultados apresentados representam a média e o erro padrão da média (SEM: standard error of the mean).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos do triflumuron em *Rhodnius prolixus*

Para avaliar os efeitos do triflumuron (Starycide®) sobre o *R. prolixus*, os insetos desta espécie foram submetidos a diferentes tratamentos e doses do composto em questão. Devido aos tratamentos, foi possível observar alterações fisiológicas que serão descritas nos itens subsequentes.

#### 4.1.1. Efeitos do triflumuron sobre a reprodução e mortalidade de fêmeas de *R. prolixus*

Fêmeas adultas de *R. prolixus* tratadas com triflumuron na apresentação comercial Starycide® por via oral demonstraram altos índices de mortalidade, de forma dose dependente, tanto em 24 horas após a alimentação com o composto, quanto após 30 dias do tratamento em comparação com as fêmeas controle. Nesse período fêmeas tratadas com a maior dose (10µL/mL de sangue) alcançaram uma mortalidade em torno de 72% (Tabela 1).

Além disso, também foi observada uma diminuição do número de ovos postos por fêmea tratada, assim como uma diminuição do percentual de ninfas eclodidas a partir dos ovos postos pelas fêmeas tratadas. Ambos os efeitos aconteceram de forma proporcional ao aumento da quantidade de triflumuron ingerida pelo inseto (Tabela 1), podendo reduzir a percentagem de eclosão das ninfas para 4 %, no caso do grupo alimentado com 10µL/mL de sangue, enquanto o grupo controle não tratado teve 73% de eclosão

Da mesma forma, o tratamento tópico também foi capaz de induzir altos índices de mortalidade, levando a morte em torno de 43% das fêmeas tratadas topicamente com 10µL de triflumuron apenas um dia após aplicação do composto (Tabela 2). Porém, o tratamento também se demonstrou eficaz nas menores doses, resultando em uma mortalidade de 86% em fêmeas que receberam tratamento de 0,1 µL de triflumuron no decorrer dos 30 dias de análise.

Tabela 1. Efeito do tratamento oral com doses entre 0,1 e 10 $\mu$ L de Starycide® por mL de sangue de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%).

Grupos	Mortalidade após tratamento (%)		Nº de ovos/fêmea	Eclosão (%)
	24 h	30 dias		
Controle	7 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	57 $\pm$ 12	73 $\pm$ 20
0,1 $\mu$ l	26 $\pm$ 7a	50 $\pm$ 40b	35 $\pm$ 16b	67 $\pm$ 5
0,5 $\mu$ l	18 $\pm$ 4a	64 $\pm$ 29c	34 $\pm$ 9b	15 $\pm$ 14c
1,0 $\mu$ l	31 $\pm$ 4a	71 $\pm$ 35c	42 $\pm$ 35a	9 $\pm$ 3c
10,0 $\mu$ l	40 $\pm$ 4b	72 $\pm$ 37c	28 $\pm$ 18c	4 $\pm$ 4c

(a: p<0,01; b: p<0,001 e c: p<0,0001)

Novamente, foi possível observar uma significativa redução do número de ovos postos pelas fêmeas tratadas de forma tópica, assim como uma redução no percentual de ninfas eclodidas em relação ao total de ovos postos comparados ao grupo de fêmeas controle, resultando em uma queda de 70% de ninfas eclodidas para 9% no caso dos ovos postos pelas fêmeas que receberam a dose de 10µL de triflumuron na apresentação comercial Starycide®.

O tratamento contínuo resulta em níveis de mortalidade semelhantes aos do tratamento tópico. Após os 30 dias nos quais os insetos permaneceram em contato com o triflumuron (Tabela 3), até em torno de 91% das fêmeas morreram na presença de 10µL/cm<sup>2</sup> do composto. Entretanto, todas as doses foram capazes de induzir grande mortalidade das fêmeas tratadas, o que ocorreu de forma dose dependente.

O contato contínuo com o triflumuron na forma comercial Starycide® além de resultar em alta mortalidade, levou à redução significativa de oviposição pelas fêmeas tratadas, e à diminuição da eclosão de ninfas a partir dos ovos postos pelas mesmas, em relação ao grupo de fêmeas controle.

Tabela 2. Efeito do tratamento tópico de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* com doses entre 0,1 e 10  $\mu\text{L}$  triflumuron na apresentação comercial Starycide® sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%).

Grupos	Mortalidade após tratamento (%)		Nº de ovos/fêmea	Eclosão (%)
	24 h	30 dias		
Controle	7 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	57 $\pm$ 12	73 $\pm$ 20
0,1 $\mu\text{l}$	30 $\pm$ 8a	86 $\pm$ 12c	55 $\pm$ 7	64 $\pm$ 23
0,5 $\mu\text{l}$	23 $\pm$ 18a	89 $\pm$ 1c	41 $\pm$ 5a	28 $\pm$ 9b
1,0 $\mu\text{l}$	33 $\pm$ 16a	93 $\pm$ 4c	23 $\pm$ 4c	12 $\pm$ 3c
10,0 $\mu\text{l}$	43 $\pm$ 16b	96 $\pm$ 4c	22 $\pm$ 3c	9 $\pm$ 2c

(a:  $p < 0,01$ ; b:  $p < 0,001$  e c:  $p < 0,0001$ )

Para avaliar mais a fundo os efeitos do triflumuron sobre a formação dos ovos, as fêmeas controle e tratadas oral e topicamente foram dissecadas e seus oócitos foram contabilizados e medidos.

Fêmeas que ingeriram sangue contendo 1 $\mu$ L de triflumuron por mL apresentaram número significativamente maior de oócitos terminais dentro de seus ovários (Figura 2A). Porém, fêmeas que receberam a mesma dose topicamente sobre o dorso não apresentaram o mesmo efeito.

Os ovos postos pelas fêmeas tratadas com triflumuron, principalmente nas maiores doses, apresentaram um escurecimento dias após a oviposição.

Quanto ao comprimento dos oócitos terminais encontrados nos ovários destas fêmeas, ambos os grupos tratados apresentaram redução neste aspecto quando comparados com o grupo de fêmeas controle, sendo que no tratamento tópico esta redução se mostrou estatisticamente significativa (Figura 2B).

Tabela 3. Efeito do tratamento contínuo de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* com doses entre 0,1 e 10 µL triflumuron na apresentação comercial Starycide® sobre a mortalidade (%), número de ovos postos por fêmea e eclosão dos ovos postos (%).

Grupos	Mortalidade após tratamento (%)		Nº de ovos/fêmea	Eclosão (%)
	24 h	30 dias		
Controle	7 ± 1	21 ± 2	57 ± 12	73 ± 20
0,1 µl	32 ± 7a	80 ± 10c	43 ± 5a	60 ± 13
0,5 µl	19 ± 19a	81 ± 1c	39 ± 52b	18 ± 3c
1,0 µl	30 ± 15a	90 ± 2c	20 ± 4c	9 ± 3c
10,0 µl	41 ± 10b	91 ± 6c	12 ± 1c	3,5 ± 0,3c

(a: p<0,01; b: p<0,001 e c: p<0,0001)

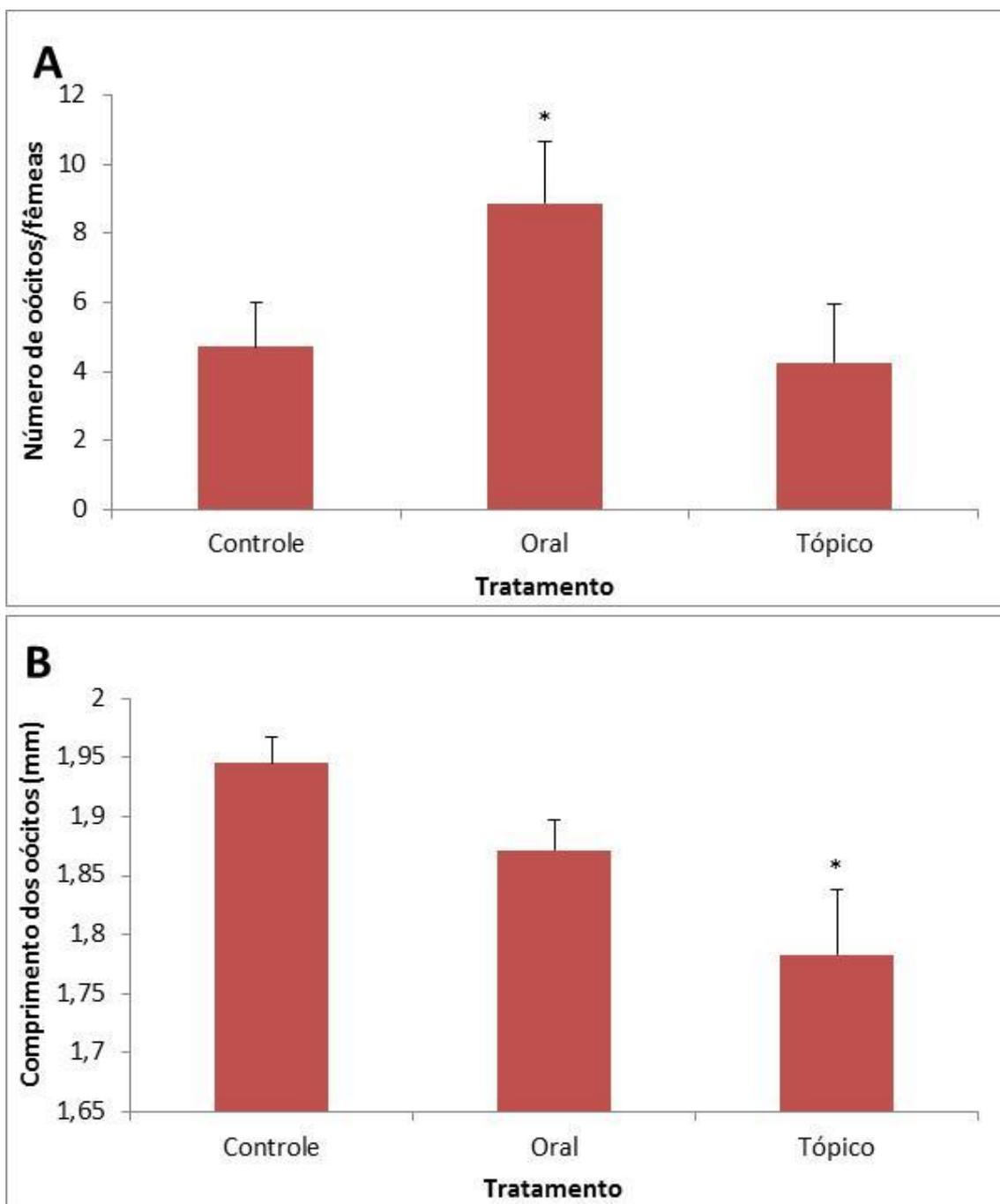


Figura 2. Avaliação dos efeitos do tratamento oral e tópico com 1 µL triflumuron (Starycide®) sobre o desenvolvimento dos oócitos de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*. (A) Número de oócitos presentes nos ovários por fêmea. (B) Comprimento dos oócitos (mm) presentes nos ovários (\*,  $p < 0,05$ )

#### 4.1.2. Efeitos do triflumuron sobre a quantidade de quitina presente em diferentes tecidos de fêmeas Rhodnius prolixus

Como resultado do tratamento oral com triflumuron na apresentação comercial Starycide®, as carcaças de fêmeas alimentadas com sangue contendo 1µL do composto por mL, tanto no caso das acasaladas quanto das não acasaladas, apresentaram diminuição na quantidade de quitina (µg) (Figura 3).

Já a quantificação de quitina das carcaças das fêmeas tratadas através da aplicação de 1µL do triflumuron sobre o dorso do inseto mostrou que somente fêmeas não acasaladas tiveram redução na quantidade de quitina (µg) nesse tecido.

Com esta técnica, descrita no item 3.8.2, foi possível medir valores entre 3 e 10 mg de quitina. Portanto, não houve sensibilidade suficiente para aferir a quantidade de quitina presente nos outros tecidos propostos.

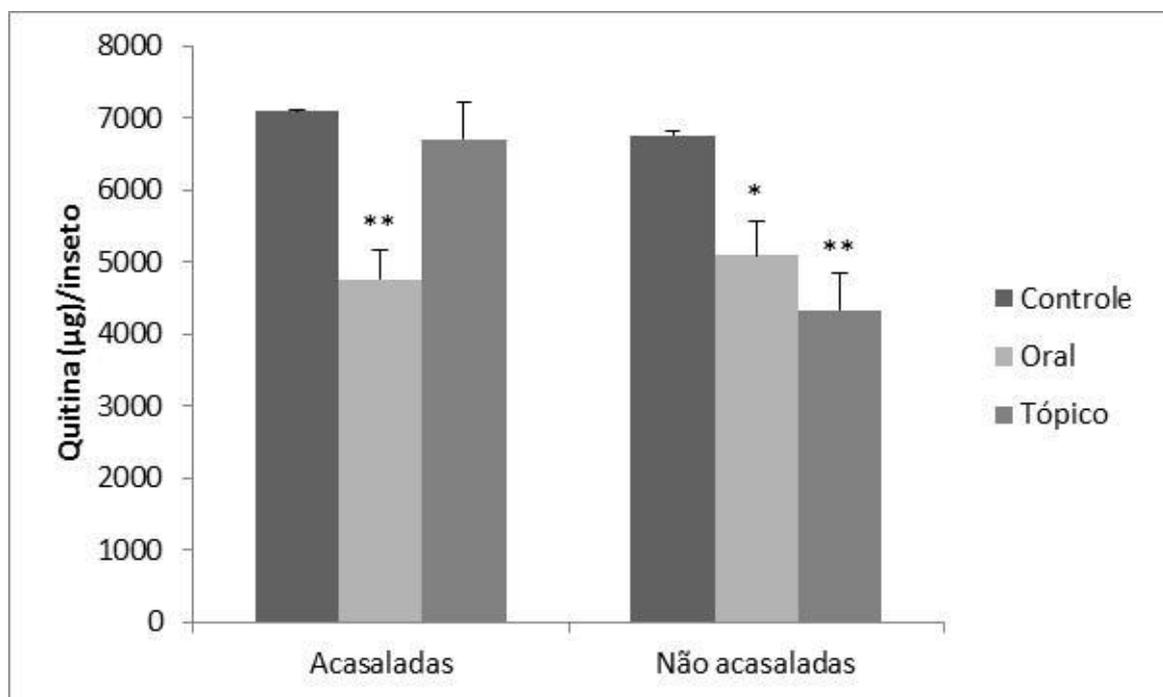


Figura 3. Quantidade de quitina na carcaça de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* sete dias após o tratamento oral ou tópico com 1µL de triflumuron (Starycide®). As fêmeas controle não sofreram nenhum tipo de tratamento (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

#### 4.1.3. Efeitos do triflumuron sobre a fisiologia de Rhodnius prolixus

Devido a elevada mortalidade e alterações no desenvolvimento, ovipostura e eclosão de ninfas em insetos tratados com triflumuron, o peso subsequente à alimentação e ao tratamento destes insetos foi analisado com o objetivo de observar possíveis divergências fisiológicas, na ingestão do sangue contendo o composto, no caso do tratamento oral, ou na digestão do alimento.

Diferenças significativas no peso inicial pós alimentação mostrou que a presença do triflumuron no sangue fornecido as fêmeas através do aparato de alimentação artificial reduz a ingestão do alimento pelas fêmeas (Figura 4). Assim como as diferenças significativas, principalmente 24h após alimentação, durante o tratamento tópico mostram que as fêmeas excretam a urina mais lentamente do que os outros dois grupos, oral e controle. Porém, após os primeiros cinco dias de digestão, há perda progressiva de peso presente de forma semelhante em todos os grupos observados.

Durante as dissecções foi observado um grande aumento na proporção do tamanho do intestino posterior, com grande frequência, nas fêmeas que ingeriram sangue contendo 1 $\mu$ L de triflumuron por mL e nas fêmeas que receberam a aplicação tópica do mesmo volume do composto, cinco dias após os tratamentos (Figura 5). Este aumento se mostrou principalmente pronunciado no caso das fêmeas pertencentes ao grupo do tratamento tópico (Figura 5C).

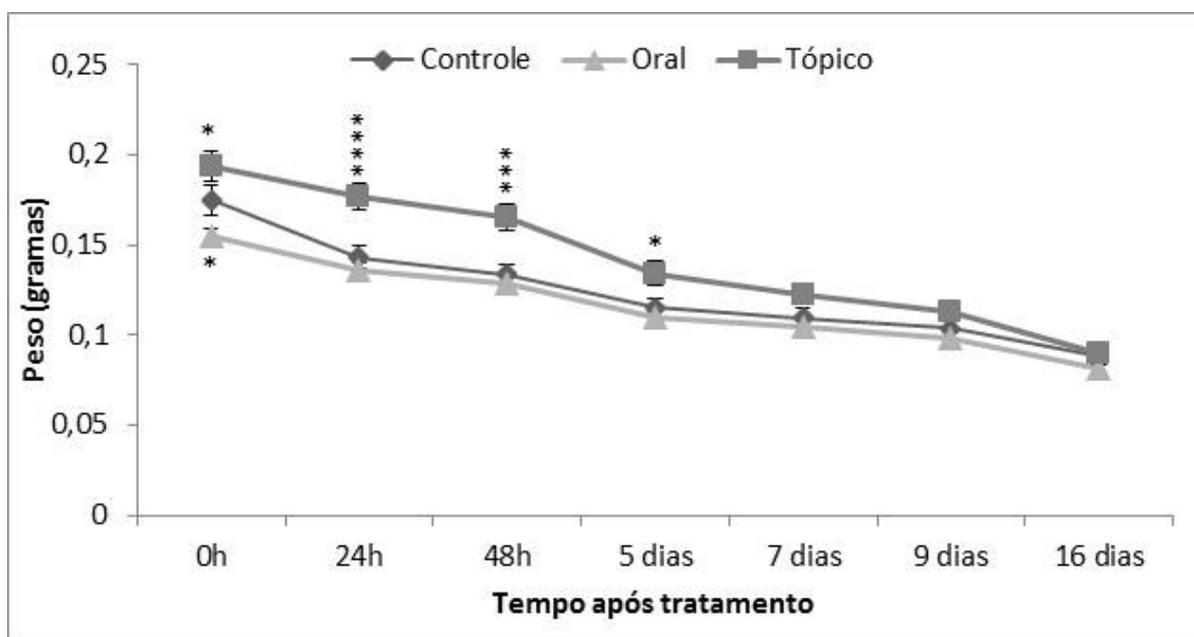


Figura 4. Efeito do tratamento tópico e oral com triflumuron (Starycide®) sobre o peso de fêmeas adultas não acasaladas de *Rhodnius prolixus* ao longo de 16 dias após alimentação (\*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,001$ ; \*\*\*,  $p<0,0001$ ).

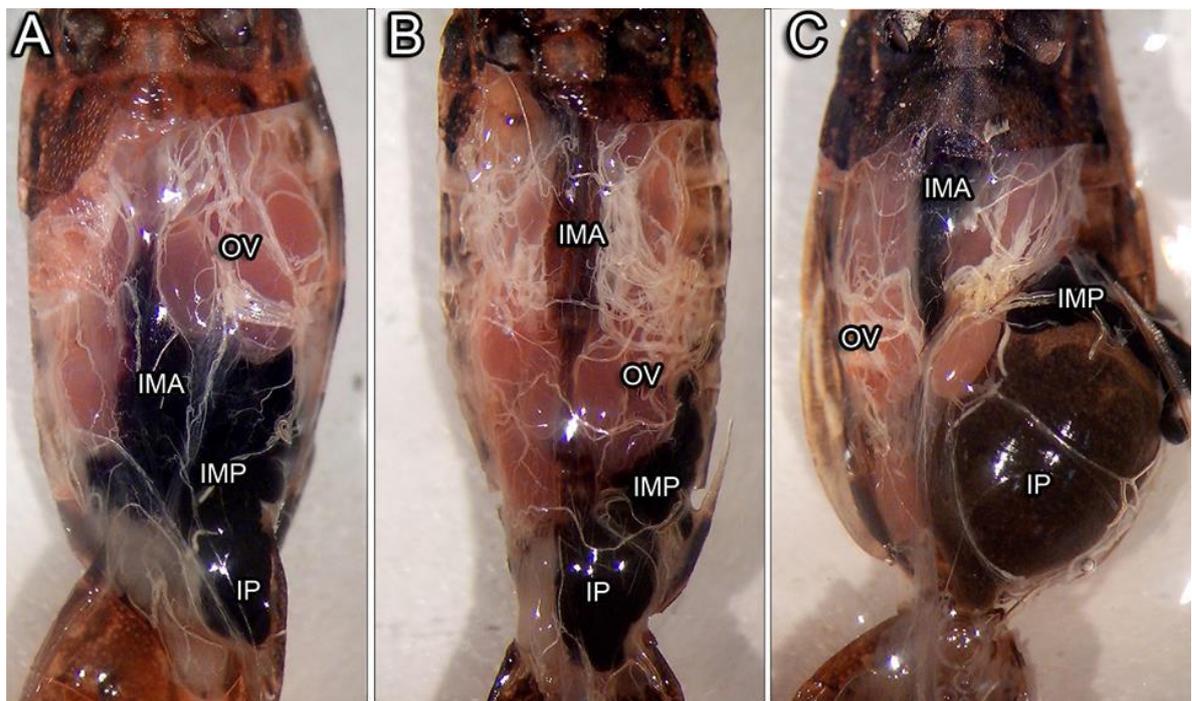


Figura 5. Morfologia interna ilustrativa de fêmeas de *Rhodnius prolixus* em aumento de 10x. Controle (A), tratada oralmente (B) e tratada topicamente (C), evidenciando os ovários (OV), o intestino médio anterior (IMA), o intestino médio posterior (IMP) e o intestino posterior (IP).

#### 4.1.4. Efeitos do triflumuron sobre o sistema imune de ninfas de 5<sup>o</sup> ínstar de *Rhodnius prolixus*

Com o intuito de observar consequências da ingestão de doses subletais de triflumuron (Starycide®) no sistema imune, foi feita uma avaliação do sistema fenoloxidase de ninfas de 5<sup>o</sup> ínstar alimentadas com sangue contendo volumes crescentes do composto.

Esta análise revelou que o triflumuron é capaz de induzir ativação significativa da atividade fenoxidásica espontânea nos insetos tratados oralmente, principalmente nas doses de 0,1 a 1 µL do composto por mL de sangue no 12<sup>o</sup> dia após alimentação contendo o composto (Figura 6A). A ativação espontânea se mostrou proporcionalmente crescente de acordo com o aumento da quantidade de triflumuron ingerida pelo inseto. Após 16 dias do tratamento ainda foi possível observar ativação residual significativa do sistema em ninfas do grupo alimentado com 0,1 µL/mL.

O aumento da atividade espontânea do sistema fenoloxidase ocorreu sem que houvesse alterações nos níveis de fenoloxidase total, ativada por tripsina, nas ninfas tratadas quando comparadas com o grupo controle não tratado (Figura 6B).

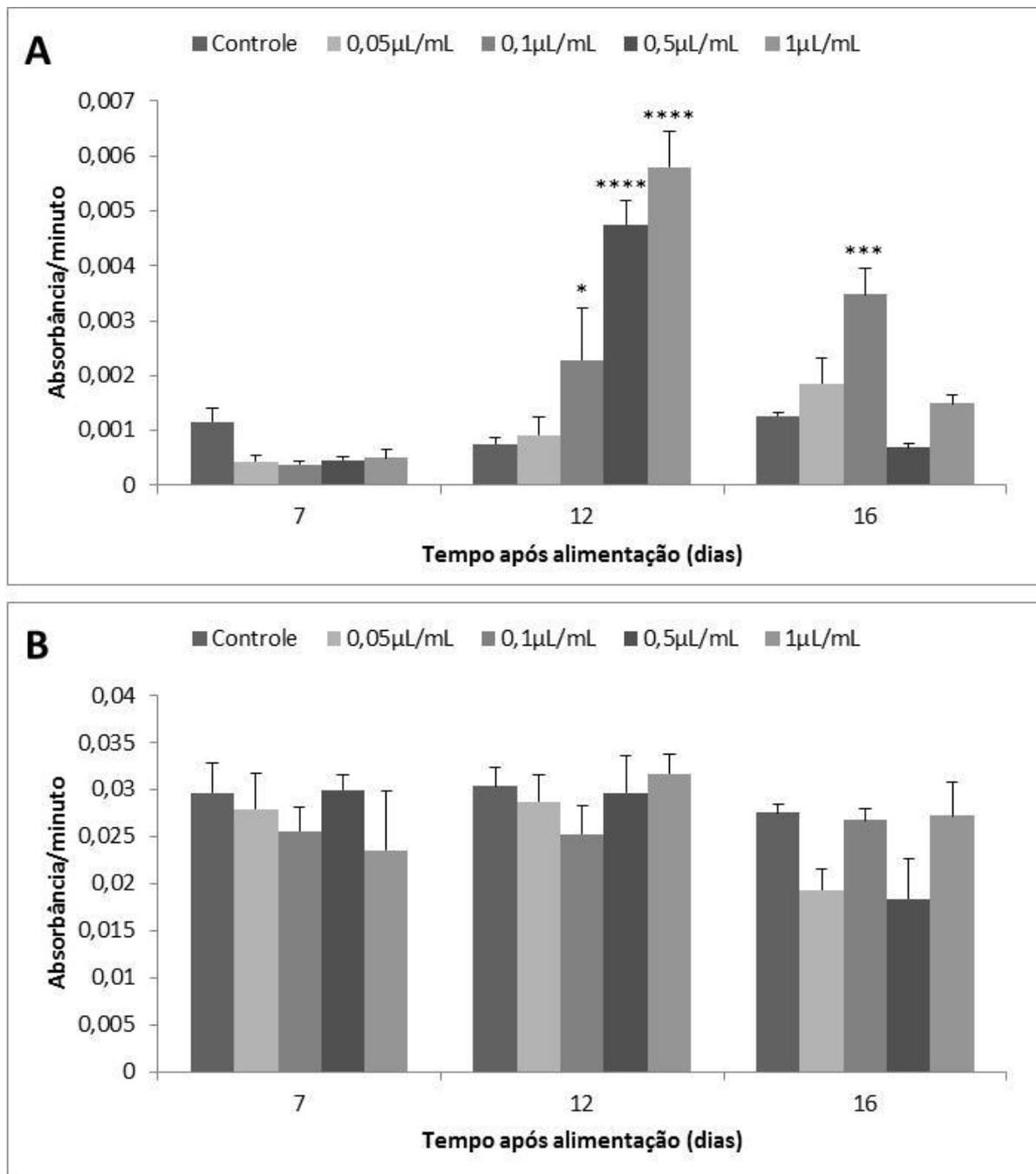


Figura 6. Avaliação do efeito do triflumuron sobre a atividade fenoloxidase. Atividade de fenoloxidase espontânea (A) e total (B) na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* alimentadas com sangue desfibrinado de coelho contendo doses crescentes de Starycide® em diferentes dias após tratamento (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.2. Caracterização da atividade proteásica presente em corpo gorduroso de *Rhodnius prolixus*

Como foi observado um efeito do triflumuron sobre o sistema fenoxidase de *R. prolixus*, e esse sistema é ativado por proteases da hemolinfa e do corpo gorduroso do inseto, decidimos estudar essas atividades em mais detalhe. Entretanto, não existem muito estudos sobre as propriedades bioquímicas dessas enzimas no corpo gorduroso ou na hemolinfa desse insetos. Para preencher essa lacuna, decidimos caracterizar a atividade proteolítica do corpo gorduroso de *R. prolixus*, usando Z-Phe-Arg-MCA como substrato modelo.

##### 4.2.1. Ensaio preliminares de atividade proteásica

Inicialmente amostras de corpo gorduroso e de hemolinfa de machos adultos de *R. prolixus* foram ensaiados em tampão cacodilato de cálcio (0,01 M cacodilato de sódio, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>) cujo pH (7,4) se assemelha ao pH encontrado na hemocele do inseto.

Tendo como modelo o substrato inespecífico Z-Phe-Arg-MCA, foi possível detectar uma atividade proteásica em corpo gorduroso que não foi observada na hemolinfa destes insetos (Figura 7).

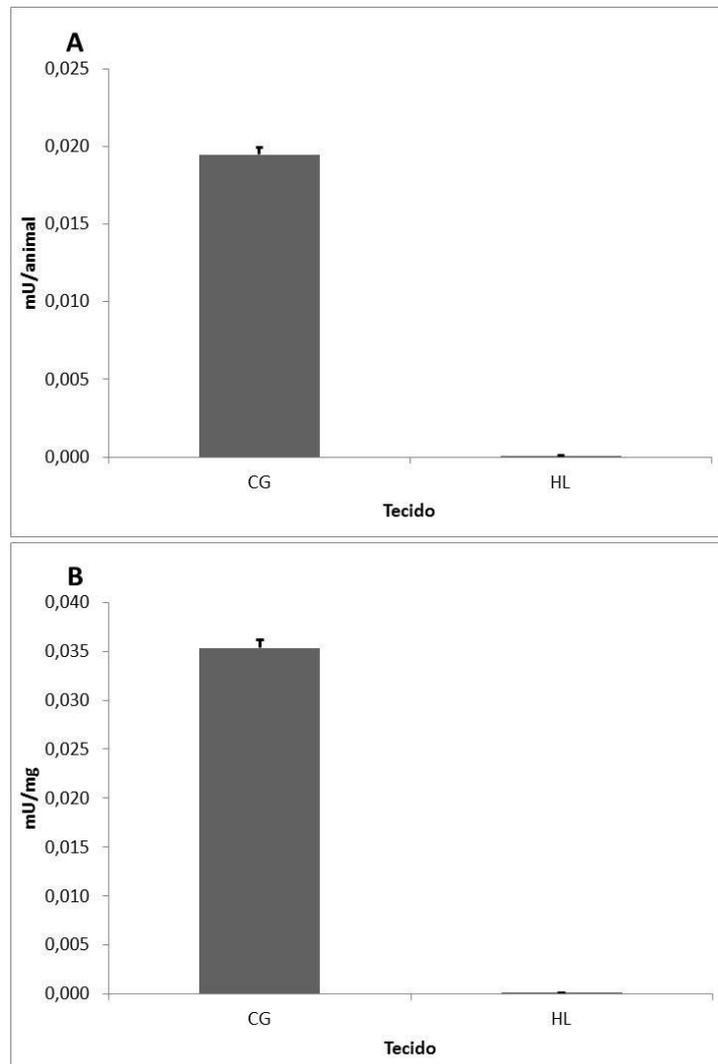


Figura 7. Comparação da atividade proteásica em corpo gorduroso e hemolinfa. Atividade proteásica no corpo gorduroso (CG) e hemolinfa (HL) de machos adultos de *Rhodnius prolixus* revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA em tampão Cacodilato pH 7,4. (A) Atividade (mU) por animal. (B) Atividade específica (mU/mg).

#### 4.2.2. Efeito do pH, congelamento e lavagem do tecido sobre a atividade proteásica no corpo gorduroso

Foram utilizados diversos tampões em diferentes pHs para aferir qual o pH ótimo da atividade em questão, além de determinar quais tampões não inibem a enzima.

A análise das atividades nos diferentes pHs demonstrou dois picos de atividade proteásica no corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus* com o substrato Z-Phe-Arg-MCA (Figura 8). Uma atividade com pH ótimo em torno de 4,5 e outra com pH ótimo em torno de 8,0.

As amostras de corpo gorduroso foram submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento e a atividade residual relativa foi comparada a atividade do tecido fresco, resultando em uma redução de 28% da atividade proteásica em pH 4,5 e uma redução de 63% da atividade proteásica em pH 8 (Figura 9).

Posteriormente, as amostras do tecido lavado em solução salina de NaCl 0.9% ou preparadas sem a lavagem prévia foram da mesma forma ensaiadas. As atividades resultantes mostraram não haver redução ou alteração significativa entre os modos de preparação de amostra (Figura 10), indicando que a atividade sendo caracterizada neste tecido não se trata de uma contaminação proveniente de outros tecidos, como o intestino médio, por exemplo.

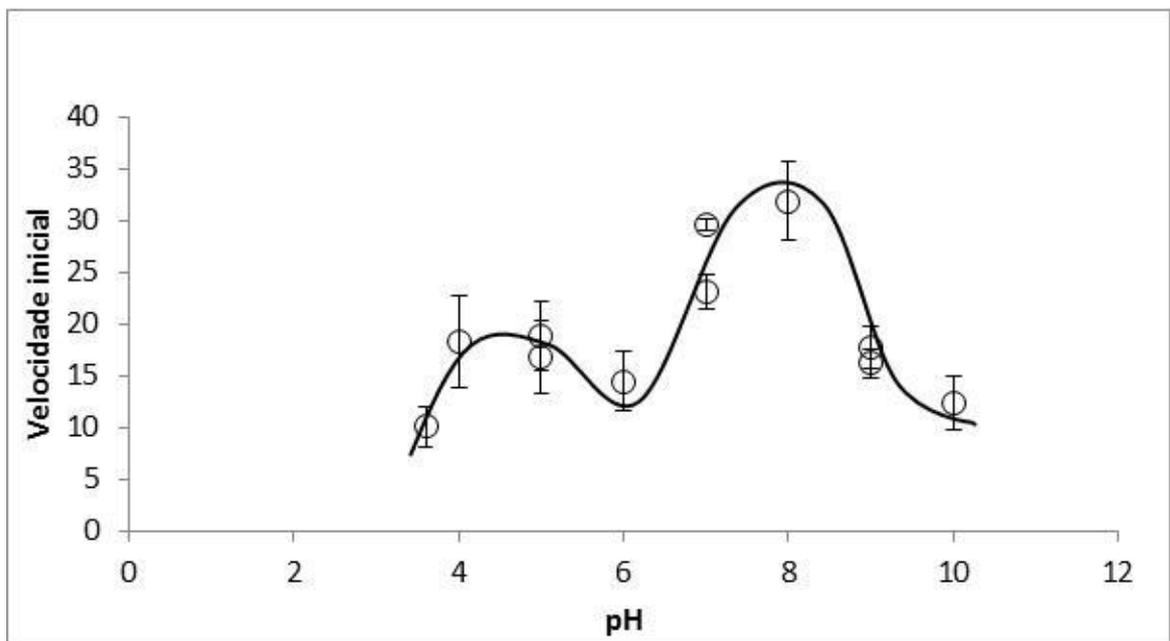


Figura 8. Efeito do pH sobre atividade proteásica no corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA. Valores de velocidade inicial correspondem a unidades arbitrárias de fluorescência por minuto. Para mais detalhes ver Material e Métodos item 3.12.

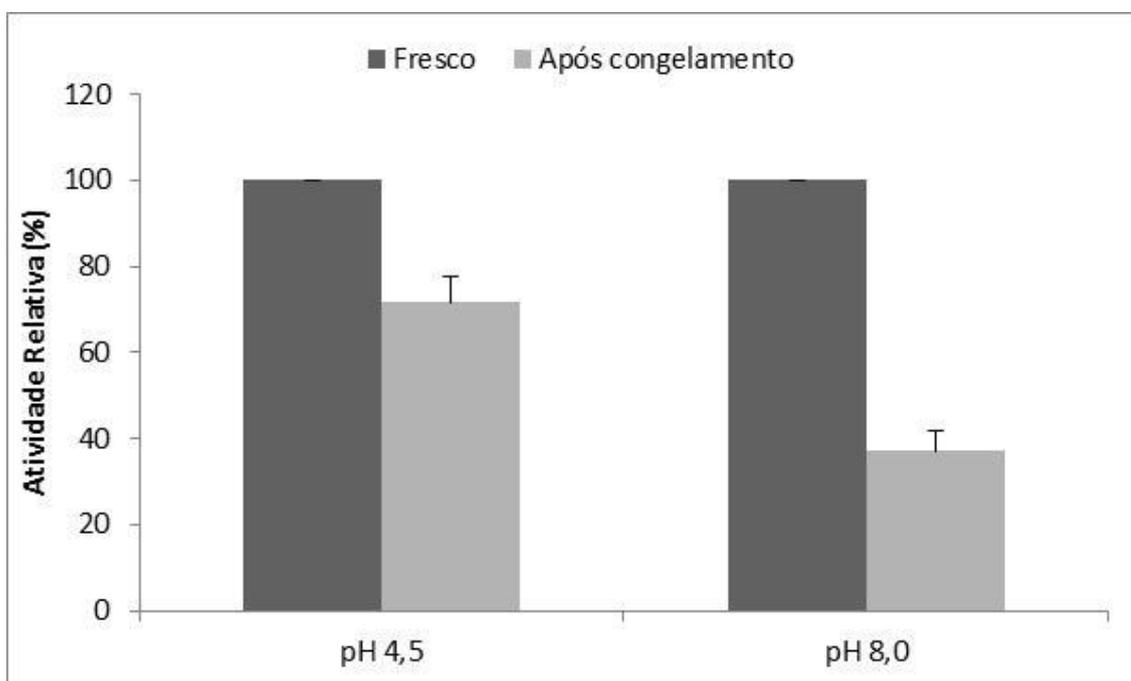


Figura 9. Avaliação do efeito do congelamento sobre a atividade proteolítica. Atividade proteolítica relativa (%) em amostra fresca corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus*, logo após dissecação, e após um ciclo de congelamento e descongelamento. Revelada em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 ou em tampão EPPS 0,2M pH 8,0, com substrato Z-Phe-Arg-MCA.

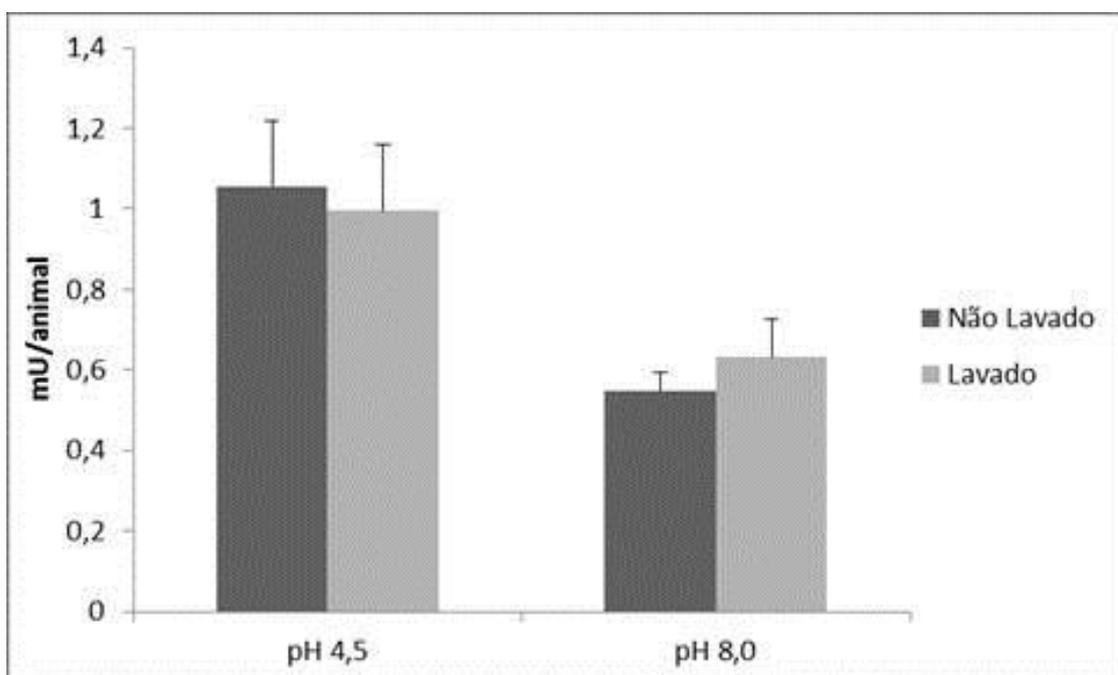


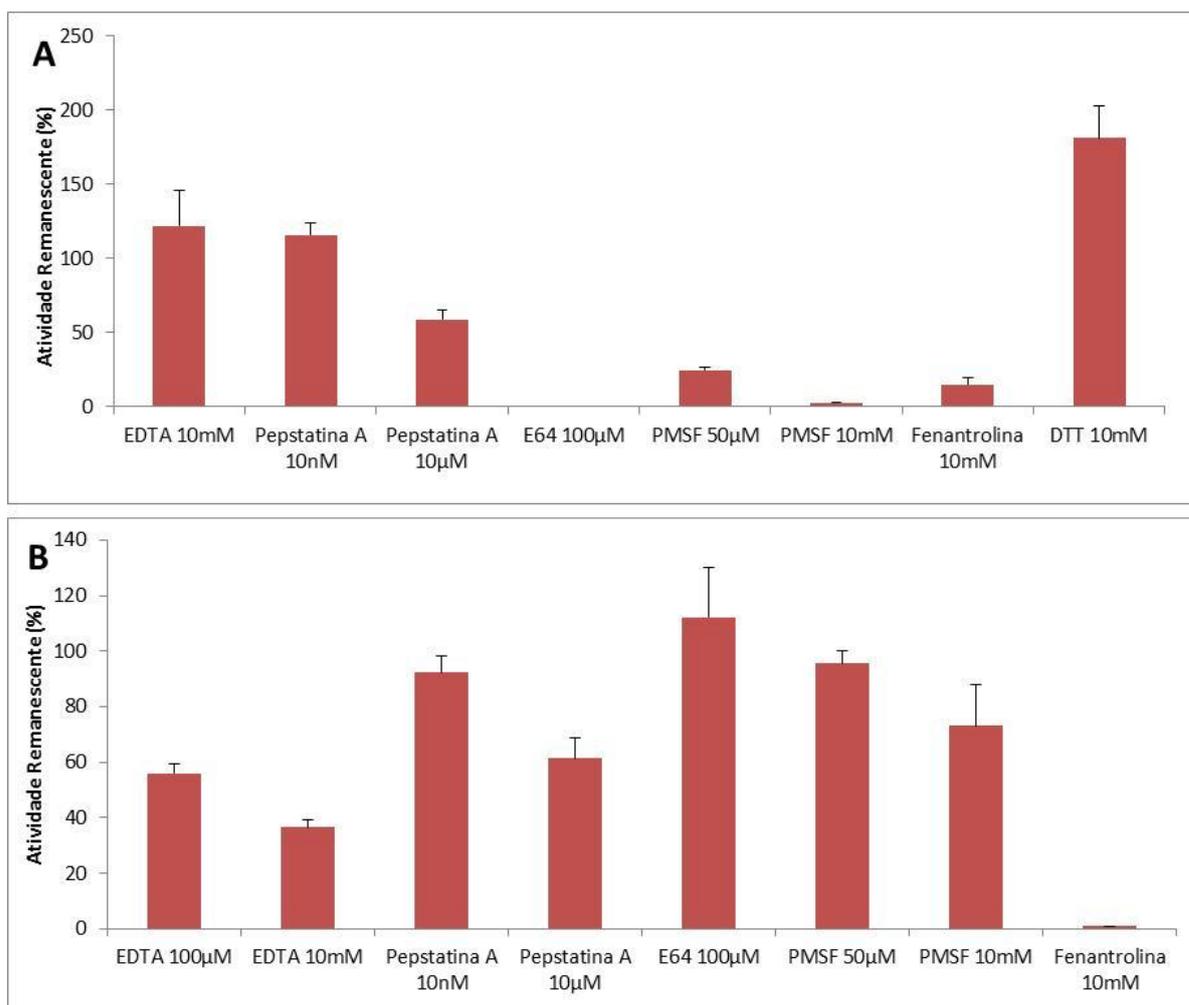
Figura 10. Comparação de atividade (mU/animal) em amostras de corpo gorduroso lavada de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em solução salina 0,9% ou não. Revelada em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 ou em tampão EPPS 0,2M pH 8, com substrato Z-Phe-Arg-MCA.

#### 4.2.3. Efeito de inibidores e de ativador na atividade proteásica

Foram utilizados diferentes inibidores para identificar quais tipos de atividades proteásicas estão presentes no tecido sendo caracterizado. Foram feitos ensaios preliminares com concentrações elevadas de inibidor, nas quais estes nem sempre são específicos, e ensaios em concentrações mais baixas, aonde se espera uma especificidade maior na inibição.

A atividade relativa em pH 4,5 se mostrou completamente inibida pelo inibidor irreversível de cisteína proteinases E64, pelo inibidor de serina proteases PMSF e parcialmente pelo inibidor de aspártico proteases pepstatina A (apenas na concentração de inibição inespecífica 10  $\mu$ M) e pelo quelante Fenantrolina (Figura 11A). Além disso, a protease foi ativada por DTT, um ativador de cisteína proteases. Essa atividade não foi inibida por EDTA nem por Pepstatina A 10 nM.

Já no caso da atividade em pH 8,0, esta foi completamente inibida pelo quelante Fenantrolina. Contudo, foi somente parcialmente inibida pelo quelante EDTA (Figura 11B). A atividade foi também parcialmente inibida pela presença de pepstatina A, inibidor de aspártico proteases, na concentração de inibição inespecífica (10  $\mu$ M). E64 e PMSF não apresentaram efeitos sobre essa enzima.



**Figura 11.** Avaliação do efeito de inibidores e ativador. Atividade proteásica remanescente (%) em pH 4,5 (A) e em pH 8,0 (B) sob efeito de diferentes inibidores (EDTA, pepstatina A, E64, PMSF e Fenantrolina) e ativador de cisteína proteases (DTT) em corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus*, revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA.

#### 4.2.4. Efeito de íons sobre a atividade proteásica de corpo gorduroso em pH 8,0

Como a atividade proteásica de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus* em pH 8,0 na presença de inibidores é inibida por EDTA e Fenantrolina, parcial e completa respectivamente, foram analisadas as recuperações de atividade após a ação de tais quelantes, na presença de diferentes íons metálicos. Para tanto, inicialmente foram analisadas as concentrações de íons que não resultariam em inibição. Deste modo, as concentrações finais ideais de uso para cada íon encontradas foram 100  $\mu\text{M}$  para  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM para  $\text{Co}^{2+}$ , 10  $\mu\text{M}$  para  $\text{Cu}^{2+}$ , 1 mM para  $\text{Mg}^{2+}$ , 10  $\mu\text{M}$  para  $\text{Mn}^{2+}$  e 10  $\mu\text{M}$  para  $\text{Zn}^{2+}$  (Figura 12). É interessante observar que em concentrações acima das descritas acima todos os íons inibem a enzima.

As concentrações de íons que não inibem a enzima foram incluídas nas misturas de reação após incubação com EDTA (Figura 13A) ou Fenantrolina (Figura 13B). Quando essa metaloprotease se encontrava quelada com EDTA somente cobalto foi capaz de recuperar completamente a atividade proteásica controle.

Todavia, na presença de fenantrolina somente o zinco foi capaz de induzir uma recuperação de em torno de 5 % em comparação a atividade controle (Figura 13B).

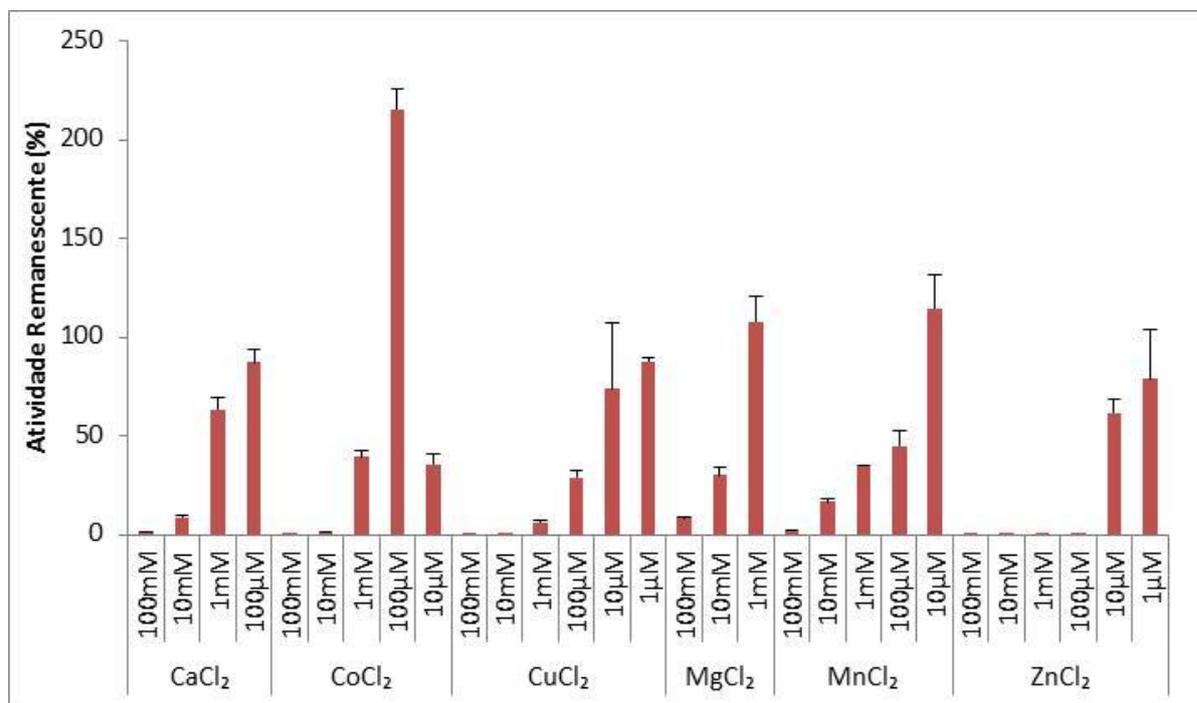


Figura 12. Efeito da incubação com íons metálicos. Atividade proteásica remanescente (%) de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em tampão EPPS 0,2M pH 8,0, sob efeito de íons Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, em diferentes concentrações finais, revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA.

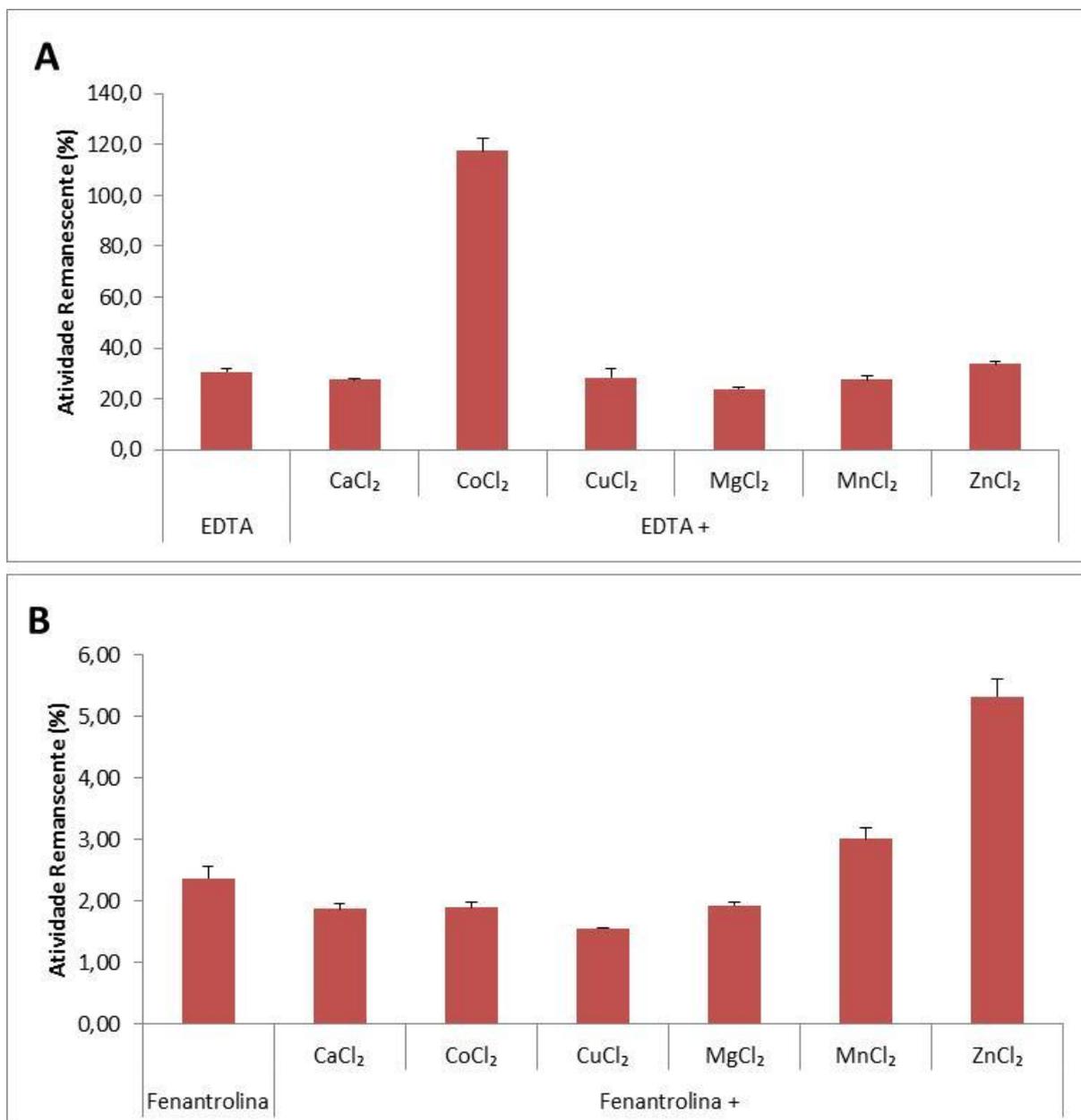


Figura 13. Recuperação de atividade proteásica com íons metálicos. Atividade proteásica remanescente (%) de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em tampão EPPS 0,2M pH 8,0 sob efeito de inibidores de metaloproteases, EDTA 1mM (A) ou (B) fenanthrolina 1mM, incubada posteriormente com CaCl<sub>2</sub> 100µM, CoCl<sub>2</sub> 1mM, CuCl<sub>2</sub> 10µM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, MnCl<sub>2</sub> 10µM ou ZnCl<sub>2</sub> 10µM (concentrações finais).

#### 4.2.5. *Ensaio de atividade em gel após eletroforese em poliacrilamida (Zimografia)*

Foi feita uma zimografia das atividades proteolíticas do corpo gorduroso utilizando o substrato modelo Z-Phe-Arg-MCA, com o objetivo de localizar as enzimas contendo as atividades proteásicas com atividade nos pHs 4,5 e 8,0. Sendo assim, amostras de intestino médio posterior foram utilizadas para efeito de controle positivo.

A imagem resultante da zimografia mostrou não ser possível visualizar uma banda de atividade nas raias de corpo gorduroso em ambos os pHs (raias 2 e 4), indicando que esta técnica não é ideal para este tecido (Figura 14), apesar de ser possível observar uma banca de atividade de intestino médio posterior em pH 4,5 na raia 1.

Entretanto, mesmo que a banda de atividade tenha sido observada somente na raia de amostra de intestino médio posterior, este tecido não apresenta atividade proteásica significativamente maior que o corpo gorduroso (Figura 15). Ainda assim o intestino médio posterior apresenta maior atividade proteásica específica devido a maior concentração de proteínas por  $\mu\text{L}$  de preparação,  $7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  comparadas a  $19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  no corpo gorduroso.

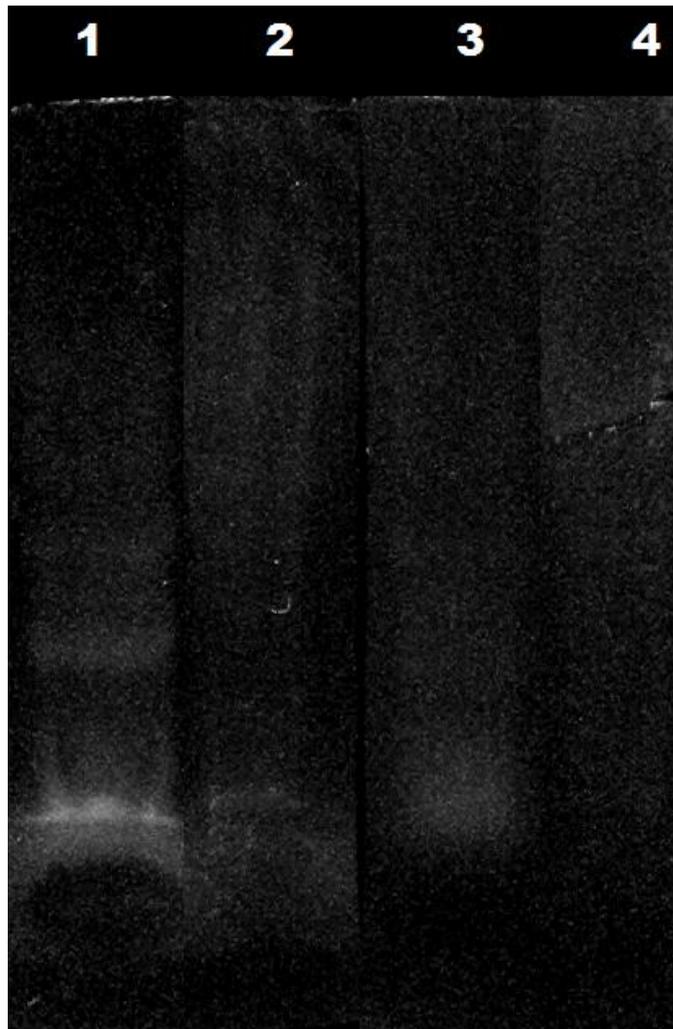


Figura 14. *Ensaio de atividade em gel após eletroforese*. Zimografia de homogenatos de intestino médio posterior (raias 1 e 3) e de corpo gorduroso (raias 2 e 4) de machos adultos de *Rhodnius prolixus* incubados por 12 horas com substrato Z-Phe-Arg-MCA em pH 4,5 (raias 1 e 2) ou pH 8,0 (raias 3 e 4).

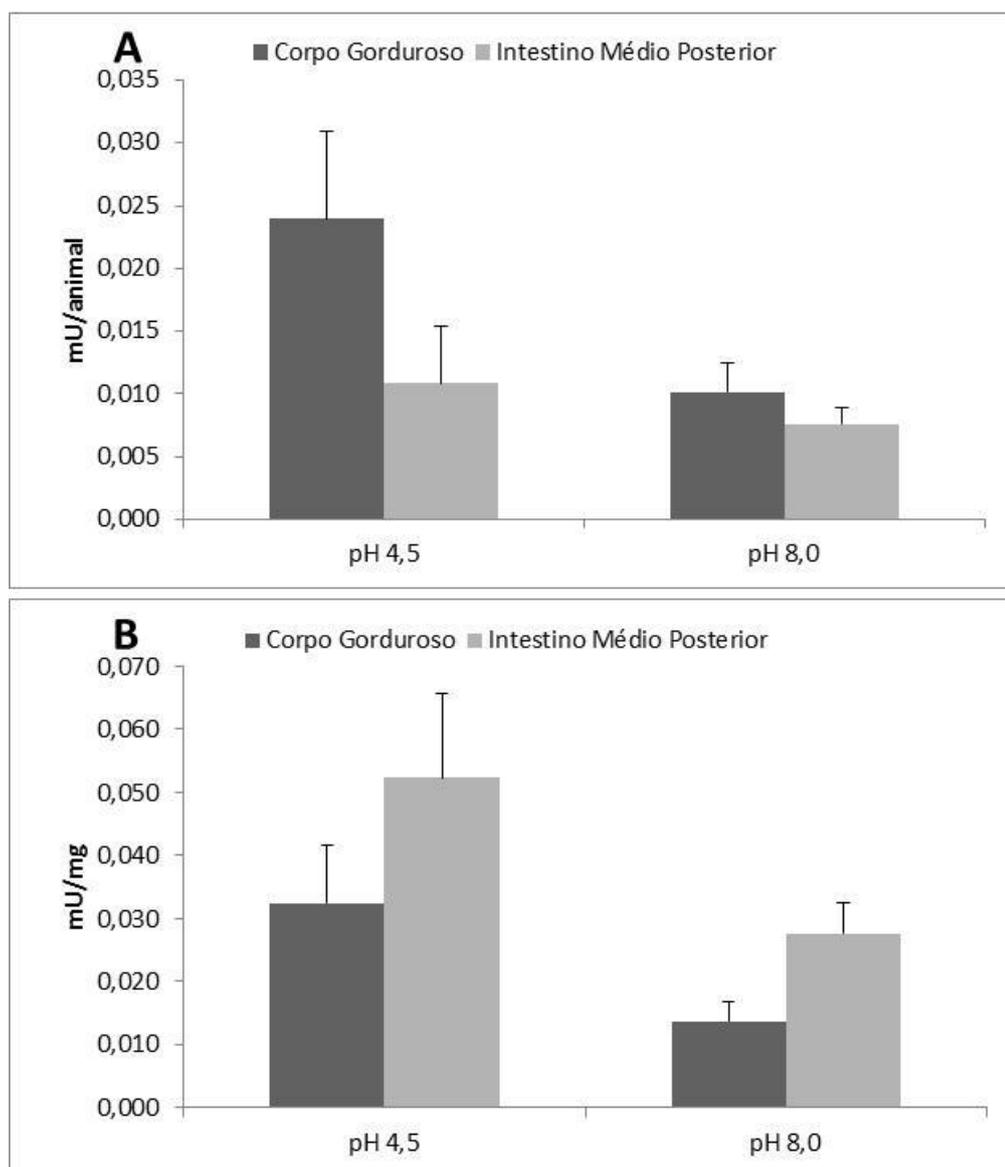


Figura 15. Comparação de atividade em corpo gorduroso e intestino médio de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em pH 4,5 ou pH 8,0. (A) Atividade proteásica por animal (mU/animal). (B) Atividade específica (mU/mg) revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA.

#### 4.2.6. Cromatografia de filtração em gel

A preparação de amostra do corpo gorduroso foi então aplicada em uma cromatografia em coluna de filtração em gel, Superdex 200, e as frações do eluente resultantes foram ensaiadas nos dois pHs. Foram observados dois picos de atividade claramente diferentes. Um pico entre as frações 16,35 e 17,85 mL com atividade em pH 4,5 (Figura 16A), com massa molecular relativa de 23 kDa (Figura 17), e outro entre as frações 14,35 e 15,85 mL com atividade em pH 8,0 (Figura 16B), com massa molecular relativa de 63 kDa (Figura 17).

A atividade específica da amostra antes do processo de cromatografia para um primeiro passo de purificação das proteases sendo estudadas era 6 U/mg em pH 4,5 e 51 U/mg em pH 8,0. Estas atividades específicas passaram a ser 26 U/mg e 363 U/mg nas frações somadas dos picos de atividade em pH 4,5 e 8,0, respectivamente.

Contudo, apesar do aumento da atividade específica, resultado da diminuição da concentração de proteínas presentes na amostra, ainda foi possível identificar diversas bandas no gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) (Figura 18). Observamos cinco bandas com massas moleculares aproximadamente de 53,8 kDa, 43,3 kDa, 31,7 kDa, 24,8 kDa e 13,1 kDa na raia 1 relativa as frações 16,85 e 17,35 mL do pico de atividade em pH 4,5. Assim como sete bandas com massas moleculares de 43,9 kDa, 24,8 kDa, 22,0 kDa, 18,2 kDa, 12,3 kDa, 10,1 e 9,7 kDa na raia 2 relativa as frações 14,85 e 15,35 mL do pico de atividade em pH 8,0.

As frações da cromatografia, no intervalo entre as frações eluídas de 13 a 19 mL, foram então ensaiadas em pH 4,5 na presença de inibidores (Figura 19A), resultando em atividades residuais que confirmam a inibição vista na preparação bruta de amostra de corpo gorduroso. A atividade foi completamente inibida por E64, um inibidor irreversível de cisteína proteinases, e parcialmente inibida por PMSF, inibidor de serina proteases, e Fenantrolina, quelante (Figura 19B).

Da mesma forma, as frações eluídas entre os volumes 13 e 19 mL, dentre as quais se encontram as frações de interesse, foram ensaiadas em pH 8,0 (Figura 20A) na presença de inibidores. A atividade neste pH foi completamente inibida pelos quelantes EDTA e Fenantrolina, confirmando o que já havia sido observado para essa enzima (Figura 20B).

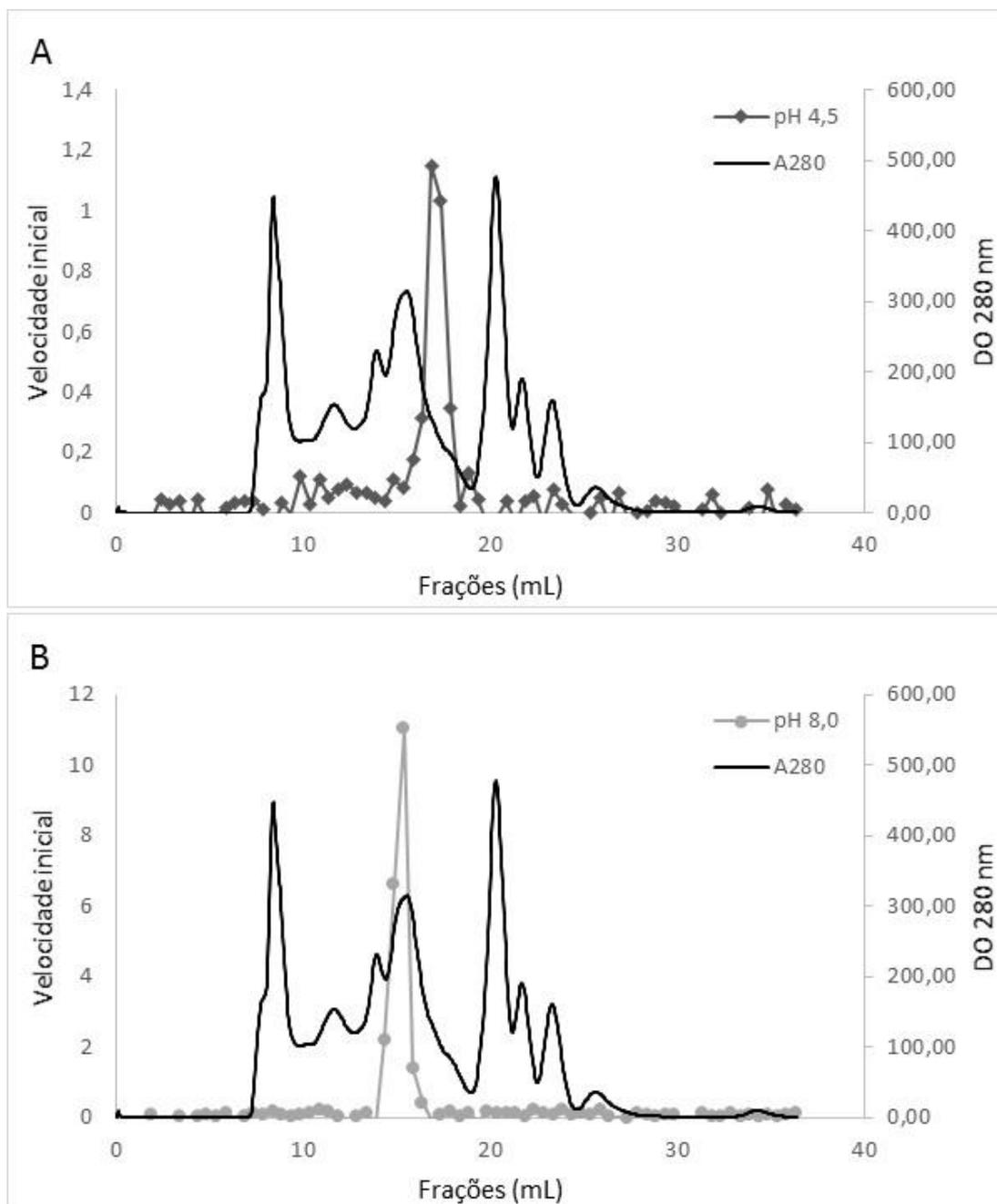


Figura 16. Atividade proteásica nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus*. Revelada em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 (A) ou tampão EPPS 0,2M pH 8,0 (B) com substrato Z-Phe-Arg-MCA. A280 se refere aos valores de densidade óptica (DO) do cromatograma à 280 nm de absorvância. Valores de velocidade inicial correspondem a unidades arbitrárias de fluorescência por minuto.

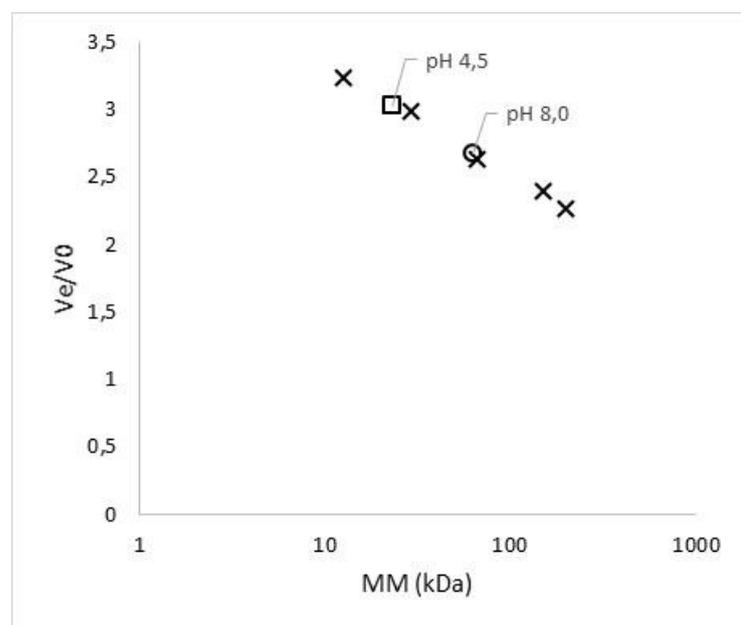


Figura 17. Relação linear entre o logaritmo da massa molecular dos padrões ou das atividades de interesse e o parâmetro  $V_e/V_0$ . Eluição da protease ativa em pH 4,5 (□) e eluição da protease ativa em pH 8,0 (○). Para mais informações ver Materiais e Métodos item 3.18.

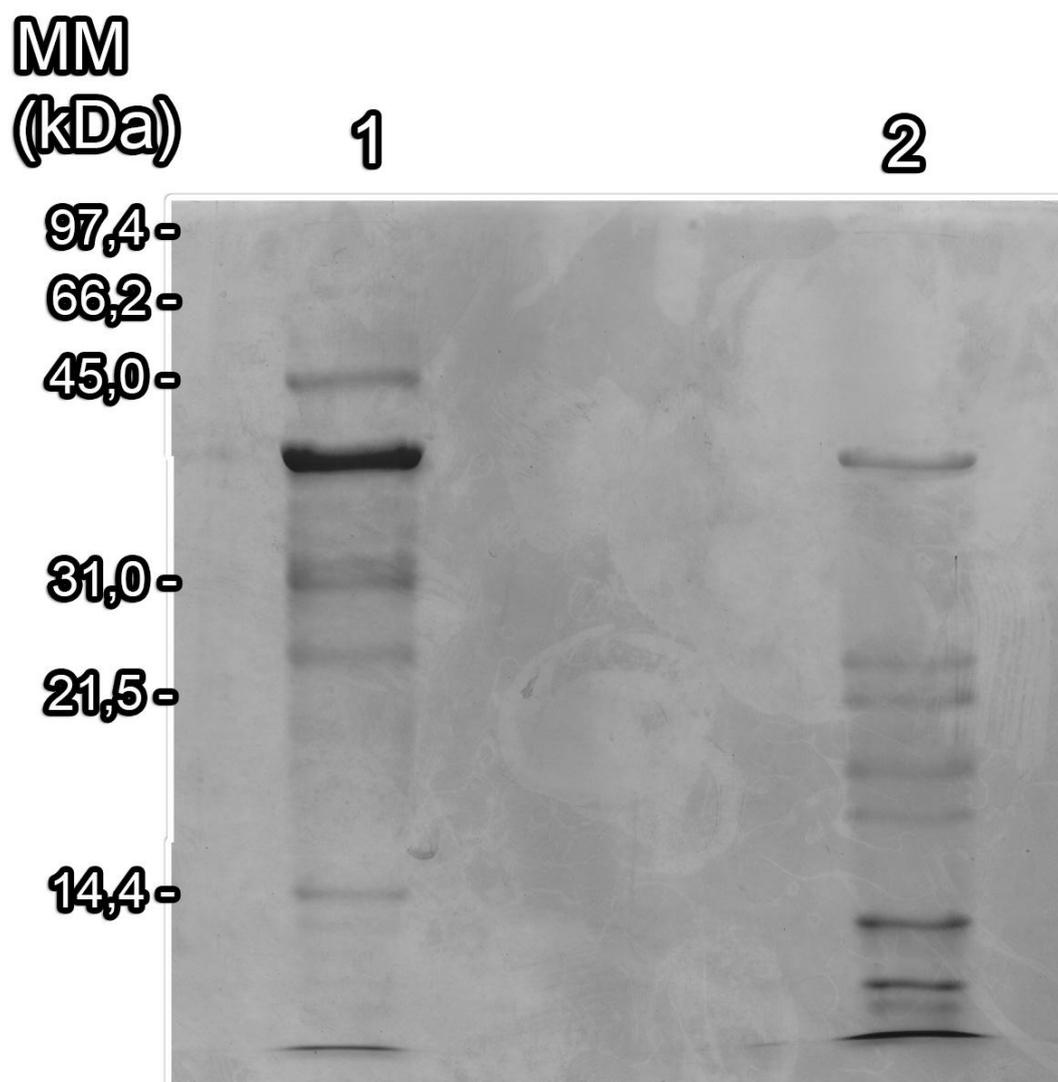


Figura 18. SDS-PAGE, eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%. Raia 1 – frações 31 e 32 da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200. Raia 2 – frações 27 e 28 da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200. Os padrões de peso molecular (MW em kDa) de acordo com Kaleidoscope Prestained Standards estão representados à esquerda. O gel foi corado com Coomassie Blue R.

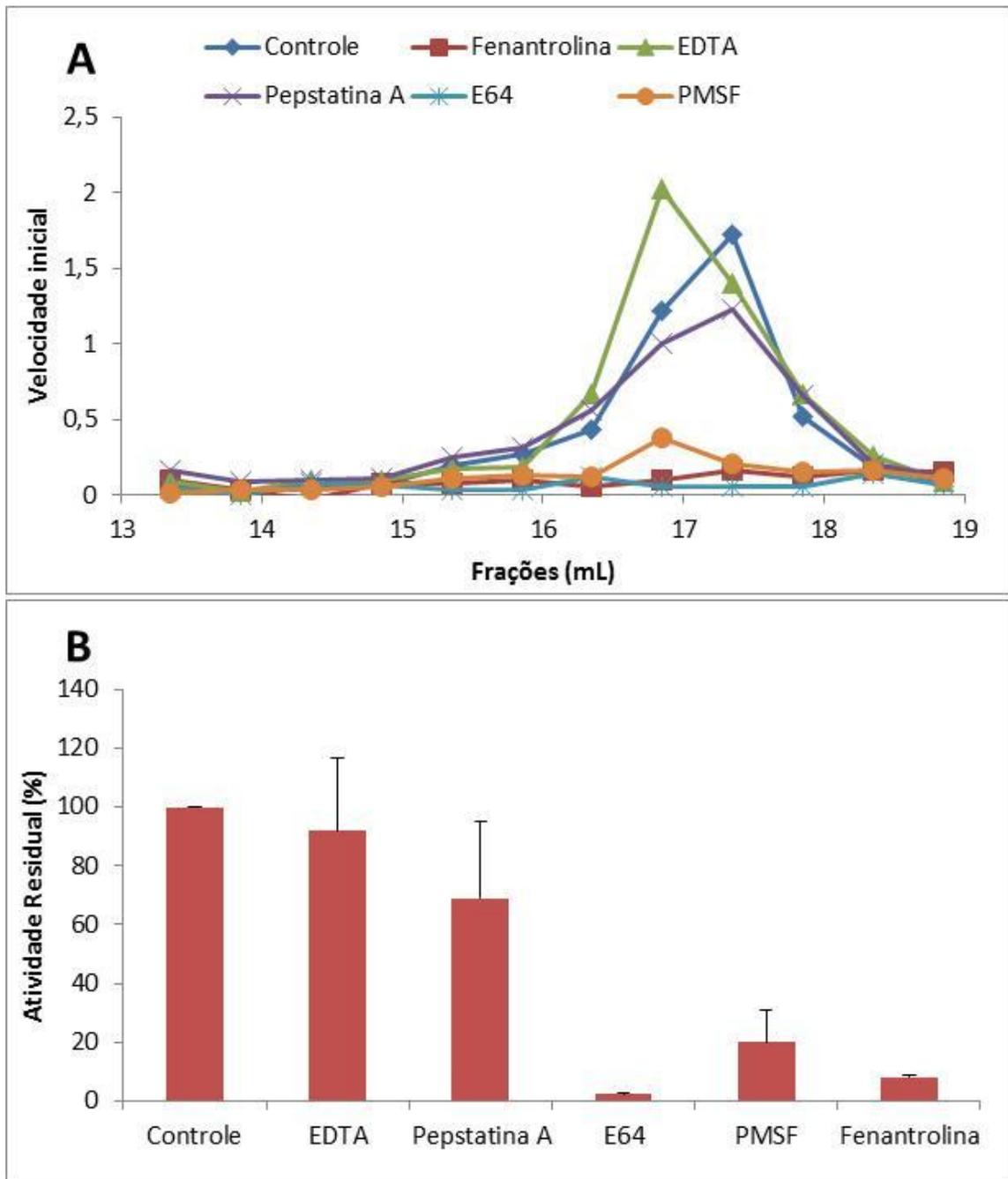


Figura 19. Atividade proteásica em pH 4,5 nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* incubadas com diferentes inibidores de proteases. A atividade foi revelada em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 com substrato Z-Phe-Arg-MCA. (A) Perfil cromatográfico. (B) Média da atividade residual (%) das frações com maior atividade na presença dos inibidores. Valores de velocidade inicial correspondem a unidades arbitrárias de fluorescência por minuto.

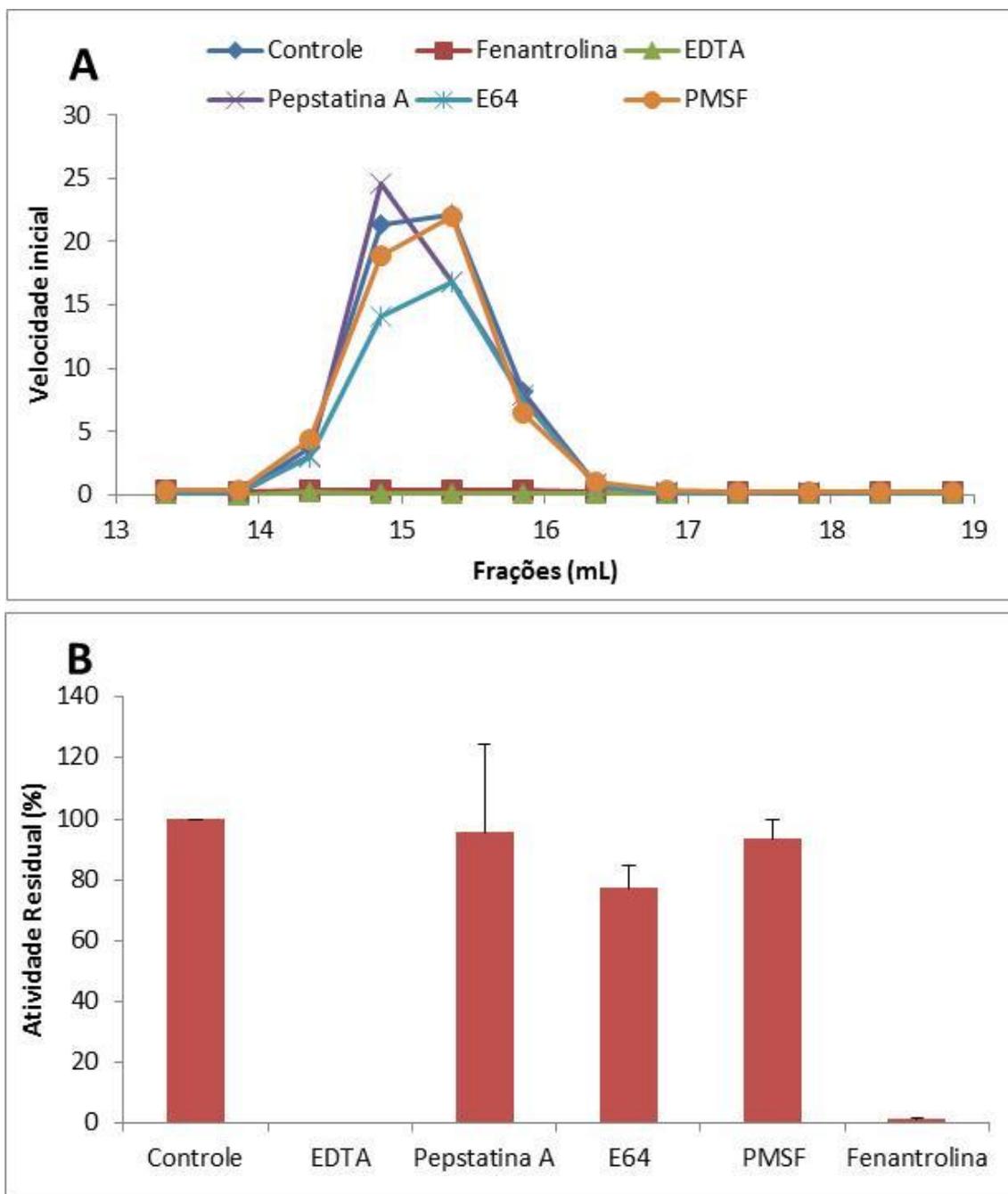


Figura 20. Atividade proteásica em pH 8,0 nas frações resultantes da cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 de homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* incubadas com diferentes inibidores de proteases. A atividade foi revelada em tampão EPPS 0,2M pH 8,0 com substrato Z-Phe-Arg-MCA. (A) Perfil cromatográfico. (B) Média da atividade residual (%) das frações com maior atividade na presença dos inibidores. Valores de velocidade inicial correspondem a unidades arbitrárias de fluorescência por minuto.

#### 4.2.7. *Variação no padrão de atividade proteásica ao longo dos dias após a alimentação sanguínea*

Visando caracterizar o padrão de atividade proteásica de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus*, as atividades foram ensaiadas em insetos em jejum e ao longo dos dias após alimentação sanguínea.

A análise destes resultados mostrou haver um padrão relativamente crescente na atividade em pH 4,5 ao longo dos dias após alimentação, atingindo um pico entre os 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dias. No entanto, a atividade em pH 8,0 mostra não se enquadrar em um padrão claro, oscilando ao longo dos dias, tendo uma queda significativa no 7<sup>o</sup> dia após a alimentação (Figura 21).

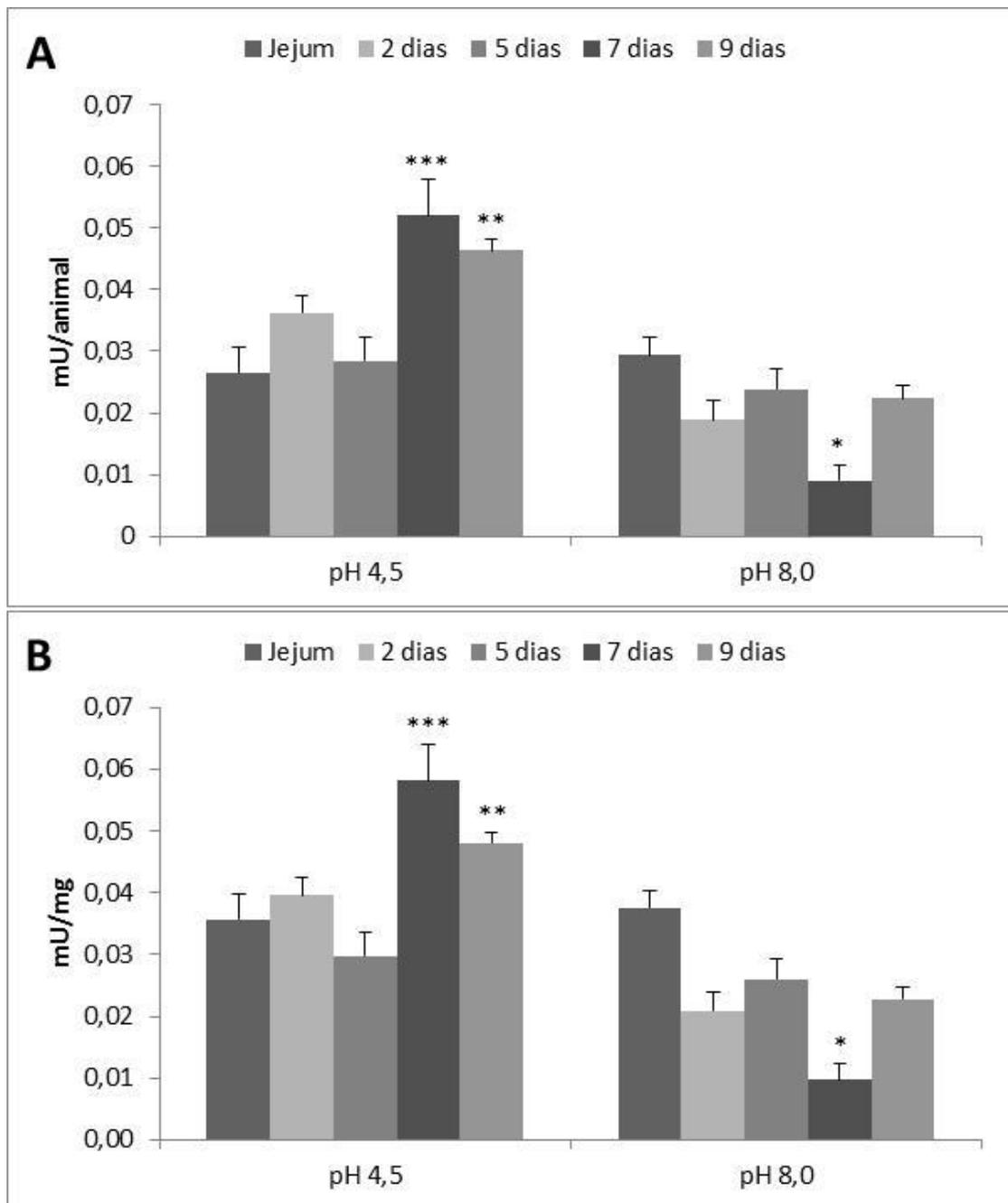


Figura 21. Perfil de atividade proteásica no corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* ao longo dos dias após alimentação sanguínea. Revelada com substrato Z-Phe-Arg-MCA. (A) Atividade (mU) por animal. (B) Atividade específica do tecido (mU/mg) (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

#### 4.2.8. Efeitos da inoculação de microorganismos na atividade proteásica do corpo gorduroso e hemolinfa

Insetos inoculados com *T. rangeli* cepa Macias ou com *Ustilago* sp. apresentaram uma diminuição significativa da atividade proteásica no corpo gorduroso em pH 4,5. 24h após esta inoculação, tanto a levedura *Ustilago* sp., nas duas concentrações, quanto o *T. rangeli* cepa Macias, foram capazes de causar esta redução de atividade (Figura 22A).

A redução dessa atividade no corpo gorduroso na presença de *Ustilago* sp. concentrado ainda é visível após 48h. Contudo, depois de sete dias, os níveis dessa protease já se normalizam. Neste período só é possível notar redução da atividade no grupo que recebeu a inoculação de cultura diluída de *T. rangeli* cepa Macias (Figura 22A).

Apesar disso, as inoculações não resultaram em nenhum tipo de alteração significativa da atividade proteásica ativa em pH 8,0 no corpo gorduroso (Figura 22B), mostrando não haver indícios de envolvimento desta atividade com o sistema imune de *R. prolixus*. Na hemolinfa dos machos adultos inoculados é possível notar divergências significativas no padrão de atividade proteásica, apesar desta atividade ser em torno de 10 vezes menor que a atividade detectada no corpo gorduroso.

A atividade proteásica em pH 4,5 se mostra reduzida na presença do inoculado de *Ustilago* sp. (Figura 23A), sem que se note variações significativas nas outras condições quando comparadas ao grupo controle que não sofreu nenhum tipo de manipulação (100%).

No caso da atividade proteásica relativa em pH 8,0, as análises mostraram aumento significativo desta atividade nos grupos que receberam inoculação tanto da cultura de *T. rangeli* cepa Macias, quanto de *Ustilago* sp., ambos na condição mais concentrada (Figura 23B).

O padrão de atividade proteásica na hemolinfa de insetos inoculados com *Ustilago* sp. na maior concentração não foi determinado.

Apesar das inoculações não resultarem em mudanças drásticas na atividade proteásica estudada no corpo gorduroso de *R. prolixus*, a inoculação com a suspensão contendo a levedura *Ustilago* sp. é capaz de induzir de forma significativa a ativação do sistema profenoxidase nestes mesmos insetos (Figura 24).

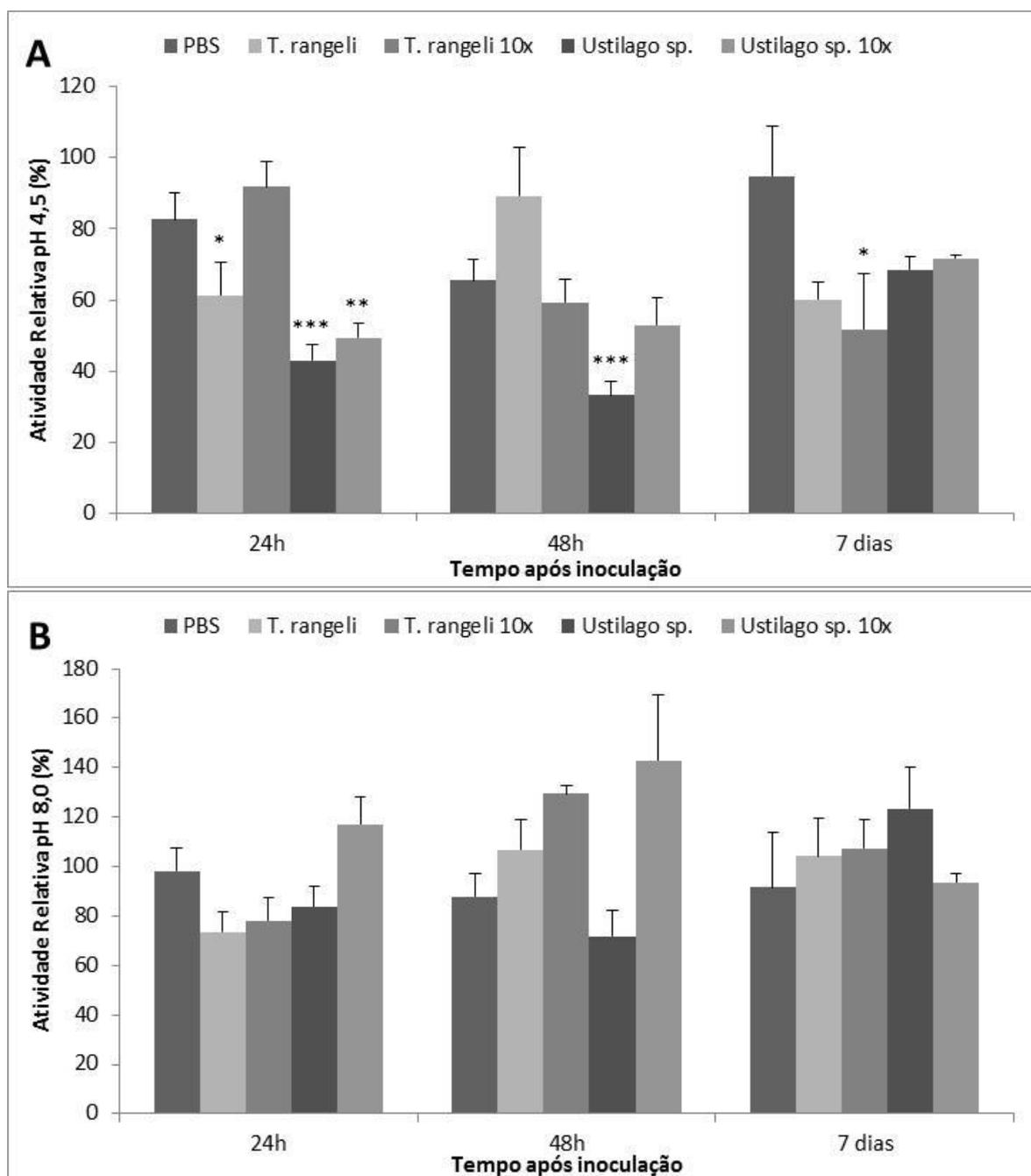


Figura 22. Efeitos da inoculação de microrganismos sobre a atividade proteásica de corpo gorduroso. Atividade proteásica relativa (%) em corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 (A) e tampão EPPS 0,2 pH 8,0 (B) inoculados com suspensão contendo *Trypanosoma rangeli* cepa Macias ou *Ustilago sp.*, diluídas ou não (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

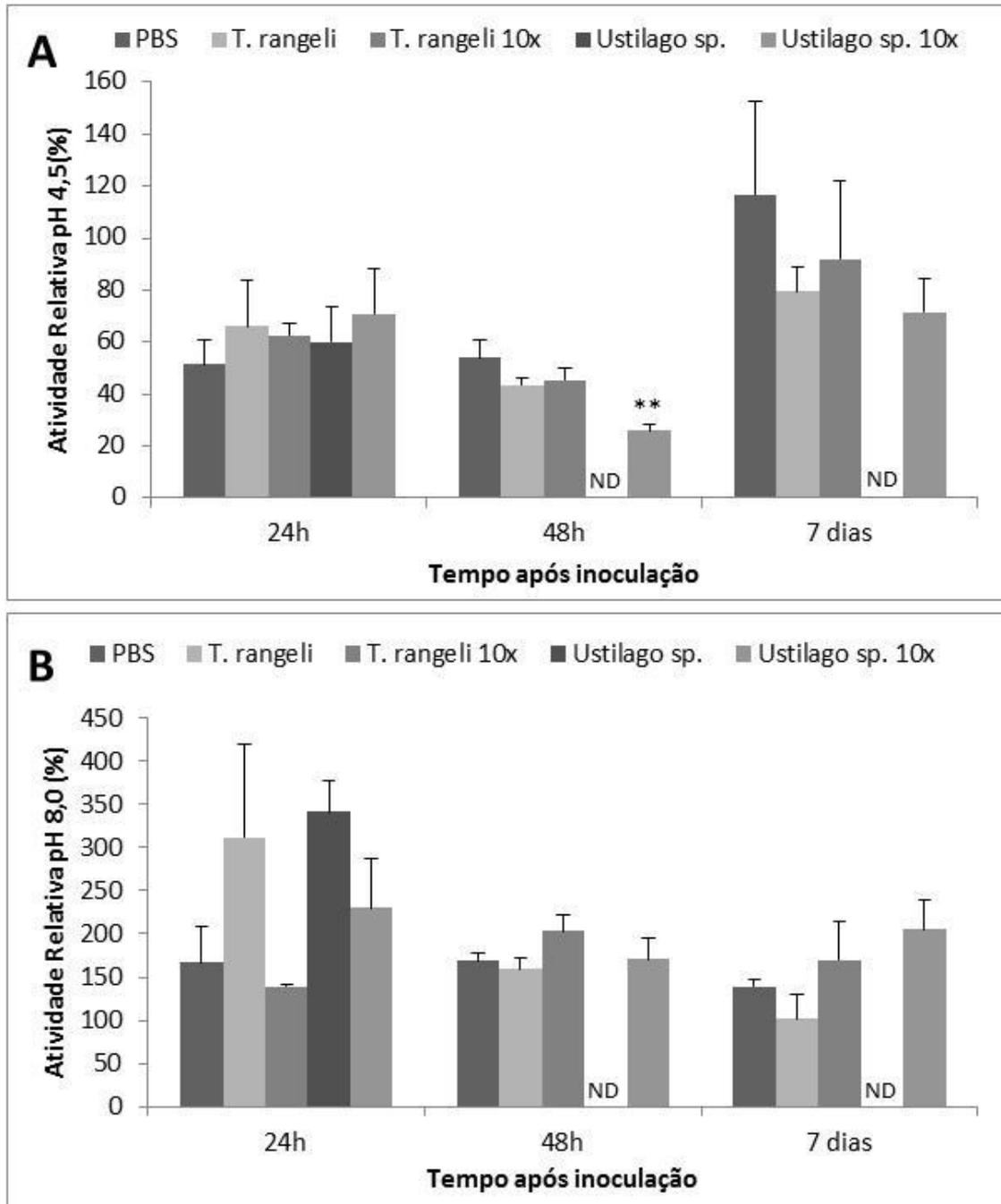


Figura 23. Efeitos da inoculação de microrganismos sobre a atividade proteásica da hemolinfa. Atividade proteásica relativa (%) em hemolinfa de machos adultos de *Rhodnius prolixus* em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 (A) e tampão EPPS 0,2 pH 8,0 (B) inoculados somente com PBS ou com suspensão contendo *Trypanosoma rangeli* cepa Macias ou *Ustilago sp.*, diluídas ou não (\*\*,  $p < 0,01$ ).

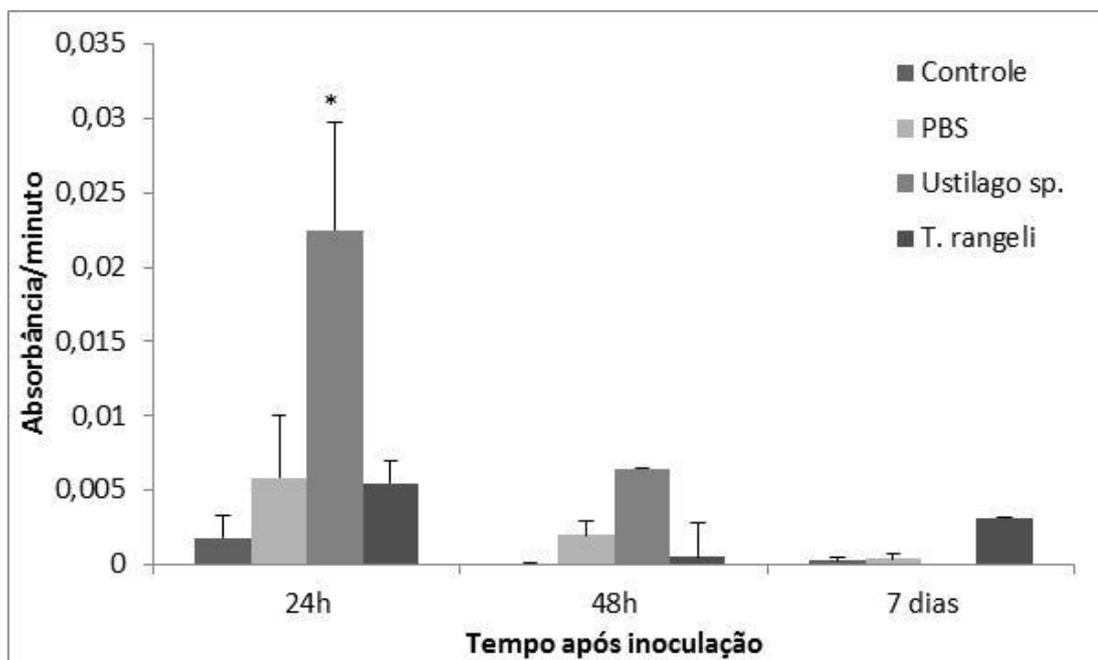


Figura 24. Atividade fenoloxidásica em hemolinfa de machos adultos de *Rhodnius prolixus* inoculados com suspensão *Trypanosoma rangeli* cepa Macias ou *Ustilago sp* ou somente PBS (\*,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.9. Ativação *in vitro* do sistema fenoloxidase com laminarina

Para avaliar se a presença do corpo gorduroso e seus componentes proteásicos são necessários para a ativação do sistema profenoloxidase e se este tecido é capaz de excretar ativadores na presença de um indutor, este tecido foi incubado na presença ou ausência de laminarina e tanto os homogenatos dos tecidos quanto os meios de incubação foram usados para avaliar a ativação do sistema PPO na hemolinfa de machos adultos de *R. prolixus*.

Incubações de corpo gorduroso em solução salina mostraram induzir uma ativação basal do sistema profenoloxidase, mas esta indução resultou em atividade fenoloxidásica significativamente maior somente no caso das amostras ensaiadas na presença do meio de incubação contendo laminarina como indutor (Figura 25).

No entanto, nestas mesmas amostras de homogenato de corpo gorduroso, a presença de laminarina na incubação *in vitro* não foi capaz de induzir diferenças significativas na atividade proteásica nos dois pHs ensaiados (Figura 26).

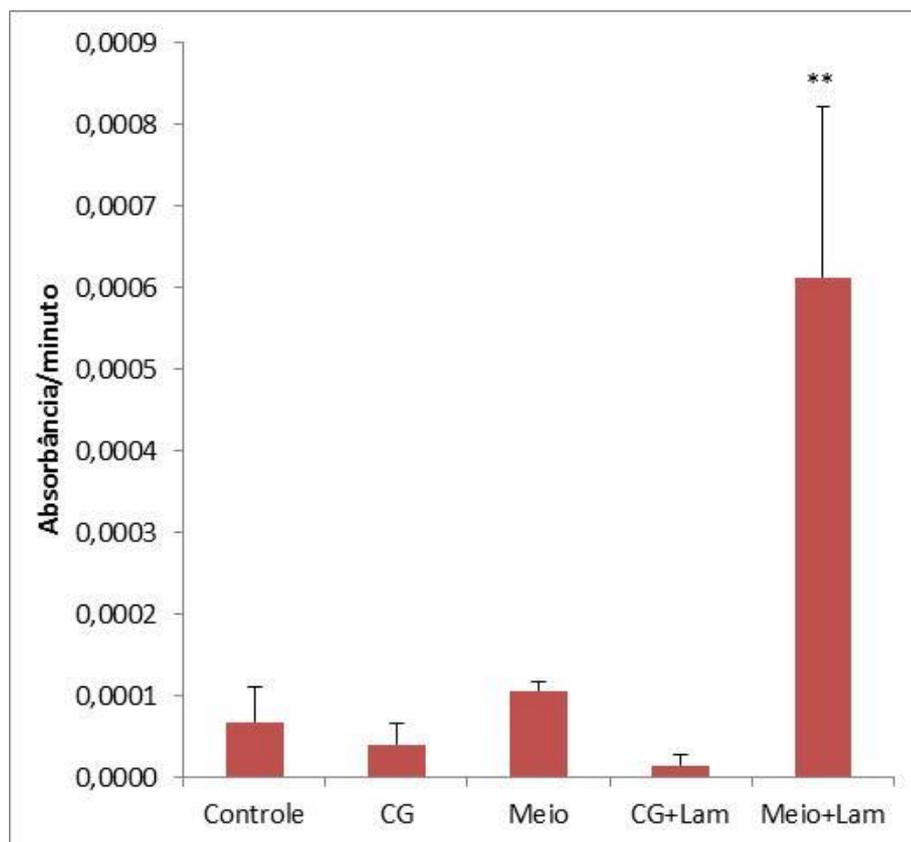


Figura 25. Atividade fenoloxidásica em hemolinfa de machos adultos de *Rhodnius prolixus* incubada com homogenato de corpo gorduroso (CG) ou meio (PBS) onde este tecido foi incubado durante 30 minutos, ambos contendo ou não laminarina (Lam) (\*\*,  $p < 0,01$ ).

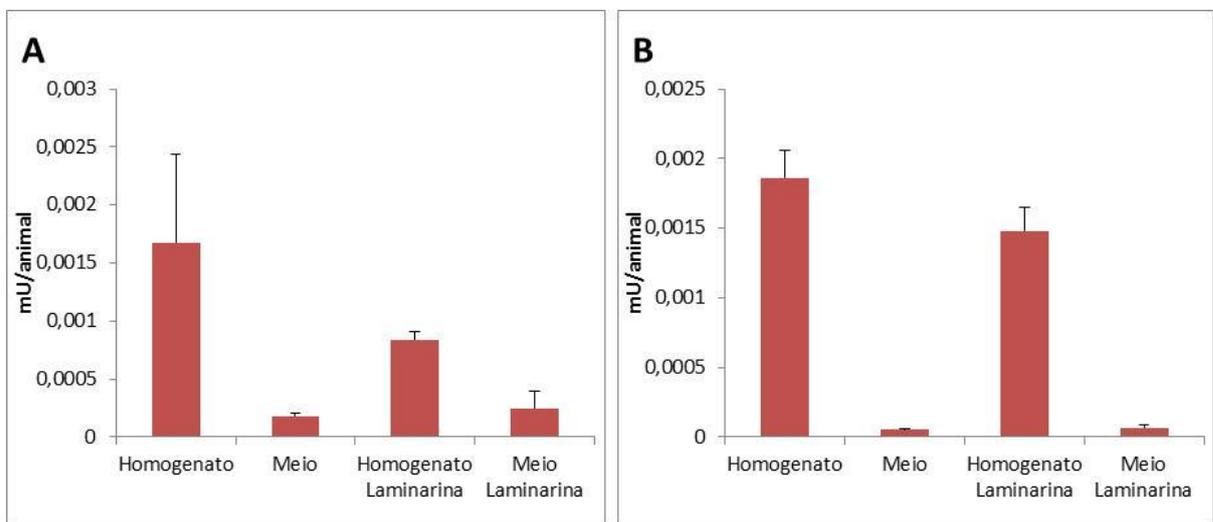


Figura 26. Atividade proteásica em tampão acetato de sódio 0,2M pH 4,5 (A) e tampão EPPS 0,2 pH 8,0 (B) em homogenato de corpo gorduroso de machos adultos de *Rhodnius prolixus* e em meio (PBS) onde este tecido foi incubado por 30 minutos.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Efeitos do triflumuron em *Rhodnius prolixus*

Os inibidores de síntese de quitina do tipo benzofeniluréias, que incluem o triflumuron e seus análogos, foram introduzidos nos anos 70 e têm se mostrado muito efetivos no controle de pragas agrícolas devido a suas altas atividades inseticidas, inclusive em baixas concentrações, sua seletividade e aos baixos índices de desenvolvimento de resistência (Matsumura 2010).

Estes inibidores estão incluídos do grupo dos reguladores de crescimento dos insetos, compostos por mais duas classes que divergem em modo de ação, os análogos de hormônio juvenil e os agonistas de ecdisona (Graf 1993; Tunaz e Uygun 2004). Por terem diferentes sítios alvo, estes compostos têm sido usados também como uma alternativa no controle de insetos vetores, já que inseticidas neurotóxicos tem efeito muito específico, o que pode levar a rápido surgimento de resistência (Graf 1993).

Apesar dos efeitos do triflumuron já terem sido estudados em ninfas de 5<sup>o</sup> instar de *R. prolixus* mostrando altos índices de mortalidade, além de prolongamento de estágio ninfal e inibição da muda destes insetos para o estágio adulto (Mello et al. 2008), nossos resultados mostraram a eficácia deste composto em fêmeas adultas da mesma espécie.

Diferentemente de estudos anteriores que resultaram em mortalidade reduzida de apenas 5% em fêmeas de *Doru luteipes* tratadas diretamente com triflumuron (Redoan et al. 2013), nossos resultados mostraram números altos de fêmeas mortas em todos os tratamentos com o composto (Tabela 1; Tabela 2 e Tabela 3). O tratamento tópico foi o que se mostrou o mais eficaz (Tabela 2), levando 90% das fêmeas a morte apenas um dia após a aplicação do produto sobre o dorso do inseto. Além disso, os tratamentos tópico e contínuo foram os mais eficazes no decorrer de 30 dias após as aplicações do produto, atingindo em torno de 96% de mortalidade de fêmeas tratadas (Tabela 2; Tabela 3).

A elevada mortalidade de adultos se contrapõe ao que se esperaria de tratamentos contendo triflumuron, devido ao seu modo de ação, que por ser um inibidor da síntese de quitina teria ação principalmente ovicida e larvicida (Redoan et

al. 2013). Entretanto, tratamentos oral e contínuo de *Tenebrio molitor* com diflubenzuron logo após a muda já mostraram resultados semelhantes de redução de longevidade de adultos somada a redução em 40% da espessura da cutícula externa deste inseto, causada provavelmente por alterações da deposição da quitina (Soltani 1984). Porém, o efeito também ocorre em adultos mais antigos e com maior intensidade, já que foi vista redução de longevidade com doses 10 vezes menores, indicando que o diflubenzuron tem outras ações fisiológicas (Soltani 1984).

A menor mortalidade em fêmeas de *R. prolixus* tratadas oralmente (Tabela 1) pode estar relacionada ao maior surgimento de populações resistentes graças à pressão seletiva exercida neste tipo de tratamento, como visto por Pinto e do Prado (2001) em *Musca domestica* tratadas oralmente com reguladores de crescimento. Esta reduzida mortalidade pode ainda estar ligada a interação do composto ativo ingerido com enzimas presentes no sistema digestivo ou nos túbulos de Malpighi, tornando a molécula menos tóxica ou até não tóxica ao inseto (Yu 2004).

Além da mortalidade, os resultados mostram que o triflumuron reduz substancialmente a eclosão de ninfas a partir dos ovos postos pelas fêmeas tratadas (Tabela 1; Tabela 2 e Tabela 3), corroborando os resultados obtidos em *Tribolium castaneum* por Merzendorfer et al. em 2012. Estes autores, apesar de não terem visto redução na oviposição, indicaram que mesmo que os embriões se desenvolvessem normalmente dentro dos ovos postos pelas fêmeas tratadas com diflubenzuron, análogo ao triflumuron, as ninfas não conseguiam quebrar os ovos para emergir, devido à sua cutícula enfraquecida ou ausência de força mecânica para atravessar a casca do ovo.

Nossos resultados mostraram também que este inibidor de síntese de quitina é um potente inibidor de oviposição em fêmeas de *R. prolixus*, principalmente quando tratadas de forma contínua na presença do composto, levando a uma taxa de oviposição de em torno de 17 ovos por fêmea, comparada a 59 ovos por fêmea no grupo controle (Tabela 3). O mesmo foi visto em *Tribolium castaneum* por Parween et al. (2001) e por Sagheer et al. (2012). Este autor sugere que o resultado deve-se ao efeito transovariano do triflumuron, já que outros inibidores de síntese de quitina, análogos ao triflumuron, causam interrupção total ou parcial da embriogênese além de afetar o desenvolvimento gonadal, resultando na diminuição do número de ovos viáveis (Soltani-Mazouni 1994). A redução de oviposição vista aconteceu de forma

dose dependente assim como em *Tribolium confusum* (Ioni et al. 2011), mostrando que o efeito está diretamente relacionado à concentração utilizada do inseticida.

Tanto os efeitos do triflumuron sobre a oviposição quanto sobre a eclosão das ninfas foram observadas por diversos autores em outras espécies como, por exemplo, *Aedes aegypti* (Belinato et al. 2009). Esses autores não só viram a redução nesses aspectos da reprodução do inseto, como também observaram que muitas das fêmeas analisadas não apresentavam indícios de inseminação em suas espermatecas, além de alterações fisiológicas que possivelmente reduziriam a capacidade vetorial destes insetos. Há também inúmeros registros destes efeitos descritos com outras benzofeniluréias, como o noviflumuron em *Blattella germanica* (Wang e Bennett 2006). Este composto apresenta forte efeito ovicida, resultando em um aumento na razão de ootecas não eclodidas em relação às eclodidas.

Em *R. prolixus*, o desenvolvimento dos oócitos em fêmeas tratadas foi observado através de dissecação, o que permitiu observar a presença de um número maior de oócitos encontrados nos ovários de fêmeas tratadas oralmente com triflumuron quando comparados ao número de oócitos encontrados nos ovários das fêmeas do grupo controle. Contudo, o mesmo não ocorreu em fêmeas tratadas topicamente. Os oócitos encontrados em fêmeas tratadas topicamente com o composto apresentavam comprimento significativamente reduzido (Figura 2). Estes resultados vão ao encontro daqueles observados por Mansur et al. (2010), que mostraram os mesmos efeitos em fêmeas de *R. prolixus* tratadas com lufenuron.

Em outras espécies, o diflubenzuron foi descrito como um interruptor do crescimento e do desenvolvimento de oócitos devido a uma diminuição da espessura do epitélio folicular e do comprimento do folículo basal (Lim e Lee 1982; Soltani e Soltani-Mazouni 1992). Além do mais, já foi observada queda do número de folículos vitelogênicos, sugerindo redução de atividade vitelogênica. Porém, outros resultados em *Tenebrio molitor* mostraram alterações em constituintes tanto da hemolinfa quanto do ovário, indicando que a redução de fecundidade nas espécies estudadas pode se originar na inibição da vitelogênese (Soltani-Mazouni 1994), resultando em baixos números de ovos postos e viáveis.

Em geral, ovos atrésicos são reabsorvidos pelos ovários com o objetivo de eliminar ovos anormais, evitando desperdício de recursos que seriam usados para maturação dos ovos defeituosos (McCall 2004). Isso pode explicar tanto a redução

da oviposição, quanto a redução do tamanho dos oócitos presentes nas fêmeas tratadas.

Dias após a oviposição das fêmeas de *R. prolixus* notou-se que os ovos postos por fêmeas provenientes de todos os grupos tratados, inicialmente rosados devido a presença de proteína ligante de heme (Oliveira et al. 1995), exibiram uma descoloração, tornando-se escurecidos. O mesmo foi observado por Wang e Bennett (2006) em *Blattella germanica*, cujas fêmeas, que ingeriram iscas contendo noviflumuron, carregavam ootecas escurecidas, e por Mansur et al. (2010) nos ovos postos por fêmeas de *R. prolixus* que haviam sido tratadas com lufenuron. Os autores especulam que este fato deve-se a facilitação de reações oxidativas em decorrência de anormalidades na camada quitinosa da cutícula dos ovos.

Além do mais, estudos anteriores mostraram que doses subletais de triflumuron, analisadas sob a ótica de toxicologia demográfica, tem ainda capacidade de reduzir a taxa de crescimento intrínseca, baseada na sobrevivência e na fecundidade dos insetos tratados, levando a redução da capacidade de crescimento populacional (Sáenz-de-Cabezón e Zalom 2006). Portanto, mesmo que a ação inseticida desta benzofeniluréia, assim como de seus análogos, seja mais lenta que os inseticidas convencionais com alvos neurológicos, a persistência da atividade deve ser levada em consideração, principalmente no manejo integrado de controle de população de insetos.

Em relação a digestão dos insetos tratados oral e topicamente com doses subletais de triflumuron, esta parece ter sido afetada quando analisamos a perda de peso das fêmeas ao longo de 15 dias após a hematofagia, porém de forma diferente ao que foi observado por Soltani (1984) em *T. molitor* (Figura 4). O autor notou perda de peso significativa nos adultos tratados continuamente com diflubenzuron, sugerindo comprometimento da digestão devido à ausência observada da membrana peritrófica no intestino médio da maioria dos insetos. Portanto, provavelmente não foi possível observar o mesmo em *R. prolixus* porque hemípteros não apresentam membrana peritrófica quitinosa no intestino médio, somente uma membrana perimicrovilar fosfolipídica (W. Terra 1990). No entanto, como o intestino posterior é um órgão de origem ectodérmica, este contém quitina em sua composição, então esta região do trato digestivo pode estar sendo alterada pelo composto, provavelmente com enfraquecimento da parede do reto, o que poderia

explicar as alterações morfológicas de aumento drástico no tamanho desse órgão, observadas durante as dissecções (Figura 5).

O aumento da porção posterior do intestino pode ter origem no comprometimento do sistema excretor do inseto, resultando em acúmulo de líquido no intestino posterior, assim como foi demonstrado previamente com *Rhodnius prolixus* tratados com diversos inseticidas por Maddrell e Casida em 1971. Os autores testaram 42 compostos de diferentes grupos de inseticidas, dentre os quais 50% causaram grande excreção de líquido para dentro do lúmen do intestino posterior, provavelmente por um aumento da liberação do hormônio excretor na hemolinfa. No entanto, o conteúdo do intestino posterior pode estar sendo retido por uma paralisia do peristaltismo do mesmo. O aumento da atividade secretora dos túbulos de Malpighi gera alterações no balanço iônico, assim como aumenta a concentração do inseticida na hemolinfa do inseto, o que aumenta a atividade do composto (Maddrell e Casida 1971).

Ainda avaliando este aspecto, como o peso inicial das fêmeas alimentadas com sangue contendo 1 µL de triflumuron por mL, a qual tratada se mostrou significativamente diferente das fêmeas controle, mesmo em baixas concentrações o triflumuron parece ter efeito repelente ou fagoinibidor. Isso difere do que foi observado em moscas do gênero *Anastrepha* alimentadas com dieta contendo lufenuron, nas quais esta benzofeniluréia em baixas concentrações não resultou em inibição de alimentação (Moya et al. 2010).

Assim como em larvas de *Anopheles quadrimaculatus* (Zhang e Zhu 2006) e de *Aedes aegypti* (Farnesi et al. 2012), expostas a diflubenzuron e novaluron respectivamente, em *R. prolixus*, foi observada uma significativa redução na quantidade de quitina na carcaça de fêmeas acasaladas e não acasaladas alimentadas com sangue contendo triflumuron e também nas carcaças de fêmeas não acasaladas tratadas topicamente (Figura 3). Esta alteração não levou a redução do peso total dos insetos porque a quitina é responsável por apenas uma pequena proporção do peso úmido dos mesmos (Zhang e Zhu 2006).

No entanto, para quantificação de quitina no intestino médio, no intestino posterior, nos ovários e nos ovos postos será necessário um aumento no número de amostras coletadas para possibilitar a leitura de valores adequados para o cálculo mais preciso da quantidade de quitina presente destes tecidos, já que a técnica

utilizada (Lehmann e White 1975) não foi capaz de detectar quitina usando somente material proveniente de três insetos. Zhang e Zhu em 2006 e Farnesi et al. em 2012 conseguiram com sucesso quantificar quitina de “pools” contendo 15 larvas L3 do gênero *Anopheles* e *Aedes*, com a metodologia de Lehmann e White (1975), mostrando que este aumento será necessário para obter os resultados desejados.

Do ponto de vista imunológico, tanto patógenos quanto inseticidas são capazes de afetar as populações de insetos, portanto, é questionável se a mortalidade está relacionada com o comprometimento do mesmo ou se há aumento da suscetibilidade a infecções. Além disso, este complexo sistema está envolvido também com mecanismos de detoxificação, que tem função de evitar possíveis danos causados por metabólitos secundários provenientes de plantas, toxinas fúngicas e, também, inseticidas (James e Xu 2012). É possível que o sistema profenoloxidase seja provavelmente o mais vulnerável, já que alguns de seus processos de oxidação, redução e hidrólise também estão envolvidos com detoxificação (Nasr et al. 2010).

Nossos resultados mostraram que ninfas de *R. prolixus* alimentadas com sangue contendo triflumuron em sua apresentação comercial Starycide® sofreram ativação em seu sistema profenoloxidase, de forma dose dependente, principalmente 12 dias após o tratamento (Figura 6). Em menores doses, a ativação aconteceu com certo atraso, observando-se um pico de atividade em 16 dias. Esta ativação também foi vista por Ishaaya e Casida em 1974. Esses autores viram que larvas de *Musca domestica* que ingeriram alimento contendo TH 6040, uma benzofeniluréia, apresentavam aumento relativo de 55% da atividade fenoxidásica na cutícula comparada a atividade das larvas controle. Os mesmos autores relataram um aumento relativo de até 150% da atividade de quitinase, o que poderia ser a causa da redução na quantidade de quitina presente nas carcaças das fêmeas de *R. prolixus* tratadas com triflumuron (Figura 3) e esta redução também pode estar ligada a ativação do sistema profenoloxidase, já que a cutícula quitinosa funciona como primeira barreira contra patógenos, tanto física como química, protegendo a hemocele do inseto (James e Xu 2012).

Entretanto, estudos anteriores com outros tipos de reguladores de crescimento de insetos, que não os inibidores de síntese de quitina, mostraram que larvas de *Spodoptera littoralis* tem atividade fenoxidásica inibida quando alimentadas com os

inseticidas buprofezina e piriproxifeno (Nasr et al. 2010). Da mesma forma, diversos metabolitos secundários de plantas tem efeito inibidor nesse sistema, como o terpinen-4-ol em *Mythimma separate* (Zhi-qing et al. 2008) e o extrato de *Artemisia annua* em *Eurygaster integriceps* (Zibae e Bandani 2010), enquanto a azadiractina, isolada da árvore sinamomo, não tem efeitos sobre a melanização (Azambuja et al. 1991).

## 5.2. Caracterização bioquímica e fisiológica das proteases de corpo gorduroso de machos adultos de *R. prolixus*

O corpo gorduroso de insetos tem função de armazenamento de nutrientes, além de grande atividade metabólica e sintetizante. Ele é capaz de sintetizar as proteínas da hemolinfa e metabólitos circulantes (Law and Wells 1989). Grandes quantidades de proteínas usadas como reserva para morfogênese, lipoforinas responsáveis pelo transporte de lipídios ou vitelogeninas para maturação dos oócitos são secretadas pelo corpo gorduroso, inclusive proteases (Arrese e Soulages 2010).

Durante os experimentos preliminares envolvendo a caracterização proteolítica de corpo gorduroso com uso do substrato modelo Z-Phe-Arg-MCA, foi inicialmente comparada a atividade presente em corpo gorduroso e em hemolinfa de machos adultos de *R. prolixus* em tampão cacodilato de cálcio pH 7,4. Foi encontrada uma atividade em corpo gorduroso em torno de 700 vezes maior que a encontrada em hemolinfa (Figura 7). Entretanto, a atividade específica sobre esse substrato de corpo gorduroso mostrou-se equivalente à atividade específica do intestino médio posterior (Figura 15). Vale destacar que a atividade proteásica no intestino médio posterior é considerada alta, devido ao papel deste órgão na digestão de proteínas do sangue ingerido. Em machos adultos de *R. prolixus*, a atividade de protease tem um pico de atividade no quarto dia após a alimentação sanguínea, como descrito por Persaud e Davey em 1971.

A protease em questão se mostrou instável ao congelamento e descongelamento (Figura 9), sendo necessário analisar amostras preparadas no mesmo dia, ao longo do nosso estudo. Para garantir que não se tratava de contaminação proveniente de outros tecidos, as amostras de corpo gorduroso foram lavadas e suas atividades comparadas aquelas de tecidos não lavado (Figura 10). Como não houve diferença entre os grupos, acreditamos que a atividade estudada pertence realmente ao corpo gorduroso.

Durante a avaliação de diferentes tampões em diversos pHs para identificar qual seria o ideal para caracterizar a atividade proteásica de corpo gorduroso de machos adultos, foi possível identificar dois picos de atividade, indicando a presença de pelo menos duas atividades diferentes (Figura 8). Um pico em pH relativamente ácido, em torno de 4,5, e outro em pH mais alcalino, em torno de 8.

As diferenças se confirmaram através da cromatografia de filtração em gel, que resultou também em dois picos de atividade eluídos em frações diferentes, com massas moleculares divergentes (Figura 16). O pico de atividade em pH 4,5 foi caracterizado com a massa molecular em torno de 23,1 kDa (Figura 17), compatível a uma das bandas vistas na raia 1 do SDS-PAGE (Figura 18). O pico com atividade em pH 8 tem massa molecular em torno de 63 kDa (Figura 17), que não pode ser vista na raia 2 do SDS-PAGE. Isso pode ter ocorrido porque a atividade de pH 8 se mostrou mais instável durante a preparação da amostra ou durante a eletroforese, possivelmente por proteólise. Em conformidade com essa hipótese, durante o teste de congelamento e descongelamento, a atividade de pH 8,0 perdeu em torno de 63% de atividade relativa, enquanto a atividade de pH 4,5 perdeu somente 28% (Figura 9).

Da mesma forma, a zimografia mostrou não ser um método ideal para a observação das bandas de atividade no tecido estudado (Figura 14), provavelmente devido à instabilidade das enzimas durante o SDS-PAGE semi desnaturante. Já a banda de atividade de intestino médio posterior pode ser vista de forma clara em pH 4,5, que é próximo ao pH ótimo descrito para a atividade proteásica de intestino médio posterior de *R. prolixus* (Garcia et al. 1978)

### 5.2.1. Atividade proteásica ativa em pH 4,5

Os resultados da análise dos efeitos de inibidores sobre a atividade proteásica cujo pH ótimo é 4,5 revelou que a protease em questão se trata provavelmente de uma cisteína proteinase, já que foi completamente inibida por E64 (Figura 11A), um inibidor irreversível deste tipo de protease (Barrett et al. 1982). Cisteína proteinases são proteases caracterizadas por conter grupamento tiol essencial altamente reativo, que participa da catálise através da formação de aciltioéster e que, portanto, são inibidas por qualquer reagente bloqueador de tiol (Green e Shaw 1981; Barrett et al. 1982).

Porém, houve também inibição parcial na presença de PMSF, um inibidor de serina proteases. Proteases tipo tripsina podem hidrolizar os mesmos substratos que

cisteína proteinases, fazendo com que haja inibição cruzada (Novillo et al. 1997). Entretanto, a ativação relativa em  $80\% \pm 20\%$  da atividade dessa protease na presença de DTT, um agente sulfidril ativador, reforça a hipótese de que esta é uma enzima do grupo das cisteína proteinases (Figura 11).

O substrato Z-Phe-Arg-MCA é um substrato inespecífico que pode ser clivado por proteases tipo cisteína proteinases, como catepsinas L e B e papaína, ou tipo serina proteinases, como calicreína e a tripsina de soja. No entanto, é possível que essa protease seja do tipo catepsina L, pois esta cliva preferencialmente aminoácidos hidrofóbicos na posição P<sub>2</sub>, enquanto catepsinas B preferem arginina nesta posição (Barret et al. 1998). Além disso, a massa molecular encontrada de aproximadamente 23 kDa, calculada a partir das curvas de atividade obtidas através da cromatografia de filtração em gel (Figura 16), se enquadra no perfil de catepsinas L, cujas massas moleculares descritas variam entre 20 e 40 kDa (revisado por Terra e Ferreira 2005).

Apesar da caracterização da atividade proteásica como uma cisteína proteinase, a protease em questão foi também inibida na presença de fenantrolina (Figura 11). Shompole e Jasmer (2001) observou o mesmo efeito da fenantrolina sobre a atividade da cisteína proteinase proveniente de intestino do nematódeo *Haemonchus contortus*. Seus resultados mostraram inibição moderada entre 57% e 87% desta atividade, que foi atribuída a uma possível formação de quelato de íon metálico. Assim como em nossos resultados, o EDTA não foi capaz de induzir efeito inibitório neste pH, o que, segundo os autores, reduz a probabilidade da contribuição de proteases não cisteínicas na atividade.

O resultado obtido com o eluente resultante da cromatografia de filtração de gel foi ao encontro daquele que já havia sido demonstrado com a amostra bruta de corpo gorduroso, ou seja, na presença dos inibidores. Assim, foi possível inferir que a atividade proteásica de pH 4,5 tem características de cisteína proteinases, mais especificamente de catepsina L (Figura 19).

Ainda que a catepsina L tenha sua função largamente descrita em corpo gorduroso de larvas e fêmeas adultas, sua função em machos adultos permanece pouco esclarecida. Nossos resultados indicam que esta protease demonstra ter regulação relacionada a alimentação destes machos, já que sua atividade mostrou ter padrão crescente ao longo dos dias após a ingestão de sangue, tendo pico em sua atividade em torno do 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dia a partir deste ponto.

Cristofolletti et al. em 2005 observou que pro-catepsinas L do tipo 1a de *T. molitor* são traduzidas principalmente no corpo gorduroso e, diferentemente do que vimos em nossos resultados, também na hemolinfa. Essas proteases em sua forma de zimogênio seriam então armazenadas em grânulos pequenos do tipo lisossomos nestes tecidos, onde tais catepsinas poderiam ter função na degradação proteolítica e, portanto, sugerindo que estes tecidos apresentariam intenso turnover de proteínas.

Já Yamamoto et al. (2000) descreveu, usando o mesmo substrato utilizado no presente estudo, uma catepsina L em corpo gorduroso e hemolinfa de larvas de *Bombyx mori*, mostrando uma atividade cíclica sincronizada com a ecdise desse inseto. O mRNA dessa enzima seria expresso somente no corpo gorduroso, sendo esta então sintetizada e secretada para a hemolinfa. Essa catepsina L provavelmente está envolvida com a ecdise, já que Homma et al. (1994) descreveu uma procatepsina L sendo secretada para os discos imaginais de *Sarcophaga* sobre os quais tem papel crucial após ativação. Estes autores sugeriram que a catepsina L quando ativada agiria digerindo a membrana basal ou a cutícula dos discos permitindo o alongamento do inseto.

Mesmo a catepsina L descrita em *B. mori* não sendo gênero-específica, sua atividade específica é maior em corpo gorduroso de fêmeas do que em machos. Isso mostra que o corpo gorduroso de fêmeas tem maior poder de síntese, e, por essa razão, essa enzima tem sido somente estudada em fêmeas. Além disso, pupas de fêmeas cujos ovários haviam sido retirados acumularam a forma inativa desta protease, indicando que a enzima encontrada nos ovários é secretada pelo corpo gorduroso e absorvida a partir da hemolinfa (Yamamoto et al. 2000). A forma precursora da enzima continua sendo armazenada nos estágios iniciais dos ovos. Contudo, esta é ativada durante a embriogênese, sendo importante na degradação do vitelo, tanto no caso do gênero *Bombyx* quanto em *Aedes* (Yamamoto e Takahashi 1993).

Wang et al. (2010) observou que catepsinas L de *Helicoverpa armigera* tem função de remodelação do corpo gorduroso e que sua expressão gênica ocorre de forma específica em hematócitos, principalmente granulócitos e plasmatócitos, induzidos pelo hormônio esteróide 20E durante a muda e metamorfose. O estudo mostrou que a redução dessa catepsina L através do uso de RNA de interferência resultou em hemócitos sem capacidade de granulação, o que pode ter sido a causa da morte das larvas durante a pupação ou da pupação anormal das mesmas. Dessa

forma, essa protease estaria relacionada com a degradação do corpo gorduroso por meio da morte celular programada dos granulócitos, já que houve também diminuição da expressão do gene efetor de apoptose, caspase 1, e aumento da expressão do gene de inibição de apoptose nesses hemócitos. A mesma função já havia sido observada previamente por Shiba et al. (2001) durante a histólise das glândulas de seda de *B. mori* na metamorfose.

Dessa forma, devido à falta de embasamento para esclarecer, além do turnover de proteínas, a possível função desta atividade proteolítica em machos adultos de *R. prolixus*, o ponto de vista imunológico foi avaliado *in vivo* através de inoculações envolvendo *T. rangeli* cepa Macias e *Ustilago* sp., uma levedura de baixa entomopatogenicidade, e *in vitro* com uso de laminarina, já que a ativação do sistema profenoloxidase envolve passos críticos de clivagem proteolítica (Cerenius et al. 2008). O sistema PPO é geralmente descrito como uma cascata de serina proteinases, como descrito em *B. mori* por Satoh em 1999 com a purificação dessas proteases.

Apesar das inoculações com *Ustilago* sp. terem resultado na ativação significativa do sistema profenoloxidase na hemolinfa (Figura 24), o mesmo aumento não pode ser observado nos níveis de atividade proteásica em pH 4,5 no corpo gorduroso (Figura 22A) ou na hemolinfa (Figura 23A) destes insetos. O que sugere que a atividade desta cisteína proteinase não tem envolvimento direto na cascata de ativação desta via do sistema imune humoral. Além do mais, pode ser que a inoculação com *T. rangeli* cepa Macias não tenha resultado em ativação do sistema profenoloxidase porque, assim como na infecção oral com a cepa H14, esse parasito pode ser capaz de evadir esta via do sistema imune suprimindo sua ativação (Gomes et al. 2003).

No entanto, diferente do esperado, a atividade proteolítica nestes tecidos sofrem redução na presença dos inóculos com leveduras. Machos adultos de *R. prolixus* inoculados com *Ustilago* sp. tem redução da atividade relativa para  $42 \pm 4$  % na maior concentração do inóculo e  $49 \pm 3$  % na menor concentração em 24 horas após a inoculação. A atividade permanece reduzida no caso da maior concentração até 48 horas, caindo para  $33 \pm 3$  %. Já nos insetos inoculados com *T. rangeli* cepa Macias, apesar de observarmos uma redução nessa atividade proteásica, essa acontece de forma menos evidente, caindo para  $61 \pm 9$  % em 24 horas no inóculo mais concentrado e para  $50 \pm 10$  % em 7 dias quando os parasitos foram inoculados diluídos 10x.

A redução da atividade proteolítica pode ter a mesma relação com os inóculos assim como foi visto nas fêmeas adultas de *R. prolixus* inoculadas com o fungo não entomopatogênico *Aspergillus niger* por Medeiros et al. (2009). Os autores observaram que essas fêmeas sofriam redução na oogênese resultando na diminuição de ovos postos devido ao aumento do título de prostaglandina na hemolinfa destes insetos. Ou seja, eicosanoides provenientes da resposta imune ao fungo estariam inibindo a reprodução, redirecionando os nutrientes que seriam utilizados neste processo e focando o gasto energético na resposta imune, já que a ativação do sistema profenoloxidase também foi registrada pelos autores. Portanto, possivelmente a redução da atividade proteolítica de turnover das catepsinas L do corpo gorduroso também pode ter sofrido redução com o objetivo de direcionar o metabolismo do inseto para a defesa do organismo.

A ativação *in vitro* do sistema profenoloxidase foi investigada na presença de laminarina, uma  $\beta$ -1,3-glucana proveniente de fungos ou algas, já que este é um dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) reconhecidos pelos receptores dos insetos capazes de resultar em ativação deste sistema (Duvic e Brehélin 1998; Cerenius et al. 2008). Os resultados indicam que, na presença de laminarina, o corpo gorduroso é capaz de ativar o sistema profenoloxidase de machos adultos através de componentes secretados, já que a ativação observada se deu somente quando o meio, composto por PBS e laminarina onde as amostras de corpo gorduroso foram incubadas, entrou em contato com a hemolinfa destes insetos (Figura 25).

Porém, não houve a mesma influência da laminarina sobre a atividade da cisteína proteinase. A presença da laminarina não resultou em aumento da atividade proteásica em pH 4,5, tanto considerando o homogenato do corpo gorduroso, quanto o meio no qual este tecido havia sido incubado (Figura 26A). Estes resultados corroboram o que foi observado *in vivo*, indicando que esta atividade não tem função na ativação deste aspecto do sistema imune humoral.

### 5.2.2. Atividade proteásica ativa em pH 8,0

A inibição parcial por EDTA e total por fenantrolina indica fortemente que a atividade proteásica cujo pH ótimo é em torno de 8 se trata de uma metaloproteinase, já que ambos os inibidores tem ação quelante removendo o metal da protease (Figura 11B), ainda que o substrato utilizado não seja específico para

este tipo de enzima. Além disso, o pH ótimo para esta atividade proteásica se enquadra nos padrões revisados por Terra e Ferreira (2005), variando de 7,2 a 9,0.

Como estas proteases necessitam de íons metálicos em seu processo catalítico, a recuperação da atividade proteolítica inibida pelos quelantes foi testada na presença de diversos íons, mostrando que na presença do EDTA, somente o  $\text{Co}^{2+}$  é capaz de recuperar a atividade relativa, partindo de  $30 \pm 1 \%$  para  $117 \pm 5\%$  na presença desse íon (Figura 13A).

Porém, na presença de fenantrolina a atividade relativa permaneceu reduzida na presença dos íons, mostrando somente um reduzido aumento na presença de  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , partindo de  $2,3 \pm 0,1 \%$  na presença do inibidor, para  $3,0 \pm 0,1 \%$  e  $5,3 \pm 0,2 \%$  com a adição desses íons, respectivamente (Figura 13B). Para verificar a recuperação de atividade na presença dos íons citados, a atividade foi previamente avaliada na presença dos mesmos, mostrando que em altas concentrações todos os íons metálicos testados tem atividade inibitória sobre essa protease (Figura 12).

Dois importante grupos de metaloproteinasas em animais são as metaloproteinasas de matriz, caracterizadas por sua capacidade de degradar matriz extracelular e por sua dependência da presença de  $\text{Zn}^{2+}$  para sua atividade proteolítica as metaloproteinasas-desintegrinas, que são metaloproteinasas transmembranares que contém domínios desintegrina (Chang and Werb 2001). Devido à pouca recuperação na presença presença de  $\text{Zn}^{2+}$  da atividade proteolítica inibida, possivelmente a atividade em questão não pertence à família das metaloproteinasas de matriz, ou possui características que as diferenciam do padrão observado nesse grupo. E em se tratando de uma metaloproteinase recuperada na fração solúvel do tecido, também não parece ser uma metaloproteinase-desintegrina.

Assim como foi visto com a amostra bruta de corpo gorduroso na presença dos inibidores, as frações eluídas a partir da cromatografia de filtração em gel com atividade sobre Z-Phe-Arg-MCA em pH 8 também foram completamente inibidas na presença de EDTA e fenantrolina, corroborando a classificação dessa atividade proteásica como uma metaloproteinase (Figura 16).

Diferentemente do padrão crescente visto na atividade da catepsina L nos dias subsequentes a alimentação, a atividade específica da metaloproteinase não parece sofrer alteração significativa ao longo dos nove dias após a ingestão de sangue, com exceção no 7º dia, no qual a atividade sofre uma diminuição (Figura 21). Portanto, a atividade desta protease não parece ser regulada pela alimentação do inseto.

Já a avaliação *in vivo* do envolvimento desta atividade proteolítica na resposta imune humoral em machos adultos de *R. prolixus* mostrou que a atividade de corpo gorduroso em pH 8 de insetos inoculados com *T. rangeli* cepa Macias ou com *Ustilago* sp. não sofreu nenhuma alteração significativa nos tempos analisados (Figura 22B). Apesar disso, a atividade dessa metaloproteinase mostrou ter um pequeno, porém significativo, aumento na hemolinfa destes insetos em 24 horas após a inoculação dos mesmos (Figura 23B). Sendo assim, não é possível confirmar ou descartar a possibilidade do envolvimento desta protease na resposta imune dos insetos em questão, já que os mesmos insetos avaliados apresentaram ativação do sistema profenoloxidase após 24 horas a partir da inoculação com *Ustilago* sp. (Figura 24).

Sendo assim, a ativação *in vitro* da metaloproteinase em estudo na presença de laminarina foi avaliada tanto no homogenato de corpo gorduroso quanto no meio no qual o corpo gorduroso foi incubado, mostrando que a ativação do sistema PPO com  $\beta$ -1,3-glucana (laminarina) não exerce influência sobre essa atividade proteásica em pH 8 (Figura 26B). Este resultado indica que provavelmente essa metaloproteinase não faz parte diretamente da cascata de ativação desta via do sistema imune humoral.

Estudos anteriores mostraram que, assim como as catepsinas L de corpo gorduroso, as metaloproteinases de matriz tem função na muda e metamorfose dos insetos. Bond et al. (2011) reportou que em larvas de *Drosophila* alterações na expressão da metaloproteinase tecido específica de corpo gorduroso resulta na letalidade destes insetos, assim como gera remodelação prematura deste tecido. Além disso, possivelmente a protease está também envolvida na clivagem de moléculas sinalizadoras no desenvolvimento de *Drosophila*.

Entretanto, em sua maioria, os resultados envolvendo metaloproteinases de corpo gorduroso de insetos relacionam sua função a ativação do sistema imune dos mesmos, divergindo dos presentes resultados. Feder et al. (1998) observou que *R. prolixus* inoculados com *Enterobacter cloacae* apresentavam atividade proteolítica, caracterizada como metaloproteinase através de inibidores, presente somente na hemolinfa, enquanto os insetos controle não inoculados apresentavam a mesma atividade somente no corpo gorduroso.

Posteriormente, Feder et al. (1999) descreveu o mesmo efeito na hemolinfa de *R. prolixus* inoculados com *T. rangeli* cepa H14 forma curta e em corpo gorduroso de insetos controle não inoculados. Ambos os resultados sugerem uma mobilização

dessas proteases do corpo gorduroso para a hemolinfa. No entanto, estes resultados foram obtidos a partir de técnicas diferentes das utilizadas no presente estudo. Nos estudos anteriores, as metaloproteinases foram caracterizadas através de zimografias em SDS-PAGE com o uso de gelatina como substrato. Além disso, os pesos moleculares descritos pelos autores sugerem tratar-se de metaloproteinases diferentes da aqui caracterizada.

Griesch et al. (2000) postularam uma possível nova via de ativação do sistema imune humoral através da hidrólise de proteínas da hemolinfa, causada por proteases liberadas por tecido lesionado ou por patógenos invasores. Larvas da lepidóptera *Galleria mellonella* inoculadas com termolisina, uma metaloproteinase de *Bacillus thermoproteolyticus*, tiveram o sistema imune humoral ativado. A ativação observada pelos autores se deu de forma semelhante àquela de insetos desafiados com LPS ou zymosan, mesmo que a termolisina tenha sido inoculada em concentração 20 vezes menor. Portanto, é possível que a metaloproteinase descrita previamente na hemolinfa de insetos desafiados com microrganismos fosse originária da lesão causada pela inoculação ou pelo próprio microrganismo inoculado.

Inclusive, inibidores de metaloproteinases sendo liberados com o objetivo de impedir a ativação excessiva do sistema profenoxidase causada por metaloproteinases de patógenos já foram descritos, o que foi reforçado pela observação de que larvas de *G. mellonella* cujas atividades inibitórias foram bloqueadas se tornavam enegrecidas quando injetadas com termolisina (Wedde et al. 1998, revisado por Gillespie et al. 2000).

## 6. CONCLUSÕES

O triflumuron, em todas as formas de administração e concentrações resultou em altas taxas de mortalidade nas fêmeas adultas de *R. prolixus*, reduziu o número de ovos postos por fêmea, a eclosão de ninfas a partir dos ovos postos e o comprimento dos oócitos.

O triflumuron também resultou na redução da quantidade de quitina na carcaça das fêmeas

O triflumuron em tratamento oral induziu um aumento da atividade fenoxidásica espontânea de forma dose-dependente e alterações morfológicas no intestino posterior.

O inseticida também gerou alterações na excreção nas fêmeas tratadas de *R. prolixus*.

Utilizando o substrato Z-Phe-Arg-MCA foi possível caracterizar duas atividades proteolíticas no corpo gorduroso de machos adultos em *R. prolixus*, uma atividade com pH ótimo em torno de 4,5 e outra com pH ótimo em torno de 8,0. A primeira pode ser uma cisteína proteinase do tipo catepsina L, possui massa molecular de 23 kDa e é regulada pela alimentação. A segunda pode ser uma metaloproteinase, possui massa molecular de 63 kDa, interage com íons cobalto e não é regulada pela alimentação. Nenhuma dessas duas proteases parece estar envolvida na ativação do sistema profenoxidase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Elghar, Gamal E, Phillip Fujiyoshi, and Fumio Matsumura. 2004. "Significance of the Sulfonylurea Receptor (SUR) as the Target of Diflubenzuron in Chitin Synthesis Inhibition in *Drosophila Melanogaster* and *Blattella Germanica*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (8) (August): 743–52.
- Akasaka, Takeshi, Susan Klinedinst, Karen Ocorr, Erika L Bustamante, Seung K Kim, and Rolf Bodmer. 2006. "The ATP-Sensitive Potassium (KATP) Channel-Encoded dSUR Gene Is Required for *Drosophila* Heart Function and Is Regulated by Tinman." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32) (August 8): 11999–2004.
- An, Chunju, Mingming Zhang, Yuan Chu, and Zhangwu Zhao. 2013. "Serine Protease MP2 Activates Prophenoloxidase in the Melanization Immune Response of *Drosophila Melanogaster*." *PLoS One* 8 (11) (January): e79533.
- Anwyl, R. 1972. "The Structure and Properties of an Abdominal Stretch Receptor in *Rhodnius Prolixus*." *Journal of Insect Physiology* 18 (11) (November): 2143–2153.
- Arrese, Estela L, and Jose L Soulages. 2010. "Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation." *Annual Review of Entomology* 55 (January): 207–25.
- Aspan, Anna, and Kenneth Söderhäll. 1991. "Purification of Prophenoloxidase from Crayfish Blood Cells, and Its Activation by an Endogenous Serine Proteinase." *Insect Biochemistry* 21 (4): 363–373.
- Atella, Georgia C, Katia C Gondim, Ednildo A Machado, Marcelo N Medeiros, and Hatisaburo Masuda. 2005. "Oogenesis and Egg Development in Triatomines :." *77*: 405–430.
- Ayalew, Gashawbeza. 2011. "Effect of the Insect Growth Regulator Novaluron on Diamondback Moth, *Plutella Xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), and Its Indigenous Parasitoids." *Crop Protection* 30 (8) (August): 1087–1090.
- Azambuja, P, D Feder, and E S Garcia. 2004. "Isolation of *Serratia Marcescens* in the Midgut of *Rhodnius Prolixus*: Impact on the Establishment of the Parasite *Trypanosoma Cruzi* in the Vector." *Experimental Parasitology* 107 (1-2): 89–96.
- Azambuja, P, D Feder, C Mello, S Gomes, and E Garcia. 1999. "Immunity in *Rhodnius Prolixus*: Trypanosomatid-Vector Interactions." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1 (January): 219–22.
- Azambuja, Patricia, Eloi S. Garcia, Norman A. Ratcliffe, and J. David Warthen Jr. 1991. "Immune-Depression in *Rhodnius Prolixus* Induced by the Growth Inhibitor, Azadirachtin." *Journal of Insect Physiology* 37 (10): 771–777.
- Azambuja, Patrícia, Norman a Ratcliffe, and Eloi S Garcia. 2005. "Towards an Understanding of the Interactions of *Trypanosoma Cruzi* and *Trypanosoma*

- Rangeli Within the Reduviid Insect Host *Rhodnius Prolixus*." *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 77 (3) (September): 397–404.
- Bao, Yanyuan, Yoshiaki Yamano, and Isao Morishima. 2007. "Beta-1,3-Glucan Inducible Expression of Prophenoloxidase-Activating Proteinase from Eri-Silkworm, *Samia Cynthia Ricini*." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 147 (1) (May): 45–8.
- Barrett, Alan J, Asha A Kembhavi, Molly A Brown, Heidrun Kirschke, C Graham Knight, Masaharu Tamait, and Kazunori Hanadat. 1982. "L-Trans-Epoxy succinyl-Leucylamido(4-Guanidino)butane (E-64) and Its Analogues as Inhibitors of Cysteine Proteinases Including Cathepsins B , H and L." *Biochemistry Journal* 4: 189–198.
- Belinato, Thiago Affonso, Ademir Jesus Martins, José Bento Pereira Lima, Tamara Nunes De Lima-Camara, Alexandre Afrânio Peixoto, and Denise Valle. 2009. "Effect of the Chitin Synthesis Inhibitor Triflumuron on the Development, Viability and Reproduction of *Aedes Aegypti*." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1) (February): 43–7.
- Bond, Nichole D, Archana Nelliot, Marsha K Bernardo, Melanie a Ayerh, Kathryn a Gorski, Deborah K Hoshizaki, and Craig T Woodard. 2011. "βFTZ-F1 and Matrix Metalloproteinase 2 Are Required for Fat-Body Remodeling in *Drosophila*." *Developmental Biology* 360 (2) (December 15): 286–96.
- Bouts, Denise M D, Ana Claudia Do Amaral Melo, Adriana Lyn Hunter Andrade, Mário a C Silva-Neto, Gabriela De Oliveira Paiva-Silva, Marcos Henrique Ferreira Sorgine, Lílian Soares da Cunha Gomes, et al. 2007. "Biochemical Properties of the Major Proteins from *Rhodnius Prolixus* Eggshell." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (11) (November): 1207–21.
- Boyer, S, H Zhang, and G Lempérière. 2012. "A Review of Control Methods and Resistance Mechanisms in Stored-Product Insects." *Bulletin of Entomological Research* 102 (2) (April): 213–29.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" 254: 248–254.
- Bulet, P, C Hetru, J L Dimarcq, and D Hoffmann. 1999. "Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function." *Developmental and Comparative Immunology* 23 (4-5): 329–44.
- Carlstrom, D. 1957. "The Crystal Structure of Alpha-Chitin (poly-N-Acetyl-D-Glucosamine)." *Journal of Biophysic and Biochemistry* 3 (5): 669–683.
- Castro, Daniele P, Caroline S Moraes, Eloi S Garcia, and Patrícia Azambuja. 2007. "Inhibitory Effects of d-Mannose on Trypanosomatid Lysis Induced by *Serratia Marcescens*." *Experimental Parasitology* 115 (2) (February): 200–4.
- Castro, Daniele P, Sergio H Seabra, Eloi S Garcia, Wanderley de Souza, and Patrícia Azambuja. 2007. "Trypanosoma Cruzi: Ultrastructural Studies of

- Adhesion, Lysis and Biofilm Formation by *Serratia Marcescens*.” *Experimental Parasitology* 117 (2) (October): 201–7.
- Cerenius, Lage, Bok Luel Lee, and Kenneth Söderhäll. 2008. “The proPO-System: Pros and Cons for Its Role in Invertebrate Immunity.” *Trends in Immunology* 29 (6) (June): 263–71.
- Cerenius, Lage, and Kenneth Söderhäll. 2004. “The Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrates.” *Immunological Reviews* 198 (April): 116–26.
- Chagas, C. 1909. “Nova Tripanozomiase Humana.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 1 (2): 159–218.
- Chang, C, and Z Werb. 2001. “The Many Faces of Metalloproteases: Cell Growth, Invasion, Angiogenesis and Metastasis.” *Trends in Cell Biology* 11 (11) (November): S37–43.
- Chen, Li, Wen-Jia Yang, Lin Cong, Kang-Kang Xu, and Jin-Jun Wang. 2013. “Molecular Cloning, Characterization and mRNA Expression of a Chitin Synthase 2 Gene from the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera Dorsalis* (Diptera: Tephritidae).” *International Journal of Molecular Sciences* 14 (8) (January): 17055–72.
- Cohen, E, and J E Casida. 1982. “Properties and Inhibition of Insect Integumental Chitin Synthetase.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17: 301–306.
- Coles, G C. 1965. “Haemolymph Proteins and Yolk Formation in *Rhodnius Prolixus* Stål.” *The Journal of Experimental Biology* 43 (3) (December): 425–31.
- Cristofoletti, Plínio T, Alberto F Ribeiro, and Walter R Terra. 2005. “The Cathepsin L-Like Proteinases from the Midgut of *Tenebrio Molitor* Larvae: Sequence, Properties, Immunocytochemical Localization and Function.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 (8) (August): 883–901.
- Davey, K G. 1987. “Inputs to the Hormonal Control of Egg Development in *Rhodnius Prolixus*.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 103–108.
- Davey, Kenneth. 2007. “The Interaction of Feeding and Mating in the Hormonal Control of Egg Production in *Rhodnius Prolixus*.” *Journal of Insect Physiology* 53 (3) (March): 208–15.
- De Oliveira, M a, and W de Souza. 2001. “An Electron Microscopic Study of Penetration by *Trypanosoma Rangeli* into Midgut Cells of *Rhodnius Prolixus*.” *Journal of Invertebrate Pathology* 77 (1) (January): 22–6.
- Dhadialla, Tarlochan S, Arthur Retnakaran, and Guy Smagghe. 2005. “Insect Growth- and Development-Disrupting Insecticides.” In *Comprehensive Insect Molecular Science, Volume 6: Control*, edited by Lawrence I Gilbert, I Kostas, and Sarjeet S Gill, 6th ed., 55–115. Pergamon ; Elsevier.
- Dias, E. 1934. “Estudos Sobre o *Schizotrypanum Cruzi*.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 28 (1): 1–110.

- Dias, J C P, a C Silveira, and C J Schofield. 2002. "The Impact of Chagas Disease Control in Latin America: a Review." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5) (July): 603–12.
- Doucet, Daniel, and Arthur Retnakaran. 2012. "Insect Chitin : Metabolism , Genomics and Pest Management." In *Advances in Insect Physiology - Insect Growth Disruptors*, edited by T S Dhadialla, 43rd ed., 43:437–511. Elsevier Ltd.
- Downer, R G.H., S J. Moore, W L Diehl-Jones, and C a. Mandato. 1997. "The Effects of Eicosanoid Biosynthesis Inhibitors On Prophenoloxidase Activation, Phagocytosis and Cell Spreading in *Galleria Mellonella*." *Journal of Insect Physiology* 43 (1) (February 19): 1–8.
- Duvic, B, and M Brehélin. 1998. "Two Major Proteins from Locust Plasma Are Involved in Coagulation and Are Specifically Precipitated by Laminarin, a Beta-1,3-Glucan." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28 (12) (December): 959–67.
- Farnesi, Luana C, José M Brito, Jutta G Linss, Marcelo Pelajo-Machado, Denise Valle, and Gustavo L Rezende. 2012. "Physiological and Morphological Aspects of *Aedes Aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron." *PloS One* 7 (1) (January): e30363.
- Feder, D, S Gomes, E Garcia, and P Azambuja. 1999. "Metalloproteases in *Trypanosoma Rangeli*-Infected *Rhodnius Prolixus*." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (6): 771–7.
- Feder, D, J M Salles, E S Garcia, and P Azambuja. 1998. "Haemolymph and Fat Body Metallo-Protease Associated with *Enterobacter Cloacae* Infection in the Bloodsucking Insect, *Rhodnius Prolixus*." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (6): 823–6.
- Felföldi, Gabriella, Ioannis Eleftherianos, Richard H Ffrench-Constant, and István Venekei. 2011. "A Serine Proteinase Homologue, SPH-3, Plays a Central Role in Insect Immunity." *Journal of Immunology* 186 (8) (April 15): 4828–34.
- Figueiredo, Marcela B, Eloi S Garcia, and Patrícia Azambuja. 2008. "Blockades of Phospholipase A(2) and Platelet-Activating Factor Receptors Reduce the Hemocyte Phagocytosis in *Rhodnius Prolixus*: In Vitro Experiments." *Journal of Insect Physiology* 54 (2) (February): 344–50.
- Gangishetti, Umesh, Sophie Breitenbach, Mareike Zander, Shaik Khaleelulla Saheb, Ursula Müller, Heinz Schwarz, and Bernard Moussian. 2009. "Effects of Benzoylphenylurea on Chitin Synthesis and Orientation in the Cuticle of the *Drosophila* Larva." *European Journal of Cell Biology* 88 (3) (March): 167–80.
- Garcia, E S, J a Guimarães, and J L Prado. 1978. "Purification and Characterization of a Sulfhydryl-Dependent Protease from *Rhodnius Prolixus* Midgut." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 188 (2) (June): 315–22.

- Garcia, E S, C B Mello, P Azambuja, and J M C Ribeiro. 1994. "Rhodnius Prolixus: Salivary Antihemostatic Components Decrease with Trypanosoma Rangeli Infection." *Experimental Parasitology* 78: 287–293.
- Garcia, Eloi S, Evandro M M Machado, and Patrícia Azambuja. 2004a. "Inhibition of Hemocyte Microaggregation Reactions in Rhodnius Prolixus Larvae Orally Infected with Trypanosoma Rangeli." *Experimental Parasitology* 107 (1-2): 31–8.
- . 2004b. "Effects of Eicosanoid Biosynthesis Inhibitors on the Prophenoloxidase-Activating System and Microaggregation Reactions in the Hemolymph of Rhodnius Prolixus Infected with Trypanosoma Rangeli." *Journal of Insect Physiology* 50 (2-3): 157–65.
- Garcia, Maria Luiza M, R P Mello, and E S Garcia. 1979. "Ecdysone, Juvenile Hormone and Oögenesis in Rhodnius Prolixus." *Journal of Insect Physiology* 25: 695–700.
- Garcia, S, and P Azambuja. 1991. "Development and Interactions of Trypanosoma Cruz / Within the Insect Vector." *Parasitology Today* 7 (9): 240–244.
- Genta, F a, R S Souza, E S Garcia, and P Azambuja. 2010. "Phenol Oxidases from Rhodnius Prolixus: Temporal and Tissue Expression Pattern and Regulation by Ecdysone." *Journal of Insect Physiology* 56 (9) (September): 1253–9.
- Genta, Fernando A, Lucas Blanes, Plínio T Cristofolletti, Claudimir L do Lago, Walter R Terra, and Clélia Ferreira. 2006. "Purification, Characterization and Molecular Cloning of the Major Chitinase from Tenebrio Molitor Larval Midgut." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (10) (October): 789–800.
- Gillespie, Jeremy P, Andy M Bailey, Ben Cobb, and Andreas Vilcinskas. 2000. "Review Fungi as Elicitors of Insect Immune Responses" 68 (July 1999): 49–68.
- Gomes, S a, D Feder, N E Thomas, E S Garcia, and P Azambuja. 1999. "Rhodnius Prolixus Infected with Trypanosoma Rangeli: In Vivo and in Vitro Experiments." *Journal of Invertebrate Pathology* 73 (3) (May): 289–93.
- Gomes, S A O, D Feder, E S Garcia, and P Azambuja. 2003. "Suppression of the Prophenoloxidase System in Rhodnius Prolixus Orally Infected with Trypanosoma Rangeli." *Journal of Insect Physiology* 49 (9) (September): 829–37.
- Graf, J F. 1993. "The Role of Insect Growth Regulators in Arthropod Control." *Parasitology Today* 9 (12) (December): 471–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463697>.
- Green, G D, and E Shaw. 1981. "Peptidyl Diazomethyl Ketones Are Specific Inactivators of Thiol Proteinases." *The Journal of Biological Chemistry* 256 (4) (February 25): 1923–8.
- Gregório, E A, and Norman A Ratcliffe. 1991. "The Distribution of Agglutinins and Lytic Activity Against Trypanosoma Rangeli and Erythrocytes in Rhodnius

- Prolixus and *Triatoma Infestans* Tissue Extracts and Haemolymph.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 86 (2): 181–186.
- Griesch, J, M Wedde, and a Vilcinskas. 2000. “Recognition and Regulation of Metalloproteinase Activity in the Haemolymph of *Galleria Mellonella*: a New Pathway Mediating Induction of Humoral Immune Responses.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6) (June): 461–72.
- Guhl, Felipe, and Gustavo Adolfo Vallejo. 2003. “*Trypanosoma* (Herpetosoma) Rangeli Tejera, 1920: An Updated Review.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (4) (June): 435–42.
- Healthcare, GE. 2010. “Gel Filtration: Principles and Methods.”
- Homma, K, S Kurata, and S Natori. 1994. “Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Procathepsin L from the Culture Medium of NIH-Sape-4, an Embryonic Cell Line of *Sarcophaga Peregrina* (flesh Fly), and Its Involvement in the Differentiation of Imaginal Discs.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (21) (May 27): 15258–64.
- Ioni, Saeideh, Maryam Moarefi, Hossain Farazmand, and Esmaeile Karami. 2011. “The Effect of Regulating Compounds on the Growth of *Tribolium Confusum* Du Val (Coleoptera: Tenebrionidae).” *Mun. Ent. Zool.* 6 (1): 377–385.
- Ishaaya, Isaac, and John E. Casida. 1974. “Dietary TH 6040 Alters Composition and Activity of Housefly Larval Cuticle<sup>1</sup>.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4: 484–490.
- James, R R, and J Xu. 2012. “Mechanisms by Which Pesticides Affect Insect Immunity.” *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (2) (February): 175–82.
- Ji, Chuanyi, Yang Wang, Xiaoping Guo, Steve Hartson, and Haobo Jiang. 2004. “A Pattern Recognition Serine Proteinase Triggers the Prophenoloxidase Activation Cascade in the Tobacco Hornworm, *Manduca Sexta*.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (33) (August 13): 34101–6.
- Lagerblad Oliveira, Pedro, Marilvia Dansa de Alencar Petretski, and Hatisaburo Masuda. 1989. “Vitellin Processing and Degradation During Embryogenesis in *Rhodnius Prolixus*.” *Insect Biochemistry* 19 (5) (January): 489–498.
- Lavine, M D, and M R Strand. 2002. “Insect Hemocytes and Their Role in Immunity.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (10) (October): 1295–309.
- Law, J H, and M a Wells. 1989. “Insects as Biochemical Models.” *The Journal of Biological Chemistry* 264 (28) (October 5): 16335–8.
- Lazzaro, Brian P. 2008. “Natural Selection on the *Drosophila* Antimicrobial Immune System.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (3) (June): 284–9.
- Lee, Kwang Sik, Bo Yeon Kim, Young Moo Choo, Hyung Joo Yoon, Pil Don Kang, Soo Dong Woo, Hung Dae Sohn, et al. 2009. “Expression Profile of Cathepsin B in the Fat Body of *Bombyx Mori* During Metamorphosis.” *Comparative*

*Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 154 (2) (October): 188–94.

- Lehmann, P F, and L O White. 1975. "Chitin Assay Used to Localization and Mycelium in Mice . Chitin Assay Used to Demonstrate Renal Localization and Cortisone-Enhanced Growth of *Aspergillus Fumigatus* Mycelium in Mice." *Infection and Immunology* 12 (5): 986–992.
- Lezzit, B Y M Iarkus, and Lawrence I Gilbert. 1969. "Control of Gene Activities in the Polytene Chromosomes of Chironomous Tentans by Ecdysone and Juvenile Hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 64 (2): 498–503.
- Li, Jinghong, Wenjun Li, Healani C. Calhoun, Fan Xia, Fen-Biao Gao, and Willis X. Li. 2003. "Patterns and Functions of STAT Activation During *Drosophila* Embryogenesis." *Mechanisms of Development* 120 (12) (December): 1455–1468.
- Lim, Suat-Jien, and S. S. Lee. 1982. "Toxicity of Diflubenzuron To the Grasshopper *Oxya Japonica*: Effects on Reproduction." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 31 (2-3) (March 5): 154–158.
- Machado, P E, I Eger-Mangrich, G Rosa, L B Koerich, E C Grisard, and M Steindel. 2001. "Differential Susceptibility of Triatomines of the Genus *Rhodnius* to *Trypanosoma Rangeli* Strains from Different Geographical Origins." *International Journal for Parasitology* 31 (5-6) (May 1): 632–4.
- Maddrell, B Y S H P. 1964. "Excretion in the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius Prolixus* Stal." *J Exp Biol* 41: 459–472.
- Maddrell, Simon H. P., and John E. Casida. 1971. "Mechanism of Insecticide-Induced Diuresis in *Rhodnius*." *Nature* 231: 55–6.
- Mansur, Juliana F., Janaina Figueira-Mansur, Amanda S. Santos, Heliomar Santos-Junior, Isabela B. Ramos, Marcelo Neves de Medeiros, Ednildo a. Machado, et al. 2010. "The Effect of Lufenuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on Oogenesis of *Rhodnius Prolixus*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (1) (September): 59–67.
- Marmaras, Vassilis J, and Maria Lampropoulou. 2009. "Regulators and Signalling in Insect Haemocyte Immunity." *Cellular Signalling* 21 (2) (February): 186–95.
- Matsumura, Fumio. 2010. "Studies on the Action Mechanism of Benzoylurea Insecticides to Inhibit the Process of Chitin Synthesis in Insects: A Review on the Status of Research Activities in the Past, the Present and the Future Prospects." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97 (2) (June): 133–139.
- Mayer, Richard T., Andrew C. Chen, and John R. DeLoach. 1980. "Characterization of a Chitin Synthase from the Stable Fly, *Stomoxys Calcitrans* (L.)." *Insect Biochemistry* 10 (5) (January): 549–556.
- McCall, Kimberly. 2004. "Eggs over Easy: Cell Death in the *Drosophila* Ovary." *Developmental Biology* 274 (1) (October 1): 3–14.

- Medeiros, Marcelo Neves De, Rodrigo Belmonte, Bruno César C Soares, Luciano Neves De Medeiros, Cláudio Canetti, Celio G Freire-de-Lima, Clarissa Menezes Maya-Monteiro, et al. 2009. "Arrest of Oogenesis in the Bug *Rhodnius Prolixus* Challenged with the Fungus *Aspergillus Niger* Is Mediated by Immune Response-Derived PGE<sub>2</sub>." *Journal of Insect Physiology* 55 (2) (February): 150–7.
- Mello, C B, E S Garcia, Norman A Ratcliffe, and P Azambuja. 1995. "Trypanosoma *Cruzi* and Trypanosoma *Rangeli*: Interplay with Hemolymph Components of *Rhodnius Prolixus*." *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 261–268.
- Mello, C B, D Mendonça-Lopes, D Feder, C D Uzeda, R M Carneiro, M a Rocha, and M S Gonzalez. 2008. "Laboratory Evaluation of the Effects of Triflumuron on the Development of *Rhodnius Prolixus* Nymph." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (8) (December): 839–42.
- Merchant, Deepali, Ronald L Ertl, Stephen I Rennard, David W Stanley, and Jon S Miller. 2008. "Eicosanoids Mediate Insect Hemocyte Migration." *Journal of Insect Physiology* 54 (1) (January): 215–21.
- Merzendorfer, Hans. 2013. "Chitin Synthesis Inhibitors: Old Molecules and New Developments." *Insect Science* 20 (2) (April): 121–38.
- Merzendorfer, Hans, Hee Shin Kim, Sujata S Chaudhari, Meera Kumari, Charles a Specht, Stephen Butcher, Susan J Brown, et al. 2012. "Genomic and Proteomic Studies on the Effects of the Insect Growth Regulator Diflubenzuron in the Model Beetle Species *Tribolium Castaneum*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42 (4) (April): 264–76.
- Miller, J S, T Nguyen, and D W Stanley-Samuelson. 1994. "Eicosanoids Mediate Insect Nodulation Responses to Bacterial Infections." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26) (December 20): 12418–22.
- Miller, J S., and D W. Stanley. 2001. "Eicosanoids Mediate Microaggregation Reactions to Bacterial Challenge in Isolated Insect Hemocyte Preparations." *Journal of Insect Physiology* 47 (12) (December): 1409–1417.
- Morita, Takashi, Kato, Hisao, Iwanaga, Sadaaki, Takada, Katsumi, Kimura, Terutoshi, Sakakibara, Shumpei. 1977. "New Fluorogenic Substrates for a-Thrombin, Factor Xa, Kallikreins and Urokinase." *Journal of Biochemistry* 82 (5): 1495–1498.
- Moya, Pilar, Salvador Flores, Idefonso Ayala, Juan Sanchis, Pablo Montoya, and Jaime Primo. 2010. "Evaluation of Lufenuron as a Chemosterilant Against Fruit Flies of the Genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)." *Pest Management Science* 66 (6) (June): 657–63.
- Mundall, Eric, and Franz Engelmann. 1977. "Endocrine Control of Vitellogenin Synthesis and Vitellogenesis in *Triatoma Protracta*." *Journal of Insect Physiology* 23: 825–836.

- Nakamura, Angelica, Renata Stiebler, Marcelo R Fantappié, Eliane Fialho, Hatisaburo Masuda, and Marcus F Oliveira. 2007. "Effects of Retinoids and Juvenoids on Moults and on Phenoloxidase Activity in the Blood-Sucking Insect *Rhodnius Prolixus*." *Acta Tropica* 103 (3) (September): 222–30.
- Nasr, Hoda M., Mohamed E.I. Badawy, and Entsar I. Rabea. 2010. "Toxicity and Biochemical Study of Two Insect Growth Regulators, Buprofezin and Pyriproxyfen, on Cotton Leafworm *Spodoptera Littoralis*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (2) (October): 198–205.
- Novillo, Concepción, Pedro Castañera, and Félix Ortego. 1997. "Inhibition of Digestive Trypsin-Like Proteases from Larvae of Several Lepidopteran Species by the Diagnostic Cysteine Protease Inhibitor E-64." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27 (3) (March): 247–254.
- O'Brien, R D. 1966. "Mode of Action of Insecticides." *Annual Review of Entomology* 11: 369–402.
- Oliveira, Pedro L., John K. Kawooya, José M.C. Ribeiro, Terrance Meyer, Roger Poorman, Elias W. Alves, F. Ann Walker, et al. 1995. "A Heme-Binding Protein from Hemolymph and Oocytes of the Blood-Sucking Insect, *Rhodnius Prolixus*. Isolation and Characterization." *Journal of Biological Chemistry* 270 (18): 10897–10901.
- Parween, Selina, Saiful Islam Faruki, and Mahmuda Begum. 2001. "Impairment of Reproduction in the Red Four Beetle, *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) Due to Larval Feeding on Triflumuron-Treated Diet." *Journal of Applied Entomology* 125 (125): 413–416.
- Persaud, C E, and K G Davey. 1971. "The Control of Protease Synthesis in the Intestine of Adults of *Rhodnius Prolixus*." *Journal of Insect Physiology* 17 (8) (August): 1429–40.
- Pinto, M C, and a P do Prado. 2001. "Resistance of *Musca Domestica* L. Populations to Cyromazine (insect Growth Regulator) in Brazil." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (5) (July): 729–32.
- Raikhel, a S, and T S Dhadialla. 1992. "Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes." *Annual Review of Entomology* 37 (January): 217–51.
- Ratcliffe, N A, and A F Rowley. 1979. "A Comparative Synopsis of the Structure and Function of the Blood Cells of Insects and Other Invertebrates." *Developmental and Comparative Immunology* 3: 189–243.
- Ratcliffe, Norman A., and J Gagen. 1976. "Cellular Nodule Defense Reactions of Insect Hemocytes in *Galleria* Larvae in Vivo: Mechanism of Formation and Development and in *Pieris Brassicae*." *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 373–382.
- Redoan, Ana Carolina Maciel, Geraldo Andrade Carvalho, Ivan Cruz, Maria de Lourdes Corrêa Figueiredo, and Rafael Braga Silva. 2013. "Physiological

- Selectivity of Insecticides to Adult of *Doru Luteipes*.” *Revista Ciência Agronômica* 44 (4): 842–850.
- Rezende, Gustavo Lazzaro, Ademir Jesus Martins, Carla Gentile, Luana Cristina Farnesi, Marcelo Pelajo-Machado, Alexandre Afrânio Peixoto, and Denise Valle. 2008. “Embryonic Desiccation Resistance in *Aedes Aegypti*: Presumptive Role of the Chitinized Serosal Cuticle.” *BMC Developmental Biology* 8 (January): 82.
- Rose, R I. 2001. “Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management.” *Emerging Infectious Diseases* 7 (1): 17–23.
- Sáenz-de-cabezón, Author F J, and Frank G Zalom. 2006. “Effects of Lufenuron on *Lobesia Botrana* ( Lepidoptera : Tortricidae ) Egg , Larval , and Adult Stages Effects of Lufenuron on *Lobesia Botrana* ( Lepidoptera : Tortricidae ) Egg , Larval , and Adult Stages” 99 (2): 427–431.
- Sagheer, Muhammad, Muhammad Yasir, and Muhammad Ashfaq. 2012. “Impact of Triflumuron on Reproduction and Development of Red Flour Beetle, *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).” *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 49 (2): 173–178.
- Satoh, D., A. Horii, M. Ochiai, and M. Ashida. 1999. “Prophenoloxidase-Activating Enzyme of the Silkworm, *Bombyx Mori*.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (11) (March 12): 7441–7453.
- Schofield, C.J., and Cleber Galvão. 2009. “Classification, Evolution, and Species Groups Within the Triatominae.” *Acta Tropica* 110 (2-3) (May): 88–100.
- Schofield, Chris J, Jean Jannin, and Roberto Salvatella. 2006. “The Future of Chagas Disease Control.” *Trends in Parasitology* 22 (12) (December): 583–8.
- Shiba, H, D Uchida, H Kobayashi, and M Natori. 2001. “Involvement of Cathepsin B- and L-Like Proteinases in Silk Gland Histolysis During Metamorphosis of *Bombyx Mori*.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390 (1) (June 1): 28–34.
- Shompole, S, and D P Jasmer. 2001. “Cathepsin B-Like Cysteine Proteases Confer Intestinal Cysteine Protease Activity in *Haemonchus Contortus*.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (4) (January 26): 2928–34.
- Soltani, Nouredine. 1984. “Effects of Ingested Diflubenzuron on the Longevity and the Peritrophic Membrane of Adult Mealworms ( *Tenebrio Molitor L .*)” *Pesticide Science* 15: 221–225.
- Soltani, Nouredine, and Nadia Soltani-Mazouni. 1992. “Diflubenzuron and Oogenesis in the Codling Moth, *Cydia Pomonella* (L.)” *Pesticide Science* 34 (3) (May 1): 257–261.
- Soltani-Mazouni, N. 1994. “Effects of Ingested Diflubenzuron on Ovarian Development During the Sexual Maturation of Mealworms.” *Tissue & Cell* 26 (3) (June): 439–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621275>.

- Sparks, Thomas C. 2013. "Insecticide Discovery: An Evaluation and Analysis." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107 (1) (September): 8–17.
- Stanley, David, Jon Miller, and Hasan Tunaz. 2009. "Eicosanoid Actions in Insect Immunity." *Journal of Innate Immunity* 1 (4) (January): 282–90.
- Teixeira, Mauro M, Igor C Almeida, and Ricardo T Gazzinelli. 2002. "Introduction: Innate Recognition of Bacteria and Protozoan Parasites." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 4 (9) (July): 883–6.
- Tellam, R L, and C Eisemann. 2000. "Chitin Is Only a Minor Component of the Peritrophic Matrix from Larvae of *Lucilia Cuprina*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30 (12) (December): 1189–201.
- Terra, W. 1990. "Evolution Of Digestive Systems Of Insects." *Annual Review of Entomology* 35 (1) (January 1): 181–200.
- Terra, W. R., and C. Ferreira. 2005. "Biochemistry of Digestion." In *Comprehensive Molecular Insect Science. Biochemistry and Molecular Biology*, 171–212.
- Terra, Walter R, Cia Ferreira, Departamento De Bioquimica, Instituto De Quimica, and Universidade De S Paulo. 1994. "Insect Digestive Enzymes : Properties , Compartmentalization and Function" (January).
- Tunaz, Hasan, and Nedim Uygun. 2004. "Insect Growth Regulators for Insect Pest Control \*." *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28: 377–387.
- Van Leeuwen, Thomas, Peter Demaeght, Edward J Osborne, Wannes Dermauw, Simon Gohlke, Ralf Nauen, Miodrag Grbic, Luc Tirry, Hans Merzendorfer, and Richard M Clark. 2012. "Population Bulk Segregant Mapping Uncovers Resistance Mutations and the Mode of Action of a Chitin Synthesis Inhibitor in Arthropods." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (12) (March 20): 4407–12.
- Vasuki, V, and A R Rajavel. 1992. "Influence of Short Time Exposure to an Insect Growth Regulator, Hexaflumuron, on Mortality and Adult Emergence of Vector Mosquitoes." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 87 (2): 275–283.
- Wang, Changlu, and Gary W Bennett. 2006. "Efficacy of Noviflumuron Gel Bait for Control of the German Cockroach , *Blattella Germanica* ( Dictyoptera : Blattellidae ) – Laboratory Studies." *Pest Management Science* 62 (September 2005): 434–439. doi:10.1002/ps.
- Wang, L-F, L-Q Chai, H-J He, Q Wang, J-X Wang, and X-F Zhao. 2010. "A Cathepsin L-Like Proteinase Is Involved in Moulting and Metamorphosis in *Helicoverpa Armigera*." *Insect Molecular Biology* 19 (1) (February): 99–111. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00952.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002797>.
- Wang, P, and R R Granados. 2000. "Calcofluor Disrupts the Midgut Defense System in Insects." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30 (2) (February): 135–43.

- Watkins, R. 1971. "Histology of *Rhodnius Prolixus* Infected with *Trypanosoma Rangeli*." *Journal of Invertebrate Pathology* 12: 59–66.
- Whitten, M M, C B Mello, S a Gomes, Y Nigam, P Azambuja, E S Garcia, and N a Ratcliffe. 2001. "Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius Prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma Rangeli* Interactions." *Experimental Parasitology* 98 (1) (May): 44–57.
- Wigglesworth, V B. 1934. "The Physiology of Ecdysis in *Rhodnius Prolixus* ( Hemiptera ). II . Factors Controlling Moulting and ' Metamorphosis '." *Quarterly Journal of Microscopical Science* s2 (77): 191–222.
- Wigglesworth. 1936. "The Function of the Corpus Allatum in the Growth and Reproduction of *Rhodnius Prolixus* ( Hemiptera ). By." *Quarterly Journal of Microscopical Science* 79: 91–121.
- Yamamoto, Y, Y Yamahama, K Katou, S Watabe, and Sy Takahashi. 2000. "Bombyx Acid Cysteine Protease (BCP): Hormonal Regulation of Biosynthesis and Accumulation in the Ovary." *Journal of Insect Physiology* 46 (5) (May 1): 783–791.
- Yamamoto, Yoshimi, and Susumu Y. Takahashi. 1993. "Cysteine Proteinase from Bombyx Eggs: Role in Programmed Degradation of Yolk Proteins During Embryogenesis." 106 (1): 35–45.
- Yu, S.J. 2004. "Induction of Detoxification Enzymes by Triazine Herbicides in the Fall Armyworm, *Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80 (2) (October): 113–122.
- Zeledón, Rodrigo. 2004. "Some Historical Facts and Recent Issues Related to the Presence of *Rhodnius Prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera : Reduviidae) in Central America." *Entomol Vect* 11 (2): 233–246.
- Zhai, X, and X-F Zhao. 2012. "Participation of Haemocytes in Fat Body Degradation via Cathepsin L Expression." *Insect Molecular Biology* 21 (5) (October): 521–34..
- Zhang, Jianzhen, and Kun Yan Zhu. 2006. "Characterization of a Chitin Synthase cDNA and Its Increased mRNA Level Associated with Decreased Chitin Synthesis in *Anopheles Quadrimaculatus* Exposed to Diflubenzuron." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (9) (September): 712–25.
- Zhi-qing, M A, H A N Xiu-ling, Feng Jun-tao, L I Guang-ze, and Zhang Xing. 2008. "Effects of Terpinen-4-Ol on Four Metabolic Enzymes and Polyphenol Oxidase ( PPO ) in *Mythimna Separta* Walker" 7 (June): 726–730.
- Zibae, A., and A. R. Bandani. 2010. "Effects of *Artemisia Annu* L. (Asteracea) on the Digestive Enzymatic Profiles and the Cellular Immune Reactions of the Sunn Pest, *Eurygaster Integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), Against *Beauveria Bassiana*." *Bulletin of Entomological Research* 100 (2) (April): 185–96.