

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Bioquímica Médica

**Angelica Nakamura**

Efeitos de retinóides e juvenóides em  
*Rhodnius prolixus* e caracterização molecular  
do receptor nuclear *ultraspiracle*: possível  
interação

Rio de Janeiro  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LOMBADA**

Efeitos de retinóides e juvenóides em *Rhodnius*  
**ANGELICA NAKAMURA** *prolixus* e caracterização molecular do receptor nuclear  
*ultraspiracle*: possível interação

**UFRJ**

**V. I**

Angelica Nakamura

Efeitos de retinóides e juvenóides em *Rhodnius prolixus* e caracterização molecular do receptor nuclear ultraspiracle: possível interação

Volume I

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira  
Co-orientadores: Marcelo Rosado Fantappié  
Hatisaburo Masuda

Rio de Janeiro  
2008

## Ficha Catalográfica

Nakamura, Angelica

Efeitos de retinóides e juvenóides em *Rhodnius prolixus* e caracterização molecular do receptor nuclear *ultraspiracle*: possível interação. Angelica Nakamura. Rio de Janeiro - 2008.

xviii, 115

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Bioquímica Médica, 2008.

Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira

Co-orientadores: Marcelo Rosado Fantappié e Hatisaburo Masuda

1. *Rhodnius prolixus*. 2. terpenóides. 3. receptores nucleares. – Teses. I. Oliveira, Marcus Fernandes (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Bioquímica

II. Título

Angelica Nakamura

Efeitos de retinóides e juvenóides em *Rhodnius prolixus* e caracterização molecular do receptor nuclear *ultraspiracle*: possível interação.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Rio de Janeiro, 23 de junho de 2008

---

Marcus Fernandes de Oliveira  
Professor Adjunto, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Orientador

---

Marcelo Rosado Fantappié  
Professor Adjunto, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Co-orientador

---

Hatisaburo Masuda  
Professor Titular, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Co-orientador

---

Mário Alberto Cardoso da Silva-Neto  
Professor Associado, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Revisor

---

Mônica Ferreira Moreira  
Professora Adjunta, Instituto de Química, UFRJ.

---

Helena Maria Marcolla Araújo  
Professora Adjunta, Departamento de Histologia e Embriologia, ICB, UFRJ.

---

Franklin David Rumjanek  
Professor Titular, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

---

Patrícia de Azambuja Penna  
Pesquisadora Titular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

---

Katia Calp Gondim  
Professora Adjunta, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Redox e Laboratório de Bioquímica de Insetos, ambos do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do professor Marcus Fernandes de Oliveira e co-orientação dos professores Marcelo Rosado Fantappié e Hatisaburo Masuda, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB-ALV), International Foundation for Science (IFS), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) e Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX).

*Aos meus pais Neide e Shoji*



## AGRADECIMENTOS

Neste momento de grande alegria e alívio, quando finalmente vejo concluído um árduo e prazeroso trabalho de alguns anos, agradeço a Deus pela forte presença em minha vida, em todos os momentos e por ter conduzido meus passos até aqui. Agradeço também a todos que estiveram ao meu lado, ajudando de alguma forma, com pequenas ou grandes contribuições, direta ou indiretamente. O sucesso desse trabalho é tão meu quanto de vocês. A todos o meu sincero agradecimento, em especial a algumas pessoas:

Ao meu orientador, **Marcus**, por toda confiança depositada em mim, por ter me dado total liberdade para conduzir este trabalho, por me cobrar na hora certa, pela convivência tranqüila, por ser um grande exemplo de dignidade e determinação, enfim, por ter feito parte do meu amadurecimento científico e pessoal nesses anos.

Ao **Masuda**, que me abrigou em seu laboratório por quase 10 anos, me dando o privilégio de conviver com toda a sua sabedoria, generosidade e bom humor. A você, professor, o meu muito obrigado!

Ao **Marcelo**, meu co-orientador, que no início ia pra bancada comigo e até se divertia e, depois, mesmo estando longe sempre esteve disponível para me ajudar, respondendo prontamente aos e-mails *quilométricos*, cheios de dúvidas *basais*.

À **Lili**, minha eterna orientadora, por estar sempre disposta a ajudar, pelos conselhos sensatos, pela sua enorme paciência e por ter contribuído tanto para a minha formação.

À **Renatinha**, minha Fofa, um grande exemplo de determinação, uma *criaturinha* com um futuro brilhante pela frente, que sempre trouxe alegria ao ambiente e foi fundamental para a conclusão dessa tese. Adoro vc *chata, chata!!!*

À **Thais**, a caçulinha da turma, um doce de pessoa, que se mostrou extremamente eficiente e dedicada.

À **Fabi**, minha *primogênita*, motivo de grande alegria e orgulho, é na verdade um anjinho que Deus colocou na minha vida para me ajudar nos momentos mais difíceis.

À **Isabel**, minha “orientadora”, por ter tido tanta paciência comigo e com as minhas varreduras que nunca davam certo, sempre me incentivando e resolvendo os *poucos* problemas que surgiam o tempo todo.

Ao **Francisco**, que me ajudou a fazer o meu primeiro PCR (quando eu nem fazia idéia do que era isso!) e durante algum tempo dividiu sua bancada, seus reagentes e seu tempo comigo.

Ao *quarteto fantástico*: **Lilian, Helô, Júnior e Litiane**, por estarem sempre por perto, ajudando e nos dando condições para desenvolver nosso trabalho, tentando organizar *o caos nosso de cada dia*, com bom humor e dedicação. O meu muito obrigado a vocês quatro!

À dona **Joana**, por ter participado de cada experimento desta tese, por seu bom humor e sorriso farto, todos os dias.

Ao **David**, parceiro de biomol e colônia, por ser sempre um *guia rápido de consultas*, por agitar e alegrar sempre o ambiente e pela *abraçoterapia* nos momentos tensos. *Valeu amigo!!!*

À amiga **Maya**, pelas inúmeras vezes que ficou me fazendo companhia no lab, pelas caronas, pela força nas horas difíceis, pelas teorias excêntricas, pelas perguntas engraçadas... Enfim, por ser a *Maya*.

Aos meus amigos **Rachelzinha** e **Chiquinho**, por tudo que fizeram por mim nesses anos de convivência, pelo apoio, pelos papos, pelas caronas, por toda diversão, por eu saber que posso mesmo contar com vocês, a qualquer hora...

À **Lize**, pessoa determinada, guerreira. Ilumina todo o ambiente com seu jeito alegre e seu humor *escrachado*, sempre conquistando a todos, e comigo não foi diferente.

Ao **Petter**, meu amigo mais nobre e internacional, aonde quer que vc esteja, estará sempre presente no meu dia-a-dia.

À **Denise**, a pessoa mais generosa que conheço, bom papo a qualquer hora, sempre fazendo o humor de todos melhorar.

À **Paulinha**, grande exemplo de determinação e maturidade, amiga com quem sei que posso contar nas horas boas e ruins.

Ao **Alan**, meu amigo de sempre.

Ao **Alan Brito**, meu dentista preferido, com sua calma soteropolitana sempre cativa todo mundo.

À **Michele**, uma substituta perfeita no setor de RP, sempre alegre, bem humorada e disposta a ajudar. Valeu pela *mãozinha* com os gráficos. Quando vai ser o próximo chá?

Aos professores **Geórgia**, **Katia**, **Mário** e **Horácio** pela paciência, pela convivência e pelos ensinamentos diários.

A todos os integrantes da grande *família MASUDA-GKM*, aos atuais companheiros de laboratório e também aos que já entregaram a foto 3x4, pela convivência diária, pelos conselhos, pelos papos, pelas risadas e pela troca de experiências: **Chris**, **Adriano**, **Ana Cláudia**, **Ed**, **Mônica**, **Glória**, **Ana Paula Salerno**, **Paula**, **Anne**, **Renata**, **Roberto**, **Márcia**, **Robinson**, **Aline**, **Daniel**, **Evê**, **Giselle**, **Paulinha**, **Alessandro**, **Nicole**, **Nuccia**, **Lívia**, **Luciano**, **Emerson**, **Bobby**, **Felipe Saraiva**, **Samy**, **Felipe Gazos**, **Rafael Mesquita**... e peço perdão aos que não foram citados (é difícil lembrar de todos os nomes nessa hora de emoção).

Aos professores **Pedro, Marcos Sorgine, Gabriela, Orlando, Carla** e todos os seus alunos, por terem sempre colaborado com este trabalho e pela convivência agradável.

Ao professor **Franklin** e todos os outros integrantes do seu lab que estiveram sempre prontos para ajudar, em especial ao **Daniel**, à **Nívea**, à **Marta**, à **Renata** e ao **Nelson**.

A todos os meus amigos que não participaram diretamente deste trabalho, mas foram fundamentais para a sua realização, pois me apoiaram e incentivaram o tempo todo, das mais diversas formas. Em especial à **Fernanda, Sylvinha, Adriana, Paty, Lú, Carina, Fábio, Moniquinha, Lindinha, Guilherme**.

Aos meus pais, **Neide** e **Shoji**, por serem exemplos de decência e determinação, por terem me criado de forma absolutamente digna e valorizado sobretudo a minha educação, fazendo com que eu me tornasse o que sou hoje.

Ao meu irmão **Gilberto**, aquele menino que brincava e brigava comigo, hoje um grande homem, extremamente generoso, honesto e determinado. E ao meu japinha loirinho, **Gabriel**, que sempre traz muita alegria à nossa casa, mesmo quando não está por perto.

À toda minha família, tios e primos, em especial a: **Meca, Lica, China, Laura, Carlos, Kátia** e **Harugi**.

Ao **Davi**, meu grande amor, meu noivo, meu companheiro, meu confidente, pessoa pela qual eu me apaixono a cada dia e amo cada vez mais.

*“Amor não é se envolver com a pessoa perfeita,  
aquela dos nossos sonhos.*

*Não existem príncipes nem princesas.*

*Encare a outra pessoa de forma sincera e real, exaltando  
suas qualidades, mas sabendo também de seus defeitos.*

*O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos  
transforme no melhor que podemos ser.”*

Mário Quintana

## RESUMO

NAKAMURA, Angelica. Efeitos de retinóides e juvenóides em *Rhodnius prolixus* e caracterização molecular do receptor nuclear ultraspiracle: possível interação. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências – Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Retinóides e juvenóides são substâncias estruturalmente relacionadas, pois possuem como base uma cadeia terpenóide. Tais compostos são amplamente distribuídos na natureza e estão envolvidos em eventos biológicos bastante diversos, como morfogênese, embriogênese e diferenciação celular. Neste trabalho, investigamos os efeitos dos retinóides 9-cis ácido retinóico (9cisAR), todo trans retinol (ttROH), todo trans ácido retinóico (ttRA) e os juvenóides metopreno (Met) e hormônio juvenil (HJ) na muda e na atividade fenoloxidase no inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, além de identificar e caracterizar o receptor nuclear ultraspiracle como um possível mediador molecular desses efeitos. De uma forma geral, podemos observar que a injeção de retinóides ou juvenóides (120 pmoles) na hemocele de ninfas de quarto estágio foi capaz de reduzir o percentual de insetos que obtiveram sucesso no processo de muda. Insetos expostos, principalmente, a 9cisAR ou HJ sofreram profundas alterações morfológicas, gerando ninfas de quinto estágio anormais e também um aumento da morte dos insetos durante o processo de muda. Além disso, a redução no percentual de insetos que mudaram sem alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com retinóides ou juvenóides é negativamente correlacionada com o percentual de insetos que mostraram ou muda anormal ou morte durante a muda. A atividade fenoloxidase hemolinfática em machos adultos tratados com 9cisAR, Met ou HJ foi significativamente reduzida após um desafio com bactérias. Ademais, identificamos e clonamos parcialmente o gene relativo ao receptor nuclear ultraspiracle (RpUSP), o qual se mostrou altamente similar ao USP de outros insetos como *Locusta migratoria* e *Blattella germanica*. O gene RpUSP mostra-se expresso por volta de quatro vezes mais nos ovários em relação ao corpo gorduroso e à glândula salivar, enquanto a expressão no intestino médio anterior e posterior e no coração é significativamente mais baixa. Durante a digestão sanguínea o perfil de expressão de RpUSP no corpo gorduroso mostra um pico por volta do sétimo dia e depois volta a diminuir. Nos ovários, podemos observar uma grande queda no quarto dia e uma subsequente elevação. Quando injetamos HJ em insetos em jejum, observamos que, após três horas, a expressão de RpUSP em corpo gorduroso é significativamente maior que no controle. Esse conjunto de dados indica que não apenas os juvenóides, mas também os retinóides apresentam um importante papel na morfogênese e na resposta imune em *R. prolixus*, sugerindo que o mecanismo molecular envolvido nesses eventos deve reconhecer o esqueleto terpenóide desses compostos como um importante determinante estrutural em insetos. Supostamente, esse mecanismo envolve receptores nucleares, mais especificamente, o ortólogo do RXR de vertebrados, o USP.

Palavras chave: Retinóides; hormônio juvenil; muda; fenoloxidase; *Rhodnius prolixus*

## ABSTRACT

NAKAMURA, Angelica. Retinoids and terpenoids effects on *Rhodnius prolixus* and molecular characterization of ultraspiracle: is there a relationship? Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências – Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Retinoic acid and insect juvenile hormone (JH) are structurally related terpenoids which are widespread in nature and are involved in many biological events such as morphogenesis, embryogenesis and cellular differentiation. Here, we investigated the effects of the retinoids 9-cis retinoic acid (9cisRA), all trans retinol (atROH), all trans retinoic acid (atRA) and the juvenoids methoprene (Met) and JH injection on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Overall, we observed that injection of retinoids or juvenoids (120 pmols) in the hemocoel of 4th instar nymphs reduced the percentage of insects which appeared normal in morphology upon moult. Noteworthy, insects exposed to 9cisRA or JH underwent profound morphological changes upon moult, generating abnormal 5th instar nymphs and also markedly increased the death of insects during the moulting process. In addition, reduction in the percentage of insects that moult without any morphological alteration, induced by retinoids or juvenoids treatment, was negatively correlated with insects that both display abnormal moult and those that die during moult. Hemolymphatic phenoloxidase activity in adult male insects injected with 9cisRA, Met and JH were significantly reduced after a bacterial challenge. Moreover, we have identified and cloned the nuclear receptor gene ultraspiracle (RpUSP), that have a high similarity with others insect USP, as *Locusta migratoria* e *Blattella germanica*. The RpUSP shows a differential expression profile between tissues and the ovary is about four times higher than the fat body. Others tissues like anterior midgut, posterior midgut and salivary gland are significantly lower. During digestion fat body shows elevated expression at seventh day, whereas in ovary we can see a significant decrease in fourth day. When fasting insects where injected with HJ the leves of RpUSP in the fat body were significantly higher then control. Together, these results indicate that not only juvenoids but also retinoids play an important role on morphogenesis and on immune response in *R. prolixus*, suggesting that the molecular mechanisms involved in these events recognize the terpenoid backbone as an important structural determinant in insects. This mechanism is supposed to involve nuclear receptor, in this case, the ortolog of vertebrate RXR, USP.

Keywords: Retinoids; Juvenile hormone; Moult; Phenoloxidase; *Rhodnius prolixus*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Mapa de distribuição da doença de Chagas .....	03
Figura 2 – <i>Rhodnius prolixus</i> .....	05
Figura 3 – Fases do ciclo de vida do <i>Rhodnius prolixus</i> .....	06
Figura 4 – <i>Rhodnius prolixus</i> durante alimentação sanguínea .....	07
Figura 5 – Estrutura química do Hormônio Juvenil .....	10
Figura 6 – Adultóide de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	12
Figura 7 – Estrutura química da ecdisona .....	14
Figura 8 – Estrutura química dos retinóides .....	16
Figura 9 – Estrutura dos receptores nucleares .....	20
Figura 10 – Alterações morfológicas induzidas por retinóides e juvenóides em ninfas de <i>R. prolixus</i> .....	41
Figura 11 – Retinóides e juvenóides reduzem a morfologia normal e aumentam as anormalidades morfológicas durante a muda de ninfas de <i>R. prolixus</i> .....	42
Figura 12 – Correlação entre muda normal e muda anormal ou morte durante a muda	43
Figura 13 – Retinóides e juvenóides inibem a atividade fenoloxidase hemolinfática em <i>R. prolixus</i> adulto .....	45
Figura 14 – Hibridização de DNA genômico de <i>R. prolixus</i> com 32P-DBD-RXR1 de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	47
Figura 15 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de diversos RXR/USP para desenho de iniciadores .....	48
Figura 16 – Produtos de amplificação da região do DBD do RpUSP utilizando iniciadores degenerados .....	50
Figura 17 – A seqüência de 181 pb amplificada a partir do cDNA de <i>R. prolixus</i> mostra alta homologia com genes USP/RXR de outras espécies .....	51

Figura 18 – Southern Blotting do DNA genômico de <i>R. prolixus</i> digerido .....	53
Figura 19 – Produto da reação de PCR de biblioteca de cDNA de intestino médio anterior com iniciadores específicos para o DBD-RpUSP .....	56
Figura 20 – Produtos de PCR de biblioteca de cDNA de intestino médio anterior.....	57
Figura 21 – A seqüência de 879 pb mostra alta homologia com genes USP/RXR de outras espécies de insetos .....	58
Figura 22 – Traces do sequenciamento do genoma de <i>R. prolixus</i> com homologia ao RpUSP .....	60
Figura 23 – Seqüência de 335 aminoácidos .....	61
Figura 24 – A seqüência de 336 aminoácidos de RpUSP mostra alta similaridade com RXR/USP de outros organismos (BLASTp) .....	63
Figura 25 – Expressão de RpUSP em diferentes tecidos 7 dias após a alimentação .....	67
Figura 26 - Expressão de RpUSP em ovário e corpo gorduroso ao longo da digestão .	68
Figura 27 – Efeito do tratamento com retinóides e juvenóides na expressão de RpUSP .....	70

## LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

20E	20 hidroxiecdisona
9cisAR	9-cis ácido retinóico
ATP	adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
DBD	domínio de ligação ao DNA ( <i>DNA binding domain</i> )
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EcR	receptor de ecdisona
EcRE	elemento responsivo à ecdisona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
HJ	hormônio juvenil
LBD	domínio de ligação ao ligante ( <i>ligand binding domain</i> )
Met	metopreno
pb	pares de base
PBS	salina tamponada por fosfato ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PTTH	hormônio protoracicotrópico
r.p.m	Rotações por minuto
RAR	receptores de ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RXR	receptores de retinóides
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
ttAR	todo-trans ácido retinóico
ttROH	todo-trans retinol
USP	ultraspiracle



## SUMÁRIO

	Página
1 Introdução .....	1
1.1 Os insetos como modelo de estudo .....	1
1.2 Subfamília <i>Triatominae</i> e a doença de Chagas .....	2
1.3 <i>Rhodnius prolixus</i> .....	4
1.4 Hormônio Juvenil e Ecdisona: os principais hormônios dos insetos .....	9
1.4.1 O hormônio juvenil .....	9
1.4.2 A ecdisona .....	13
1.5 Retinóides .....	15
1.6 Receptores nucleares .....	17
1.7 Ultraspiracle (USP) .....	20
1.8 Imunidade em insetos .....	22
1.9 Projeto de sequenciamento do genoma de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	24
2 Objetivos .....	26
2.1 - Objetivo Geral .....	26
2.2 - Objetivos específicos .....	26
3 Metodologia .....	27
3.1 Insetos .....	27
3.2 Injeção de retinóides e juvenóides .....	27
3.3 Efeito de retinóides e juvenóides na muda de ninfas .....	28
3.4 Efeito de retinóides e juvenóides na atividade fenoloxidase .....	28

3.5 Obtenção de DNA genômico .....	29
3.6 Obtenção de RNA total .....	29
3.7 Síntese da primeira fita de DNA complementar .....	30
3.8 Reação de polimerase em cadeia (PCR) .....	31
3.9 Eletroforese em gel de agarose .....	32
3.10 Clonagem .....	32
3.11 Obtenção de sonda marcada radioativamente .....	33
3.12 Southern Blotting .....	33
3.13 Análise <i>in silico</i> das seqüências obtidas .....	34
3.14 PCR em tempo real .....	34
3.15 Análise da expressão de USP em diferentes tecidos .....	35
3.16 Análise da expressão de USP no corpo gorduroso e ovários durante a digestão ..	36
3.17 Efeito de retinóides e juvenóides na expressão de USP no corpo gorduroso .....	36
3.18 Análise estatística .....	37
4 Resultados .....	38
4.1 PARTE I .....	38
4.1.1 Retinóides e juvenóides causam alterações morfológicas em ninfas de <i>R. prolixus</i> .....	38
4.1.2 Retinóides e juvenóides reduzem a atividade fenoloxidase da hemolinfa de <i>R. prolixus</i> .....	44
4.2 PARTE II .....	46
4.2.1 Identificação de um gene com homologia ao USP/RXR em <i>R. prolixus</i> .....	46
4.2.2 Estimativa do número de cópias de RpUSP presentes no genoma .....	52
4.2.3 Busca pelo cDNA completo do gene RpUSP .....	54

4.3 PARTE III .....	65
4.3.1 RpUSP é expresso diferencialmente nos tecidos de <i>R. prolixus</i> .....	65
4.3.2 A expressão de RpUSP é regulada pela alimentação no corpo gorduroso e ovário.....	65
4.3.1 Retinóides e juvenóides regulam a expressão de RpUSP em corpo gorduroso .....	69
5 Discussão .....	71
6 Referências .....	81
Anexo – Artigo publicado em periódico de circulação internacional relativo aos dados da primeira parte desta tese .....	92

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Os insetos como modelo de estudo**

A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso do filo Arthropoda, com cerca de um milhão de espécies identificadas, compreendendo aproximadamente 70 % das espécies animais conhecidas no mundo. Essas espécies são organizadas em aproximadamente 800 famílias, que se encontram distribuídas em 32 ordens (HOY, 1994). O grande sucesso evolutivo dos insetos pode ser atribuído a vários fatores, e podemos destacar entre eles: a presença de asas, que permitiu uma enorme dispersão e conquista dos mais variados ambientes; e a metamorfose completa nos grupos superiores, que diminui a competição por recursos entre larvas e adultos (MARANHÃO, 1977). Além disso, os insetos apresentam uma grande facilidade de reprodução, destacando-se a capacidade das fêmeas de produzir um grande número de ovos viáveis em um período de tempo relativamente curto. Na maioria dos casos a reprodução é sexuada, sendo as fêmeas ovíparas e, em alguns casos, ovovivíparas, capazes de produzir uma quantidade de ovos que pode ultrapassar 50 % do seu peso corporal (YAMASHITA & INDRATISH, 1988).

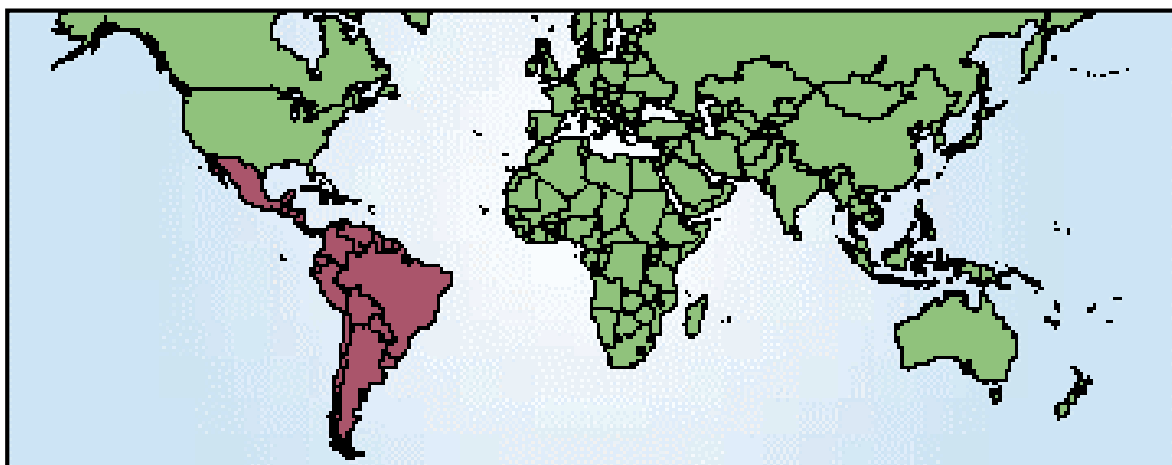
Os insetos são excelentes modelos experimentais para diversos tipos de estudos, dentre eles bioquímicos, genéticos, celulares e moleculares. Apresentam facilidade de manuseio, são pequenos, a massa e o número de indivíduos disponíveis para ensaios experimentais são relativamente grandes. Além disso, a maioria das espécies de insetos se reproduz facilmente e muitos apresentam ainda o ciclo de vida curto como, por exemplo,

*Drosophila* e *Musca domestica*, permitindo o acompanhamento das diversas fases de desenvolvimento e crescimento do indivíduo.

De fato, muitos estudos têm utilizado insetos como modelo e produzido descobertas importantes para o conhecimento científico. Estudos iniciais de genética básica foram realizados com o díptero *Drosophila melanogaster* e levaram ao estabelecimento dos conceitos básicos de citogenética, como a localização dos genes nos cromossomos (MURRAY & HUNT, 1993), além dos avanços na biologia do desenvolvimento, com a descoberta dos genes Homeobox (AKAM, 1989). O mecanismo de ação de hormônios esteróides foi elucidado com a descoberta de SCHELLER e KARLSON, em 1977, que identificaram novas formas de RNA não ribossomais transcritos através da influência de ecdisona, o hormônio esteróide dos insetos.

## **1.2 Subfamília *Triatominae* e a doença de Chagas**

A subfamília *Triatominae* é composta por insetos hematófagos pertencentes à família *Reduviidae* e popularmente conhecidos como barbeiros. Atualmente, são descritos 14 diferentes gêneros de triatomíneos que juntos albergam mais de cem espécies sendo a maioria encontrada no continente americano. Os triatomíneos são vetores da doença de Chagas, que é considerada um grave problema de saúde pública nas Américas Central e do Sul, atingindo atualmente 16-18 milhões de pessoas (**Figura 1**).



**Figura 1 – Mapa de distribuição da doença de Chagas**

A área de prevalência da doença de Chagas é destacada pela marcação em vermelho no mapa. (Retirado de: <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>)

A doença de Chagas tem como agente causador o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Ao se alimentar com o sangue de um vertebrado infectado pelo *T. cruzi*, os triatomíneos ingerem, junto com o sangue, o parasito na sua forma tripomastigota sanguíneo (SIQUEIRA-BATISTA e cols., 1996). Quando chegam ao estômago (ou intestino médio anterior) do inseto os parasitos se deparam com um ambiente bastante diferente em termos de temperatura, osmolaridade e oferta de nutrientes, além de entrarem em contato com componentes da saliva do inseto, enzimas digestivas e fatores hemolíticos (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). As formas tripomastigotas se transformam, então, em epimastigotas e vão para o intestino médio posterior, onde se replicam e se instalam permanentemente, estabelecendo assim a infecção no inseto. Em sua próxima alimentação sanguínea, o triatomíneo poderá infectar o vertebrado através de suas fezes, depositadas próximas ao

local da picada. Apesar da grande importância médica da moléstia de Chagas e da relativa facilidade de se trabalhar experimentalmente com os triatomíneos, ainda se sabe pouco sobre as interações vetor-parasito (AZAMBUJA e cols., 2005). A principal forma de controle da doença ainda é baseada na erradicação da população de triatomíneos dos ecótopos domiciliares com o uso de inseticidas, uma vez que estes insetos são muito suscetíveis a tais produtos, raramente desenvolvendo resistência aos mesmos (MARCONDES, 2001; SILVEIRA & VINHAES, 1999). Esta estratégia vem permitindo bons resultados no sentido de controlar a população de triatomíneos e, dessa forma, reduzir a transmissão vetorial do *T. cruzi* para o homem. No entanto, a eliminação dos triatomíneos dos domicílios não é a solução definitiva para a erradicação da moléstia de Chagas. Deve-se ressaltar que existem os reservatórios do protozoário em vertebrados selvagens, e que existem espécies silvestres de triatomíneos que são capazes de transmiti-lo ao homem (SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2005).

### **1.3 *Rhodnius prolixus***

O *Rhodnius prolixus* (**Figura 2**) é um inseto hematófago pertencente à subfamília *Triatominae*, e é apontado como o principal transmissor da doença de Chagas no norte da América do Sul, principalmente na Colômbia e Venezuela (LENT, 1999). Ele apresenta hábitos noturnos e alimenta-se do sangue de vertebrados. É a espécie mais estudada da subfamília, tendo proporcionado grande número de dados para o conhecimento da fisiologia dos insetos (WIGGLESWORTH, 1972).

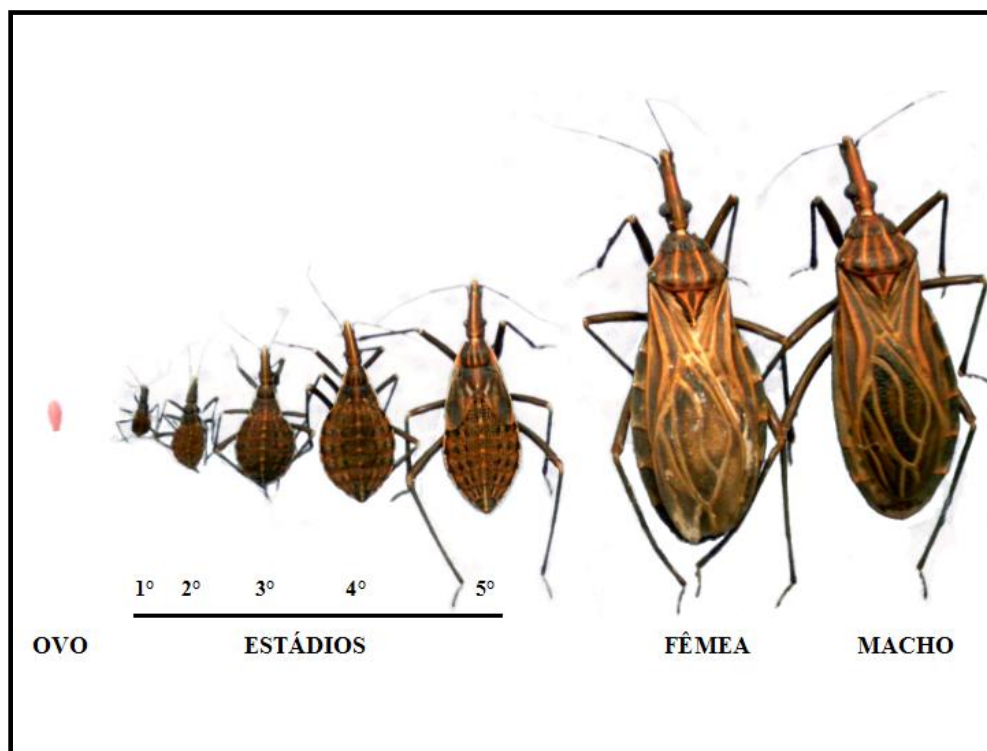


**Figura 2 – *Rhodnius prolixus***

Fêmea de *R. prolixus* durante alimentação sanguínea sobre dorso da mão de humano. (Foto de Márcia Franco)

Assim como os outros hemípteros, o *R. prolixus* é um inseto hemimetábolo. O embrião desenvolve-se dentro de um ovo em aproximadamente 15 dias, quando eclode e dá origem a uma ninfa de primeiro estágio. Passa por cinco estágios de ninfa até atingir a fase adulta, quando alcança a maturação sexual e está pronto para a reprodução (**Figura 3**). Cada mudança de estágio, no caso das ninfas, e cada ciclo de postura de ovos, no caso das fêmeas adultas, são precedidos por uma alimentação sanguínea, condição *sine qua non* para que esses eventos ocorram (ALDANA e cols., 2001).

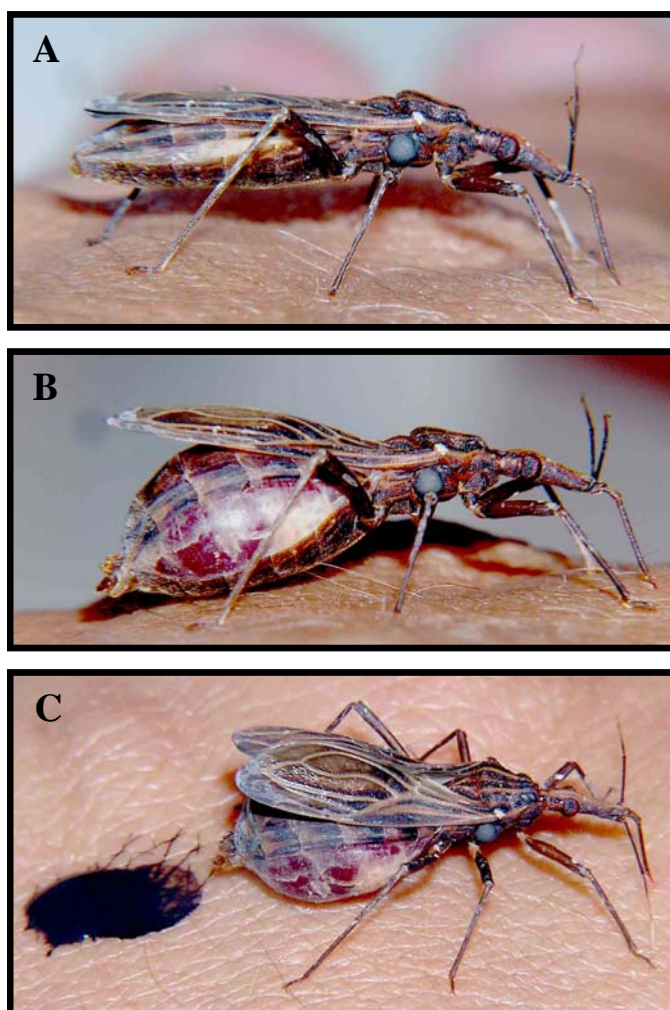




**Figura 3 – Fases do ciclo de vida do *Rhodnius prolixus***

Ovo; 1º a 5º estádios de ninfa e adultos (Foto de Roberto Eizemberg).

Todos os membros da subfamília *Triatominae* são caracterizados por serem hematófagos obrigatórios, ou seja, tanto as ninfas quanto os adultos, os machos ou as fêmeas, alimentam-se exclusivamente de sangue. Suas fontes alimentares, no entanto, são bastante diversas e incluem não só o homem, mas também uma enorme variedade de animais, podendo-se citar galinha, gambá, boi, gato e outros (CARCAVALLO e cols., 1997; CORRÊA e cols., 1998). A picada dos triatomíneos é praticamente indolor ocorrendo, normalmente, no período noturno. No caso do *R. prolixus* a duração média da picada é de 14 minutos, nos quais o inseto pode ingerir até 9 vezes o seu peso em sangue (**Figura 4**). A quantidade de sangue que o inseto ingere na alimentação interfere diretamente no seu desenvolvimento e na produção de ovos (FRIEND, 1965; VALLE e cols., 1987).



**Figura 4 – *Rhodnius prolixus* durante alimentação sanguínea**

Fêmea da espécie *Rhodnius prolixus* alimentando-se sobre o dorso da mão de humano.

(A) dois minutos após o início da picada;

(B) sete minutos após o início da picada, já sendo visível a dilatação do abdome do inseto;

(C) doze minutos após o início da picada, inseto finalizando o processo de alimentação e defecando simultaneamente.

(Fotos de Marcia Franco)

Cada fêmea adulta fertilizada de *R. prolixus* produz cerca de 40 a 42 ovos, de 2 mm cada, advindos de uma única alimentação. Por volta do terceiro dia após a alimentação, os ovários já se encontram repletos de ovócitos, e por volta do sexto dia após a alimentação, estes insetos iniciam a postura (ATELLA e cols, 2005). Devido ao fato de realizar todo o seu desenvolvimento embrionário isolado do organismo materno, o *R. prolixus* apresenta um sistema de organelas intracelulares denominadas de grânulos de vitelo, que ocupam quase todo o citoplasma do ovo. Esses grânulos possuem grande quantidade de reserva nutritiva, sendo ricos em proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais que irão nutrir o embrião durante todo o seu desenvolvimento, até a eclosão de uma ninfa de primeiro estágio (BYRNE e cols., 1989; RAIKHEL & DHADIALLA, 1992; OLIVEIRA e cols., 1989). O acúmulo de vitelo nos ovócitos em desenvolvimento é um processo conhecido por vitelogênese. A principal proteína de vitelo presente nos ovos dos insetos é a vitelina que é derivada da vitelogenina. A vitelogenina é sintetizada pelo corpo gorduroso, secretada para a hemolinfa e posteriormente captada pelos ovócitos em desenvolvimento através de endocitose mediada por receptor (PAN e cols., 1969; ENGELMANN, 1979; HARNISH e cols., 1982).

Já foi demonstrado que a síntese e o acúmulo de proteínas de vitelo nos ovos dos insetos estão sob controle hormonal (HAGEDORN & KUNKEL, 1979; DAVEY, 1981; RAIKHEL & DHADIALA, 1992; BELLÉS, 2004). Em *R. prolixus*, o primeiro relato de que a vitelogênese era controlada por hormônio foi feito por Wigglesworth em 1936, quando ele descreveu um fator liberado pela corpora alata, atualmente conhecido como HJ. Mais tarde foi demonstrado que um outro hormônio, a ecdisona, também faz parte do controle da vitelogênese, sendo capaz de inibir a ovogênese de forma dose dependente (GARCIA e cols, 1979).

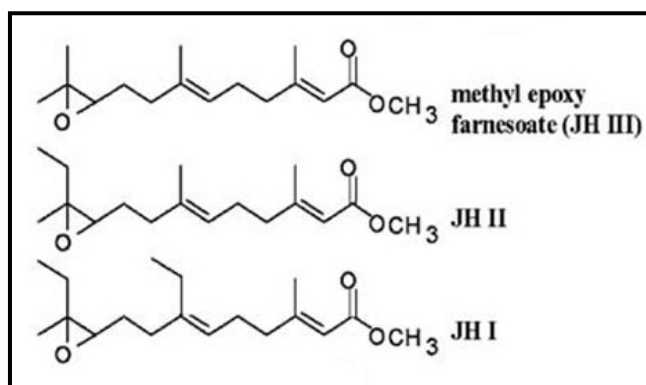
## 1.4 Hormônio Juvenil e Ecdisona: os principais hormônios dos insetos

### 1.4.1 O hormônio juvenil

O hormônio juvenil (**Figura 5**) é um sesquiterpenóide que apresenta múltiplas funções nos insetos. É um dos principais hormônios desses organismos, e já foi demonstrado que ele é capaz de regular a morfogênese tecidual através do controle da metamorfose em combinação com os hormônios ecdisteróides; regular a fertilidade em fêmeas por estímulo à síntese de vitelogenina no corpo gorduroso e sua captação pelos ovócitos em desenvolvimento; gerar polimorfismos sofisticados em insetos sociais; além de estar envolvido na regulação da resposta imune (WIGGLESWORTH, 1940; SOCHA & SEHNAL, 1973; WIGGLESWORTH, 1973; DAVEY, 1987; RANTALA e cols., 2003).

O HJ é produzido e liberado pela corpora alata, um par de glândulas endócrinas conectadas ao cérebro por dois a três pares de nervos. A produção e secreção de HJ são controladas por fatores estimulatórios, chamados de alatotrópicos, e inibitórios, os alatostáticos. Tais fatores incluem neuropeptídeos, precursores de HJ, aminas biogênicas e peptídeos sexuais (GILBERT e cols, 2000; STAY, 2000). O HJ pode ser encontrado em várias formas, e as principais são: hormônio juvenil I, II e III (**Figura 5**). O HJ I e, ocasionalmente o HJ II, são encontrados principalmente em lepidópteras, enquanto o HJ III pode ser detectado em quase todos os insetos. Por ser altamente lipofílico, o HJ não pode circular pela hemolinfa de forma livre, necessitando estar ligado a um transportador para ser levado do seu sítio de produção até os tecidos alvo. No caso do *R. prolixus*, a lipoforina, principal lipoproteína presente na hemolinfa desse inseto, além de desempenhar esse papel

de transporte, ainda protege o HJ contra a degradação por esterases de um modo geral (HARTFELDER, 2000).



**Figura 5 – Estrutura química do Hormônio Juvenil**

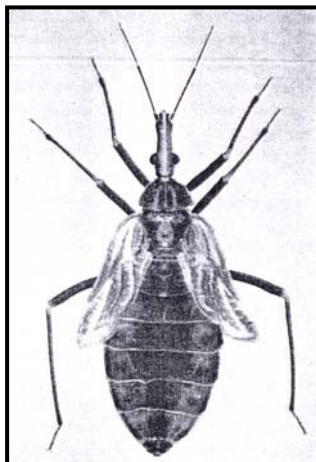
Adaptado de Wozniac, 2004.

Durante o desenvolvimento das ninfas, a presença do HJ na hemolinfa impede que ocorra uma muda precoce para a fase adulta, fato que explica a nomenclatura do hormônio. No entanto, no último estágio de ninfa, próximo à sua muda para a fase adulta, ocorre uma queda abrupta nos níveis de HJ, o que estimula a liberação de um outro hormônio, o hormônio protoracicotrópico (PTTH) que, por sua vez, leva a síntese e liberação de ecdisona. Então, pela primeira vez no ciclo de vida do inseto, ele terá a presença de altos níveis de ecdisona sem a respectiva elevação nos níveis de HJ. Esta situação permite que ocorra a muda do estágio de ninfa para adulto (HARTFELDER, 2000).

Durante a fase de vida adulta, o HJ continua a ser de grande importância em diversos aspectos da fisiologia dos insetos. A cópula é capaz de induzir a corpora alata a produzir e

secretar HJ (MUNDALL & ENGELMANN, 1977; DAVEY, 1987), que age diretamente sobre os ovários, controlando o alargamento dos canais interfoliculares para permitir que as macromoléculas provenientes da hemolinfa, como a vitelogenina, alcancem a superfície dos ovócitos e sejam captadas (ATELLA, 2005). Além disso, algumas evidências também têm demonstrado que o HJ apresenta um papel central na resposta imune de insetos, visto que altos níveis estão implicados em imunossupressão humoral (ROLFF & SIVA-JOTHY, 2002).

A importância do HJ durante o processo de desenvolvimento dos insetos vem sendo demonstrada ao longo de anos por vários grupos de pesquisa. Muitos trabalhos têm demonstrado os seus efeitos, assim como de seus análogos, no processo de muda de triatomíneos (WIGGLESWORTH, 1962; WIGGLESWORTH, 1969; BARRET, 1974; TARRANT & CUPP, 1978; AZAMBUJA e cols, 1984; JURBERG, 1984). Através de interferência nos níveis de HJ, por alatectomia, decapitação ou com o uso de compostos anti-HJ, observa-se uma variedade de alterações morfológicas como, por exemplo, a metamorfose precoce levando a formação de adultóides em *R. prolixus* (**Figura 6**) (JURBERG e cols., 1997). O tratamento com precoceno II, um composto anti homônio juvenil, em ninfas de triatomíneos aumentou o tempo de muda (AZAMBUJA e cols., 1984) e induziu o aparecimento de adultóides com asas rudimentares e genitália deformada (JURBERG e cols., 1986). Além disso, ovos tratados com precoceno II, resultaram em redução da viabilidade, enquanto ninfas de 2º, 3º e 5º estádios tratadas com o mesmo composto foram induzidas a metamorfose precoce, transformando-se em adultóides (TARRANT & CUPP, 1978). Curiosamente, o ácido retinóico pode exercer um efeito parecido com o do HJ em insetos, levando a ninfas anormais, malformações embrionárias e promovendo a síntese de vitelogenina em fêmeas alatectomizadas (NEMEC e cols., 1993).



**Figura 6 – Adultóide de *Rhodnius prolixus***

Adaptado de Wigglesworth, 1969

Os primeiros estudos envolvendo o HJ datam da década de 1930 e foram desenvolvidos no inseto *R. prolixus* (WIGGLESWORTH, 1934). Desde então inúmeros estudos acerca desse hormônio vêm sendo desenvolvidos no inseto citado, principalmente relacionados ao processo de vitelogênese. Já foi demonstrado que estão sob controle do HJ os processos de síntese e liberação de vitelogenina pelo corpo gorduroso (COLES, 1965; VALLE, 1993), captação de vitelogenina mediada por receptor na membrana dos ovócitos (WANG, 1992), patencia (DAVEY, 1974), entre outros.

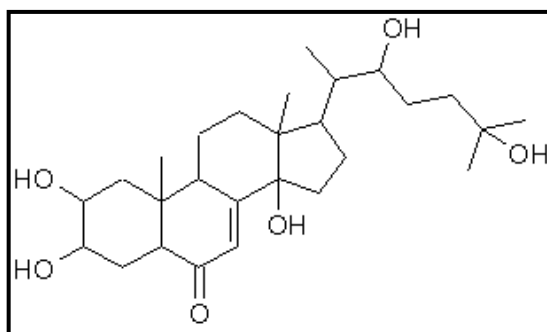
Porém, apesar da significativa quantidade de estudos disponíveis envolvendo *R. prolixus* e HJ, vale ressaltar que este ainda não foi identificado endogenamente no inseto em questão.

### 1.4.2 A ecdisona

A ecdisona (**Figura 7**) é um hormônio esteroidal que desempenha diversos papéis em todas as fases de vida dos insetos. Está envolvida na regulação dos principais eventos inerentes ao desenvolvimento dos insetos, como muda e metamorfose, bem como na vitelogenese em adultos (HUANG, 2008).

Como já foi consistentemente demonstrado, os artrópodes não são capazes de sintetizar esteróis a partir de moléculas precursoras simples, como o acetato (SVOBODA, 1999). Dessa forma, eles necessitam ingerir esteróis, de uma forma geral o colesterol, em suas dietas. Vários estudos têm demonstrado que os insetos podem absorver colesterol da dieta tanto na forma livre quanto na esterificada, mas que em seguida à absorção uma pequena fração da forma livre é esterificada no ambiente intracelular. A importância da esterificação é desconhecida, mas tem sido sugerido que ela pode servir como um mecanismo temporário de armazenamento intracelular (TURUNEN & CHIPPENDALE, 1977; KUTHIALA & RITTER, 1988; KOMNIK & GIESA, 1994; JOUNI e cols, 2002). Após a absorção no intestino médio, os esteróis têm de ser transportados pela hemolinfa para os órgãos onde serão armazenados e utilizados. Porém, a natureza hidrofóbica dos esteróis requer que existam sistemas carreadores hemolinfáticos, papel desempenhado pela lipoforina (CHINO & GILBERT, 1971; JOUNI, 2002). A fisiologia de esteróis nas várias famílias de insetos é diversificada, estando bastante relacionada à dieta inerente a cada espécie. Muitos aspectos a respeito do metabolismo e fisiologia dos esteróis em insetos ainda são desconhecidos. Atualmente são considerados três papéis desempenhados pelos esteróis nos insetos: i) como um constituinte de membranas; ii) como um precursor dos hormônios ecdisteróides; e iii) como uma molécula sinalizadora durante o desenvolvimento (BEHMER & NES, 2003).





**Figura 7 – Estrutura química da ecdisona**

Quando mencionamos a síntese de ecdisona então, estamos nos referindo a uma seqüência de alterações sofridas pela molécula de colesterol na glândula protorácica dos insetos. Tal síntese ocorre por estímulo de um outro fator, o hormônio protoracicotrópico (PTTH), que é produzido no cérebro por um grande par de neurônios laterais que se ligam à corpora alata. A secreção de PTTH está sob complexo controle e sobre influência de fatores externos, como o fotoperíodo, a hora do dia e a alimentação do inseto (GILBERT, 2002). É interessante notar que o PTTH de *Bombyx mori*, uma lepidóptera, é capaz de estimular a ecdisteroidogênese na glândula protorácica de *R. prolixus*, um hemíptero (VAFOPOULOU & STEEL, 1997).

O hormônio ecdisteróide em sua forma ativa é chamado de 20-hidroxiectdisona (20E) e apresenta caráter polar, sendo solúvel em meio aquoso, como a hemolinfa dos insetos, ao mesmo tempo em que também é capaz de atravessar membranas celulares (lipofílicas). Esta última característica lhe confere a habilidade de entrar nas células alvo e atingir o núcleo, aonde irá se ligar ao seu receptor, o receptor de ecdisona (EcR), pertencente à superfamília

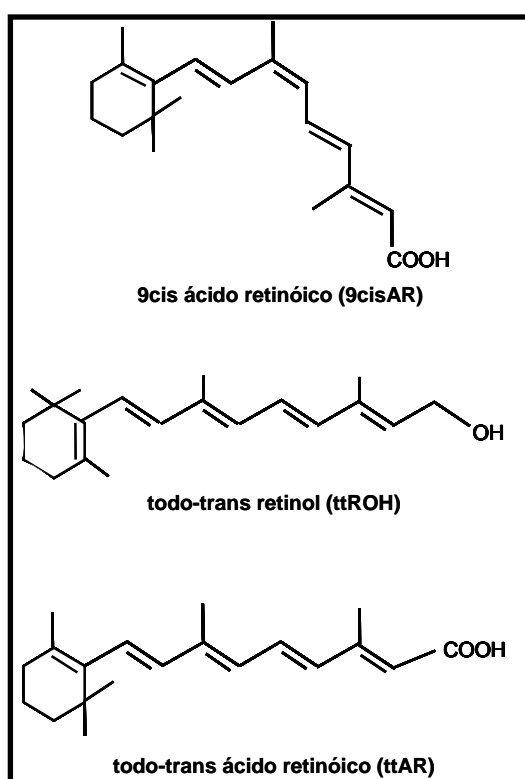
dos receptores nucleares que será abordada mais adiante. Dessa forma, através da interação desse complexo com regiões específicas da cadeia de DNA, a ecdisona é capaz de interferir na expressão gênica nos insetos regulando vários processos fisiológicos, inclusive os de muda e metamorfose (GILBERT, 2002).

Da mesma forma, a ecdisona é também capaz de regular a vitelogênese. Em fêmeas adultas, um único repasto sanguíneo estimula a produção de ecdisona que irá atuar em vários tecidos. No corpo gorduroso, ela induz a produção de várias proteínas, sendo a principal a vitelogenina, que é liberada para a hemolinfa e chega até os ovários. Nos ovários, a ecdisona estimula a expressão do receptor de vitelogenina, importante para a internalização da proteína nos ovócitos em desenvolvimento (MARTIN, 2001).

## 1.5 Retinóides

Os retinóides, como o ácido retinóico todo-trans (tt-AR), ácido retinóico 9-cis (9cis-AR) e o retinol (vitamina A) (**Figura 8**), são compostos, derivados dos carotenóides e provenientes de diversas reações enzimáticas. São amplamente distribuídos na natureza e evidências indicam que atuam como importantes reguladores celulares envolvendo o crescimento celular e a diferenciação, no período da embriogênese e do desenvolvimento de vertebrados (MADEN, 1994; KERSZBERG, 1999). Tais substâncias agem como potentes morfógenos, regulando não apenas a formação de membros, mas também determinando o desenvolvimento dos eixos durante a embriogênese (MADEN, 1993; THALLER & EICHELE, 1987). Na maioria dos embriões, um eixo antero-posterior advém de células que especificam identidades de posição no embrião. A especificação do posicionamento, por exemplo, pode ser gerado por um simples gradiente de substâncias que se difundem, conhecidas como morfógenos, que possuem a característica de serem substâncias com

grande capacidade de se difundir e normalmente apresentam baixa massa molecular (THALLER, 1987). Em muitos modelos de vertebrados, esses compostos ao atuarem como morfógenos, controlam o padrão de formação nestes organismos, através da regulação da expressão de genes Homeobox (cuja expressão é regulada por retinóides e estão envolvidos no padrão de formação de vertebrados) (ROZOWSKI, 2002).



**Figura 8 – Estrutura química de retinóides**

No interior das células, a presença de proteínas ligadoras indica que um tecido é alvo para a ação dos retinóides, uma vez que a regulação dos níveis de proteínas ligadoras durante o desenvolvimento pode representar mudanças nos requerimentos de retinóides

durante os diferentes estágios do desenvolvimento. Os retinóides e receptores de retinóides pertencem a uma superfamília de reguladores transcricionais ativados por ligantes nucleares que estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos em diversos sistemas. O padrão de desenvolvimento de embriões requer um elaborado sistema envolvendo mecanismos moleculares. Genes regulados durante o desenvolvimento atuam na organização do crescimento e diferenciação de tipos celulares específicos em localizações precisas, resultando na formação de tecidos altamente especializados. A sinalização célula-célula e fatores que governam a estabilização e regulação da expressão de gene Homeobox durante o desenvolvimento não estão bem elucidados, mas sugere-se o envolvimento de retinóides.

Em invertebrados, retinóides e receptores de retinóides têm sido identificados em diversos tecidos (GUO, 1998; ZHU e cols, 2003), estando implicados em vários processos biológicos, do ciclo visual (CARLSON e cols., 1967) a morfogênese (NEMEC e cols., 1993).. Já foi demonstrado que os retinóides estão presentes em algumas espécies de insetos, tendo sido descritos primeiramente em cabeças de abelhas (GOLDSMITH, 1958). Recentemente foi demonstrado que alguns artrópodes apresentam proteínas ligadoras de ácido retinóico, enzimas relacionadas ao seu metabolismo, além de receptores funcionais e genes Homeobox importantes em determinar o plano corporal nos insetos (PETKOVITCH e cols., 1987; GRUN e cols, 1996; MANSFIELD e cols., 1998).

## **1.6 Receptores nucleares**

Organismos multicelulares necessitam de uma forma de comunicação intercelular específica para a sua organização e para a manutenção de suas funções ao longo das várias fases de vida. Fatores de crescimento, neurotransmissores e hormônios peptídicos ligam-se a

receptores localizados nas membranas celulares, disparando cascatas de sinalização intracelular e produzindo assim o seu efeito. No entanto, moléculas sinalizadoras pequenas e hidrofóbicas, como os hormônios esteroidais e algumas vitaminas, atravessam a membrana celular e entram nas células alvo onde se ligam a membros da superfamília de receptores nucleares para produzirem seus efeitos. (LAUDET & GRONEMEYER, 2002). Os receptores nucleares fazem parte de uma grande superfamília de ativadores da transcrição induzidos por ligantes de alta afinidade. Eles são responsáveis por controlar um considerável número de processos celulares e fisiológicos essenciais aos organismos multicelulares tais como o desenvolvimento embrionário, o metabolismo e a diferenciação celulares, a homeostase de lipídeos e glicose e a reprodução. Estas proteínas são responsáveis pela resposta transcricional aos hormônios esteróides sexuais (progestinas, estrogênios e androgênios), aos esteróides da adrenal (glucocorticóides e mineralocorticóides), à vitamina D3, ao hormônio tireoideano, ao ácido retinóico (9-cis e all-trans) e uma variedade de outros ligantes metabólicos. Os ligantes naturais de muitos dos membros desta superfamília, entretanto, são desconhecidos e por isso eles são chamados de receptores órfãos. Devido à multiplicidade de ações em que estão envolvidos, defeitos no funcionamento dos receptores nucleares, normalmente mutações, são potencialmente danosos ao organismo. Já foi demonstrado que a perda do controle das vias de sinalização por receptores nucleares está associada ao desenvolvimento de doenças relacionadas com o sistema endócrino tais como o câncer de próstata (HEINLEIN, 2004), o câncer de ovário (MODUGNO, 2004), a diabetes (BLASCHKE, 2006) e a obesidade (TSUCHIDA, 2005).

Apesar de estarem envolvidos em processos regulatórios tão diversos, a superfamília dos receptores nucleares apresenta uma estrutura terciária bastante conservada. São compostos por seis diferentes domínios, de A a F (**Figura 8**). A região N-terminal A/B é a

que apresenta menor nível de conservação quando comparamos receptores nucleares de diferentes subfamílias. O seu tamanho é bastante variável, podendo apresentar de 23 (receptor de vitamina D) a 550 aminoácidos (receptores de glicocorticóide e mineralocorticóide). Contém um domínio de ativação independente de ligante chamado de AF-1. A região seguinte, denominada C, é altamente conservada e abriga o domínio de ligação ao DNA (DBD – DNA binding domain). O DBD contém dois motivos de dedo-de-zinco (zinc finger), que conferem uma alta especificidade no reconhecimento das sequências regulatórias de DNA de seus genes-alvo. A região D é uma região pouco conservada entre os membros da superfamília e funciona como uma dobradiça (hinge) entre os domínios C e E, conferindo flexibilidade à proteína e permitindo que ela adote diferentes conformações. A região E é altamente estruturada e compreende dois importantes domínios: o domínio de interação com o ligante (LBD – ligand binding domain) e um segundo domínio de ativação, o AF-2. A resolução da estrutura cristalográfica do LBD de vários receptores nucleares confirmou as especulações de que todos eles compartilham uma estrutura comum, a qual inclui uma cavidade hidrofóbica formada por 12  $\alpha$ -hélices (H1 a H12) que acomoda o ligante hidrofóbico. A região C-terminal, conhecida como F, é bastante diversa e pouco conservada entre os receptores nucleares, sendo que em alguns receptores ela pode até mesmo estar ausente. Sua função ainda é desconhecida, no entanto, assim como a região A/B, ela é alvo de modificações pós-transcricionais, o que aumenta a complexidade dessas proteínas (LAUDET & GRONEMEYER, 2002).



**Figura 8 – Estrutura dos receptores nucleares**

Esquema representativo da estrutura geral dos receptores nucleares, destacando os seus domínios funcionais. DBD – domínio de ligação com o DNA (*DNA binding domain*); LBD – domínio de ligação com o ligante (*ligand binding domain*).

Todos os receptores nucleares reconhecem regiões de DNA chamadas de elementos responsivos. Eles são derivados de uma única seqüência: 5'-PuGGTCA (sendo Pu = A ou G). No entanto, a partir dessa seqüência, podem ocorrer mutações, extensões, duplicações e, sobretudo, diferentes orientações, gerando elementos responsivos que são seletivos para determinados receptores ou classe de receptores (LAUDET & GRONEMEYER, 2002).

Em insetos já foram caracterizados alguns tipos de receptores nucleares, sendo os principais o receptor de ecdisona (EcR) e o ultraspiracle (USP). Além deles, já foram descritos o E75, E74, E78, sevenup, entre outros (HENRICH & BROWN, 1995).

### 1.7 Ultraspiracle (USP)

Em 1990, Oro e colaboradores buscavam no genoma de *Drosophila* genes homólogos ao receptor de ácido retinóico, como parte de um projeto que procurava esclarecer o controle hormonal durante o desenvolvimento desse inseto. Utilizando então um oligonucleotídeo que codifica o receptor  $\alpha$  de ácido retinóico humano (hRAR $\alpha$ ) como

sonda para varrer uma biblioteca de cDNA de *Drosophila*, eles encontraram um gene localizado numa região chamada de *ultraspiracle* (*usp*) e observaram que o produto deste gene era uma proteína homóloga ao receptor X de retinóides (RXR). Passaram a chamá-la, então, de ultraspiracle (USP). Depois dessa descoberta, o USP já foi identificado e caracterizado em vários outros artrópodes, incluindo uma grande variedade de insetos, como: *Bombyx mori* (TZERTZINIS e cols, 1994), *Aedes aegypti* (KAPITSKAYA e cols, 1996), *Lucilia cuprina* (HANNAN & HILL, 2001), *Chironomus tentans* (GREBE & SPINDLER-BARTH, 2002), *Apis mellifera* (BARCHUK e cols, 2004), *Blattella germanica* (MAESTRO e cols, 2005), entre outros.

Durante muito tempo, o USP foi considerado um receptor órfão, carente de um ligante endógeno. Contudo, especulava-se que o HJ fosse um possível ligante, por sua natureza terpenóide que faz com que ele se assemelhe ao ácido retinóico, podendo, portanto, apresentar um mecanismo de ação similar. Esta hipótese começou a ganhar força em 1997, quando Jones & Sharp publicaram um estudo no qual mostravam que este receptor seria capaz de ligar HJ. Nos anos seguintes, novos trabalhos do mesmo grupo de pesquisadores reforçaram o achado anterior de que o HJ realmente se liga ao USP, inclusive levando a mudanças conformacionais no receptor após a ligação (JONES & JONES, 2000; JONES e cols, 2001; WOZNIAK e cols, 2004). Entretanto, ainda há autores que não consideram comprovada a teoria de ser o HJ o ligante endógeno de USP, baseados, principalmente, na baixa afinidade da ligação (BILLAS e cols, 2001; CLAYTON e cols, 2001; SASORITH e cols, 2002).

Já foi demonstrado que o USP forma um forte e estável heterodímero com o receptor de ecdisona (EcR), sendo considerado o seu receptor funcional. Vale ressaltar que a baixa afinidade de 20-hidroxiecdisona, a forma biologicamente ativa de ecdisona, pelo seu



receptor é drasticamente aumentada na presença de USP, levando a um valor de ordem nanomolar (YAO e cols, 1993). O heterodímero EcR-USP se liga ao elemento responsivo à ecdisona (EcRE), região do DNA que confere especificidade à ligação receptor-DNA e dessa forma regula a expressão de vários genes, direta ou indiretamente (YAO e cols, 1993; SWEVERS e cols, 1996; HALL & THUMMEL, 1998). A seqüência preferencial para a ligação do heterodímero EcR-USP é uma seqüência palindrômica baseada em GAGGTCA e com as duas repetições separadas por uma única base central, que pode ser A ou T. Além dessa seqüência, já foi demonstrada também a sua capacidade de se ligar a repetições diretas, embora com uma menor afinidade (LAUDET & GRONEMEYER, 2002).

Um dos papéis mais estudados do receptor funcional de ecdisteróides é a regulação do processo de vitelogenese, especialmente no mosquito *Aedes aegypti*. (MARTIN e cols, 2001). A região regulatória do gene da vitelogenina é composta por três unidades e nelas estão presentes sítios de ligação do complexo transcricional EcR-USP. A alimentação sanguínea dispara uma cascata hormonal que leva ao aumento da concentração do hormônio esteróide endógeno (20E), que atua, no corpo gorduroso, sobre o gene da vitelogenina através do heterodímero EcR-USP. A ligação do receptor ao elemento responsivo ativa diretamente a transcrição do gene da vitelogenina. Além disso, ocorre também o estímulo à transcrição de outros genes, como o E74 e o Broad, que codificam fatores de transcrição que irão se ligar a outras unidades da mesma região regulatória, aumentando ainda mais a transcrição de vitelogenina (PARK e cols, 2006).

## **1.8 Imunidade em insetos**

Os insetos encontram-se amplamente distribuídos pela natureza e vivem em praticamente qualquer tipo de habitat ficando, desta forma, expostos a ambientes

potencialmente patogênicos. Devido ao grande sucesso evolutivo da classe em questão, fica claro que eles devem apresentar um eficiente sistema de defesa (SODERHALL & CERENIUS, 1998). De fato, o sistema de defesa dos insetos é bastante desenvolvido, sendo composto por respostas celular e humoral, que agem de forma cooperativa para evitar que microrganismos invasores se tornem patógenos. Os mecanismos de defesa incluem fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento, produção de lisozima e liberação de peptídeos antibacterianos, tais como cecropinas, atacinas e defensinas, entre outros (FEDER, 1997).

Além dos fatores citados, devemos ressaltar a ativação da cascata da profenoloxidase, um dos principais mecanismos de defesa nos insetos. A profenoloxidase é encontrada na hemolinfa dos insetos e é o precursor inativo da fenoloxidase, enzima dependente de cobre que catalisa a hidroxilação de monofenol a difenol e sua oxidação a quinona que, em uma reação não-enzimática, gera a melanina (MASON, 1955; 1965). A deposição de melanina em tecidos danificados impede a entrada de possíveis patógenos, além de evitar a perda de hemolinfa. A melanina pode também ser depositada em microrganismos que eventualmente penetrem o inseto (ASHIDA, 1971).

Foi demonstrado que a profenoloxidase está sob controle hormonal. A forma ativa de ecdisona é capaz de aumentar a transcrição do gene da profenoloxidase 1 em *Anopheles gambiae* (AHMED, 1999). Por outro lado, em *Manduca sexta*, a aplicação de HJ exógeno inibe a síntese de profenoloxidase e a consequente melanização, enquanto em *Apis mellifera* o tratamento com um análogo de JH, o piriproxifeno, aumenta tanto a atividade fenoloxidase como a melanização da cutícula (HIRUMA & RIDDIFORD, 1988; BITONDI e cols., 1998).

Em *R. prolixus* já foi demonstrado que a inoculação de bactérias induz a um aumento no número de hemócitos e formação de nódulos, o aparecimento de peptídeos antibacterianos e interferência na cascata de ativação da profenoloxidase. Vale considerar que a composição da alimentação é importante na regulação da resposta imune do inseto, visto que quando alimentado apenas com plasma apresentam um aumento de mortalidade quando infectados com bactérias. É interessante ressaltar que o tratamento com ecdisona exógena é capaz de reverter o efeito do estado de má nutrição causado pela alimentação com plasma (FEDER e cols, 1997).

### **1.9 Projeto de sequenciamento do genoma de *Rhodnius prolixus***

Várias espécies de insetos das ordens Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Coleoptera tiveram ou estão tendo seus genomas seqüenciados. No entanto, na ordem Hemiptera, o *R. prolixus* será a primeira espécie. O tamanho do genoma dos insetos varia de forma considerável. Por exemplo: *Drosophila* 180 MBp; *Anopheles gambiae* 260 MBp; *Bombyx mori* 530 MBp; *Manduca sexta* 530 MBp; *Triatoma infestans* entre 1,3 e 1,8 GBp e *Triatoma dimidiata* 955MBp. O genoma do *R. prolixus* apresenta 670 MBp (PANZERA e cols., 2004).

O projeto de sequenciamento do genoma de *R. prolixus* já encontra-se em andamento e está sendo realizado por um consórcio internacional, com representantes do Brasil, Canadá, Argentina, Uruguai, Paraguai, Colômbia, Chile, França e Estados Unidos da América. As primeiras coberturas do genoma completo já foram obtidas e dados preliminares já estão sendo divulgados e utilizados (<http://triatomine.org>).

O sequenciamento do genoma do *R. prolixus* é de grande importância para o avanço da pesquisa tanto a nível biomédico como biológico, e terá como algumas de suas conseqüências:

- gerar conhecimento sobre a biologia do vetor e sobre as interações vetor-parasita;
- desenvolver mais ferramentas e base de conhecimento para o desenvolvimento de novas medidas de controle do vetor;
- explorar potenciais moléculas biofarmaceuticas oferecidas pelo inseto;
- estudar a filogenia e permitir comparações genômicas entre os artropodos;
- desenvolver ferramentas para manipulação genética nesse vetor;
- fornecer informações básicas necessárias para estudos de proteômica; e
- estudar a expressão de genes específicos de tecidos e órgãos e seus papeis funcionais.

Certamente, o sequenciamento do genoma de *R. prolixus* aumentará a importância e a utilidade deste inseto como modelo de estudo e, associado à rica literatura já disponível, ajudará no entendimento de funções biológicas específicas, como elas são reguladas e como evoluíram.

Dessa forma, tendo como base os dados fornecidos pela literatura e utilizando como modelo experimental o inseto *Rhodnius prolixus*, buscamos estudar os efeitos de compostos terpenóides como os retinóides e os juvenóides, na fisiologia e bioquímica dos insetos, além de caracterizar molecularmente o receptor nuclear ultraspiracle (USP), um possível mediador dos efeitos desses compostos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos de terpenóides, incluindo retinóides e juvenóides, no inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, bem como tentar elucidar possíveis mecanismos de ação através da caracterização molecular do receptor nuclear *ultraspiracle* (USP).

### 2.2 Objetivos específicos

- caracterizar os efeitos de ácido retinóico (isômeros todos-trans e 9-cis), todos-trans retinol, hormônio juvenil e metopreno, administrados por injeção na hemocele, durante o processo de muda de ninfas de *R. prolixus*;
- caracterizar os efeitos de ácido retinóico (isômeros todos-trans e 9-cis), todos-trans retinol, hormônio juvenil e metopreno, administrados por injeção na hemocele, na atividade fenoxidase em adultos;
- obter a seqüência parcial de nucleotídeos do gene *ultraspiracle* de *R. prolixus*;
- caracterizar a expressão de *ultraspiracle* em diferentes tecidos e situações metabólicas em *R. prolixus*;
- mostrar o possível envolvimento do receptor nuclear codificado pelo gene *ultraspiracle* na mediação dos efeitos causados por retinóides e juvenóides.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Insetos**

Os insetos utilizados neste trabalho foram obtidos na colônia do Laboratório de Bioquímica de Insetos, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, implantada no início da década de 1980. Esta colônia é mantida sob condições controladas de temperatura ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e todos os insetos são alimentados com sangue de coelho a intervalos regulares de três semanas. Os adultos passam por até quatro ciclos de alimentação. Foram utilizadas ninfas de quarto e quinto estágio, bem como machos adultos de primeira alimentação e fêmeas adultas de segunda alimentação. O tempo após a alimentação é descrito para cada tipo de ensaio.

#### **3.2 Injeção de retinóides e juvenóides**

As soluções estoque de retinóides e juvenóides foram preparadas em etanol 100 % com BHT a 1 mg/mL e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. As diluições das soluções estoque eram preparadas no dia da injeção, em salina tamponada por fosfato (phosphate buffered saline – PBS). Os compostos foram injetados na hemocele dos insetos utilizando uma seringa de microvolume Hamilton #95 (Hamilton CO. Reno, Nevada) em um volume total de  $2\mu\text{L}$ , tomando os devidos cuidados para não haver perfuração dos órgãos internos. Foram injetados 120 pmoles de cada composto e a concentração de etanol nas soluções diluídas em PBS variou entre 0,338 % e 1,025 %. A massa dos compostos correspondentes a 120 pmoles foram as seguintes: 9cisAR = 36,05 ng/inseto; atROH = 34,37 ng/inseto; atAR = 36,05 ng/inseto; Met = 37,20 ng/inseto; HJ = 31,96 ng/inseto. O grupo controle foi injetado com etanol a 1,025 % diluído em PBS.

### 3.3 Efeito de retinóides e juvenóides na muda de ninfas

Ninfas de quarto e quinto estágio de *R. prolixus* foram injetadas com 120 pmoles de cada substância 12 e 18 dias após a alimentação sanguínea, respectivamente, ou seja, na véspera de iniciarem o processo de muda. Após a injeção, os grupos foram avaliados diariamente, durante uma semana e classificados em quatro diferentes grupos:

- i) morte antes da muda – ninfas que morreram antes de iniciar o processo de muda;
- ii) normal – ninfas que completaram a muda com características morfológicas externas normais;
- iii) anormal – ninfas que completaram o processo de muda com anormalidades morfológicas; e
- iv) morte durante a muda – ninfas que iniciaram o processo de muda, mas não conseguiram completá-lo, morrendo em seguida.

Os efeitos dos retinóides ou juvenóides foram avaliados pela comparação entre os insetos injetados com os diferentes compostos e aqueles injetados apenas com PBS e etanol (controle). A quantificação foi expressa como percentual de insetos.

### 3.4 Efeito de retinóides e juvenóides na atividade fenoloxidase

Machos adultos de *R. prolixus* de primeira alimentação foram injetados com 120 pmoles de 9cisAR, atROH ou HJ três dias após a alimentação, e 20 horas depois foram desafiados com a injeção de *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $9,4 \times 10^5$  células) também na hemocele. A hemolinfa dos insetos foi coletada em diferentes tempos e a atividade fenoloxidase foi ensaiada da seguinte forma: 25  $\mu$ L da hemolinfa coletada foi diluída em PBS com pH 7,4 contendo solução anticoagulante (EDTA 10 mM, glicose 100 mM, cloreto de sódio 62 mM, citrato de sódio 26 mM e ácido cítrico 30 mM) na presença de 4 mg/mL de L-DOPA,

utilizado como substrato. A atividade fenoloxidase foi determinada por espectrofotometria avaliando-se a absorção de luz à 470 nm, utilizando  $\epsilon = 3715 \text{ mM/cm}^{-1}$ , como descrito por Daquinag e colaboradores (1995).

### **3.5 Obtenção de DNA genômico**

Insetos machos adultos em jejum foram dissecados e tiveram todos os seus tecidos internos coletados e macerados em tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 150 mM; SDS a 2 %; proteinase K a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). O material foi incubado por 2 horas a 56°C. Em seguida o DNA foi extraído seqüencialmente com 1 volume de fenol tamponado, 1 volume de fenol-clorofórmio e 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa foi submetida a precipitação com 2,5 volumes de etanol absoluto e KOAc 4 M pH 5,2 a 1:10 por 30 minutos a -70°C.

### **3.6 Obtenção de RNA total**

Para a obtenção de RNA total, os tecidos dissecados eram homogeneizados em 1 mL do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em microtubos e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras eram então centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes eram transferidos para tubos novos e a eles eram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, EUA). As amostras eram incubadas por 2 min a temperatura ambiente e depois novamente centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. A fase aquosa (superior) era transferida para novos tubos e foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Merck) para precipitar o RNA. As amostras eram incubadas por 10 min a temperatura ambiente e depois centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C por mais 15 min. Os sobrenadantes eram descartados e adicionava-se 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto (Merck) aos



precipitados. O RNA era estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso, quando o etanol era descartado e o precipitado era solubilizado em água livre de RNase.

As amostras tiveram seu conteúdo de RNA quantificado por espectrometria em cubetas de quartzo (LEE & SCHMITTGEN, 2006). Uma alíquota de cada amostra era diluída 500 vezes em água deionizada e submetida à leitura espectrofotométrica a 260 nm. A concentração de RNA era estimada considerando que cada unidade de densidade ótica (DO) medida a 260nm equivale à concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA.

Apesar da extração com TRIzol<sup>®</sup> ser específica para RNA, a etapa de tratamento da amostra com uma DNase é importante para evitar que qualquer contaminação com DNA genômico causada por uma extração de RNA mal realizada possa interferir nos resultados de quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real a ser realizada em etapas posteriores. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá). Em um tubo de 0,2 ml no gelo, foram adicionados 1  $\mu\text{g}$  de RNA, 1  $\mu\text{l}$  do tampão da DNase I (10x), 1  $\mu\text{l}$  de DNase I (1U/ $\mu\text{l}$ ) e água livre de RNase em quantidade suficiente para completar 10  $\mu\text{l}$ . A reação foi incubada por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Ao final, adicionava-se 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 25mM e incubava-se a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min, para inativar a DNase.

### **3.7 Síntese da primeira fita de DNA complementar**

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o kit Super Script II (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Aos 11  $\mu\text{l}$  obtidos no tratamento das amostras com DNase I foram adicionado 2,2  $\mu\text{l}$  do tampão de reação (10x), 0,88  $\mu\text{l}$  de dNTP (100 mM), 2,2  $\mu\text{l}$  de iniciadores aleatórios (10x), 1,1  $\mu\text{l}$  da transcriptase reversa (50 U/ $\mu\text{l}$ ) e água livre de RNase para completar 22  $\mu\text{l}$ .

A reação foi incubada 10 min a 25 °C e depois a 37 °C por 2 h. As amostras de DNAc foram estocadas a -20°C até o uso.

### 3.8 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Para realizar as reações de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada a enzima Taq DNA Polimerase (Phoneutria). As misturas de reação para PCR continham 2 µl de tampão para específico para Taq DNA Polimerase (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8,4 100 mM, Triton X-100 1% e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 0,4 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl do iniciador senso (10 µM), 0,4 µl do iniciador anti-senso (10 µM), 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1 µl da amostra de cDNA e 14,6 µl de água, formando um volume final de 20 µl. As amostras foram levadas ao termociclador (Applied Biosystems) sob o programa: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 45 s; e 72 °C por 10 min. As seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação nas reações de PCR foram as seguintes:

Iniciadores degenerados:

RpUSP1F (senso): 5' AAGCAYCTSTGYTCIATYTGCGG 3'

RpUSP2F (senso): 5' AGCTGYGARGGWTGCAARGGTT 3'

RpUSP2R (anti-senso): 5' AAKCCYTTGCAWCCYTCRCAGCT 3'

RpUSP3R (anti-senso): 5' TCYTGGACSGCYTCBCGCTTCAT 3'

Iniciadores específicos para o DBD de USP:

RpDBDF (senso): 5' AGATCGAGCTTCCGGCAA 3'

RpDBDR (anti-senso): 5' CCCCATGGATAAACATTTCTGATATCTA 3'

O gene da actina foi utilizado com controle positivo e a reação de PCR para sua amplificação utilizou os seguintes iniciadores:

RpActF (senso): 3` AGTAGCTGCATGGGTTGTAG 5`

RpActR (anti-senso): 3` CAACATACATTGCTGGACTG 5`

### **3.9 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Ao final da eletroforese, as bandas de DNA eram visualizadas em um transiluminador com luz ultravioleta e os géis eram fotografados com câmera digital.

### **3.10 Clonagem**

Para a clonagem de fragmentos de DNA, os produtos de PCR foram purificados em sistema GFX (Amershan Pharmacia Biotech ®) e eluídos com água. Esses produtos foram então submetidos à reação de ligação com o vetor TOPO TA (Invitrogen) por 30 minutos. O produto dessa reação foi adicionado às células eletrocompetentes (TOP 10) e eletroporados a 2,5 V em um eletroporador (Bio Rad). As células foram então incubadas em meio LB líquido a 37°C por 1 hora, sob agitação contínua e depois colocadas em meio LB sólido contendo ampicilina e X-gal, ficando em estufa a 37°C por 16 horas. Após esse tempo, as colônias brancas foram selecionadas e uma amostra de cada foi utilizada como molde para reação de PCR com os iniciadores específicos para o DBD. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2 % e as reações positivas selecionadas para clonagem. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio líquido e incubadas por 16

horas a 37°C. O DNA da cultura foi extraído e enviado para sequenciamento na empresa MacroGen DNA Sequencing Service.

### **3.11 Obtenção de sonda marcada radioativamente**

Amplificamos por PCR um fragmento de DNA de 181 pb correspondente à região DBD-RpUSP. Este fragmento foi marcado radioativamente com 50  $\mu$ Ci de  $\alpha$ dCTP com o auxílio do kit RadPrime DNA Labelling System (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.12 Southern Blotting**

Alíquotas de 10  $\mu$ L de DNA genômico de machos de *R. prolixus* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bcl*1, *Eco*R1, *Pst*1, *Sal*1 e *Bam*H1, em tampão específico fornecido pelo fabricante, por 16 horas sendo em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % e corado com brometo de etídio. Ao final da corrida, o gel foi fotografado e imediatamente tratado com as seguintes soluções: i) solução de depurinação (HCl 0,2 N) por tempo suficiente para que os dois corantes das amostras mudassem de cor; ii) solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 45 minutos; iii) solução de neutralização (Tris-HCl 1 M e NaCl 1,5 M – pH 7,4) por 45 minutos, trocando a solução na metade do tempo. Entre uma solução e outra, o gel foi lavado com água. Após o tratamento, o gel foi colocado em um sistema de transferência por capilaridade, seguindo o protocolo padrão descrito em Sambrook e cols., 2001, e o DNA foi transferido para uma membrana de nylon Hybond HN Plus (Amersham). Para fixar o DNA na membrana, esta foi colocada em estufa a 80°C por 2 horas. A membrana foi então pré-incubada por 2 horas a 42°C em 40 mL de solução de pré-hibridização (gelatina 3% p/v, Tween 20 0,05%, NaCl 0,5 M, Tris-HCl pH

7,5 0,1 M e solução de Denhardt 10X) e em seguida, incubada por 16 horas a 42°C em solução de hibridização (SSC 5X, formamida 50%, dextran sulfato 10%, SDS 1% e solução de Denhardt10X) contendo a sonda descrita anteriormente. Após o tempo de incubação a membrana foi lavada a temperatura ambiente duas vezes com solução contendo SSC 2X e SDS 1%, por 10 minutos cada lavagem, e uma vez a 52°C por 15 minutos em solução contendo SSC 0,5X e SDS 0,1%. A membrana lavada foi colocada em cassete com filme de raioX para expor por 7 dias. O filme foi revelado e a sua imagem foi digitalizada com auxílio de um scanner.

### **3.13 Análise *in silico* das seqüências obtidas**

Para realizar as análises de bioinformática utilizamos como ferramentas os programas:

- Basic local alignment search tool - BLAST (Altschul e cols., 1997)
- ORF Finder (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> - de Tatiana Tatusov e Roman Tatusov)
- ClustalW v.1.74 (Higgins e cols., 1994)
- VecScreen (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)
- ExPASy Translate tool (disponível em: <http://www.expasy.ch/tools/>)

### **3.14 PCR em tempo real**

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Kit (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo a seguir. As reações foram feitas em placa ótica de 96 poços. Em cada poço adicionava-se 12,5 µl de SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix

(2X), 1 µl da amostra de cDNA, 0,16 µl de cada iniciador (15 µM / senso e anti-senso) e água para completar 25 µl de reação. Para cada poço de amplificação experimental (iniciadores de USP) havia um poço de controle endógeno (iniciadores de actina). Nos brancos, o cDNA foi substituído por água. Todas as reações foram realizadas em triplicata. O programa de variação de temperatura utilizado foi: 95 °C por 10 min e 50 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 45 s, seguido por uma curva de dissociação. Os iniciadores utilizados para a amplificação de USP foram:

RpUSPRTF (senso): 5' AGATCGAGCTTCCGGCAA 3'

RpUSPRTR (anti-senso): 5' CCCCATGGATAAACATTTCTGATATCTA 3'

Os iniciadores utilizados para a amplificação da actina, usada como controle endógeno, foram:

RpActRTF (senso): 3'-CCATGTACCCAGGTATTGCT-5'

RpActRTR (anti-senso): 3'-ATCTGTTGGAAGGTG GACAG-5'

Os valores de quantidade relativa foram calculados a partir dos valores de  $C_t$  ("threshold cycle", número de ciclos necessários para produzir uma quantidade de fluorescência definida) obtidos através do PCR em tempo real, segundo Nordgård e cols. (2006).

### **3.15 Análise da expressão de USP em diferentes tecidos**

Dez fêmeas adultas de segunda alimentação foram dissecadas sete dias após a alimentação e os tecidos extraídos (intestino anterior, intestino posterior, ovário, corpo gorduroso, coração e glândula salivar) foram homogeneizados em 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). A extração de RNA, dosagem, tratamento com Dnase e síntese de cDNA foram realizadas como descrito anteriormente. Foi realizada uma reação de PCR para cada amostra para testar a eficácia da síntese de cDNA, seguida de eletroforese em gel de

agarose 2%. As amostras foram então submetidas à reação de PCR em tempo real e o resultado mostrado em expressão relativa.

### **3.16 Análise da expressão de USP no corpo gorduroso e ovários durante a digestão**

Fêmeas adultas segunda alimentação foram alimentadas com sangue de coelho e depois dissecadas em diferentes tempos após a alimentação (1, 4, 7, 10, 14 e 21 dias), tendo seus ovários e corpo gorduroso coletados. Fêmeas em jejum foram usadas como controle. Foram utilizados dez insetos em cada ponto experimental. Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). A extração de RNA, dosagem, tratamento com Dnase e síntese de cDNA foram realizadas conforme descrito anteriormente. Foi realizada uma reação de PCR para cada amostra para testar a eficácia da síntese de cDNA, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. As amostras foram então submetidas à reação de PCR em tempo real e o resultado mostrado em expressão relativa.

### **3.17 Efeito de retinóides e juvenóides na expressão de USP no corpo gorduroso**

Fêmeas em jejum de segunda alimentação foram injetadas com 120 pmoles de 9cis ácido retinóico ou HJ em um volume de 2µl. Cada grupo era constituído por 5 fêmeas. Os insetos foram dissecados em diferentes tempos após a injeção (0, 2 e 5 horas) e o tiveram o corpo gorduroso coletado. A extração de RNA, dosagem, tratamento com DNase e síntese de cDNA foram realizadas como descrito anteriormente. Foi realizada uma reação de PCR para cada amostra para testar a eficácia da síntese de cDNA, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. As amostras foram então submetidas à reação de PCR em tempo real e o resultado mostrado em expressão relativa.

### 3.18 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey para pares ou correlação no programa GraphPad Prism 4.0 para Windows. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão e foram consideradas significativamente diferentes com  $P < 0,001$  ou  $P < 0,05$ , conforme indicado nas legendas das figuras.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PARTE I

Na primeira parte deste trabalho procuramos analisar os efeitos de compostos terpenóides na fisiologia do inseto *Rhodnius prolixus*. Os terpenóides utilizados foram dos tipos retinóides (ácidos retinóicos e retinol) ou juvenóides (hormônio juvenil e metopreno) e a análise se deu através da avaliação de parâmetros morfológicos e da resposta imune.

#### 4.1.1 Retinóides e juvenóides causam alterações morfológicas em ninfas de *Rhodnius prolixus*

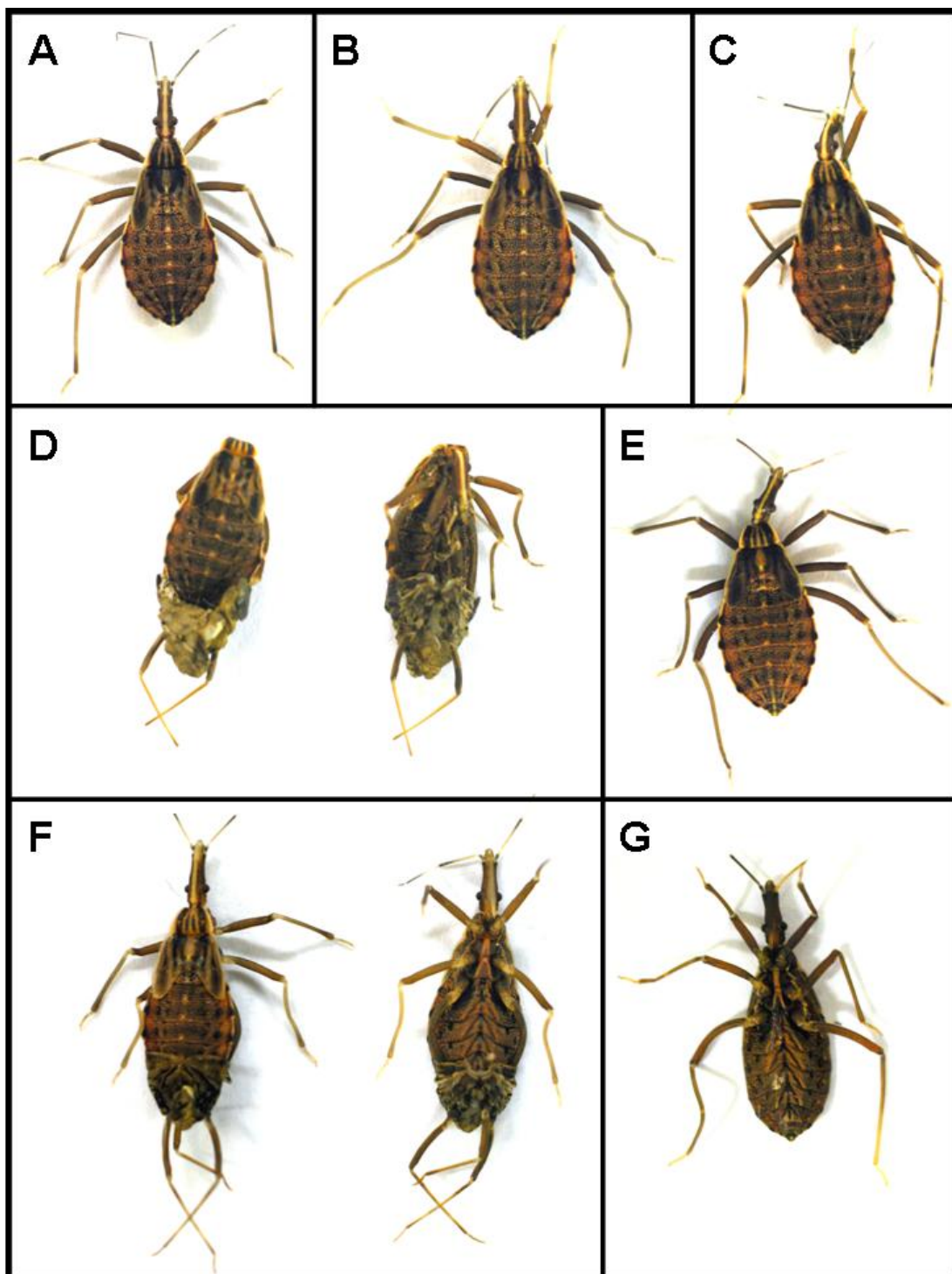
A primeira abordagem deste trabalho foi investigar o efeito da injeção de retinóides e juvenóides no processo de muda de ninfas de *R. prolixus*. Para isso, ninfas de quarto estágio foram injetadas, doze dias após a alimentação, com 120 pmoles de uma das seguintes substâncias: 9cis ácido retinóico (9cisAR), todo trans retinol (ttROH), todo trans ácido retinóico (ttAR), metopreno (Met) ou hormônio juvenil (HJ). Aproximadamente um dia após a injeção, as ninfas começaram o processo de muda, sendo acompanhadas durante os sete dias seguintes. Observamos que o tratamento dos insetos com retinóides ou juvenóides resultou em um dos seguintes eventos: i) ninfas mortas antes de começar o processo de muda; ii) ninfas que completaram a muda com aparência normal; iii) ninfas que completaram a muda com alterações morfológicas; e iv) ninfas que morreram durante a muda. Nesse último grupo, todos os insetos apresentavam alterações morfológicas e morreram sem completar o processo de muda. A **figura 10** mostra algumas das anormalidades morfológicas observadas nos insetos tratados com retinóides ou juvenóides. As principais alterações morfológicas encontradas nos insetos foram as seguintes: a) patas

anormalmente curvadas (**Figuras 10B, 10E e 10G**); b) eixo antero-posterior curvado lateralmente (**Figuras 10C e 10E**); c) cabeça curvada para a parte ventral do abdômem (**Figura 10D**); d) confinamento da ninfa na cutícula antiga (**Figura 10D e 10F**). Dentre essas alterações, a presença de patas curvadas de forma anormal foi a mais freqüente encontrada.

É importante ressaltar que o tratamento com retinóides ou juvenóides não induziu a formação de asas rudimentares, característica de adultóides, nas ninfas com alterações morfológicas, como descrito anteriormente na literatura para compostos anti-HJ (Jurberg et al., 1997) (Figura 6 - Introdução). Por outro lado, a injeção de retinóides ou juvenóides em ninfas de quinto estágio (120 pmoles) indicou que os efeitos gerais na morfologia externa durante a muda foram mais suaves, quando comparados àqueles exibidos por ninfas de quarto estágio que sofreram o mesmo tratamento (dados não mostrados). A observação detalhada das ninfas com alterações morfológicas sugere que a intensidade das mudanças depende do composto administrado.

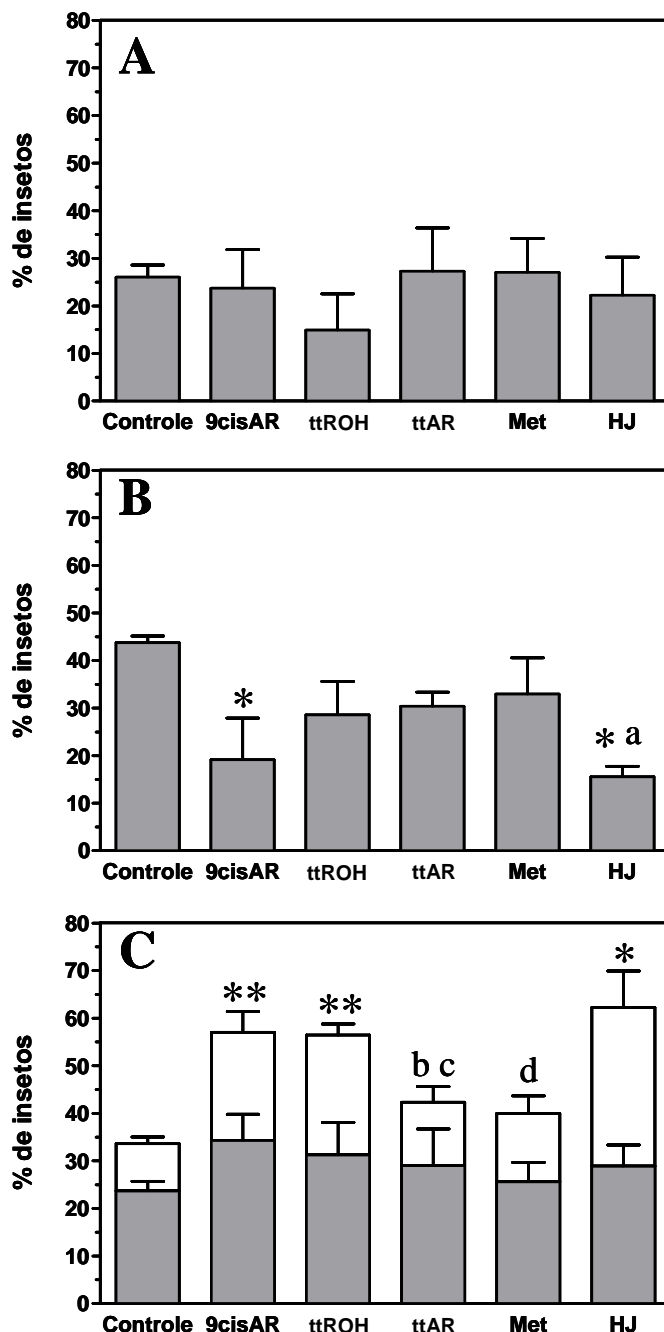
De fato, a quantificação dos efeitos de retinóides e juvenóides na muda e na viabilidade das ninfas de quarto estágio dá suporte a essa hipótese (**Figura 11**). Observamos que o tratamento com retinóides ou juvenóides não resultou em nenhuma diferença significativa na morte antes da muda (**Figura 11A**), indicando que a injeção na hemocele afetou igualmente os insetos, independente do composto injetado, incluindo o controle (etanol). De um modo geral, retinóides e juvenóides parecem reduzir o percentual de insetos que mudam com morfologia normal (**Figura 11B**), observação particularmente evidente para os grupos tratados com 9cisAR ( $19,2 \% \pm 8,7$ ) ou HJ ( $15,6 \% \pm 2,2$ ), em comparação ao controle ( $43,7 \% \pm 1,5$ ). Isso indica que 9cisAR e HJ parecem ser moduladores mais potentes da muda em *R. prolixus* do que os outros compostos testados nesse estudo.

Observamos uma tendência geral de aumento no percentual de insetos com morfologia atípica dentre os insetos tratados com retinóides ou juvenóides (**Figura 11C**, barras cinza). No entanto, a maior parte das mudanças foram concentradas nos insetos que morreram durante a muda (**Figura 11C**, barras brancas) possivelmente devido a alterações morfológicas profundas, sendo mais pronunciadas nos grupos tratados com 9cisAR ( $22,7 \% \pm 4,3$ ), com HJ ( $33,3 \% \pm 7,7$ ) e também com ttROH ( $25,2 \% \pm 2,3$ ), quando comparados ao controle ( $9,93 \% \pm 1,5$ ). Dessa forma, podemos observar que a muda normal está negativamente correlacionada não apenas com a indução de morfologias atípicas causadas pelos retinóides e juvenóides (**Figura 12A**, Pearson  $r = -0,5674$ ,  $P = 0,0020$ ) mas também com a morte durante a muda (**Figura 12B**, Pearson  $r = -0,6251$ ,  $P = 0,0005$ ).



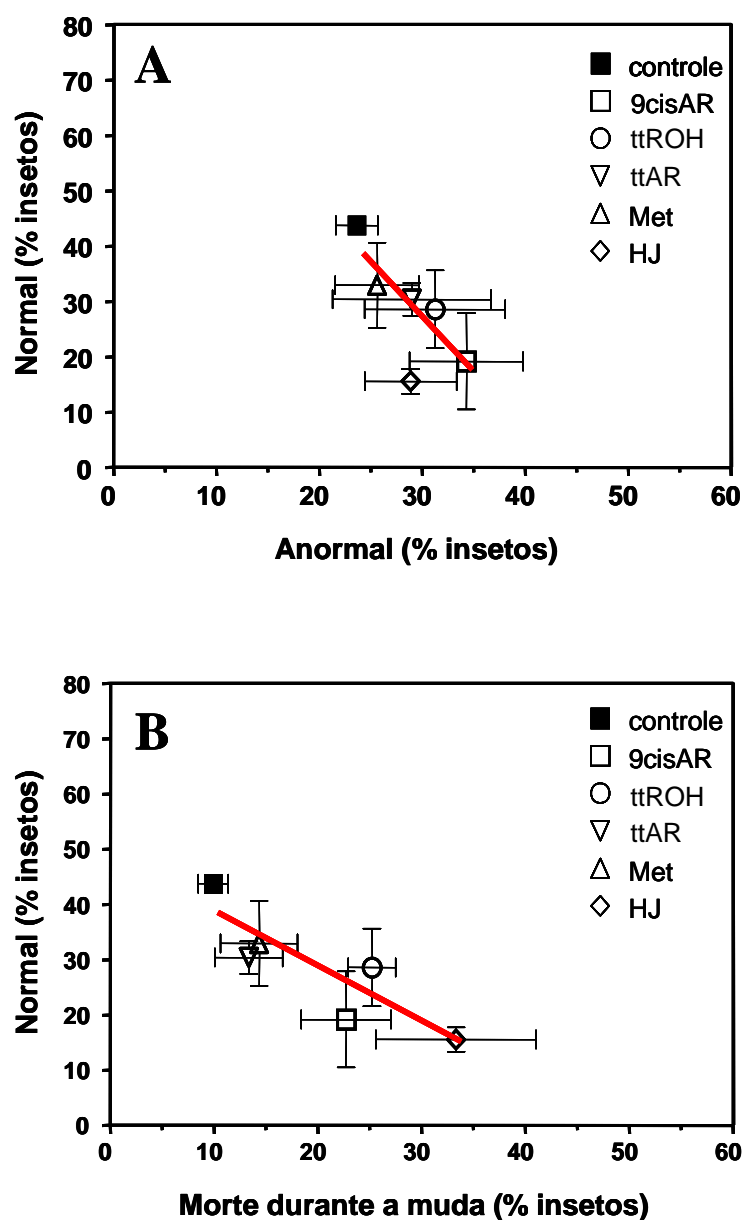
**Figura 10 – Alterações morfológicas induzidas por retinóides e juvenóides em ninfas de *R. prolixus***

Ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* foram alimentadas com sangue de coelho e 12 dias mais tarde foram injetadas com 120 pmoles de 9cis ácido retinóico (9cisAR), todo trans retinol (ttROH), todo trans ácido retinóico (ttAR), metopreno (Met) ou hormônio juvenil (HJ). Os insetos foram observados pelos sete dias subsequentes. As figuras mostram algumas das alterações morfológicas mais frequentes induzidas por esses compostos. A: controle; B – G: insetos com alterações morfológicas.



**Figura 11 – Retinóides e juvenóides reduzem a morfologia normal e aumentam as anormalidades morfológicas durante a muda de ninfas de *R. prolixus***

Quantificação das anormalidades induzidas por retinóides e juvenóides encontradas durante a muda de ninfas de quarto estágio. A – percentual de insetos mortos antes de iniciar o processo de muda. B – percentual de insetos que completaram a muda com aparência normal. C – percentual de insetos que apresentaram algum tipo de alteração morfológica externa. Barras cinza representam insetos que completaram o processo de muda vivos e barras brancas representam insetos que morreram durante a muda. \* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,05$  (em relação ao controle), a  $P < 0,05$  (relativo ao Met), b  $P < 0,05$  (relativo ao ttROH); c  $P < 0,001$  (relativo ao HJ); d  $P < 0,001$  (relativo ao HJ).



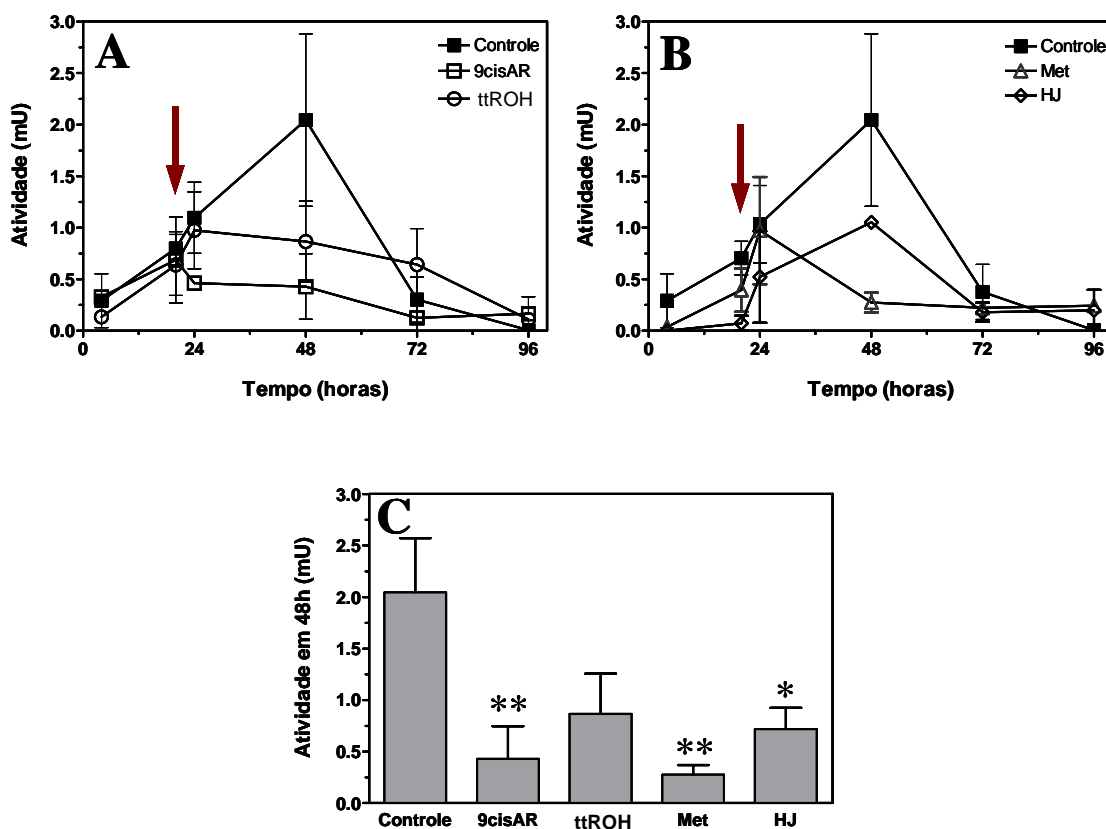
**Figura 12 – Correlação entre muda normal e muda anormal ou morte durante a muda.**

O eixo y dos painéis A e B correspondem às barras cinza e brancas da figura 11C, respectivamente. A – correlação entre muda normal e muda anormal (Pearson  $r = -0.5674$ ,  $P=0.0020$ ). B – correlação entre muda normal e morte durante a muda (Pearson  $r = -0.6251$ ,  $P=0.0005$ ).

#### 4.1.2 Retinóides e juvenóides reduzem a atividade fenoloxidase da hemolinfa de *R. prolixus*

Após as investigações sobre o processo de muda, continuamos explorando os efeitos do tratamento com retinóides e juvenóides avaliando um dos principais componentes da imunidade humoral em insetos: a atividade fenoloxidase hemolinfática (RICHMAN & KAFATOS, 1996). Adultos machos de *R. prolixus* foram injetados três dias após a alimentação com 120 pmoles de retinóides (9cisAR e ttROH) ou juvenóides (Met e HJ) e 24 horas após foram desafiados com injeção de bactéria (*E. coli* DH5 $\alpha$ ). A **figura 13** mostra o padrão de atividade fenoloxidase na hemolinfa até 96 horas após a injeção dos compostos. Com exceção de HJ, nos insetos tratados com todos os outros compostos, inclusive o controle, a atividade fenoloxidase aumentou por volta de três vezes nas primeiras 20 horas após a injeção. Surpreendentemente, quando os insetos foram desafiados pela injeção de bactéria, observamos que os compostos administrados suprimiram a indução da atividade fenoloxidase (**Figuras 13A e 13B**). Isso é claramente observado 48 horas após o tratamento com retinóides ou juvenóides (**Figura 13C**). O grupo de insetos tratados com 9cisAR (0.43 mU  $\pm$  0.32; P<0.01) e Met (0.27 mU  $\pm$  0.09; P<0.01) foram os mais significativamente distintos do controle (2.04 mU  $\pm$  0.53) (**Figura 13C**). Além disso, a exposição ao HJ também reduziu significativamente a atividade enzimática (0.718 mU  $\pm$  0.21; P<0.05) quando comparado ao controle (**Figura 13C**). Embora não significativo, a exposição de *R. prolixus* a atROH também reduziu a atividade fenoloxidase induzida por bactéria (**Figura 13C**).

De uma forma geral, os resultados mostrados aqui indicam que as duas classes de compostos foram capazes de interferir tanto na morfogênese em ninfas como na resposta imune humoral de adultos de forma parecida.



**Figura 13 – Retinóides e juvenóides inibem a atividade fenoloxidase hemolinfática em *R. prolixus* adulto**

Machos adultos de *R. prolixus* foram injetados com 120 pmoles de 9cis ácido retinóico (9cisAR), todo trans retinol (ttROH), metopreno (Met) ou hormônio juvenil (HJ) três dias após a alimentação. Os insetos foram desafiados com injeção de bactéria 20 horas após a injeção dos compostos. A hemolinfa foi coletada em diferentes tempos após a primeira injeção (4, 20, 24, 48, 72 e 96 horas) e a atividade fenoloxidase determinada espectrofotometricamente a 470 nm usando L-DOPA como substrato. A – insetos tratados com retinóides. B – insetos tratados com juvenóides. C – atividade fenoloxidase em 48 horas. \* $P < 0,01$  e \*\* $P < 0,05$  (em relação ao controle). Setas indicam momento do desafio com bactéria.



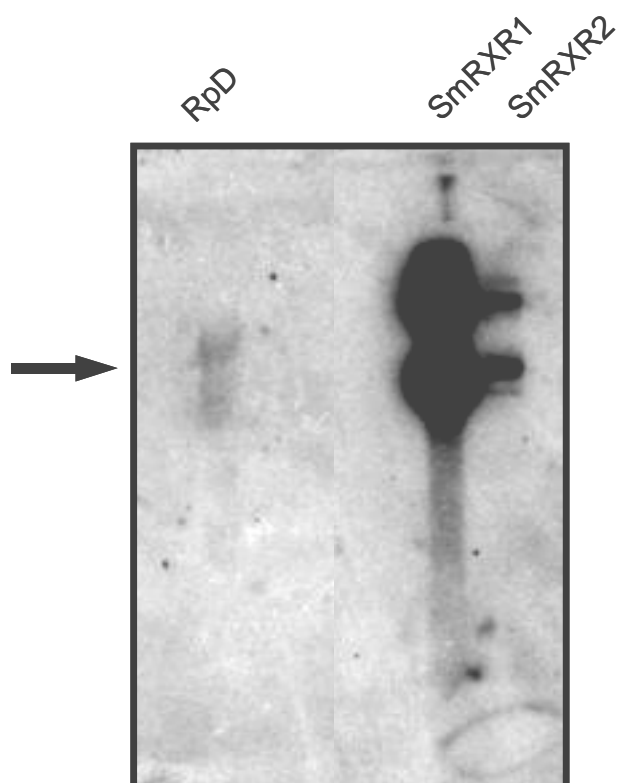
## 4.2 PARTE II

Na segunda parte deste trabalho procuramos identificar a presença do receptor nuclear *ultraspiracle* (USP) em *Rhodnius prolixus* bem como obter sua sequência.

### 4.2.1 Identificação de um gene com homologia ao USP/RXR em *R. prolixus*

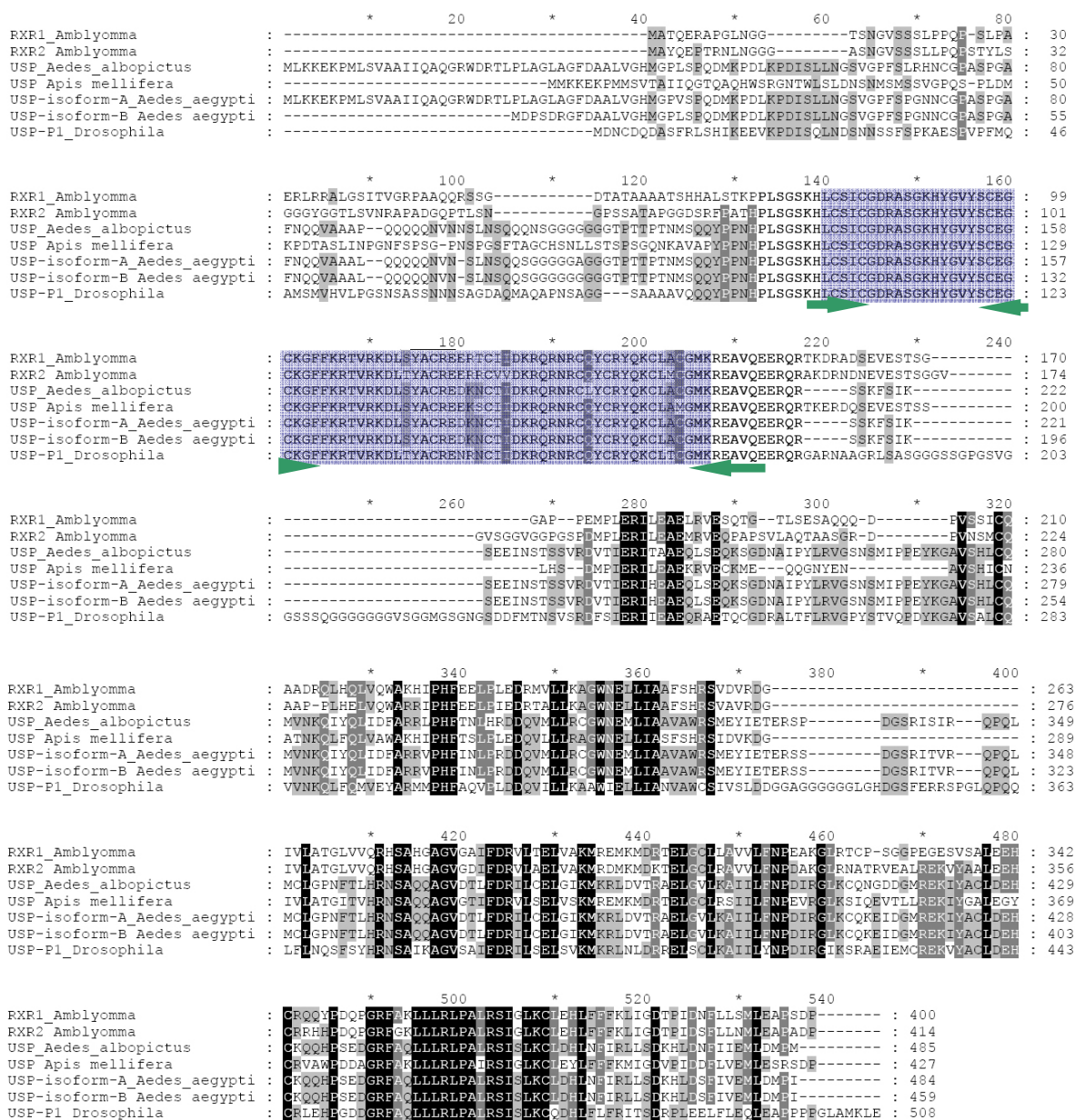
Nosso primeiro passo na investigação de um possível homólogo de USP/RXR foi submeter uma amostra de DNA genômico de *R. prolixus* à técnica de Southern Blotting. Para hibridizar ao DNA utilizamos como sonda uma sequência específica para a região do DBD do RXR1 de *Schistosoma mansoni* marcada radioativamente. Os genes RXR1 e RXR2 de *S. mansoni* foram utilizados como controles positivos da reação. Após hibridização e lavagem da membrana, esta foi exposta a filme de raio X que foi revelado depois de 24 horas. Podemos observar no autoradiograma da membrana após hibridização (**Figura 14**) que duas regiões do genoma de *R. prolixus* foram capazes de hibridizar com a sonda, demonstrando assim que possivelmente o inseto em estudo apresenta genes homólogos ao RXR.

Após a primeira evidência de que o *R. prolixus* apresentava um gene homólogo ao USP/RXR, buscamos no banco de dados sequências já conhecidas desse gene em organismos filogeneticamente próximos. Realizamos então um alinhamento das sequências de aminoácidos dos genes que codificam o USP em outros artrópodos, o que serviu de base para desenhar iniciadores degenerados (**Figura 15**). Classicamente, como a região mais conservada desse gene é a do DBD, ela foi utilizada para o desenho dos iniciadores.



**Figura 14 – Hibridização de DNA genômico de *R. prolixus* com  $^{32}\text{P}$ -DBD-RXR1 de *Schistosoma mansoni***

DNA genômico de *R. prolixus* (5  $\mu\text{g}$ ) foi submetido à técnica de Southern Blotting com sonda sintetizada a partir do DBD de RXR1 de *S. mansoni* marcado com  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup>. RpD – DNA genômico de *R. prolixus*, SmRXR1 – RXR1 de *S. mansoni*, SmRXR2 – RXR2 de *S. mansoni*. Seta indica marcação positiva no DNA de *R. prolixus*.



**Figura 15 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de diversos RXR/USP para desenho de iniciadores**

Seqüências parciais de RXR ou USP dos artrópodos *Amblyomma americanum*, *Aedes albopictus*, *Apis mellifera*, *Aedes aegypti* e *Drosophila melanogaster* foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. Setas verdes – posição dos iniciadores degenerados desenhados:

**RpUSP1F** (senso): 5' AAGCAYCTSTGYTCTIATYTGCGG 3';

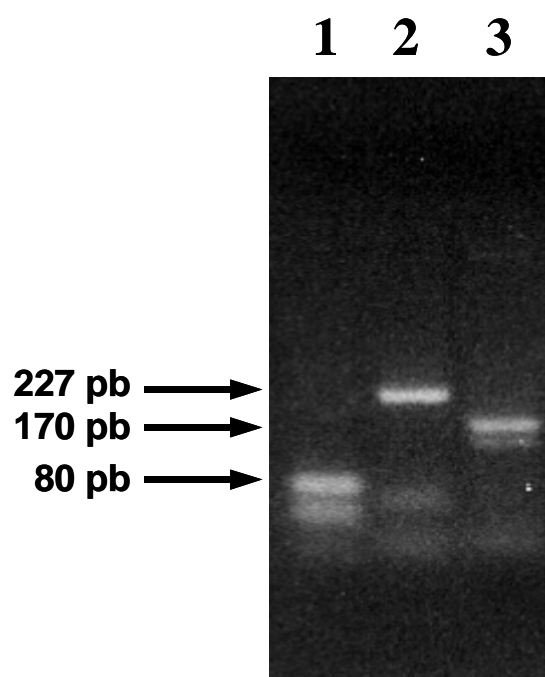
**RpUSP2F** (senso): 5' AGCTGYGARGGWGCAARGGTT 3';

**RpUSP2R** (anti-senso): 5' AAKCCYTTGCAWCCYTCRCAGCT 3';

**RpUSP3R** (anti-senso): 5' TCYTGACSGCYTCBCGCTTCAT 3'.

Os iniciadores degenerados foram utilizados em três combinações diferentes, de modo a gerar fragmentos com tamanhos estimados em 80, 170 e 227 pares de base, respectivamente. Para a reação de PCR foi utilizado como molde cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de corpo gorduroso de fêmeas de *R. prolixus* três dias após a alimentação. Após a reação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e fotografado em um transiluminador UV. Podemos observar na **figura 16** que as três combinações de iniciadores geraram fragmentos de DNA com os tamanhos esperados.

O fragmento de maior tamanho (227 pb) foi escolhido para ser clonado. Após nova amplificação e purificação do fragmento de DNA, o mesmo foi clonado em sistema TOPO TA (Invitrogen) utilizando células eletrocompetentes TOP10 e, em seguida, enviado para sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul). O resultado do sequenciamento gerou uma seqüência de 181 pb localizada dentro da região do DBD. A análise posterior da seqüência de nucleotídeos confrontada com o banco de dados disponível no sítio do National Institutes of Health (USA) através das ferramentas BLASTn, mostra que o gene clonado de *R. prolixus* trata-se de fato do *ultraspiracle*. Podemos dizer isso, uma vez que a homologia das seqüências de USP/RXR de outros insetos utilizados na comparação foi alta, uma vez que os valores de E-value (ou expected) foram muito baixos, significando que a probabilidade da sequencia em questão ser homóloga a seqüência de *R. prolixus* ao acaso é muito baixa (**Figura 17**). Com mais essa evidência da presença do *ultraspiracle* em *R. prolixus*, passamos a chamar este gene de RpUSP e desenhamos posteriormente iniciadores específicos, localizados dentro da região do DBD, que amplificam fragmentos de 181 pb.



**Figura 16 – Produtos de amplificação da região do DBD do RpUSP utilizando iniciadores degenerados**

Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e fotografado em transiluminador UV dos produtos de amplificação da reação de PCR utilizando iniciadores degenerados desenhados para a região do DBD do RXR/USP e cDNA de corpo gorduroso como molde. As três bandas apresentam os tamanhos esperados para os produtos do PCR. Combinação de iniciadores: 1 – RpUSP1F e RpUSP2R; 2 – RpUSP1F e RpUSP3R; 3 - RpUSP2F e RpUSP3R.

**Sequencia de 181 pb:**

CCATGGATAAACATTTCTGATATCTACAATACTGGCATCTGTTTCTTTGTCTTTTGTCCACTAA  
 ACACTGTTTGTCTCTCGACAAGCATAAGACAGATCTTTGCGGACGGTTCTTTTGAAAAAGC  
 CTTTGCAACCTTCGCAACTGTACTCCATAATGTTTGCCGGAAGCTCGATCTCC

**BLASTn**

>[gi|19919403|gb|AF438229.1](#) *Dirofilaria immitis* nuclear receptor RXR (RXR) mRNA, complete cds  
 Length = 1527 Score = 73.8 bits (37), Expect = 1e-10 Identities = 76/89 (85%) Strand = Plus / Minus

>[gi|18859340|ref|NM\\_131217.1](#) *Danio rerio* retinoid x receptor, alpha (rxra), mRNA  
 Length = 1644 Score = 69.9 bits (35), Expect = 2e-09 Identities = 92/111 (82%) Strand = Plus / Minus

>[gi|1046294|gb|U29940.1|DRU29940](#) *Danio rerio* retinoid X receptor alpha (RXR-alpha) mRNA  
 Length = 1644 Score = 69.9 bits (35), Expect = 2e-09 Identities = 92/111 (82%) Strand = Plus / Minus

>[gi|1304737|gb|U44837.1|MSU44837](#) *Manduca sexta* MsUSP-1 protein (usp) mRNA, complete cds  
 Length = 2028 Score = 69.9 bits (35), Expect = 2e-09 Identities = 53/59 (89%) Strand = Plus / Minus

>[gi|214934|gb|L11443.1|XELXRXRG](#) *Xenopus laevis* mRNA sequence  
 Length = 2390 Score = 69.9 bits (35), Expect = 2e-09 Identities = 47/51 (92%) Strand = Plus / Minus

>[gi|21464743|gb|AF411257.1](#) *Trichoplusia ni* ultraspiracle protein (USP) mRNA, partial cds  
 Length = 737 Score = 63.9 bits (32), Expect = 1e-07 Identities = 44/48 (91%) Strand = Plus / Minus

>[gi|21464739|gb|AF411255.1](#) *Spodoptera frugiperda* ultraspiracle protein (USP) mRNA, partial cds  
 Length = 1091 Score = 61.9 bits (31), Expect = 4e-07 Identities = 43/47 (91%) Strand = Plus / Minus

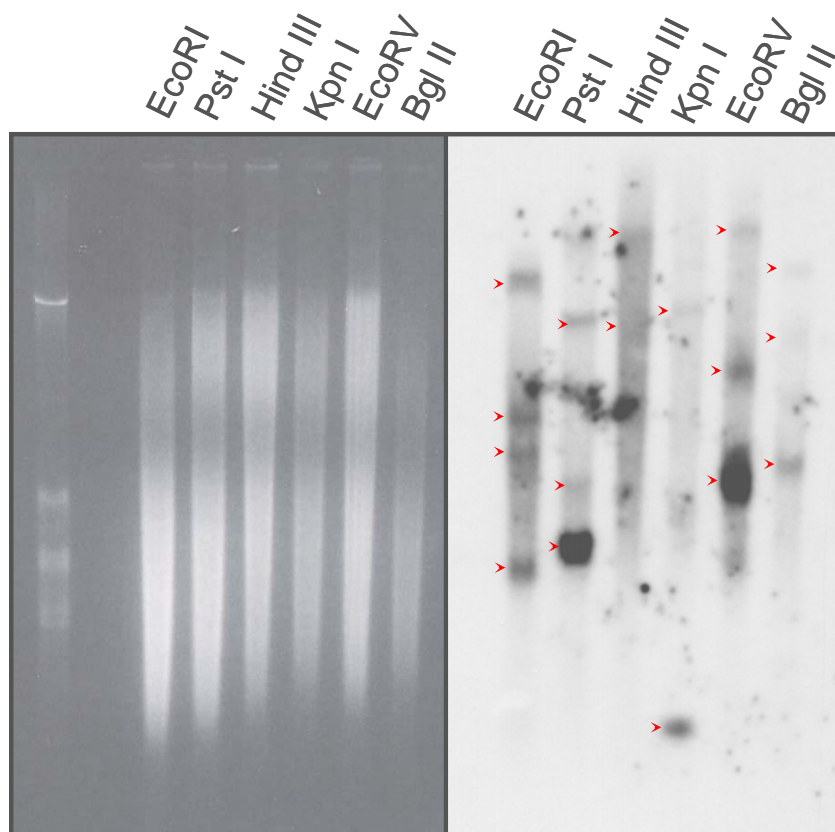
>[gi|34849538|gb|BC058401.1](#) *Mus musculus* retinoid X receptor gamma, mRNA  
 (cDNA clone MGC:67123 IMAGE:5707723), complete cds  
 Length = 2133 Score = 56.0 bits (28), Expect = 3e-05 Identities = 49/56 (87%) Strand = Plus / Minus

**Figura 17 – A seqüência de 181 pb amplificada a partir do cDNA de *R. prolixus* mostra alta homologia com genes USP/RXR de outras espécies**

A seqüência de nucleotídeos (181 pb) obtida através do sequenciamento do produto de clonagem de 227 pb foi submetida a uma busca no banco de dados por seqüências similares (BLASTn). No quadro inferior está disposto o resultado da busca.

#### 4.2.2 Estimativa do número de cópias de RpUSP presentes no genoma

Com o objetivo de estimar o número de cópias do gene RpUSP presentes no genoma de *R. prolixus*, utilizamos novamente a técnica de Southern Blotting. Para isso, amostras do DNA genômico obtidas a partir de uma mistura de órgãos internos do inseto adulto macho foram digeridas com as enzimas de restrição EcoRI, PstI, HindIII, KpnI, EcoRV e BglII e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Ao final, o conteúdo do gel foi transferido para uma membrana de nylon e esta foi incubada com sonda específica para a região LBD-RpUSP marcada radioativamente. Após lavagem da membrana e exposição por 48 horas a filme de raio X, podemos observar no autoradiograma (**Figura 18**) que existem pelo menos três marcações na maioria dos canais, indicando que provavelmente existe mais de uma cópia desse gene em *R. prolixus*, assim como ocorre outros organismos.



**Figura 18 – Southern Blotting do DNA genômico de *R. prolixus* digerido**

DNA genômico de *R. prolixus* foi digerido com diferentes enzimas de restrição e submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8 % e transferidos para membrana de nylon. Para hibridização foi utilizada sonda específica para DBD de RpUSP (fragmento de 181 pb) marcada radioativamente. Cabeças de setas indicam as marcações positivas.

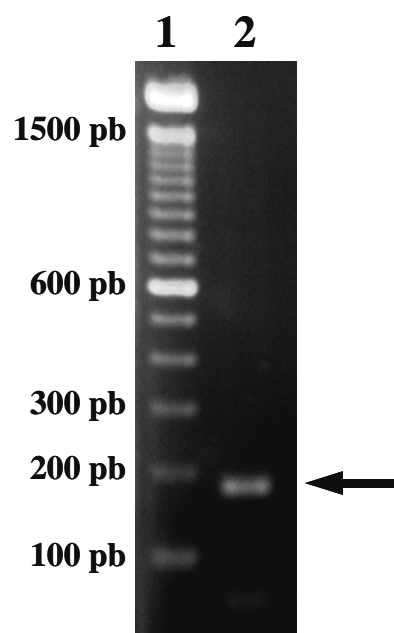


### 4.2.3 Busca pelo cDNA completo do gene RpUSP

Começamos, então, a busca pela cópia inteira do gene RpUSP, e o primeiro passo foi investigar a presença do gene em uma biblioteca de cDNA de intestino médio anterior de *R. prolixus*, construída com o vetor TripleX (Novagen) em fagos circularizados. Para isso, fizemos uma reação de PCR utilizando uma alíquota da biblioteca diluída em água (10x) como molde e os iniciadores específicos para o DBD de RpUSP. Após a reação de PCR, observamos que a biblioteca de cDNA apresentava seqüências que amplificavam com os iniciadores específicos (**Figura 19**).

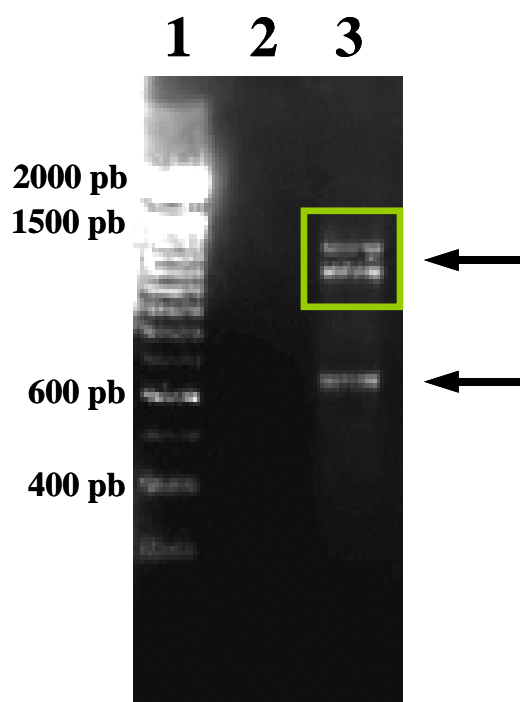
Uma vez que identificamos a presença de cópias do RpUSP na biblioteca de intestino médio anterior de *R. prolixus*, passamos a trabalhar na busca dessas cópias e o passo seguinte foi realizar reações de PCR utilizando a biblioteca como molde e os iniciadores específicos do DBD em combinação com os iniciadores das regiões que flanqueiam o ponto de inserção no vetor (sítio de clonagem). As combinações de iniciadores utilizadas foram RpDBDF (senso) com T7 (anti-senso) ou RpDBDR (anti-senso) com TESP (senso). Após a reação de PCR, observamos que apenas a combinação RpDBDF / T7 resultou em produtos de amplificação, sendo três majoritários de aproximadamente 1300 pb, 1100 pb e 700 pb (**Figura 20**). Os produtos foram purificados para clonagem, sendo que as bandas de 1300 pb e 1100 pb foram tratadas como um único produto, pois por apresentarem tamanhos próximos, poderia haver contaminação entre elas. Os dois produtos (1300/1100 pb e 700 pb) foram clonados em sistema pGEM-T Vector System (Promega) utilizando células eletrocompetentes *E. coli* DH10 $\beta$  e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul). Com o resultado do sequenciamento obtivemos uma seqüência de 879 pb que se mostrou altamente similar às seqüências de USP/RXR de outros insetos utilizados na

comparação, uma vez que os valores de E-value (ou *expected*) foram muito baixos, principalmente em relação a *Locusta migratoria* e *Blattella germanica* (**Figura 21**). Essa seqüência de 879 pb inclui parte do DBD, o domínio hinge inteiro e parte do LBD do RpUSP.



**Figura 19 – Produto da reação de PCR de biblioteca de cDNA de intestino médio anterior com iniciadores específicos para o DBD-RpUSP**

A reação de PCR foi feita utilizando como molde a biblioteca de cDNA diluída em água e os iniciadores específicos para o DBD-RpUSP. 1 – marcador de peso molecular. 2 – produto da reação de PCR.



**Figura 20 – Produtos de PCR de biblioteca de cDNA de intestino médio anterior**

Uma alíquota da biblioteca de cDNA de intestino médio anterior de *R. prolixus* foi diluída 10 vezes e utilizada como molde para reação de PCR com iniciadores específicos para o DBD-RpUSP em combinação com iniciadores das regiões de flanco do sítio de clonagem do vetor da biblioteca (TriplEx). 1 – marcadores de massa molecular (100 pb *ladder*). 2 - RpDBDR (anti-senso) com TESP (senso). 3 - RpDBDF (senso) com T7 (anti-senso). Setas indicam os produtos obtidos.

**Sequencia de 879 pb:**

AGATCGAGCTTCCGGCAAACATTATGGAGTGTACAGTTGCGAAGGTTGCAAAGGCTTTTTCAAAGAACCGTCCGCAAAGATCT  
 GTCTTATGCTTGTGCGAGAGGACAAACAGTGTAGTGGACAAAAGACAAAGAACAGATGCCAGTATTGTAGATATCAGAAATGT  
 TTATCCATGGGGATGAAGAGGGAAGCTGTACAGGAAGAACGGCAGCGAACGAAAGAACGAGACCAGAACGAAGTGGAGAGTA  
 CCAGTAGTTTCCACACGGACATGCCCCGTCGAGAGGATACTCGAAGCAGAACAGAGGGTGGACTGCAAGTTGGAAATGAAAGAG  
 GAGTTCAACTTGGGCCAATGAGCGACATCATCTGTCAAGCGACGTACAACCAACTTTGGCAGCTGATAGATTGGGCTAAACAT  
 ATACCGCACTTACATCGCTACCTATCGAAGATCAAGTAACCTTGCTCAGTGCAGGTTGGAATGAGCTGCTTATTGCTGGATTTT  
 CGCATCGATCGATACTGGCTAAAGAAGGACTGGTGTAGTCCCGGAGTGATTATCAACGGGAACAACGCTCATCAGATTGGAG  
 TCGGTCCAATATACGATAGAGTGCTAACAGAATTAGTCTCCAAGATGAGAGAAATGAAGATGGACAAGACAGAAGTTGGATGTCT  
 TAGAACGATCATTCTTTTAAATCCAGAGGTACGTCTCAAGTCTGTCCAAGAAGTGGAACTGCTAAGAGAAAAGTTACGCTT  
 CTCTAGAAGAATATACACGCATCAGCCATCCGAACGAGCCAGGAAGGTTTGCAAAACCTTTGCTAAGGCTGCCATCCTTAAGGT  
 CTATAGGACTTAAATGTTTAGAACACCTGTTCTTCTG

**BLASTp**

	(Bits)	Value
gb AAQ55293.1  nuclear receptor RXR-I [Locusta migratoria]	451	3e-125
emb CAH69897.1  retinoid X receptor [Blattella germanica]	442	1e-122
emb CAH69898.1  retinoid X receptor [Blattella germanica]	440	4e-122
gb AAF00981.1  AF136372_1 RXR [Locusta migratoria]	432	2e-119
ref NP_001011634.1  ultraspiracle protein [Apis mellifera]	419	8e-116
gb AAW02952.1  ultraspiracle [Melipona scutellaris]	419	1e-115
gb ABB00308.1  ultraspiracle protein [Scaptotrigona depilis]	418	2e-115
emb CAL25729.1  ultraspiracle nuclear receptor [Tribolium castan]	410	4e-113
ref XP_972475.1  PREDICTED: similar to retinoid x receptor, a...	410	4e-113
gb AAO18153.1  USP-RXR [Leptopilina heterotoma]	410	5e-113
gb AAW34268.1  retinoid X receptor [Lymnaea stagnalis]	405	2e-111
gb AAL86461.1  RXR-like protein [Biomphalaria glabrata]	404	4e-111
emb CAB75361.1  USP protein [Tenebrio molitor]	402	1e-110
gb ABF74729.1  retinoid X receptor-like protein [Daphnia magn...	400	5e-110
dbj BAD99298.1  ultraspiracle [Leptinotarsa decemlineata]	400	5e-110
gb AAO18155.1  USP-RXR [unidentified wasp FB-2002]	399	1e-109

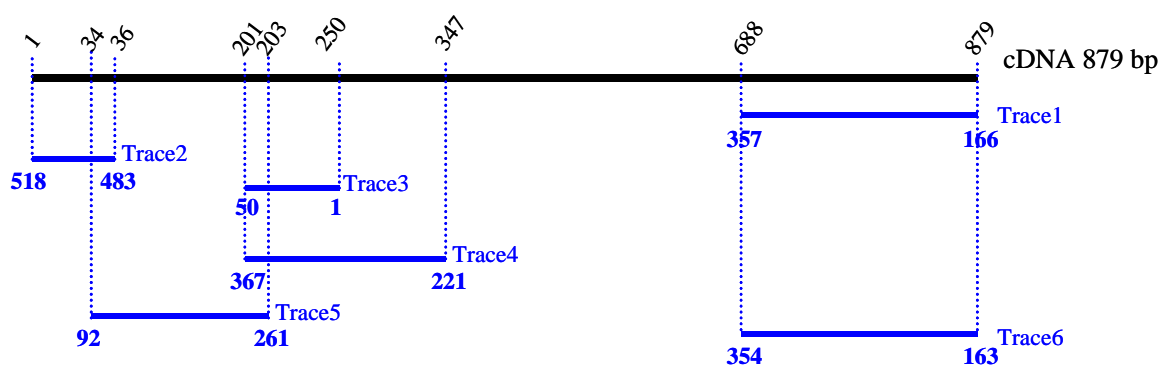
**Figura 21 – A sequência de 879 pb mostra alta homologia com genes USP/RXR de outras espécies de insetos**

A sequência de nucleotídeos (879 pb) obtida através do sequenciamento dos produtos de clonagem foi submetida a uma busca no banco de dados por seqüências protéicas similares (BLASTp). No quadro inferior está disposto o resultado da busca.

De posse agora de uma seqüência de 879 pb, continuamos a busca pela cópia inteira do gene RpUSP, e a estratégia utilizada foi a varredura de bibliotecas de cDNA. As bibliotecas de cDNA utilizadas foram de epitélio folicular e de intestino médio anterior de *R. prolixus*. Desenhamos iniciadores específicos para amplificar uma seqüência de aproximadamente 700 pb que inclui parte do DBD, o domínio hinge inteiro e parte do LBD. Esses iniciadores foram empregados para sintetizar a sonda que seria utilizada para a varredura das bibliotecas. Após algumas tentativas de hibridização da sonda marcada radioativamente com as bibliotecas, não obtivemos sucesso na marcação, levando a descartar a possibilidade de isolamento do gene por esta técnica.

Uma nova possibilidade de obtenção da sequência inteira do gene RpUSP surgiu com a liberação dos primeiros *drafts* do genoma do *R. prolixus*. Utilizando a seqüência de nucleotídeos previamente clonada de 879 pb, fizemos uma busca entre os *traces* liberados pelo consórcio de sequenciamento do genoma e encontramos seis *traces* com homologia à seqüência de RpUSP (**Figura 22**). Dentre eles, três foram particularmente importantes, pois alinhavam com as regiões terminais já conhecidas, possibilitando o alongamento da seqüência nas duas direções.

Em direção a extremidade carboxi terminal, utilizamos as seqüências dos *traces* 1 (NAAX-abj25e05.g1) e 6 (NAAX-abi22e05.g1) em consenso, levando a um aumento de 81 pb que correspondem aos 26 aminoácidos finais e o stop códon. Esta porção inclui a parte final do LBD e o domínio F. Já em direção a porção amino terminal, utilizamos o *trace* 2 (NAAX-adv26g01.b1) e obtivemos um aumento de 51 pb, ou de 17 aminoácidos, abrangendo o início do DBD e parte do domínio A/B. Após estes acréscimos, obtivemos uma seqüência final com 336 aminoácidos (**Figura 23**).



**Figura 22 – Traces do sequenciamento do genoma de *R. prolixus* com homologia ao RpUSP**

A seqüência de 879 pb previamente clonada foi submetida a uma busca por seqüências homólogas dentro dos traces resultantes do primeiro draft do sequenciamento do genoma de *R. prolixus*. Os 6 traces resultantes da busca são representados por traços azuis e a numeração representa a posição do nucleotídeo.

Seqüência de aminoácidos RpUSP

yppnhplsgskhlcsicgdrasgkhygvyscegckgffkrtvrkdlsyacredkqclv  
 dkrqnrncqycryqkclsmgmkreavqeerqrkerdqnevestssfhtdmpverile  
 aeqrvdcklemkeefnlgpmsdiicqatynqlwqlidwakhphftslpiedqvtlls  
 agwnelliagfshrsilakeglvlpggviingnnaHQIGVGPiYdrVltelVskmrem  
 kmdktelgclrtiilfnpevrllksvqevellrekvyasleeytrishpnepgrfakl  
 llrlpslrSIGLkclehlffcrvvgeapvdtflaqllespevsnriSTOP  
llrlpslrSIGLkclehlffcrvvgeapvdtflaqllespevsnriSTOP

**Figura 23 – Seqüência de 336 aminoácidos**

Seqüência obtida após análise do primeiro draft do genoma de *R. prolixus*. Em azul – DBD. Em vermelho – LBD. Barras verdes – porções obtidas através do sequenciamento do genoma.



A nova seqüência do RpUSP, agora com 336 aminoácidos, foi submetida a uma busca no banco de dados por seqüências homólogas (BLASTp) e podemos observar que ela apresenta alta similaridade com as seqüências de USP/RXR de outros insetos, como *Locusta migratoria*, *Blattella germanica* e *Apis mellifera*, entre outros (**Figura 24**). Ao analisarmos os domínios DBD, hinge e LBD independentemente, comparando com os domínios correspondentes em USP/RXR de outros insetos, observamos que, conforme esperado, o DBD apresenta as maiores similaridades e identidades, seguido pelo LBD e depois pelo domínio hinge (Tabela 1).

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
<a href="#">gb AAQ55293.1 </a>	nuclear receptor RXR-1 [Locusta migratoria]	<a href="#">550</a>	6e-155
<a href="#">emb CAH69897.1 </a>	retinoid X receptor [Blattella germanica]	<a href="#">538</a>	2e-151
<a href="#">emb CAH69898.1 </a>	retinoid X receptor [Blattella germanica]	<a href="#">535</a>	3e-150
<a href="#">ref NP_001011634.1 </a>	ultraspiracle protein [Apis mellifera] >g...	<a href="#">533</a>	7e-150
<a href="#">gb AAW02952.1 </a>	ultraspiracle [Melipona scutellaris]	<a href="#">533</a>	8e-150
<a href="#">gb ABB00308.1 </a>	ultraspiracle protein [Scaptotrigona depilis]	<a href="#">532</a>	1e-149
<a href="#">gb AAF00981.1 AF136372_1</a>	RXR [Locusta migratoria]	<a href="#">529</a>	1e-148
<a href="#">ref NP_001107766.1 </a>	ultraspiracle nuclear receptor [Tribolium...]	<a href="#">526</a>	6e-148
<a href="#">emb CAB75361.1 </a>	USP protein [Tenebrio molitor]	<a href="#">521</a>	3e-146
<a href="#">dbj BAD99298.1 </a>	ultraspiracle [Leptinotarsa decemlineata]	<a href="#">511</a>	2e-143
<a href="#">gb ABF74729.1 </a>	retinoid X receptor-like protein [Daphnia magn...]	<a href="#">510</a>	6e-143
<a href="#">dbj BAF85823.1 </a>	ultraspiracle [Liocheles australasiae]	<a href="#">500</a>	6e-140
<a href="#">gb AAW34268.1 </a>	retinoid X receptor [Lymnaea stagnalis]	<a href="#">493</a>	1e-137
<a href="#">gb AAL86461.1 </a>	RXR-like protein [Biomphalaria glabrata]	<a href="#">492</a>	2e-137
<a href="#">dbj BAF91724.1 </a>	retinoid X receptor [Ornithodoros moubata]	<a href="#">490</a>	5e-137
<a href="#">gb AAU12572.1 </a>	retinoid X receptor [Thais clavigera]	<a href="#">484</a>	4e-135
<a href="#">gb AAH63827.1 </a>	RXRA protein [Homo sapiens]	<a href="#">481</a>	2e-134
<a href="#">gb AAC95154.1 </a>	retinoic acid receptor RXR [Cloning vector pERV3]	<a href="#">481</a>	2e-134
<a href="#">gb ABB96254.1 </a>	retinoid X receptor, alpha [Homo sapiens]	<a href="#">481</a>	3e-134
<a href="#">gb AAG02188.1 </a>	retinoid-X-receptor [Cloning vector pFB-ERV]	<a href="#">481</a>	3e-134
<a href="#">ref NP_002948.1 </a>	retinoid X receptor, alpha [Homo sapiens] >s...	<a href="#">481</a>	4e-134
<a href="#">ref XP_001506054.1 </a>	PREDICTED: similar to RNase H, putative [...]	<a href="#">480</a>	6e-134
<a href="#">ref XP_001372307.1 </a>	PREDICTED: similar to retinoid X receptor...	<a href="#">480</a>	7e-134
<a href="#">dbj BAE26004.1 </a>	unnamed protein product [Mus musculus]	<a href="#">480</a>	8e-134
<a href="#">gb EDL08372.1 </a>	retinoid X receptor alpha [Mus musculus]	<a href="#">480</a>	8e-134

**Figura 24 – A seqüência de 336 aminoácidos de RpUSP mostra alta similaridade com RXR/USP de outros organismos (BLASTp)**

DBD		hinge		LBD				
	I %	S %		I %	S %		I %	S %
<i>Blattella germanica</i>	96	98	<i>Periplaneta americana</i>	73	80	<i>Locusta migratória</i>	79	91
<i>Locusta migratória</i>	94	98	<i>Blattella germanica</i>	73	80	<i>Blattella germanica</i>	75	89
<i>Apis mellifera</i>	93	98	<i>Locusta migratória</i>	69	79	<i>Melipona scutellaris</i>	72	88
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	93	97	<i>Apis mellifera</i>	64	78	<i>Apis mellifera</i>	72	87
<i>Gecarcinus lateralis</i>	90	97	<i>Melipona scutellaris</i>	64	78	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	72	86
<i>Spodoptera litura</i>	89	97						
<i>Periplaneta americana</i>	94	97						
<i>Melipona scutellaris</i>	92	97						
<i>Bombyx mori</i>	92	97						
<i>Anopheles gambiae</i>	93	96						
<i>Aedes aegypti</i>	93	96						
<i>Culex pipiens</i>	93	96						

**Tabela 1 – Identidade e similaridade dos principais domínios de RpUSP com organismos filogeneticamente relacionados**

Números de acesso: *Blattella germânica* |CAH69897.1|; *Leptinotarsa decemlineata* |BAD99298.1|; *Locusta migratória* |AAQ55293.1|; *Apis mellifera* |AAP33487.1|; *Periplaneta americana* |CAF21855.1|; *Gecarcinus lateralis* |AAZ20368.1|; *Melipona scutellaris* |AAW02952.1|; *Bombyx mori* |NP\_001037470.1|; *Anopheles gambiae* |XP\_320944.4|; *Aedes aegypti* |AAG24886.1|; *Culex pipiens* |XP\_001866328.1|. I % - identidade; S % - similaridade.

### 4.3 PARTE III

Na terceira parte desse trabalho buscamos caracterizar o padrão de expressão do RpUSP em diferentes tecidos e situações fisiológicas, além de observar os efeitos do tratamento com retinóides e juvenóides na expressão deste gene.

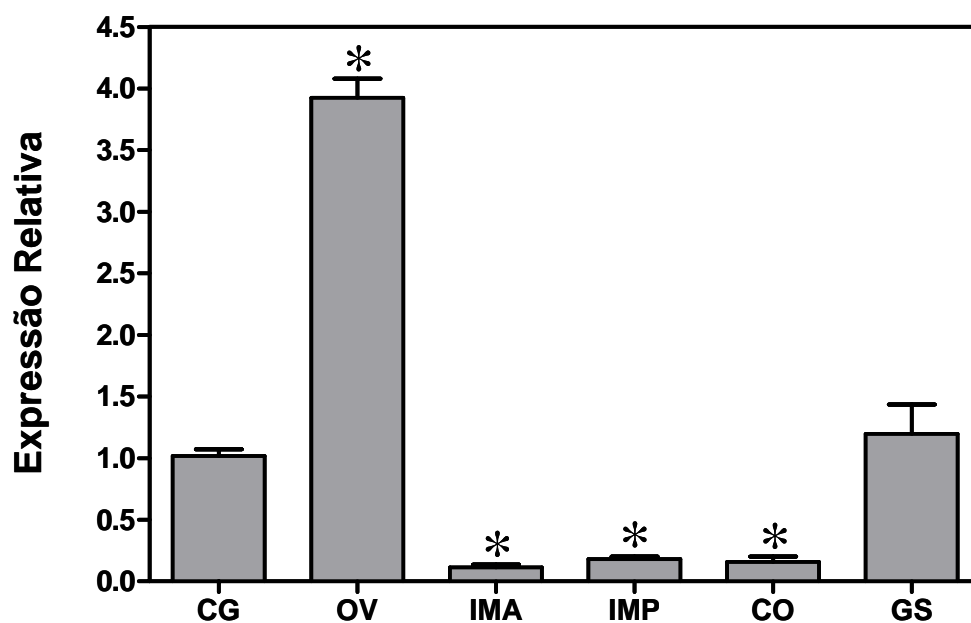
#### 4.3.1 RpUSP é expresso diferencialmente nos tecidos de *R. prolixus*

Para analisar a diferença de expressão de RpUSP nos tecidos de *Rhodnius prolixus*, fêmeas adultas foram dissecadas sete dias após a alimentação sanguínea e tiveram os seguintes tecidos coletados e submetidos à técnica de PCR em tempo real: corpo gorduroso, ovário, intestino médio anterior, intestino médio posterior, coração e glândula salivar. Observamos que dentre os tecidos analisados o ovário apresenta a maior expressão de RpUSP, cerca de 4 vezes maior que a expressão no corpo gorduroso e glândula salivar. O intestino médio, tanto a porção anterior quanto a posterior, e o coração são aparentemente os tecidos com menores níveis de expressão do RpUSP (**Figura 25**).

#### 4.3.2 A expressão de RpUSP é regulada pela alimentação no corpo gorduroso e ovário

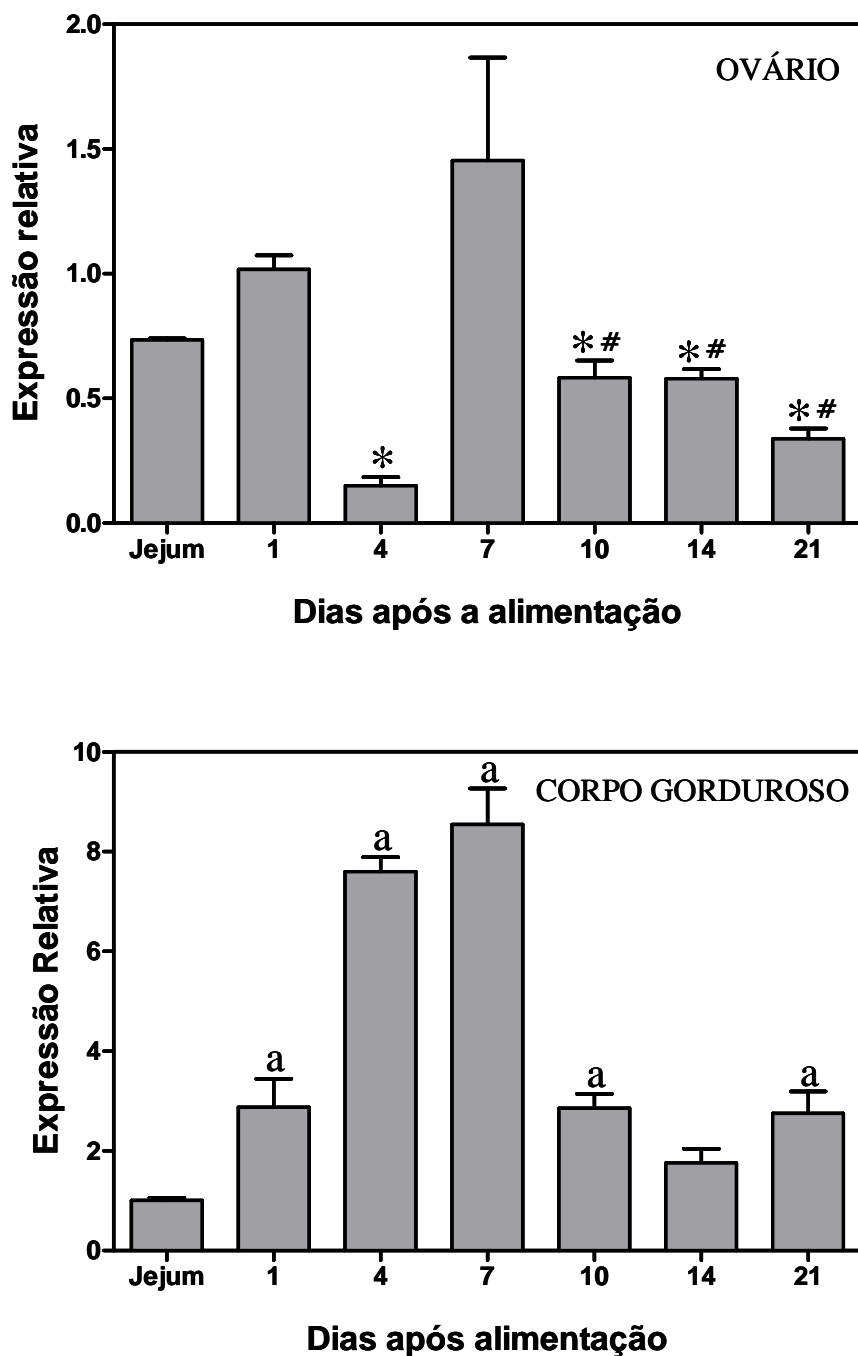
Em *R. prolixus*, assim como em outros insetos hematófagos, a alimentação sanguínea é o sinalizador para que vários eventos metabólicos e fisiológicos ocorram como, por exemplo, a vitelogênese. Dessa forma, analisamos a expressão de RpUSP nos ovários e também no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *R. prolixus* em diferentes tempos ao longo da digestão (1, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a alimentação). Com o resultado (**Figura 26**) podemos observar que em ovários ocorre uma queda abrupta no nível de expressão de

RpUSP no quarto dia após a alimentação seguido por uma recuperação desse nível de expressão no sétimo dia. Após o décimo dia os níveis de expressão parecem próximos ao jejum, não havendo muita variação. Já em corpo gorduroso, encontramos um padrão diferente. O inseto em jejum tem um nível de expressão relativamente baixo, que aumenta gradativamente até o sétimo dia e depois volta a decair até o dia 21, quando o inseto já se encontra novamente em jejum (**Figura 26**).



**Figura 25 – Expressão de RpUSP em diferentes tecidos 7 dias após a alimentação**

Fêmeas adultas de *R. prolixus* foram dissecadas 7 dias após a alimentação e tiveram seus tecidos coletados. Após extração de RNA e síntese de primeira fita de cDNA, as amostras foram submetidas a reação de PCR em tempo real. CG – corpo gorduroso; OV – ovário; IMA – intestino médio anterior; IMP – intestino médio posterior; CO – coração; GS – glândula salivar; \* $P < 0,05$  (em relação ao CG).



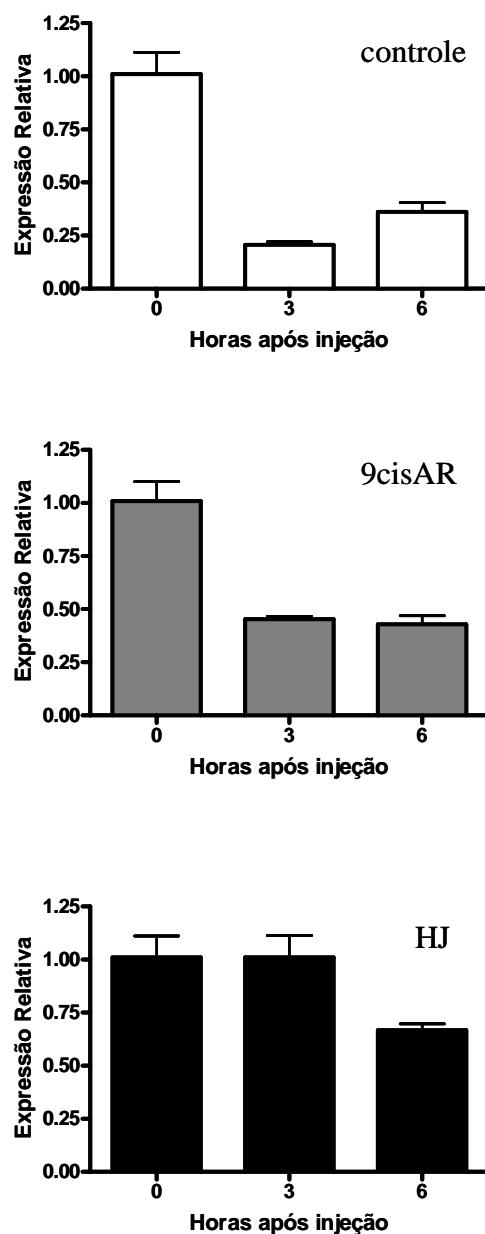
**Figura 26 - Expressão de RpUSP em ovário e corpo gorduroso ao longo da digestão**

Fêmeas adultas de *R. prolixus* foram alimentadas com sangue de coelho e dissecadas em diferentes dias após a alimentação (1, 4, 7, 10, 14 e 21 dias). Os ovários e corpo gorduroso foram coletados e submetidos à extração de RNA. Após tratamento com DNase, o RNA foi utilizado para síntese de primeira fita de cDNA que foi utilizado em reação de PRC em tempo real. \*P < 0,05 (relativo ao dia 1); #P < 0,05 (relativo ao dia4); aP < 0,05 (relativo ao jejum).

#### 4.3.1 Retinóides e juvenóides regulam a expressão de RpUSP em corpo gorduroso

Com o objetivo de verificar uma possível participação do receptor RpUSP nos mecanismos responsáveis pela mediação dos efeitos fisiológicos dos retinóides e juvenóides encontrados em *R. prolixus*, injetamos os compostos nos insetos e avaliamos os níveis de expressão desse gene através da técnica de PCR em tempo real. Podemos observar que o próprio veículo (etanol) ou, mais provavelmente, o ato da injeção em si causa uma drástica e rápida diminuição nos níveis de expressão do gene RpUSP. O mesmo perfil pode ser visto com a injeção de ácido-9cis-retonóico, porém, insetos tratados com HJ são capazes de prevenir esta diminuição, pelo menos nas primeiras três horas após o tratamento (**Figura 27**).





**Figura 27 – Efeito do tratamento com retinóides e juvenóides na expressão de RpUSP**

Fêmeas adultas em jejum foram injetadas com 120 pmoles de 9cis ácido retinóico (9cisAR) ou hormônio juvenil (HJ) e foram dissecadas em diferentes tempos após a injeção (0, 3 e 6 horas). Os corpos gordurosos foram coletados e submetidos à extração de RNA. Após tratamento com DNase, o RNA foi utilizado para síntese de primeira fita de cDNA que foi utilizado em reação de PCR em tempo real.

## 5. DISCUSSÃO

Os insetos têm sido um modelo de grande utilidade no estudo de processos bioquímicos e fisiológicos, permitindo uma melhor compreensão desses mecanismos, inclusive em outros organismos, como os vertebrados. Ademais, o estudo de insetos hematófagos é de grande relevância, devido à importância médica destes como vetores de numerosas doenças humanas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Dessa forma, compreender as bases bioquímicas e fisiológicas que regem estes organismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle desses vetores. No caso do *R. prolixus*, principal vetor da Doença de Chagas no Norte da América do Sul, o controle populacional do inseto é a base da estratégia de controle da doença. Portanto, a pesquisa sobre os processos biológicos acerca do inseto forma a base de conhecimento fundamental para estudos posteriores que visem o controle populacional dos insetos, e conseqüentemente o controle da doença em si.

No presente estudo, investigamos os efeitos de retinóides e juvenóides na fisiologia do inseto *Rhodnius prolixus*, utilizando como parâmetros as alterações morfo-funcionais durante o processo de muda em ninfas e a imunidade humoral em adultos, através da atividade fenoloxidase. Além disso, caracterizamos molecularmente o receptor nuclear *ultraspiracle* (RpUSP) e sugerimos sua possível participação na mediação dos efeitos provocados pelos compostos investigados.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que uma grande variedade de compostos são capazes de afetar a morfogênese em artrópodes, tais como: a ecdisona (BOWERS, 1968), os juvenóides (WIGGLESWORTH, 1962; WIGGLESWORTH, 1969; ZDAREK &

HARAGSIM, 1974; BARRET, 1974; TARRANT & CUPP, 1978; AZAMBUJA e cols., 1984; JURBERG e cols., 1984; JURBERG e cols., 1986; JURBERG e cols., 1997) e os retinóides (NEMEC e cols., 1993; BELOZEROV, 2003; BELOZEROV, 2004). O primeiro trabalho que investigou a possibilidade de que retinóides poderiam exercer efeitos semelhantes aos compostos relacionados ao HJ na metamorfose de insetos foi realizado por Slama, onde ele demonstrou que o retinol, além de ácidos e álcools graxos, induziram mudanças durante a metamorfose do inseto *Pyrrhocoris apterus* (SLAMA, 1962). Pouco tempo depois, foi demonstrado que a exposição ao retinol, administrado através da dieta, foi capaz de acelerar a metamorfose no díptero *Agna affinis* (HOUSE, 1965). Curiosamente, a inibição da metamorfose foi alcançada em resposta ao tratamento com ácido retinóico em *P. apterus*, *Dysdercus cingulatus* e *Tenebrio molitor*, fenômeno até então somente creditado ao HJ e seus análogos (NEMEC e cols., 1993).

Trabalhos feitos em duas espécies de carrapatos (*Haemaphysalis* e *Ixodes*), mostraram que o efeito de ácido retinóico em processos de regeneração são similares aos do metopreno (BELOZEROV, 2003; BELOZEROV, 2004). O ácido retinóico e os juvenóides foram capazes de induzir mudanças no órgão de Haller de *Haemaphysalis* e também de *Ixodes*, (BELOZEROV, 2001). Porém, diferente dos juvenóides, o ácido retinóico pode afetar não apenas a regeneração, mas também o desenvolvimento normal do órgão de Haller em carrapato (BELOZEROV, 2003; BELOZEROV, 2004). Nemeč e colaboradores também demonstraram que a exposição de ninfas de último estágio de três diferentes espécies de insetos ao ácido retinóico causou efeito juvenilizante de forma dose dependente, mimetizando os efeitos do HJ (NEMEC e cols., 1993). Além disso, o tratamento de larvas de *P. apterus* e *Dysdercus cingulatus* com ácido retinóico causou mudanças morfológicas, restaurou a reprodução além de estimular a síntese de vitelogenina (NEMEC e cols., 1993).

No entanto, nesse trabalho (NEMEC e cols., 1993), não é especificado qual isômero de ácido retinóico foi utilizado (possivelmente o isômero todo trans). Isso é de grande relevância, pois pequenas mudanças na estrutura do ácido retinóico apresentam um impacto na sua atividade biológica nos insetos, como demonstrado nas figuras 11 e 13. Nossos resultados mostram que a exposição de ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* a retinóides ou juvenóides causou alterações morfológicas durante o processo de muda, produzindo ninfas anormais ou causando a morte precoce do inseto antes que completasse a muda.

Um efeito parecido foi obtido por Barret quando ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* foram tratadas com uma mistura de análogos de HJ, causando a morte dos insetos durante a muda (BARRET, 1974). Em ambos os casos, é admissível que a morte seja consequência de alterações tão profundas que determinem a inviabilidade dos insetos. Possivelmente, a intensidade dos efeitos de retinóides e juvenóides em *R. prolixus* observadas no presente estudo, poderiam ser ainda maiores dependendo do momento e também da via de administração dos compostos. Nesse sentido, Barret mostrou que quanto mais cedo fosse feita a administração dos compostos ao longo dos dias após a alimentação, maiores eram os efeitos juvenilizantes nas ninfas de *R. prolixus* (BARRET, 1974). É também possível que esses compostos fossem mais ativos se eles tivessem sido aplicados topicamente ao invés de injetados através da hemocele, pois poderiam ser metabolizados na cutícula e então liberados gradualmente para a hemolinfa (WIGGLESWORTH, 1973). No entanto, um estudo seminal de Wigglesworth mostrou que HJ e muitos dos seus análogos seriam mais ativos na promoção de efeitos morfogenéticos quando aplicados através de injeção do que por aplicação tópica (WIGGLESWORTH, 1969).

O papel de juvenóides na regulação da atividade fenoloxidase também foi demonstrado em vários modelos de insetos (BITONDI e cols., 1998; RANTALA e cols., 2003; ROLFF & SIVA-JOTHY, 2002). Sobre os efeitos do HJ na resposta imune, existem poucos estudos direcionados ao papel desse hormônio nos dois principais componentes do sistema imune dos insetos: os hemócitos, que possuem várias importantes funções imunológicas na fagocitose, encapsulação e reparo de feridas (AMDAM e cols., 2004; AMDAM e cols., 2005) e a atividade fenoloxidase hemolinfática, uma enzima chave envolvida no processo de melanização nos insetos (ANDERSEN, 1985; RANTALA e cols., 2003; ROLFF & SIVA-JOTHY, 2002). Em abelhas, o aumento nos níveis de HJ induz a morte dos hemócitos levando a uma severa baixa na imunidade (AMDAM e cols., 2004). Uma observação interessante é que o gene da profenoloxidase de insetos responde à ecdisona e a sua região promotora contém um elemento responsivo a ecdisteróides (EcRE) que é capaz de ligar de forma funcional o heterodímero EcR/USP (AHMED e cols., 1999). Então, é possível propor que atividade imunomodulatória do HJ pode depender da sua interação com USP. Nossos dados, apresentados aqui, oferecem evidências experimentais de que não só o HJ e seu análogo Met, mas também 9cisAR, desempenham um papel na modulação da resposta imune de *R. prolixus*, pois o aumento esperado na atividade fenoloxidase após o desafio com bactérias não ocorreu nos insetos tratados com esses compostos. Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores que mostram que altos níveis de HJ estão implicados na supressão da função imune em insetos (RANTALA e cols., 2003; ROLFF & SIVA-JOTHY, 2002).

Muitas evidências sugerem que retinóides e juvenóides compartilham vários aspectos biológicos, além de sua similaridade estrutural como derivados de terpenóides. Embora o mecanismo pelo qual retinóides e juvenóides exerçam seus efeitos

morfogenéticos em insetos não seja ainda bem estabelecido, é possível supor que eles possam requerer fatores de transcrição induzidos por ligante, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares, como o ultraspiracle (USP) e o receptor de ecdisona (EcR). Nesse sentido, dando suporte a essas observações, vários trabalhos vêm demonstrando que o produto do gene USP, um ortólogo do receptor de ácido retinóico (RXR) dos vertebrados, parece ter como ligante endógeno o HJ, que dessa forma é capaz de controlar a expressão gênica (ORO e cols., 1990; JONES & SHARP, 1997; JONES e cols., 2001). Além disso, Jones e colaboradores mostraram recentemente que USP de *Drosophila* liga com alta afinidade o composto metilfarnesoato, um produto secretado pela *ring gland*, com uma especificidade semelhante ao 9cisAR pelo RXR (JONES e cols., 2006). Por outro lado, já foi demonstrado que metopreno e seus metabólitos são capazes de ativar o receptor RXR de mamífero de forma específica, não tendo a habilidade de ativar RAR, como o ligante endógeno 9cisAR (HARMON e cols., 1995).

Nesse contexto, USP, assim como RXR, forma um complexo heterodimérico com outros receptores nucleares, especialmente com o EcR que é necessário para a atividade transcricional de genes alvo, como a vitelogenina (YAO e cols., 1993; MARTIN e cols., 2001). Vale lembrar que a restauração da expressão de vitelogenina observada após a exposição a Met ou ttAR de fêmeas alatectomizadas de *P. apterus* (NEMEC e cols., 1993) pode ser mediada por USP, pois HJ é capaz de modular a transcrição gênica através da ligação com esse receptor (XU e cols., 2002).

Baseado nos resultados aqui apresentados podemos concluir que o esqueleto terpenóide dos retinóides e juvenóides parece representar um importante determinante estrutural para regular o processo de muda e a atividade fenoloxidase em *R. prolixus*.

Todavia, é importante ressaltar que o esqueleto terpenóide por si próprio não é suficiente para explicar a extensão dos efeitos observados na morfogênese e na resposta imune humoral. Nesse sentido, parece que pequenas mudanças na estrutura terpenóide, como a exibida entre 9cisAR e ttAR, pode ser crucial para determinar sua potência em insetos. Isso é particularmente verdadeiro quando comparamos os efeitos de 9cisAR e ttAR na muda, e também os efeitos de 9cisAR e ttROH na atividade fenoloxidase. Então, entre os retinóides investigados no presente estudo, parece que o 9cisAR é o melhor análogo de HJ. Dessa forma, parece que o mecanismo molecular envolvido na morfogênese e na resposta imune humoral em insetos são capazes de reconhecer o esqueleto terpenóide como um importante determinante estrutural, que pode ter a atividade biológica aumentada dependendo de pequenas mudanças em sua estrutura.

Dessa forma, a identificação do receptor USP em *R. prolixus* (RpUSP), feita aqui nesse trabalho, traz uma luz a mais sobre esse assunto. A seqüência parcial de RpUSP que obtivemos apresenta os domínios C, D, E e F inteiros, incluindo o códon de parada. No lado oposto, em direção ao amino-terminal, o domínio A/B apresenta-se incompleto, sendo o único que não teve sua seqüência totalmente elucidada. No entanto, por comparação com as seqüências de USP de outros organismos filogeneticamente relacionados, acreditamos estar faltando poucos nucleotídeos para chegarmos até a trinca que codifica a metionina inicial. A análise da seqüência de aminoácidos deduzida para RpUSP nos mostra que o receptor de *R. prolixus* é mais parecido com os receptores dos insetos *Locusta migratoria*, *Blattella germanica*, *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* do que de *Aedes aegypti* e *Drosophila melanogaster*. Da mesma forma, o USP de *A. mellifera* apresenta uma maior similaridade aos seus ortólogos de vertebrados-crustáceos-carrapatos-locusta do que os do grupo de díptera-lepidoptera (BARCHUK e cols., 2004). Quando analisamos os domínios C, D e E

isoladamente observamos, conforme esperado, que os percentuais de identidade e similaridade são maiores na região do DBD, pois esta é a parte mais conservada do receptor. O DBD de AaUSP (*A. aegypti*) apresenta 92 % e 97 % de identidade com o mesmo domínio de DmUSP (*Drosophila*) e BmUSP (*Bombix mori*) respectivamente, enquanto o LBD apresenta 57 % e 52 % também em relação a DmUSP e BmUSP. Em *R. prolixus* é possível encontrar no DBD um grau de identidade da mesma ordem em relação a outros insetos, como *B. germanica* (96 %), *Locusta migratoria* (94 %) e *Apis mellifera* (93 %). O domínio intermediário *hinge* apresenta as maiores similaridades com o domínio correspondente de USP das baratas *Periplaneta americana* e *B. germanica* (ambos 73 %). Já no domínio LBD de RpUSP a relação de identidade com o LBD de outros insetos é maior quando comparada com a relação de *A. aegypti* com *Drosophila* e *B. mori*.

Além disso, de acordo com o que já foi estabelecido para outros organismos como, por exemplo, *A. aegypti* (KAPITSKAYA e cols., 1996) e *Manduca sexta* (JINDRA e cols., 1997), é possível que existam duas isoformas do receptor RpUSP em *R. prolixus*, pois é comum esse achado em insetos. Em *A. aegypti* foram identificadas duas isoformas de USP foram chamadas de AaUSPa e AaUSPb, que variam apenas na porção N-terminal, no domínio A/B. Com relação ao número de cópias presente no genoma desse inseto, podemos dizer que é provável que haja mais de uma cópia, pois, conforme visto na figura 18, existe mais de uma marcação positiva em cada canal que corresponde ao tratamento com enzimas de restrição diferentes, embora em *A. mellifera* uma única cópia do gene AMUSP seja capaz de produzir dois transcritos diferentes de aproximadamente 4 e 5 kb que são expressos no corpo do animal (BARCHUK e cols., 2004).



Em *A. aegypti* a expressão das duas isoformas do receptor é diferenciada entre os tecidos. Enquanto AaUSPa é predominante no corpo gorduroso, AaUSPb é majoritário nos ovários (KAPITSKAYA e cols., 1996). Em *R. prolixus* podemos observar que no sétimo dia após a alimentação (**Figura 25**) a expressão de RpUSP é cerca de quatro vezes maior nos ovários do que em corpo gorduroso. Quando relacionamos esse resultado com os gráficos que mostram a expressão ao longo da digestão (**Figura 26**), podemos observar que, de uma forma geral, em ovário a expressão de RpUSP é maior do que em corpo gorduroso durante todo o ciclo de alimentação-digestão. Em *M. sexta* a expressão de USP-2 acompanha os níveis de HJ circulantes, enquanto USP-1 apresenta um perfil de expressão oposto (RIDDIFORD e cols., 2003).

Em *R. prolixus* ainda não foi identificado HJ endógeno, porém várias evidências mostram que HJ é capaz de regular diversos aspectos da biologia do inseto durante todo o ciclo de vida (WIGGLESWORTH, 1934; COLES, 1965; VALLE, 1993; WANG, 1992; DAVEY, 1974). Se considerarmos o título de HJ em *A. aegypti* podemos dizer que é mais alto durante o período pré-vitelogênico e muito baixo durante a vitelogêne, que coincide com o período de digestão do sangue ingerido (RAIKHEL e cols., 2002). O nível de AaUSP mRNA no corpo gorduroso permanece quase constante durante todo o ciclo vitelogênico, enquanto em ovários a cinética coincide com a do receptor de ecdisteróides, sendo elevada durante o período pré-vitelogênico e diminuída após a vitelogênese (KAPITSKAYA e cols., 1996). Em *R. prolixus* observamos um pico de expressão no sétimo dia após a alimentação, o que coincide com o início da oviposição, enquanto nos ovários há uma interessante queda nos níveis de expressão no quarto dia, quando ocorre o pico da vitelogênese. O silenciamento do gene da vitelogenina por RNAi em *A. mellifera* está associado a um significativo aumento no título de HJ. A associação observada entre a diminuição de

vitelogenina e aumento de HJ fornece forte evidência para a hipótese da regulação por mecanismo de feedback (GUIDUGLI e cols., 2005). Em resposta ao tratamento com HJ, ocorre um rápido e transiente aumento nos níveis de RNAm de AMUSP (*A. mellifera*) que podem ser observados no corpo gorduroso de rainhas e operárias (BARCHUK e cols., 2004).

No entanto, é importante ressaltar que os efeitos de retinóides e juvenóides podem não ser exclusivamente dependentes dos receptores nucleares (BUSZCZAK & SEGRAVES, 1998). Por exemplo, já foi demonstrada a presença de uma proteína ligadora de ácido retinóico (CRABP) em *Manduca sexta*, que apresenta um sítio de ligação que pode abrigar ácido retinóico e é aceito como mediador dos seus efeitos na morfogênese (MANSFIELD e cols., 1998). USP de *Drosophila melanogaster* (dUSP) liga de forma específica HJ III, mas não liga farnesol nem HJ ácido. Além disso, a ligação do HJ III ao dUSP leva uma mudança específica na conformação da proteína (JONES e cols., 2001). Além disso, uma proteína ligadora de HJ de 29 Kda foi encontrada na epiderme de *M. sexta* que desaparece durante a muda e parece estar envolvida nos efeitos antimetamórficos do HJ (PALLI e cols., 1994).

Assim, demonstramos nessa tese, que compostos terpenóides, como os retinóides e os juvenóides, são capazes de induzir alterações fisiológicas em *R. prolixus*. Utilizando uma abordagem comparativa, os resultados aqui apresentados mostram, pela primeira vez, que ambas as classes de compostos são capazes de interferir com a morfogênese e resposta imune humoral de uma maneira semelhante, sugerindo que o mecanismo molecular envolvido nesses eventos reconhece o esqueleto terpenóide como um importante determinante estrutural. Ademais, sugerimos uma possível mediação desses efeitos pelo

receptor nuclear *ultraspiracle*, caracterizado molecularmente no presente trabalho. Esses dados, em conjunto, certamente servirão de base para estudos futuros que abordem o controle populacional não só de *R. prolixus*, mas de outros insetos/vetores também.

## 6. REFERÊNCIAS

- AHMED, A., MARTIN, D., MANETTI, A.G., HAN, S.J., LEE, W.J., MATHIOPOULOS, K.D., MULLER, H.M., KAFATOS, F.C., RAIKHEL, A. AND BREY, P.T. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 96, 14795-14800, 1999.
- AKAM, M. Hox and Hom: homologous gene cluster in insects and vertebrates. **Cell** 57, 347-354, 1989.
- ALDANA, E., LIZANO, E., VALDERRAMA, A. Effects of human blood feeding on the fecundity, fertility and biological cycle of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). **Rev. Biol. Trop.** 49, 689-691, 2001.
- AMDAM, G.V., AASE, A.L., SEEHUUS, S.C., KIM FONDRK, M., NORBERG, K., HARTFELDER, K. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. **Exp. Gerontol.** 40, 939-947, 2005.
- AMDAM, G.V., SIMÕES Z.L.P., HAGEN, A., NORBERG, K., SCHRODER, K., MIKKELSEN, O., KIRKWOOD, T.B.L. AND OMHOLT, S.W. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. **Exp. Gerontol.** 39, 767-773, 2004.
- ANDERSEN, S.O. Sclerotization and tanning of the cuticle. In: G.A. Kerkut and L.I. Gilbert (Eds.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 59-74, 1985.
- ASHIDA, M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. **Arch. Biochem. Biophys.** 144(2), 749-62, 1971.
- ATELLA, G.C., GONDIM, K.C., MACHADO, E.A., MEDEIROS, M.N., SILVA-NETO, M.A.C. AND MASUDA, H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **An. Acad. Bras. Cienc.** 77, 405-430, 2005.
- AZAMBUJA, P., FURTADO, A.F. AND GARCIA, E.S. Effects of juvenile hormone analogue on ecdysis prevention induced by precocene in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79, 419-423, 1984.
- AZAMBUJA, P., RATCLIFFE, N.A., GARCIA, E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. **An. Acad. Bras. Cienc.** 77, 397-404, 2005.
- BARCHUK AR, MALESZKA R, SIMOES ZL. *Apis mellifera* ultraspiracle: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. **Insect Mol. Biol.** 13(5), 459-67, 2004.

- BARRET, F.M. Effect of topical application of a juvenile hormone mimic on the duration of the moulting cycle in fifth instar *Rhodnius*. **J. Insect Physiol.** 20, 1507-1514, 1974.
- BEHMER, S.T., NES, W.D. Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. **Advan. Insect Physiol.** 31, 1-72, 2003.
- BELOZEROV, V.N. Effects of juvenoids and retinoic acid on development of larvae and nymphs in the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari, Ixodidae) and regeneration of Haller's organ during metamorphosis. **Russ. J. Devel. Biol.** 34, 42-50, 2003.
- BELOZEROV, V.N. Regeneration of limbs and sensory organs in *Ixodid* ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae). **Russ. J. Devel. Biol.** 32, 129-142, 2001.
- BELOZEROV, V.N. Specific features of Haller's organ regeneration in the tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari, Ixodidae) in the presence of methoprene and retinoic acid. **Russ. J. Devel. Biol.** 35, 168-173, 2004.
- BILLAS, I.M., MOULINIER, L., ROCHEL, N., MORAS, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J. Biol. Chem.* 276(10), 7465-7474, 2001.
- BITONDI, M.M., MORA, I.M., SIMÕES, Z.L. AND FIGUEIREDO, V.L. The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. **J. Insect Physiol.** 44, 499-507, 1998.
- BLASCHKE, F., TAKATA, Y., CAGLAYAN, E., LAW, R.E., HSUEH, W.A. Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.** 26 (1), 28-40, 2006.
- BLOMHOFF, R. Transport and metabolism of vitamin A. **Nutr. Rev.** 52, S13-S23, 1994.
- BOWERS, W.S. Juvenile hormone: activity of natural and synthetic synergists. **Science** 161, 895-897, 1968.
- BUSZCZAK, M. AND SEGRAVES, W.A. *Drosophila* metamorphosis: The only way is USP? **Curr. Biol.** 8, 879-882, 1998.
- BYRNE, B.M., GRUBER, M., AB, G. The evolution of egg yolk proteins. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** 53, 33-69, 1989.
- CARCAVALLO, R.U., GIRÓN, I.G., JURBERG, J., LENT, H. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997.
- CARLSON, S.D., STEEVES, H.R., VANDEBERG, J.S. AND ROBBINS, W.E. Vitamin A deficiency: effect on retinal structure of the moth *Manduca sexta*. **Science** 158, 268-270, 1967.

- CARMICHAEL, J.A., LAWRENCE, M.C., GRAHAM, L.D., PILLING, P.A., EPA, V.C., NOYCE, L., LOVRECZ, G., WINKLER, D.A., PAWLAK-SKRZECZ, A., EATON, R.E., HANNAN, G.N. AND HILL, R.J. The x-ray structure of a hemipteran Ecdysone receptor ligand-binding domain. **J. Biol. Chem.** 280, 22258-22269, 2005.
- CHINO, H., GILBERT, L.I. The uptake and transport of cholesterol by hemolymph lipoproteins. **Insect Biochem.** 1, 337-347, 1971.
- CLAYTON, G.M., PEAK-CHEW, S.Y., EVANS, R.M. AND SCHWABE, J.W. The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 98, 1549-1554, 2001.
- COLES, G.C. Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stål. **J. Exp. Biol.** 43(3), 425-31, 1965.
- CORRÊA, A.D., MIRANDA-FILHO, N., SIQUEIRA-BATISTA, R., HUGGINS, D.W. Papel dos reservatórios na epidemiologia da moléstia de Chagas. **Rev. Bras. Med.** 55, 414-420, 1998.
- DAQUINAG, A.C., NAKAMURA, S., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y. AND TSUKAMOTO, T. Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92, 2964-2968, 1995.
- DAVEY, K.G., HUEBNER, E. The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenile hormone and antigonadotropin in vitro. **Can. J. Zool.** 52(11), 1407-1412, 1974.
- DAVEY, K.G. Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rhodnius prolixus*. **Stal. Amer. Zool.** 21, 701-705, 1981.
- DAVEY, K.G. Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82, 103-108, 1987.
- ENGELMANN, F. Insect vitellogenin, biosynthesis and role in vitellogenesis. **Adv. Insect Physiol.** 14, 49-107, 1979.
- FRIEND, W.G. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stal. **Can. J. Zool.** 43, 125-132, 1965.
- GARCIA, E.S., GUIMARÃES, J.A., Proteolytic enzymes in the *Rhodnius prolixus* midgut. **Experientia** 35(3), 305-6, 1979.
- GILBERT, L.I., RYBCZNSKI, R., WARREN, J.T. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. **Annu. Rev. Ent.** 47, 883-916, 2002.

- GILBERT, L.I., GRANGER, N.A., ROE, R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 30, 617-644, 2000.
- GOLDSMITH, T.H. The visual system of the honeybee. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 44, 123-126, 1958.
- GREBE, M., SPINDLER-BARTH, M. Expression of ecdysteroid receptor and ultraspiracle from *Chironomus tentans* (Insecta, Diptera) in *E. coli* and purification in a functional state. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32(2), 167-74, 2002.
- GRÜN, F., NOY, N., HÄMMERLING, U., BUCK, J. Purification, cloning, and bacterial expression of retinol dehydratase from *Spodoptera frugiperda*. **J. Biol. Chem.** 271(27), 16135-16138, 1996.
- GUIDUGLI, K.R., NASCIMENTO, A.M., AMDAM, G.V., BARCHUK, A.R., OMHOLT, S., SIMÕES, Z.L., HARTFELDER, K. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. **FEBS Lett.** 579(22), 4961-4965, 2005.
- GUO, X., XU, Q., HARMON, M.A., JIN, X., LAUDET, V., MANGELSDORF, D.J., PALMER, M.J. Isolation of two functional retinoid X receptor subtypes from the Ixodid tick, *Amblyomma americanum* (L.). **Mol. Cell. Endocrinol.** 139(1-2), 45-60, 1998.
- HAGEDORN, H.H., KUNKEL, J.G. Vitellogenin and vitellin in insects. **Ann. Rev. Entomol.** 24, 475-505, 1979.
- HALL, B.L., THUMMEL, C.S. The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. **Development** 125(23), 4709-4717, 1998.
- HANNAN, G.N., HILL, R.J. LcUSP, an ultraspiracle gene from the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*: cDNA cloning, developmental expression of RNA and confirmation of function. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31(8), 771-781, 2001.
- HARMON, M.A., BOEHM, M.F., HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92(13), 6157-6160, 1995.
- HARNISH, D.G., WHITE, B.N. Insect vitellin: identification, purification and characterization from eight orders. **J. Exp. Zool.** 220, 1-10, 1982.
- HARTFELDER, K. Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33, 157-177, 2000.
- HEINLEIN, C.A., CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocr. Rev.** 25(2), 276-308, 2004.

- HENRICH, V.C., BROWN, N.E. Insect nuclear receptors: a developmental and comparative perspective. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 25(8), :881-897, 1995.
- HIRUMA, K. AND RIDDIFORD, L.M. Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. **Dev. Biol.** 130, 87-97, 1988.
- HOUSE, H.L. Effects of vitamin A acetate and structurally related substances on growth and reproduction of *Agria affinis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae). **J. Insect Physiol.** 11, 1039-1045, 1965.
- HOY, M.A. Insect Molecular Genetics: an introduction to principles and applications. California: Genes, genome organization, and development in insects. 1994
- HUANG, X., WARREN, J.T., GILBERT, L.I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. **J. Genet. Genomics.** 35(1), 1-10, 2008.
- JINDRA, M., HUANG, J.Y., MALONE, F., ASAHINA, M., RIDDIFORD, L.M. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. **Insect Mol. Biol.** 6(1), 41-53, 1997.
- JONES, G., JONES, D. Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 30(8-9), 671-679, 2000.
- JONES, G. AND SHARP, P.A. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 94, 13499-13503, 1997.
- JONES, G., JONES, D., TEAL, P., SAPA, A. AND WOZNIAK, M. The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. **FEBS J.** 273, 4983-4996, 2006.
- JONES, G., WOZNIAK, M., CHU, Y., DHAR, S. AND JONES, D. Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32, 33-49, 2001.
- JOUNI, Z.E., ZAMORA, J., WELLS, M.A. Absorption and tissue distribution of cholesterol in *Manduca sexta*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 49, 167-175, 2002.
- JURBERG, J., COSTA, J.M., GONÇALVES, T.C., GARCIA, E. AND DE AZAMBUJA, P. Biomorphogenetic changes caused by the application of precocene II in nymphs of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 81, 171-184, 1986.
- JURBERG, J., COSTA, J.M., GONÇALVES, T.C.M, GARCIA, E.S. AND AZAMBUJA, P. Morphogenetic effects of precocene II on nymphs of *Rhodnius prolixus* (STAL, 1859) (Hemiptera – Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79, 397-407, 1984.



- JURBERG, J., GALVÃO, C., BOWERS, W.S., GARCIA, E.S. AND AZAMBUJA, P. Morphological alterations induced by an anti-juvenile hormonal compound, 2-(2-EthoxyEthoxy)Ethyl Furfuryl Ether, on three species of Triatominae larvae (Hemiptera, Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 92, 263-268, 1997.
- KAPITSKAYA, M., WANG, S., CRESS, D.E., DHADIALLA, T.S., RAIKHEL, A.S. The mosquito ultraspiracle homologue, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.** 121(2), 119-132, 1996.
- KERSZBERG, M. Morphogen propagation and action: towards molecular models. **Semin. Cell. Dev. Biol.** 10(3), 297-302, 1999.
- KOLLIEN, A.H., SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitol. Today** 16(9), 381-387, 2000.
- KOMNIK, H., GIESA, U. Intestinal absorption of cholesterol, transport in the haemolymph, and incorporation into the fat body and malpighian tubules of the larval dragonfly *Aeshna cyanea*. **Comp. Biochem. Physiol.** 107A, 553-557, 1994.
- KUTHIALA, A., RITTER, K.S. Esterification of cholesterol and cholestanol in the whole body, tissue, and frass of *Heliothis zea*. **Arch. Insect Biochem.** 7, 237-247, 1988.
- LAUDET, V. e GRONEMEYER, H. General organization of nuclear receptors in The Nuclear Receptor Factsbook. Academic Press, Londres, 2002.
- LEE, E.J., SCHMITTGEN, T.D. Comparison of RNA assay methods used to normalize cDNA for quantitative real-time PCR. **Anal. Biochem.** 357, 299-301, 2006.
- LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94, 89-92, 1999.
- LI, J.Y., Tracy, J.W. and Christensen, B.M. Hemocyte monophenol oxidase activity in mosquitoes exposed to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. **J. Parasitol.** 75, 1-5, 1989.
- LI, J.Y., Tracy, J.W. and Christensen, B.M. Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. **Dev. Comp. Immunol.** 16, 41-48, 1992.
- MADEN, M. Vitamin A in embryonic development. **Nutr. Rev.** 52, S3-S12, 1994.
- MADEN, M. The homeotic transformation of tails into limbs in *Rana temporaria* by retinoids. **Dev. Biol.** 159, 379-391, 1993.
- MAESTRO, O., CRUZ, J., PASCUAL, N., MARTÍN, D., BELLÉS, X. Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the

hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). **Mol. Cell. Endocrinol.** 238(1-2), 27-37, 2005.

- MANSFIELD, S.G., CAMMER, S., ALEXANDER, S.C., MUEHLEISEN, D.P., GRAY, R.S. AND TROPSHA, A. Molecular cloning and characterization of an invertebrate cellular retinoic acid binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 95, 6825-6830, 1998.
- MARANHÃO, Z.G. Entomologia Geral. 2ª Edição, Nobel, São Paulo, 1977.
- MARCONDES, C.B. Entomologia Médica e Veterinária. Editora Atheneu, São Paulo, 2001.
- MARTIN, D., WANG, S.F. AND RAIKHEL, A.S. The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. **Mol. Cell Endocrinol.** 173, 75-86, 2001.
- MODUGNO, F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGe review. **Am. J. Epidemiol.** 159, 319-335, 2004.
- MUNDALL, E., ENGELMANN, F. Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta*. **J. Insect Physiol.** 23(7), 825-836, 1977.
- MURRAY, A., HUNT, T. The cell cycle. Ed. Oxford University, New York, 1993.
- NEMEC, V., KODRÍK, D., SVATOPLUK, M. AND LAUFER, H. Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. **J. Insect Physiol.** 39, 1083-1093, 1993.
- NORDGÅRD, O., KVALØY, J.T., FARMEN, R.K., HEIKKILÄ, R. Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: The balance between accuracy and precision. **Anal. Biochem.** 356, 182-193, 2006.
- OLIVEIRA, P.L., PETRETSKI, M.D.A., MASUDA, H. Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. (Hemiptera, Reduviidae). **Insect Biochem.** 19, 489-498, 1989.
- ORO, A.E., MCKEOWN, M. AND EVANS, R.M. Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. **Nature** 347, 298-301, 1990.
- PALLI, S.R., HORMANN, R.E., SCHLATTNER, U. AND LEZZI, M. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. **Vitam. Horm.** 73, 59-100, 2005.
- PALLI, S.R., TOUHARA, K., CHARLES, J.P., BONNING, B.C., ATKINSON, J.K., TROWELL, S.C., HIRUMA, K., GOODMAN, W.G., KYRIAKIDES, T. AND PRESTWICH, G.D. A nuclear juvenile hormone-binding protein from larvae of

*Manduca sexta*: a putative receptor for the metamorphic action of juvenile hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, 6191-6195, 1994.

- PAN, M., BELL, W.J., TELFER, W.H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. **Science** 165, 393-394, 1969.
- PANZERA, F., DUJARDIN, J.P., NICOLINI, P., CARACCIO, M.N., ROSE, V., TELLEZ, T., BERMÚDEZ, H., BARGUES, M.D., MAS-COMA, S., O'CONNOR, J.E., PÉREZ, R. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. **Emerg. Infect. Dis.** 10(3), 438-446, 2004.
- PARK, J.H., ATTARDO, G.M., HANSEN, I.A., RAIKHEL, A.S. GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.** 281(16), 11167-11176, 2006.
- PYE, A.E. Microbial activation of prophenoloxidase from immune insect larvae. **Nature** 251, 610-613, 1974.
- RAIKHEL, A.S., DHADIALLA, T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Ann. Rev. Entomol.** 37, 217-251, 1992.
- RAIKHEL, A.S., KOKOZA, V.A., ZHU, J., MARTIN, D., WANG, S.F., LI C, SUN, G., AHMED, A., DITTMER, N., ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32(10), 1275-1286, 2002.
- RANTALA, M.J., VAINIKKA, A. AND KORTET, R. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. **Proc. R. Soc. Lond.** 270, 2257-2261, 2003.
- RICHMAN, A. AND KAFATOS, F.C. Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. **Curr. Opin. Immunol.** 8, 14-19, 1996.
- RIDDIFORD, L.M., HIRUMA, K., ZHOU, X., NELSON, C.A. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 33(12), 1327-1338, 2003.
- ROLFF, J. AND SIVA-JOTHY, M.T. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 99, 9916-9918, 2002.
- ROZOWSKI, M., AKAM, M. Hox gene control of segment-specific bristle patterns in *Drosophila*. **Genes Dev.** 16(9), 1150-1162, 2002.
- SASORITH, S., BILLAS, I.M., IWEMA, T., MORAS, D., WURTZ, J.M. Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. **J. insect Sci.** 2, 25, 2002.

- SCHELLER, K., KARLSON, P. Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells in *Calliphora vicina*. **J. Insect Physiol.**, 23, 285-291, 1977.
- SEKERIS, C.E. AND MERGENHAGEN, D. Phenoloxidase system of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. **Science** 145, 68-69, 1964.
- SILVEIRA, A.C., VINHAES, M.C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(1), 405-411, 1999.
- SIQUEIRA-BATISTA, R., GOMES, A.P. Os antimicrobianos e a metáfora da guerra. In: SIQUEIRA-BATISTA, R., GOMES, A.P. Antimicrobianos: guia prático. Rubio, Rio de Janeiro, 2005.
- SIQUEIRA-BATISTA, R., QUINTAS, L.E.M., VAHIA-LOUREIRO, A.M. O *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA-BATISTA, R., CORRÊA, A.D., HUGINS, D.W. Moléstia de Chagas. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1996.
- SLÁMA, K. The juvenile hormone-like activity of fatty acids, fatty alcohols and other compounds in insect metamorphosis. **Acta. Soc. Ent. Czechoslov.** 59, 323-340, 1962.
- SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10(1), 23-28, 1998.
- STAY, B. A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 30, 653-662, 2000.
- SVOBODA, J.A. Variability of metabolism and function of sterols in insects. **Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.** 34, 49-57, 1999.
- SWEVERS, L., CHERBAS, L., CHERBAS, P., IATROU, K., *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 26(3), 217-221, 1996.
- TARRANT, C.A. AND CUPP, E.W. Morphogenetic effects of precocene II on the immature stages of *Rhodnius prolixus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 72, 666-668, 1978.
- THALLER, C. AND EICHELE, G. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. **Nature** 327, 625-628, 1987.
- TSUCHIDA, A., YAMAUCHI, T., TAKEKAWA, S., HADA, Y., ITO, Y., MAKI, T., KADOWAKI, T. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. **Diabetes** 54(12), 3358-3370, 2005.

- TURUNEN, S., CHIPPENDALE, G.M. Lipid absorption and transport: sectional analysis of the larval midgut of the corn borer, *Diatraea grandiosella*. **Insect Biochem.** 7, 203-208, 1977.
- TZERTZINIS, G., MALECKI, A., KAFATOS, F.C. BmCF1, a *Bombyx mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila ultraspiracle*. **J. Mol. Biol.** 238(3), 479-486, 1994.
- VAFOPOULOU, X., STEEL, C.G.H. Ecdysteroidogenic action of *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin on the prothoracic glands of *Rhodnius prolixus* in vitro. **J. Insect Physiol.** 43, 651-656, 1997.
- VALLE, D., KUN, J., LINSS, J., GARCIA, E.S., GOLDENBERG, S. cDNA cloning and expression of *Rhodnius prolixus* vitellogenin. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 23, 457-465, 1993.
- VALLE, D., LIMA GOMES, J.E.P., GOLDEMBERG, S, GARCIA, E.S. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon the blood source. **J. Insect Physiol.** 33, 249-254, 1987.
- WANG, S.F., ZHU, J., MARTIN, D., RAIKHEL, A.S. Regulation of vitellogenin gene expression by ecdysteroids. In: RAIKHEL, A.S. Progress in Vitellogenesis. 69-73, 2005.
- WIGGLESWORTH, V.B. Assays on *Rhodnius* for juvenile hormone activity. **J. Insect Physiol.** 19, 205-211, 1973.
- WIGGLESWORTH, V.B. Chemical structure and juvenile hormone activity: comparative test on *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.** 15, 73-94, 1969.
- WIGGLESWORTH, V.B. The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **J. Exp. Biol.** 17, 201-222, 1940.
- WIGGLESWORTH, V.B. The juvenile hormone effect of farnesol and some related compounds: quantitative experiments. **J. Insect Physiol.** 9, 105-119, 1962.
- WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology. London. 7<sup>th</sup> Ed. Chapman e Hall Ltda, 1972.
- WOZNIAK, M., CHU, Y., FANG, F., XU, Y., RIDDIFORD, L., JONES, D., JONES, G. Alternative farnesoid structures induce different conformational outcomes upon the *Drosophila* ortholog of the retinoid X receptor, ultraspiracle. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 34(11), 1147-1162, 2004.
- XU, Y., FANG, F., CHU, Y., JONES, D. AND JONES, G. Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. **Eur. J. Biochem.** 269, 6026-36, 2002.

- YAMASHITA, O., INDRATISH, L.S. Metabolic fates of yolk proteins during embryogenesis in Arthropods. **Dev. Growth Differ.** 30, 337-346, 1988.
- YAO, T.P., FORMAN, B.M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J.D., MCKEOWN, M., CHERBAS, P. AND EVANS, R.M. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. **Nature** 366, 476-479, 1993.
- ZDAREK, J. AND HARAGSIM, O. Action of juvenoids on metamorphosis of the honey-bee, *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.** 20, 209-221, 1974.
- ZERBA, E.N. Chemical control of Chagas disease vectors. *Biomed. Environ. Sci.* 2, 24-29, 1989.
- ZHU, J., CHEN, L., RAIKHEL, A.S. Posttranscriptional control of the competence factor betaFTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100(23), 13338-13348, 2003.

## ANEXO

Trabalho publicado em periódico de circulação internacional

NAKAMURA, A.; STIEBLER, R.; FANTAPPIÉ, M.R.; FIALHO, E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, M.F. Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Acta Tropica** 103 (2007) 222-230.

# Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*

Angelica Nakamura<sup>a,1</sup>, Renata Stiebler<sup>a,1</sup>, Marcelo R. Fantappiè<sup>a</sup>, Eliane Fialho<sup>b</sup>,  
Hatisaburo Masuda<sup>a</sup>, Marcus F. Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

Received 1 February 2007; received in revised form 7 May 2007; accepted 28 June 2007

Available online 1 July 2007

## Abstract

Retinoic acid and insect juvenile hormone (JH) are structurally related terpenoids which are widespread in nature and are involved in many biological events such as morphogenesis, embryogenesis and cellular differentiation. Here, we investigated the effects of the retinoids 9-cis retinoic acid (9cisRA), all trans retinol (atROH), all trans retinoic acid (atRA) and the juvenoids methoprene (Met) and JH injection on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Overall, we observed that injection of retinoids or juvenoids (120 pmols) in the hemocoel of 4th instar nymphs reduced the percentage of insects which appeared normal in morphology upon moult. Noteworthy, insects exposed to 9cisRA or JH underwent profound morphological changes upon moult, generating abnormal 5th instar nymphs and also markedly increased the death of insects during the moulting process. In addition, reduction in the percentage of insects that moult without any morphological alteration, induced by retinoids or juvenoids treatment, was negatively correlated with insects that both display abnormal moult and those that die during moult. Hemolymphatic phenoloxidase activity in adult male insects injected with 9cisRA, Met and JH were significantly reduced after a bacterial challenge. Together, these results indicate that not only juvenoids but also retinoids play an important role on morphogenesis and on immune response in *R. prolixus*, suggesting that the molecular mechanisms involved in these events recognize the terpenoid backbone as an important structural determinant in insects.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Retinoids; Juvenile hormone; Moult; Phenoloxidase; *Rhodnius prolixus*

## 1. Introduction

A number of physiological processes such as organogenesis, cell proliferation and apoptosis are regulated by steroid and terpenoid hormones in vertebrates

(Blomhoff, 1994). Terpenoid hormones, as the derivatives of retinol (vitamin A), also known as retinoids, act as potent morphogens regulating not only limbs formation but also determining axis development during embryogenesis (Maden, 1993; Thaller and Eichele, 1987). It has been shown that retinoids are major compounds in some insect species, being firstly described in heads of honeybees (Goldsmith, 1958). In insects, retinoids have been implicated in several biological processes from visual cycle (Carlson et al., 1967) to mor-

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 25626755; fax: +55 21 22708647.

E-mail address: [maroli@bioqmed.ufjf.br](mailto:maroli@bioqmed.ufjf.br) (M.F. Oliveira).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.



phogenesis (Nemec et al., 1993). The terpenoid methyl epoxyfarnesoate, known as juvenile hormone (JH), is a major hormone in insects, regulating tissue morphogenesis, vitellogenesis and immune response (Wigglesworth, 1940; Wigglesworth, 1973; Davey, 1987; Rantala et al., 2003). This hormone is produced by corpora allata and plays a central role during development of insects, as interference on the JH hemolymph titer, by allatectomy or through the use of anti-JH activity compounds, results in a variety of morphological alterations like precocious metamorphosis into small adultoids (Jurberg et al., 1997). Curiously, retinoic acid exerted JH-like effect in bugs, leading to abnormal nymphs, embryonic malformations and promoting vitellogenin synthesis in allatectomized adult females (Nemec et al., 1993).

Besides their morphogenetic effects, evidences also suggest that JH plays a key role on insect immune response, as high titres of this hormone have been implicated in humoral immunosuppression in insects (Rolff and Siva-Jothy, 2002). Treatment with JH caused a reduction in both encapsulation rate and on the phenoloxidase activity, a copper-containing enzyme (Sekeris and Mergenhagen, 1964) which plays a major role on insect immune response (Pye, 1974; Li et al., 1989, 1992). In *Manduca sexta*, exogenous JH prevented prophenoloxidase synthesis and consequent melanization, whereas in *Appis mellifera* treatment with the JH analogue pyriproxifen increased both phenoloxidase activity and cuticule melanization (Hiruma and Riddiford, 1988; Bitondi et al., 1998).

Triatomine insects are important vectors of Chagas' disease in Latin America and molecules that would regulate development, embryogenesis and immune response seems to be good candidates to control these insects population (Zerba, 1989; Carmichael et al., 2005; Palli et al., 2005). In this regard, the hemimetabolous kissing bug *Rhodnius prolixus* is a model of study for the biochemistry and physiology among triatomine insects (Atella et al., 2005). Many works have demonstrated the effects of JH, and its analogs, on the moulting process of triatomine insects (Wigglesworth, 1962, 1969; Barret, 1974; Tarrant and Cupp, 1978; de Azambuja et al., 1984; Jurberg et al., 1984). Decapitated *R. prolixus* adults were only able to moult when receive 5th instar nymphs hemolymph, which develop nymphal characters when is exposed to JH (Wigglesworth, 1940). Treatment with precocene II, an anti-JH compound, in nymphs of triatomines increased the moulting time (de Azambuja et al., 1984) and induced the appearance of adultoids with rudimentary wings and deformed genitalia (Jurberg et al., 1986). Also, eggs treated with precocene II resulted on reduced viability while on nymphs, pre-

cocene induced precocious metamorphosis to adultoids from 2nd, 3rd and 5th instar (Tarrant and Cupp, 1978). Thus, in the present work, we investigated the effects of retinoids and juvenoids on moult and phenoloxidase activity in the blood sucking insect *R. prolixus*. By using a comparative approach, our results show, for the first time, that both classes of compounds were capable to interfere with morphogenesis and on humoral immune response in a similar profile, suggesting that the molecular mechanisms involved in these events recognize the terpenoid backbone as an important structural determinant.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

9-cis Retinoic acid, all-trans retinol, all-trans retinoic acid, methoprene and juvenile hormone (Fig. 1) were purchased from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). All other reagents were from analytical grade.

### 2.2. Insects

*Rhodnius prolixus* were reared under controlled conditions of temperature ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $70 \pm 5\%$ ) with a photoperiod of 12 h light and 12 h dark. Adult males and fourth-instar nymphs were fed with rabbit blood.

### 2.3. Compounds injection

Retinoids and juvenoids stock solutions were prepared in 100% ethanol and BHT 1 mg/mL and kept at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Dilutions of stock solutions were prepared in phosphate buffered saline (PBS) at the day of experiment. Fourth-instar nymphs of *R. prolixus* were fed with blood and 12 days later were injected in the hemocoel with 120 pmols of each compound using a Hamilton syringe, in a total volume of  $2 \mu\text{L}$ . Compounds were carefully administered through injection in order to avoid any perforation of internal organs, particularly the midgut. The ethanol concentrations of diluted stock solutions in PBS ranged from 0.338% to 1.025% and the mass of compounds corresponding to 120 pmols were the following: 9cisRA = 36.05 ng/insect, atROH = 34.37 ng/insect, atRA = 36.05 ng/insect, Met = 37.20 ng/insect, JH = 31.96 ng/insect. Control groups were injected with 1.025% ethanol solution diluted in phosphate buffered saline (PBS). This type of control was designed in order to exclude, from the experimental group (injection containing retinoids or

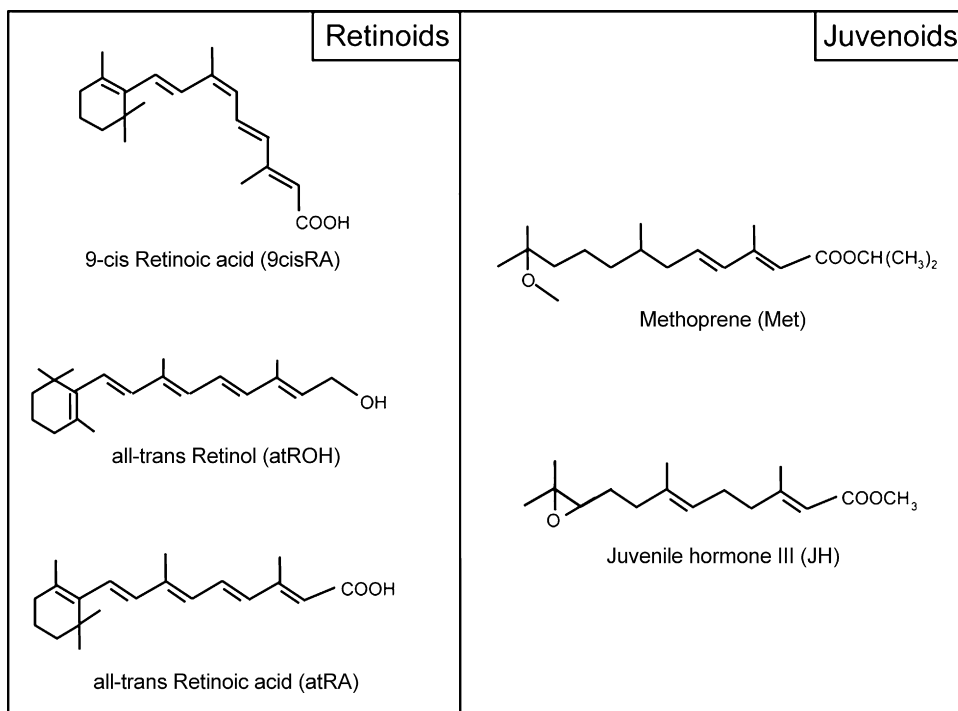


Fig. 1. Molecular structure of retinoids and juvenoids utilized in this study. Left panel: retinoids; right panel: juvenoids. The name of each structure was included inside each panel.

juvenoids), the effect attributed exclusively to the act of injection. After that, insects were observed during the next seven days and classified according to their external morphology in four different groups: (i) nymphs that die before initiating the moulting process; (ii) normal—nymphs that have completed the moult with a normal appearance; (iii) nymphs that have completed the moult but with altered morphology (abnormal) and (iv) nymphs that died during the moulting process (dead during moult). The insects classified as “abnormal” or “dead during moult” were considered related as we assumed that insects which did not successfully conclude the moulting process probably die due to profound morphological abnormalities exhibited. The action of retinoids and juvenoids on general external morphology was examined by comparing control and treated insects every day after treatment under a stereoscopic microscope (Zeiss, Stemi SV11 MC80). Quantification of groups was expressed as percentage of insects.

#### 2.4. Phenoloxidase activity

Phenoloxidase activity was assayed using L-DOPA as substrate. Briefly, adult males of *R. prolixus* were

fed with blood and 3 days later they were injected with 120 pmols of 9cisRA, atROH, Met or JH in the hemocoel. Hemolymph (25  $\mu$ L) was collected at different times after retinoids or juvenoids injection, diluted in PBS pH 7.4 containing anticoagulant solution (10 mM EDTA, 100 mM glucose, 62 mM NaCl, 26 mM sodium citrate and 30 mM citric acid) in the presence of L-DOPA (4 mg/mL) used as substrate and the phenoloxidase activity was determined spectrophotometrically at 470 nm using  $\epsilon = 3715 \text{ mM/cm}^{-1}$  as described in the literature (Daquinag et al., 1995). Twenty hours after retinoids or juvenoids treatment, the insects were challenged by injection of *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $9.4 \times 10^5$  cells) in the hemocoel and the hemolymph collected along different times.

#### 2.5. Statistical analysis

Comparisons between groups were done by one-way ANOVA analysis of variance and a *posteriori* Tukey's test for pair-wise comparisons or correlation analysis in GraphPad ©Prism 4.0 software. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error and considered significantly different at  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$  as indicated in figure legends.

### 3. Results

#### 3.1. Retinoids and juvenoids caused morphological alterations on nymphs of *R. prolixus*

Our first attempt was to investigate the effect of retinoids or juvenoids injection on the moulting process of 4th instar nymphs of *R. prolixus* (Fig. 1). We observed that treatment of insects with retinoids or juvenoids resulted in one of the following events: (i) nymphs that die before initiating the moult; (ii) nymphs that have completed the moult with a normal appearance (normal); (iii) nymphs that have shown morphological abnormalities in the moulting process. Within this group, all insects have shown altered morphology but some have completed the moult (abnormal) while others died during moult (dead during moult). Fig. 2 show some of the external morphological abnormalities observed in retinoids

and juvenoids treated insects. The morphological alterations found in insects were the following: (i) head recurved to the ventral surface of the abdomen (Fig. 2A); (ii) confinement of nymph in the old cuticle (Fig. 2A); (iii) legs abnormally curved (Fig. 2B–E). Among these, the presence of legs abnormally curved (Fig. 2B–E) were the most frequent alteration observed. It is important to notice that retinoids or juvenoids treatment did not induce rudimentary adultoid wings in the morphologically abnormal nymphs, as previously described in the literature for anti-juvenile hormonal compounds (Jurberg et al., 1997). Conversely, retinoids or juvenoids injection of 5th instar nymphs (120 pmols) indicated that overall effects on external morphology upon moult were generally soften, compared to those exhibited by treated 4th instar nymphs (data not shown). Examination of morphologically altered nymphs suggested that the intensities of changes depended on the administered

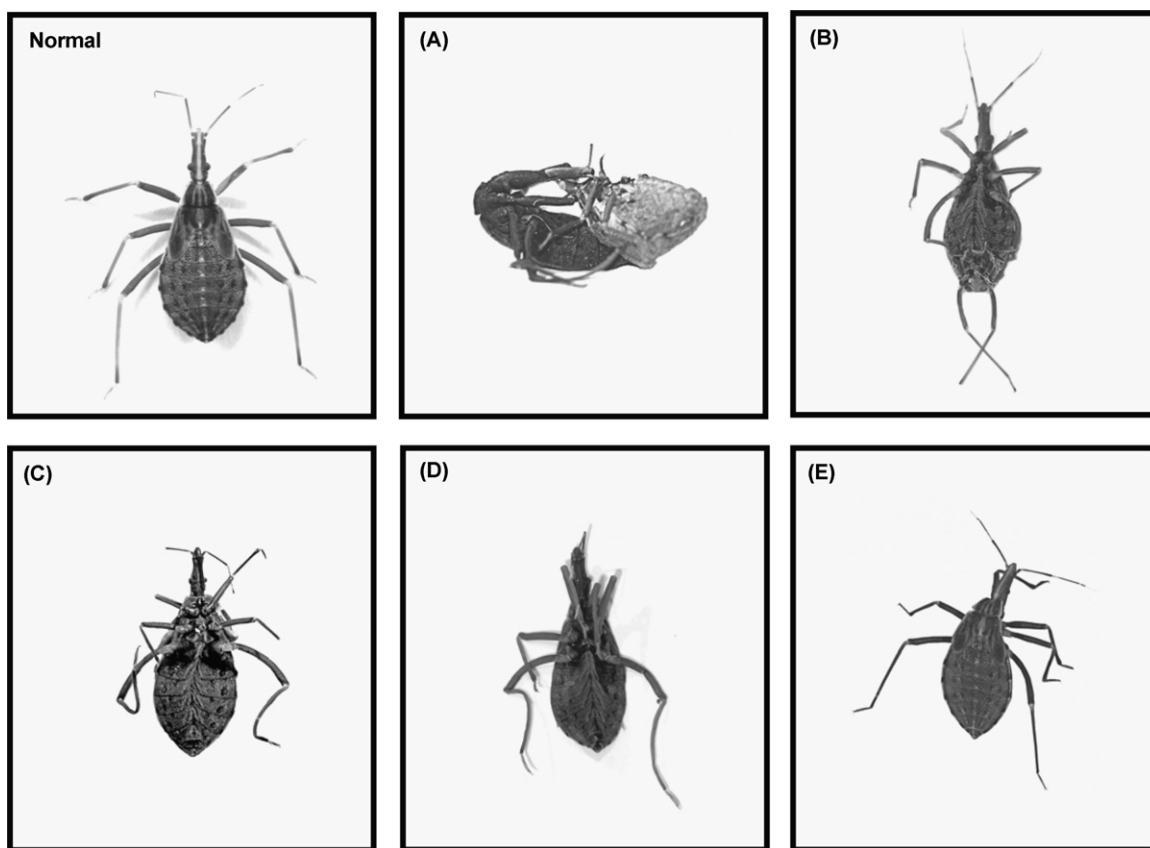


Fig. 2. Morphological alterations promoted by retinoids and juvenoids in *R. prolixus*. Fourth instar nymphs of *R. prolixus* were fed with rabbit blood and 12 days later were injected with 120 pmols of 9cis retinoic acid (9cisRA), all trans retinol (atROH), all trans retinoic acid (atRA), methoprene (Met) or juvenile hormone (JH). The insects began the moulting process in the next day and were observed in the following seven days. The figure shows some of the most frequent external morphological changes induced by these compounds. Normal—insect with normal external morphology. A—Insect dead during the ecdysis and confined within the old cuticle. B–E—Insects that underwent successful ecdysis but exhibit striking abnormalities in their external morphology such as severe bending of legs.

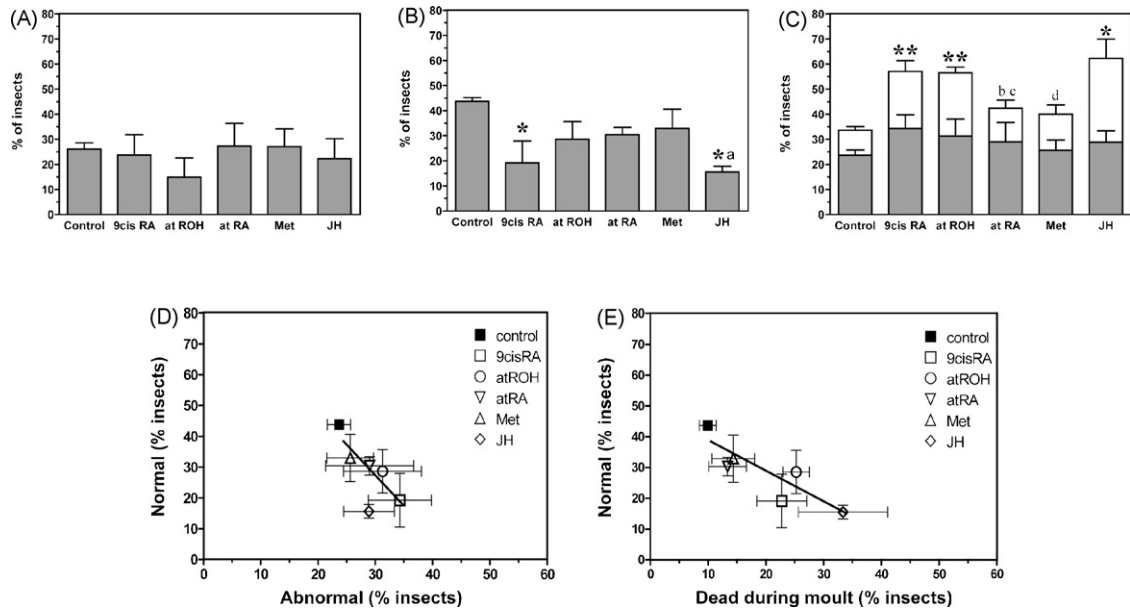


Fig. 3. Quantitative analysis of morphological alterations following treatment with retinoids and juvenoids in fourth instar nymphs of *R. prolixus*. A—Percentage of insects dead before initiating the moulting process; B—percentage of insects that successfully completed the moulting with normal appearance; C—percentage of insects that presented morphological modification. Grey bars mean the insects alive after moulting (abnormal) while white bars mean dead insects during the moulting (dead during moulting); D—correlation between normal moulting and abnormal (Pearson  $r = -0.5674$ ,  $P = 0.0020$ ); E—correlation between normal moulting and dead during moulting (Pearson  $r = -0.6251$ ,  $P = 0.0005$ ). The y-axis of figures D and E correspond to grey and white bars of C, respectively. Statistical differences were represented as following: \* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.05$  (relative to control), <sup>a</sup> $P < 0.05$  (relative to Met), <sup>b</sup> $P < 0.05$  (relative to atROH); <sup>c</sup> $P < 0.001$  (relative to JH); <sup>d</sup> $P < 0.001$  (relative to JH).

compound. In fact, quantification of retinoids and juvenoids effects on moulting and viability of 4th instar nymphs support this hypothesis (Fig. 3). We observed that retinoids or juvenoids treatment did not result in any significant difference in the death before moulting (Fig. 3A), indicating that injection in the hemocoel equally affected the insects regardless of the administered compound, including control. In general, retinoids and juvenoids seem to reduce the percentage of insects that moulting with normal morphology (Fig. 3B), which is particularly significant when we compared the insects treated with 9cisRA ( $19.2 \pm 8.7\%$ ;  $P < 0.001$ ) or JH ( $15.6 \pm 2.2\%$ ;  $P < 0.001$ ) with control ( $43.7 \pm 1.5\%$ ). This indicates that 9cisRA and JH seem to be more powerful modulators of moulting in *R. prolixus* than other compounds tested in this study. Interestingly, we observed a tendency of increase in the percentage of insects with atypical morphology in retinoids or juvenoids treated insects (Fig. 3C, grey bars). However, most of the changes were concentrated on those insects that die during moulting (Fig. 3C, white bars) possibly due to profound morphological alterations, being more pronounced in JH ( $33.3 \pm 7.7\%$ ;  $P < 0.001$ ) and also in 9cisRA ( $22.7 \pm 4.3\%$ ;  $P < 0.05$ ) and in atROH ( $25.2 \pm 2.3\%$ ;  $P < 0.05$ ), compared to control ( $9.93 \pm 1.5\%$ ). Further, most of the changes

induced by 9cisRA or JH in reducing normal moulting, increasing abnormal moulting and death during moulting occurred in the first two days after treatment (data not shown). Interestingly, successful completion of moulting with normal morphology is negatively correlated not only with induction of atypical morphologies in insects treated with retinoids and juvenoids (Fig. 3D, Pearson  $r = -0.5674$ ,  $P = 0.0020$ ) but also with death during moulting (Fig. 3E, Pearson  $r = -0.6251$ ,  $P = 0.0005$ ).

### 3.2. Retinoids and juvenoids reduced hemolymphatic phenoloxidase activity in adult *R. prolixus*

Following the investigations on moulting, we further explored the effects of retinoids and juvenoids treatment by evaluating one of the main components of humoral immunity in insects: the hemolymphatic phenoloxidase activity (Richman and Kafatos, 1996). Fig. 4 shows the pattern of phenoloxidase activity along 96 h in the hemolymph of *R. prolixus* adult males treated with retinoids or juvenoids and challenged with bacterial injection. With exception of JH, in insects treated with all other compounds, phenoloxidase activity increased about three-fold in the first 20 h after injection. Sur-

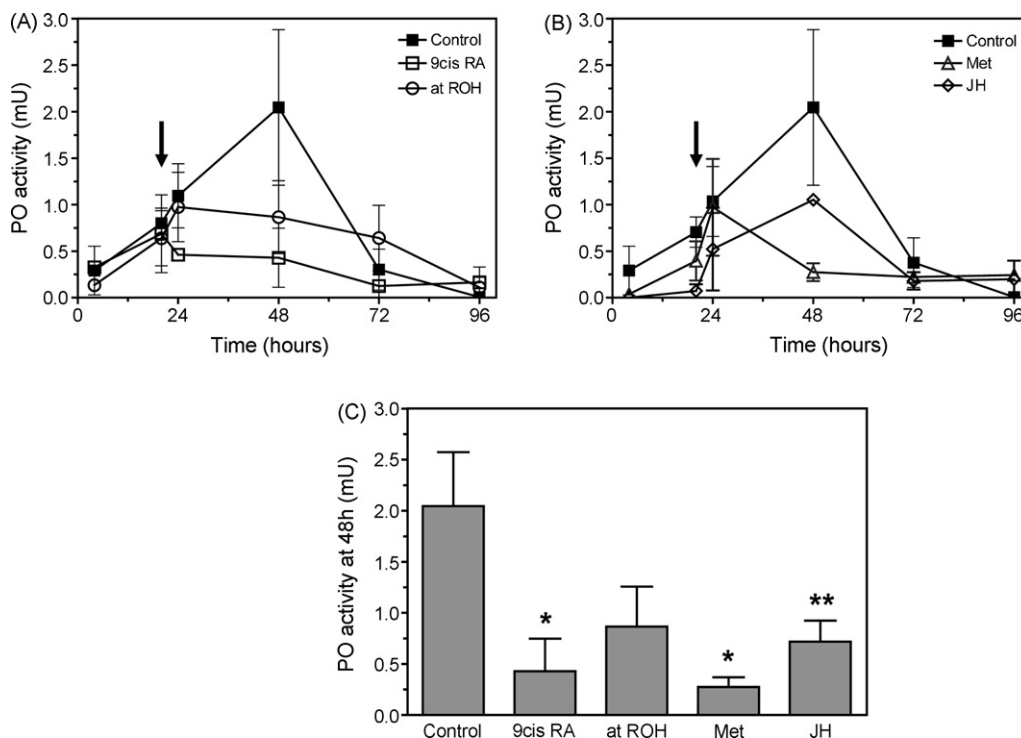


Fig. 4. Effects of retinoids and juvenoids on hemolymphatic phenoloxidase activity. Adult males of *R. prolixus* were injected with 120 pmoles of 9-cis retinoic acid (9cisRA), all trans retinol (atROH), methoprene (met) or juvenile hormone (JH) 3 days after blood meal. The insects were challenged by bacteria injection 20 h after retinoids or juvenoids injection. Hemolymph (25  $\mu$ l) was collected at 4, 20, 24, 48, 72 and 96 h after first injection and was diluted in PBS containing anticoagulant solution in the presence of the substrate L-DOPA (4 mg/mL). Phenoloxidase activity was determined spectrophotometrically at 470 nm using  $\epsilon = 3715$  M/cm. Arrows indicate the time of bacterial challenge. The time course of phenoloxidase activity was evaluated in the hemolymph of retinoids (A) or juvenoids (B) treated insects; C- Phenoloxidase activity at 48 h after retinoids or juvenoids injection. Statistical differences were represented as following: \* $P < 0.01$  and \*\* $P < 0.05$  (relative to control).

prisingly, when insects were challenged by injection of *E. coli* bacteria 20 h after retinoids or juvenoids treatment, we observed that these compounds suppressed the induction of phenoloxidase activity (Fig. 4A and B). This is clearly seen at 48 h of retinoids or juvenoids treatment (Fig. 4C). The group of 9cisRA ( $0.43 \text{ mU} \pm 0.32$ ;  $P < 0.01$ ) and Met ( $0.27 \text{ mU} \pm 0.09$ ;  $P < 0.01$ ) were the most significantly distinct from control ( $2.04 \text{ mU} \pm 0.53$ ) (Fig. 4C). Moreover, exposure to JH also significantly reduced phenoloxidase activity ( $0.718 \text{ mU} \pm 0.21$ ;  $P < 0.05$ ) compared to control. Despite non-significant, exposure of *R. prolixus* to atROH also reduced the bacterial-induced phenoloxidase activity (Fig. 4C). Taken together, the results shown here indicate that both classes of compounds were capable of interfering with insect morphogenesis and humoral immune response in a similar manner.

#### 4. Discussion

The possibility that retinoids would exert JH-like effects on insect metamorphosis was firstly investigated

by Slama, which have shown that fatty acids, fatty alcohols and retinol induced changes during metamorphosis of the bug *Pyrhrocoris apterus* (Sláma, 1962). Curiously, complete inhibition of metamorphosis was achieved by retinoic acid treatment in bugs (Nemec et al., 1993), whereas exposure to retinol accelerated metamorphosis of the diptera *Agnia affinis* (House, 1965). The role of juvenoids in regulating phenoloxidase activity has also been demonstrated in several insect models (Bitondi et al., 1998; Rantala et al., 2003; Rolff and Siva-Jothy, 2002). Although the effects of retinoids and terpenoids in arthropods were observed in different models, a comparative survey of their effects was lacking. Here, we provide this comparison for the first time and based on the presented results we conclude that the terpenoid backbone of juvenoids and retinoids seems to represent an important structural determinant for regulating moult and phenoloxidase activity in *R. prolixus* (Figs. 3 and 4). Notwithstanding, it is important to notice that the terpenoid backbone itself is not sufficient to explain the extent of effects observed on morphogenesis and on humoral immune response. In this way,

it seems that small changes in the terpenoid structure, like those exhibited between 9cisRA and atRA, may be crucial to determine their potency in insects. This is particularly true, when we compared the effects of 9cisRA and atRA on moult (Fig. 3B and C), and also the effects of 9cisRA and atROH on phenoloxidase activity (Fig. 4A and C). Thus, among the retinoids investigated in the present study, it seems that 9cisRA is the best JH-mimic tested. Hence, we conclude that the molecular mechanisms involved on morphogenesis and on humoral immune response in insects are able to recognize the terpenoid backbone as an important structural determinant, which may have their biological activity improved depending on small changes on its structure.

A number of compounds affected arthropod morphogenesis such as ecdysone (Bowers, 1968), juvenoids (Wigglesworth, 1962, 1969; Zdarek and Haragsim, 1974; Barret, 1974; Tarrant and Cupp, 1978; de Azambuja et al., 1984; Jurberg et al., 1984, 1986, 1997) and retinoids (Nemec et al., 1993; Belozerov, 2003, 2004). Previous works carried out in two tick species (*Haemaphysalis* and *Ixodes*), have shown that the effect of retinoic acid on regenerative processes were similar to those of Met (Belozerov, 2003, 2004). Retinoic acid and juvenoids were capable of inducing changes in the Haller's organ of *Haemaphysalis* and also of *Ixodes* (Belozerov, 2001). Unlike juvenoids, retinoic acid can affect not only regeneration, but also normal development of tick Haller's organ (Belozerov, 2003, 2004). Nemec and colleagues have also demonstrated that exposure of last instar nymphs of three different bug species to retinoic acid caused juvenilizing effects in a dose-dependent manner (Nemec et al., 1993). Further, treatment of *P. apterus* and *Dysdercus cingulatus* larvae with retinoic acid caused morphological changes, restored reproduction and also stimulated vitellogenin synthesis (Nemec et al., 1993). However, in that paper (Nemec et al., 1993), it is not specified which isomer of retinoic acid the study was undertaken (possibly the all trans isomer). This is important since small changes on the retinoic acid structure have an impact on their biological activity in insects, as demonstrated in Figs. 3B–E and Fig. 4. Our results indicate that exposure of 4th instar nymphs of *R. prolixus* to retinoids or juvenoids caused morphological changes during the moulting process, producing abnormal nymphs that both have completed the moult and also that died during the moulting process (Fig. 3C). A similar effect was obtained by Barret when 5th instar nymphs of *R. prolixus* were treated with a mixture of JH mimics causing insects death during the moult (Barret, 1974). In both cases, it is conceivable

that death would be a consequence of such profound alterations, thus determining the insect viability. Possibly, the intensity of retinoids and juvenoids effects on *R. prolixus* observed in the present work, were even greater depending both on the time and also the route of compounds administration. In this regard, Barret have shown that earlier the administration of JH mimics along the days after feeding on *R. prolixus* nymphs, greater is the juvenilization effect on insects (Barret, 1974). It is also possible that these compounds were more active if they were topically applied instead of injected through the hemocoel, as this would be metabolized in the cuticule and then released gradually to the hemolymph (Wigglesworth, 1973). However, a seminal study of Wigglesworth have shown that JH and several of its analogues were more active in promoting morphogenetic effects when applied through injection than by topical application (Wigglesworth, 1969).

A number of evidences suggest that retinoids and juvenoids share several biological features, beyond their structural similarities as terpenoid derivatives. Although the mechanisms by which retinoids and juvenoids exert morphogenetic effects in insects are not currently well-known, it is conceivable that these may require the ligand-inducible transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily, like *ultraspiracle* (USP) and the ecdysone receptor (EcR) which is the receptor of ecdysteroid hormones. Supporting these observations, the USP gene product, which is an ortholog of the vertebrate retinoic acid receptor (RXR), seems to have JH as an endogenous ligand, controlling gene expression (Oro et al., 1990; Jones and Sharp, 1997; Jones et al., 2001). Further, Jones and colleagues have recently shown that *Drosophila* USP binds with high affinity to methyl farnesoate, a secreted product of the ring gland, with a strength similar to that of RXR for 9cisRA (Jones et al., 2006). In this context, USP, likewise RXR, form heterodimer complexes with other nuclear receptors, especially with EcR which is necessary for transcriptional activity of target genes like vitellogenin (Yao et al., 1993; Martin et al., 2001). Interestingly, restoration of vitellogenin expression observed in Met or atRA exposed allatectomized females of *P. apterus* (Nemec et al., 1993) may be mediated by USP as JH is able to modulate gene transcription through USP binding (Xu et al., 2002). However, it is important to notice that, mechanistically, retinoids and juvenoids effects may not exclusively depend on the nuclear receptors (Buszczak and Segraves, 1998). For example, it has been demonstrated the presence of a cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Manduca sexta*, which has a ligand binding pocket that can bind retinoic acid and is thought to mediate its effects on mor-

phogenesis (Mansfield et al., 1998). Moreover, a nuclear JH-binding protein of 29 KDa has been found in *M. sexta* epidermis which disappears during moult and seems to be involved in the antimetamorphic effects of JH (Palli et al., 1994).

Regarding the effects of JH on the immune response, there are relatively few studies addressing the role of this hormone on two important components of insects immune system: the hemocytes, which have several important immunological functions in phagocytosis, encapsulation and wound repair (Amdam et al., 2004, 2005) and the hemolymphatic phenoloxidase activity, a key enzyme involved in melanization processes in insects (Andersen, 1985; Rantala et al., 2003; Rolff and Siva-Jothy, 2002). In honeybees, increase in the JH titer induces hemocyte death through nuclear pycnosis leading to a marked decline in immunity (Amdam et al., 2004). An interesting observation was that the prophenoloxidase gene of insects responds to ecdysone and its promoter region contains an ecdysteroid-responsive element (EcRE) that is able to functionally bind to EcR/USP heterodimer (Ahmed et al., 1999). Thus, it is tempting to propose that the immunomodulatory action of JH may depend on its interaction with USP. Our data presented here provide experimental evidence that not only JH and its analog Met, but also 9cisRA, plays a role in modulating *R. prolixus* immune response as increase of phenoloxidase activity after bacterial challenge did not occur in insects exposed to these compounds (Fig. 4C). These data are in agreement with previous studies which show that high titers of JH have been implicated in suppressed immune functions in insects (Rantala et al., 2003; Rolff and Siva-Jothy, 2002).

Thus, based on the data presented here, we conclude that whatever the mechanism which regulates moult and phenoloxidase activity in *R. prolixus* is, a common structural pattern shared between retinoids and juvenoids seems to be recognized by the molecular entities involved in these processes, explaining the similarities of effects exhibited by these two classes of compounds. This common structural pattern seems to rely on the terpenoid backbone, but small changes on its structure are important to determine its effectiveness on *R. prolixus*. Strategies aiming a rational design of molecules that would mimic JH or retinoids biological roles seems to be a potential mechanism of control of this insect vector.

### Acknowledgements

We are grateful to Mr. José de S. L. Junior and Mrs. Litiane M. Rodrigues for the excellent tech-

nical support. This investigation received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases through the South-South Initiative Programme (A60265). MFO, MRF and HM are research scholars from CNPq.

### References

- Ahmed, A., Martin, D., Manetti, A.G., Han, S.J., Lee, W.J., Mathiopoulos, K.D., Muller, H.M., Kafatos, F.C., Raikhel, A., Brey, P.T., 1999. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 14795–14800.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Exp. Gerontol. 39, 767–773.
- Amdam, G.V., Aase, A.L., Seehuus, S.C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., Hartfelder, K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. Exp. Gerontol. 40, 939–947.
- Andersen, S.O., 1985. Sclerotization and tanning of the cuticle. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford, pp. 59–74.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A.C., Masuda, H., 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. An. Acad. Bras. Cienc. 77, 405–430.
- Barret, F.M., 1974. Effect of topical application of a juvenile hormone mimic on the duration of the moulting cycle in fifth instar *Rhodnius*. J. Insect Physiol. 20, 1507–1514.
- Belozero, V.N., 2001. Regeneration of limbs and sensory organs in Ixodid ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae). Russ. J. Dev. Biol. 32, 129–142.
- Belozero, V.N., 2003. Effects of juvenoids and retinoic acid on development of larvae and nymphs in the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari, Ixodidae) and regeneration of Haller's organ during metamorphosis. Russ. J. Dev. Biol. 34, 42–50.
- Belozero, V.N., 2004. Specific features of Haller's organ regeneration in the tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari, Ixodidae) in the presence of methoprene and retinoic acid. Russ. J. Dev. Biol. 35, 168–173.
- Bitondi, M.M., Mora, I.M., Simões, Z.L., Figueiredo, V.L., 1998. The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. J. Insect Physiol. 44, 499–507.
- Blomhoff, R., 1994. Transport and metabolism of vitamin A. Nutr. Rev. 52, S13–S23.
- Bowers, W.S., 1968. Juvenile hormone: activity of natural and synthetic synergists. Science 161, 895–897.
- Buszczak, M., Segraves, W.A., 1998. *Drosophila* metamorphosis: the only way is USP? Curr. Biol. 8, 879–882.
- Carlson, S.D., Steeves, H.R., Vandenberg, J.S., Robbins, W.E., 1967. Vitamin A deficiency: effect on retinal structure of the moth *Manduca sexta*. Science 158, 268–270.
- Carmichael, J.A., Lawrence, M.C., Graham, L.D., Pilling, P.A., Epa, V.C., Noyce, L., Lovrecz, G., Winkler, D.A., Pawlak-Skrzecz, A.,

- Eaton, R.E., Hannan, G.N., Hill, R.J., 2005. The x-ray structure of a hemipteran Ecdysone receptor ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* 280, 22258–22269.
- Daquinag, A.C., Nakamura, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Tsukamoto, T., 1995. Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2964–2968.
- Davey, K.G., 1987. Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 103–108.
- de Azambuja, P., Furtado, A.F., Garcia, E.S., 1984. Effects of juvenile hormone analogue on ecdysis prevention induced by precocene in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 419–423.
- Goldsmith, T.H., 1958. The visual system of the honeybee. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 123–126.
- Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1988. Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 130, 87–97.
- House, H.L., 1965. Effects of vitamin A acetate and structurally related substances on growth and reproduction of *Agria affinis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae). *J. Insect Physiol.* 11, 1039–1045.
- Jones, G., Sharp, P.A., 1997. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13499–13503.
- Jones, G., Wozniak, M., Chu, Y., Dhar, S., Jones, D., 2001. Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 33–49.
- Jones, G., Jones, D., Teal, P., Sapa, A., Wozniak, M., 2006. The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand. *FEBS J.* 273, 4983–4996.
- Jurberg, J., Costa, J.M., Gonçalves, T.C.M., Garcia, E.S., Azambuja, P., 1984. Morphogenetic effects of precocene II on nymphs of *Rhodnius prolixus* (STAL. 1859) (Hemiptera – Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 397–407.
- Jurberg, J., Costa, J.M., Gonçalves, T.C., Garcia, E., de Azambuja, P., 1986. Biomorphogenetic changes caused by the application of precocene II in nymphs of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81, 171–184.
- Jurberg, J., Galvão, C., Bowers, W.S., Garcia, E.S., Azambuja, P., 1997. Biomorphological alterations induced by an anti-juvenile hormonal compound, 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl furfuryl ether, on three species of Triatominae larvae (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 263–268.
- Li, J.Y., Tracy, J.W., Christensen, B.M., 1989. Hemocyte monophenol oxidase activity in mosquitoes exposed to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* 75, 1–5.
- Li, J.Y., Tracy, J.W., Christensen, B.M., 1992. Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 41–48.
- Maden, M., 1993. The homeotic transformation of tails into limbs in *Rana temporaria* by retinoids. *Dev. Biol.* 159, 379–391.
- Mansfield, S.G., Cammer, S., Alexander, S.C., Muehleisen, D.P., Gray, R.S., Tropsha, A., 1998. Molecular cloning and characterization of an invertebrate cellular retinoic acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6825–6830.
- Martin, D., Wang, S.F., Raikhel, A.S., 2001. The vitellogenin gene of the mosquito *Aedes aegypti* is a direct target of ecdysteroid receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 173, 75–86.
- Nemec, V., Kodrčák, D., Svatoopluk, M., Laufer, H., 1993. Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. *J. Insect Physiol.* 39, 1083–1093.
- Oro, A.E., McKeown, M., Evans, R.M., 1990. Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* 347, 298–301.
- Palli, S.R., Touhara, K., Charles, J.P., Bonning, B.C., Atkinson, J.K., Trowell, S.C., Hiruma, K., Goodman, W.G., Kyriakides, T., Prestwich, G.D., 1994. A nuclear juvenile hormone-binding protein from larvae of *Manduca sexta*: a putative receptor for the metamorphic action of juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6191–6195.
- Palli, S.R., Hormann, R.E., Schlattner, U., Lezzi, M., 2005. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. *Vitam. Horm.* 73, 59–100.
- Pye, A.E., 1974. Microbial activation of prophenoloxidase from immune insect larvae. *Nature* 251, 610–613.
- Rantala, M.J., Vainikka, A., Kortet, R., 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proc. R. Soc. Lond.* 270, 2257–2261.
- Richman, A., Kafatos, F.C., 1996. Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 14–19.
- Rolff, J., Siva-Jothy, M.T., 2002. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9916–9918.
- Sekeris, C.E., Mergenhang, D., 1964. Phenoloxidase system of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *Science* 145, 68–69.
- Sláma, K., 1962. The juvenile hormone-like activity of fatty acids, fatty alcohols and other compounds in insect metamorphosis. *Acta. Soc. Ent. Czechoslov.* 59, 323–340.
- Tarrant, C.A., Cupp, E.W., 1978. Morphogenetic effects of precocene II on the immature stages of *Rhodnius prolixus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 666–668.
- Thaller, C., Eichele, G., 1987. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 625–628.
- Wigglesworth, V.B., 1940. The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 17, 201–222.
- Wigglesworth, V.B., 1962. The juvenile hormone effect of farnesol and some related compounds: quantitative experiments. *J. Insect Physiol.* 9, 105–119.
- Wigglesworth, V.B., 1969. Chemical structure and juvenile hormone activity: comparative test on *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 15, 73–94.
- Wigglesworth, V.B., 1973. Assays on *Rhodnius* for juvenile hormone activity. *J. Insect Physiol.* 19, 205–211.
- Xu, Y., Fang, F., Chu, Y., Jones, D., Jones, G., 2002. Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.* 269, 6026–6036.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., Evans, R.M., 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476–479.
- Zdarek, J., Haragsim, O., 1974. Action of juvenoids on metamorphosis of the honey-bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 20, 209–221.
- Zerba, E.N., 1989. Chemical control of Chagas disease vectors. *Biomed. Environ. Sci.* 2, 24–29.



# CURRICULUM VITAE

Nome: Angelica Nakamura

Nascimento: 18/07/1977

Naturalidade: São Paulo

## Formação Acadêmica

- Graduação em Nutrição pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, fevereiro/2001.
- Mestrado em Nutrição Humana no Instituto de Nutrição Josué de Castro – Universidade Federal do Rio de Janeiro, julho/2003.

## Co-orientação de Estudante

1. Fabiana Alves Casanova – iniciação científica de julho/2002 a julho/2003
2. Renata Stiebler – iniciação científica de setembro/2003 a março/2006
3. Thais da Cunha Canuto - iniciação científica de julho/2006 a julho/2007

## Comunicação em Congresso

- 18 comunicações em congressos

## Publicações

1. CASANOVA, F. A., **NAKAMURA, A.**, MASUDA, H., LIMA, L. M. T., FIALHO, E. (2008). Functionality of phosphorylated vicilin exposed to chemical and physical agents. Food Chemistry. , v.107, p.1138 – 1143.
2. **NAKAMURA, A.**, STIEBLER, R., FANTAPPIE, M. R., FIALHO, E., MASUDA, H., OLIVEIRA, M. F. (2007). Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Acta Tropica. , v.103, p.222 – 230.
3. FIALHO, E., **NAKAMURA, A.**, MASUDA, H., SILVA NETO, M. A. C. (2005). Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Arch Biochem Biophys. , v.435, p.246 – 253.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)