

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A importância de ácidos nucleicos extracelulares para o sistema imune de *Rhodnius prolixus*: possível envolvimento na resposta contra a toxina derivada de urease, Jaburetox.

Matheus Vinícius Coste Grahl

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, outubro de 2018.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A importância de ácidos nucleicos extracelulares para o sistema imune de *Rhodnius prolixus*: possível envolvimento na resposta contra a toxina derivada de urease, Jaburetox.

Matheus Vinícius Coste Grahl

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientação:

Prof^a. Dr^a. Fernanda Stanisçuaski
Centro de Biotecnologia (CBIOT) – UFRGS

Co-orientação:

Prof. Dr. Leonardo Fruttero
Universidad Nacional de Córdoba - CONICET - Argentina.

Porto Alegre, outubro de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), sob orientação da Prof^a. Dra. Fernanda Stanisquaski e co-orientação do Dr. Leonardo Luis Fruttero. Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Dizem que o tempo muda tudo,
mas não é verdade. Fazer as coisas é que
muda algo, não fazer nada deixa as coisas
do jeito que estão”.*

Hugh Laurie

AGRADECIMENTOS

Palavras! Em diversas ocasiões não temos noção do poder das palavras, da força que elas tem e da capacidade mudar a vida das pessoas. Em outros momentos palavras são apenas letras unidas das quais falamos sem o devido valor. Mas, em inúmeros momentos, as palavras são expressões que não temos a coragem para dizê-las.

Para começar preciso agradecer aquelas pessoas que sempre entenderam quando eu não estive disponível para apreciar vossas companhias. A todos os meus queridos amigos, sejam de infância ou da faculdade, agradeço por juntos termos construído uma relação da qual eu posso chamar de família!

Agradeço a Dra. Celia Carlini que há cerca de 4 anos acreditou em mim e permitiu que eu ingressasse a este grupo do Laprotox/LaNeurotox no qual pude conhecer pessoas sensacionais e crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Dentre essas pessoas existem nomes que se sobressaem dos demais.

Dentre essas pessoas agradeço especialmente os meus “pais acadêmicos”. O Dr. Leonardo Fruttero e a Dra. Natalia Moyetta, esse casal de argentinos que me adotou em 2015 e ao longos dos anos sempre me apoiou e incentivou em todas as minhas conquistas. Vocês são um exemplo que eu sigo até hoje. Agradeço por demonstrarem a beleza que é estudar e aprender.

Agradeço à minha orientadora Dra. Fernanda Stanisçuaski que me aceitou como orientado e teve a maior paciência do mundo para ultrapassar todas as questões burocráticas que tivemos durante este período e me auxiliar no decorrer do processo de formação de um mestre.

Aos colegas que adquiri neste grupo de laboratório e que hoje, não são apenas colegas, mas sim amigos. Dr. Augusto Uberti e Natalia Callai obrigado por melhorarem as tardes de convivência no laboratório. Obrigado Dra. Fernanda Lopes por estar sempre disposta a auxiliar seus colegas.

Agradeço aos meus Dindos, Eliane e Leonel, que há 23 anos são meus principais torcedores e estão sempre a me apoiar. Obrigado por todo amor e carinho que vocês sempre me deram.

Aos meus avôs, em especial ao meu avô Darcy, que quando vivo me ensinou muitas coisas sobre a vida, sobre o amor e sobre percorrer seus sonhos. Agradeço por mesmo depois de tudo, ainda me ensinar e servir de inspiração. Só queria que soubesse que farei o meu melhor para cumprir com a minha promessa.

Se este momento ocorre é porque faz 23 anos que duas pessoas (Curt e Elisa) acreditam em mim, me apoiam, incentivam e não desistem de mim, mesmo que eu dê motivos para isso, ainda que eu mesmo desista de mim. Sei que não sou o melhor filho do mundo, o mais expressivo ou demonstre ser o mais carismático mas saibam que eu levo vocês como exemplos de vida, exemplos de batalha e dedicação. Obrigado por desde criança me incentivarem com pequenos gestos tão simples, porém, tão simbólicos que hoje eu consigo ver a importância que estes pequenos incentivos tiveram na minha vida. Amo muito vocês.

Obrigado ao meu irmão André que sempre serviu como um exemplo de persistência e dedicação assim como os modelos que tivemos de nossos pais e avôs. No papel e importância que um irmão mais velho tem com relação ao mais novo tu conseguistes exercer a influência e exemplo que serviu/servem de espelho para mim.

Meu convívio neste laboratório possibilitou conhecer aquela pessoa que veio a se tornar a minha melhor amiga e como se isso não bastasse essa pessoa se tornou minha namorada. Essa conquista não seria possível sem sua ajuda, Ana Paula. Nosso convívio tornou as manhãs mais alegres (apesar do meu ranço por acordar) e fez dos meus dias mais fáceis. Do teu lado até passar um domingo de sol estudando se tornou interessante. A vida ficou mais colorida depois de te conhecer. Eu desejo o mundo para nós, desejo uma vida inteira de incentivo, apoio e amor como foram durante este período. Eu te amo

Além destas pessoas, agradeço ao meu grande (ou fisicamente pequeno) companheiro, Buddy. Meu amigo que, possivelmente, foi o que mais me apoiou nessa trajetória. Foram inúmeras as madrugadas em que ele estava lá deitado apenas me assistindo estudar e nunca reclamou, ou latiu! Foram diversas as vezes em que eu tive que trocar um carinho para poder escrever/estudar e lá estava ele com seus olhos de “gato de botas”. Obrigado por mesmo assim continuar sendo meu pequeno parceiro, Buddy.

Sumário

Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução.....	15
1.1. Ureasas	15
1.2. Jaburetox	17
1.3. Sistema Imune de Insetos	19
1.3.1. Barreiras Físicas	21
1.3.2. Respostas Celulares.....	21
1.3.3. Resposta Humoral	23
1.4. <i>Rhodnius prolixus</i>	26
2. Objetivo Geral	28
2.1. Objetivos específicos	28
3. Manuscrito	29
Abstract.....	31
1. Introduction	32
2. Materials and Methods	33
2.1. Chemicals	33
2.2. Jaburetox production.....	34
2.3. Insects	35
2.4. RNA extraction.....	35
2.5 <i>In vivo</i> insect treatments	35
2.6. Hemocyte aggregation assays	36
2.7. Phenoloxidase activity assay.....	36
2.8. Immunocompetence assay	36
2.9. Quantification of ETs.....	37
2.10. Fluorescent microscopy	37
2.11. Viability and ROS production in cell culture	38
2.12. Statistical analysis	38
3. Results	39
3.1. Cellular response	39
3.2. Humoral response	41

3.3. Immunocompetence assay	42
3.4. ETs release	43
3.5. Effect of Jbtx on ROS production and cell viability	46
4. Discussion.....	47
5. Acknowledgements.....	51
4. Discussão Geral	53
5. Conclusão geral	59
6. Perspectivas	59
7. Referências.....	60
Apêndice A.....	74
1. Introdução.....	75
2. Materiais e métodos	77
2.1. Imunofluorescência	77
2.2. Modelagem molecular e atracamento molecular.....	78
3. Resultados e discussão	79
4. Perspectivas	84
5. Referências.....	85
Apêndice B.....	89
Apêndice C.....	91
Apêndice D.....	93
Curriculum Vitae	95

Lista de Abreviaturas

Jbtx: Jaburetox

PO: Fenoloxidase

ROS: Espécie Reativa de Oxigênio

RNS: Espécie Reativa de Nitrogênio

ETs: Armadilhas Extracelulares (do inglês *Extracellular Traps*)

RNAet: Ácido Ribonucleico Extracelular

RNA: Ácido Ribonucleico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

NBT: *Nitroblue Tetrazolium*

MTT: *3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*

JBU: Urease Majoritária de *Canavalia ensiformis* (do inglês *Jack Bean Urease*)

CNTX: Canatoxina

UAP: UDP-*N*-Acetilglicosamina Pirofosforilase

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

PAMPs: Padrão Molecular Associado a Patógeno (do inglês *Pathogen Associated*

Molecular Pattern)

AMPs: Peptídeos Antimicrobianos

PKC: Proteína Quinase C

NADPH oxidase: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase

PHOX: Oxidase Fagocítica

MPO: Mieloperoxidase

NE: Elastase Neutrofílica (do inglês *Neutrofil elastase*)

PAD4: Peptidil Arginina Deaminase 4

Pro-PO: Pro-Fenoloxidase

FBS: Soro Fetal Bovino

CFU: Unidades Formadoras de Colônia

OD: Densidade Óptica

PB: Tampão Fosfato

LPS: lipopolissacarídeo

COX: Cicloxigenase

UDP-GlcNac: UDP-*N*-acetilglicosamina

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GPIA: Âncoras de glicosilfosfatidilinositol

Resumo

Ureases são enzimas que catalisam a hidrólise de ureia para formar amônia e dióxido carbono, sendo produzidas por plantas, fungos e bactérias. A toxina de estudo, Jaburetox, é um peptídeo recombinante derivado de uma das isoformas de urease presentes em *Canavalia ensiformis*. Esta molécula mostrou toxicidade a insetos de diferentes ordens quando administrada oralmente ou por injeção e, além disso, apresenta atividades antifúngica e bacteriostática, não exibindo efeitos tóxicos para mamíferos, demonstrando um enorme potencial biotecnológico. Em estudos realizados com *Rhodnius prolixus*, um dos principais vetores da Doença de Chagas na América Latina, observamos que o Jaburetox é capaz de interagir com hemócitos, células do sistema imune. Concomitante a esta interação, também demonstramos que o peptídeo é capaz de induzir a agregação de hemócitos, característica da resposta celular, e também é capaz de aumentar a atividade da fenoloxidase (PO), enzima envolvida na resposta humoral dos insetos. Estes efeitos sugerem que o peptídeo é capaz de ativar o sistema imune dos insetos. Os insetos apresentam somente imunidade inata, sendo esta subdividida em resposta celular e humoral. A resposta celular, mediada por hemócitos, é caracterizada pela fagocitose, agregação e encapsulação de patógenos. Em contraste, a resposta humoral é representada pela produção de peptídeos antimicrobianos, melanização desencadeada pela enzima PO e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Recentemente, outro mecanismo de resposta imune inata tem sido estudado: as armadilhas extracelulares - *Extracellular Traps* (ETs), sendo bem caracterizadas em mamíferos, porém pouco estudadas em insetos. As ETs são armadilhas de ácidos nucleicos extracelulares associados a proteínas citoplasmáticas, que podem auxiliar na captura e na morte de patógenos. Essa resposta é desencadeada por receptores extracelulares de células granulares que induzem o aumento de Ca^{2+} intracelular, levando à produção de ROS, que parece ser parte fundamental para liberação dos ácidos nucleicos, permitindo com que estes passem para o citoplasma e associem-se com as proteínas. O presente estudo tem como objetivo avaliar o papel de ácidos nucleicos extracelulares na resposta imune e na proteção contra o peptídeo entomotóxico Jaburetox. As respostas imunológicas foram avaliadas por meio da contagem de agregados, através de hemocitômetro, e por ensaio colorimétrico para dosar alterações da resposta humoral, 6 e 18 h após injeção de Jaburetox e/ou RNA extracelular (RNAet). A liberação de RNA e DNA foi avaliada 6 h pós injeção de tratamentos para ensaios *in vivo* e

1 h pós incubação para ensaios *in vitro*, através do kit Qubit RNA HS e Qubit dsDNA HS. Para avaliar a liberação de ROS e viabilidade celular, realizamos culturas de hemócitos, que foram tratados por 24 h com Jaburetox. Por fim, avaliamos a imunocompetência dos insetos após tratamentos com Jaburetox, RNAet ou Jaburetox + RNAet e desafiamos o inseto contra uma bactéria patogênica. A hemolinfa dos insetos foi coletada e unidades formadoras de colônia foram mensuradas pelo método de *drop-plate*. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o RNAet é capaz de ativar as defesas do organismo, tanto celular quanto humoral e, quando associado à toxina, apresentam um efeito protetor. Jaburetox não foi capaz de induzir alterações na liberação de ácidos nucleicos em nenhuma das abordagens, mas modificou a liberação de ROS na dose de 6 μ M. A viabilidade celular não foi alterada em nenhuma das condições testadas. Nos ensaios de imunocompetência, observamos que o peptídeo modula a resposta do organismo, deixando-o mais susceptível a infecções. Os tratamentos com RNAet desencadeiam uma resposta protetora. Nossos dados sugerem que o RNAet modula as defesas do organismo de forma benéfica para combater patógenos, enquanto que o Jaburetox, nas condições testadas, não induz resposta imune através de ETs, mas torna o inseto mais susceptível a infecções por patógenos. Os presentes achados enfatizam a importância dos ácidos nucleicos extracelulares para as defesas imunológicas em insetos. Também elucidamos os efeitos desencadeados pelo peptídeo, aprimorando os conhecimentos referentes a esta toxina, enfatizando o potencial uso deste composto como um bioinseticida.

Abstract

Ureases are enzymes that catalyze the hydrolysis of urea to form ammonia and carbon dioxide, being produced by plants, fungi and bacteria. The studied toxin, Jaburetox, is a recombinant peptide derived from one of the urease isoforms present in *Canavalia ensiformis*. This molecule showed toxicity to insects of different orders when administered orally or by injection and, in addition, presents antifungal and bacteriostatic activities, not exhibiting toxic effects to mammals, demonstrating an enormous biotechnological potential. Studies with *Rhodnius prolixus*, one of the main vectors of Chagas' disease in Latin America, have shown that Jaburetox is capable of interacting with hemocytes, the cells of the immune system. Concomitant with this interaction, we also demonstrated that the peptide induces hemocyte aggregation, a characteristic of the cellular response, and is also capable of increasing the activity of phenoloxidase (PO), an enzyme involved in the humoral response in insects. These effects suggest that the peptide is able of activating the insect immune system. Insects present only innate immunity, which is subdivided into cellular and humoral responses. The cellular response, mediated by hemocytes, is characterized by phagocytosis, aggregation and encapsulation of pathogens. In contrast, the humoral response is represented by the production of antimicrobial peptides, melanization triggered by the PO enzyme and the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Recently, another mechanism of innate immune response has been studied: the Extracellular Traps (ETs), being well characterized in mammals, but little studied in insects. ETs consist of extracellular nucleic acids associated with cytoplasmic proteins that may aid in the capture and killing of pathogens. This response is triggered by extracellular granular cell receptors that induce the increase of intracellular Ca^{2+} , leading to the production of ROS, which appear to play a key role in the release of nucleic acids, allowing them to pass into the cytoplasm and associate with proteins. The present study aims to evaluate the role of extracellular nucleic acids in the immune response and protection against the entomotoxic peptide Jaburetox. Immunological responses were evaluated by means of hemocytometer counting and by colorimetric assays to measure changes in the humoral response, 6 and 18 h after injection of Jaburetox and/or extracellular RNA (RNAet). The release of RNA and DNA was evaluated 6 h post injection of treatments for *in vivo* assays and 1 h post incubation for *in vitro* assays, using the Qubit RNA HS and Qubit dsDNA HS kits. In order to evaluate the release of ROS and

the cell viability, hemocyte cultures were treated for 24 h with Jaburetox. Finally, the immunocompetence was evaluated after treatment with Jaburetox, RNAet or Jaburetox + RNAet and challenging the insects with a pathogenic bacterium. Hemolymph of the insects was collected and colony forming units were measured by the drop-plate method. The results obtained in this work indicated that RNAet is able to activate the organism defenses, both cellular and humoral, and displays a protective effect when associated with the toxin. Jaburetox was not able to induce changes in the release of nucleic acids in any of the approaches, but modified the release of ROS at the dose of 6 μ M. Cell viability was not altered in any of the conditions tested. In the immunocompetence assays, we observed that the peptide modulates response of the organism, making it more susceptible to infections. RNAet treatments elicit a protective response. Our data suggest that RNAet modulates the insect defenses in a beneficial way to fight pathogens, while Jaburetox, in the conditions tested, does not induce an immune response through ETs, but makes the insect more susceptible to pathogen infections. The present findings emphasize the importance of extracellular nucleic acids for immune defenses in insects. We also elucidate the effects triggered by the peptide, improving the knowledge regarding this toxin, reinforcing its potential use as a bioinsecticide.

1. Introdução

1.1. Ureases

As ureases (ureia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são um grupo de diversas metaloenzimas dependentes de níquel que possuem atividade ureolítica, atuando na formação de amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂), a partir da reação de hidrólise da molécula de ureia (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

As ureases são produzidas em uma grande diversidade de organismos incluindo plantas, fungos, leveduras e bactérias, contudo não são sintetizadas por animais. Evolutivamente, estas moléculas apresentavam uma composição original de três cadeias. Porém, através de um evento único na evolução, ureases de fungos e plantas alteraram suas conformações para uma cadeia única, em processo de fusão das três cadeias ancestrais (LIGABUE-BRAUN et al., 2013).

A urease é encontrada abundantemente em sementes de *Canavalia ensiformis*, sendo sua principal isoforma a *jack bean urease* (JBU), que corresponde de 0,07 à 0,14 % do peso seco das sementes (KRAJEWSKA, 2009). A JBU é um hexâmetro formado por monômeros com massa molecular em torno de 90 kDa, contendo cerca de 840 aminoácidos, e possuindo dois átomos de níquel em seu sítio ativo (Fig. 1) (CARLINI & POLACCO, 2008). Estudos demonstram que a JBU possui propriedades independentes da sua atividade ureolítica, como atividades entomotóxica e antifúngica, atividade pró-inflamatória, ativação da agregação plaquetária, além de estar envolvida em processos de neurotoxicidade (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012; DEFFERRARI et al., 2014; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).



Figura 1. Organização tridimensional do monômero da urease majoritária (JBU) de *C. ensiformis* (PDB ID 3LA4).

Em 1981, foi isolada a partir do extrato bruto de sementes da *C. ensiformis* uma neurotoxina nomeada como canatoxina (CNTX), e posteriormente caracterizada como uma isoforma de urease (FOLLMER et al., 2001). A CNTX representa cerca de 0,5 % do peso da semente e sua principal estrutura é um dímero não covalente de uma cadeia polipeptídica de 95 kDa (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). Em seu sítio ativo, esta enzima possui um átomo de zinco e um de níquel em cada subunidade (FOLLMER et al., 2004). A CNTX é letal para ratos, quando injetada por via intraperitoneal (DL₅₀ 2,0 mg/kg), causando convulsões tônicas precedendo a morte; quando administrada por via oral, não possui efeito tóxico (CARLINI & GUIMARÃES, 1981; CARLINI et al., 1984; FOLLMER et al., 2001). A CNTX induz diversas atividades biológicas independentes da sua atividade enzimática, como agregação plaquetária (CARLINI et al., 1985), exocitose em mastócitos, neutrófilos, macrófagos e sinaptossomas de cérebro, processos em que não ocorre perda da integridade da membrana celular. Estes efeitos de algum modo são mediados por metabólitos derivados de lipoxigenase (CARLINI et al., 1985; BARJA-FIDALGO et al., 1991; RIBEIRO-DA SILVA et al., 1993). Também demonstrou-se que a CNTX é capaz de perturbar o transporte de Ca²⁺ pelas vesículas de membranas (ALVES et al., 1992). Além disso, a CNTX apresentou efeitos entomotóxicos para insetos de diferentes ordens (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). Este efeito letal para os insetos está relacionado à liberação de um peptídeo (pepcanatox, ~10 kDa) gerado após a clivagem pelas enzimas digestivas do tipo catepsinas do inseto (CARLINI et al., 1997b; FERREIRA-DASILVA et al., 2000). Por outro lado, em insetos com diferentes tipos de enzimas digestivas, esse efeito tóxico não é observado (Fig. 2).



Figura 2. Esquema representativo da formação do peptídeo pepcanotox (em verde) em insetos com sistema digestório baseado em enzimas do tipo catepsina ou tipo tripsina.

1.2. Jaburetox

A partir da sequência do N-terminal do pepcanotox, derivado da canatoxina, um peptídeo recombinante foi gerado com base no gene da JBURE-II da *C. ensiformis*. Apresentando 93 aminoácidos e um peso molecular de ~11 kDa, esta proteína foi batizada como Jaburetox-2Ec. Posteriormente, o gene foi reclonado em um novo vetor e então a proteína purificada foi denominada apenas Jaburetox (Jbtx) (Fig. 3) (MULLINARI et al., 2007; POSTAL et al., 2012). Este peptídeo é tóxico para insetos de diferentes ordens, incluindo aqueles não suscetíveis à CNTX e JBU. Jbtx não demonstrou efeitos tóxicos em roedores (ratos e camundongos) e zebrafish, apresentando, portanto, grande potencial biotecnológico para uso no controle de insetos (MULLINARI et al., 2007; MARTINELLI et al., 2014; KAPPAUN, 2018).

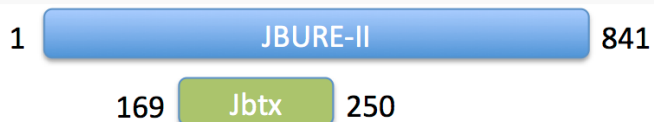


Figura 3. Esquema representativo da localização do Jbtx dentro da sequência de JBURE-II. Obtido de laneurotox.net.br

MARTINELLI et al. (2014) realizaram ensaios na busca dos domínios responsáveis pelas atividades do Jbtx, avaliando os efeitos das regiões N e C-terminal do peptídeo. A porção N-terminal do Jbtx é a principal responsável pela atividade entomotóxica, sendo também capaz de interagir com membranas lipídicas, enquanto que a região C-terminal interage fortemente com membranas lipídicas e apresenta poucos efeitos entomotóxicos. A união de ambas as partes é fundamental para um amplo efeito do peptídeo.

O Jbtx é uma potente toxina com um amplo campo de atuação apresentando, além da atividade entomotóxica, atividade antifúngica e bacteriostática (POSTAL et al., 2012; MARTINELLI et al., 2014b; BECKER-RITT et al., 2017). Desde sua identificação, diversas linhas de pesquisa surgiram para elucidar como ocorrem os mecanismos que fazem do Jbtx uma potente toxina para insetos.

Em 2009, utilizando *Rhodnius prolixus* como modelo, STANISÇUASKI et al. (2009) demonstram que Jbtx era capaz de interagir com fatores de membrana que levavam ao aumento de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), alterando o transporte de íons e induzindo a inibição da secreção pelos túbulos de Malpighi. No mesmo ano BARROS et al. (2009) explanaram que o Jbtx interage com membranas lipídicas e promove a permeabilização das mesmas, resultados que foram corroborados por PIOVESAN et al. (2014), que demonstraram a capacidade da toxina de induzir a formação de poros transmembranares em membranas artificiais.

Dados prévios do nosso grupo indicam que o Jbtx é capaz de afetar o sistema nervoso e neurolocomotor de insetos (GALVANI et al., 2015). Em 2015, Galvani e colaboradores trataram com Jbtx insetos da espécie *Triatoma infestans* (inseto hematófago vetor da doença de Chagas) e observaram movimentos anormais das antenas, paralisia das pernas e extensão da probóscide. A interação entre o Jbtx e o sistema nervoso central dessa espécie foi confirmada através de ensaios de imunohistoquímica e Western blot. Através dos resultados de microscopia, mostrou-se que o Jbtx estava presente em regiões neuronais que expressam óxido nítrico sintase (NOS), enzima envolvida na sinalização nitrinérgica,

possivelmente explicando as alterações neurolocomotoras. Corroborando com estes dados, os autores também observaram uma diminuição da atividade da enzima NOS. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que o Jbtx é capaz de interagir fisicamente com a enzima UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP). Em *T. infestans* homogeneizados do sistema nervoso central apresentaram atividade enzimática da UAP aumentada, efeito também observado em *R. prolixus* (GALVANI et al., 2015; FRUTTERO et al., 2017).

Recentemente, nosso grupo tem expandido os estudos deste peptídeo para avaliar seu mecanismo de ação no sistema imune de insetos. Nossos dados mostram que as células do sistema imune são alvos do peptídeo. A toxina é capaz de interagir com os hemócitos em diferentes períodos pós tratamento e localiza-se em diversas regiões (núcleo, citoplasma e superfície celular). Essa localização não assume um padrão único com o decorrer do tempo (MOYETTA et al., 2017). Além disso, também foi demonstrado que o peptídeo afeta o sistema imune de *R. prolixus* desencadeando a agregação de hemócitos, induzindo a resposta imune celular de uma maneira dependente de cicloxigenase e de Ca^{2+} . Jaburetox também leva ao aumento da atividade de fenoloxidase (PO), enzima presente na resposta imune humoral, mas não induz alterações nas atividades de lisozima e cecropinas. Ademais, comprovamos que o Jbtx não modifica a atividade de NOS, enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) que induz formação de radicais livres que atuam em diferentes rotas metabólicas, auxiliando nas defesas imunológicas. Quando o inseto tratado com Jbtx é desafiado contra uma bactéria patogênica, a toxina atua de forma imunossupressora. No entanto, não observamos alterações da atividade fagocítica que possam explicar esta imunossupressão (FRUTTERO et al., 2016).

1.3. Sistema Imune de Insetos

Em organismos multicelulares a resposta contra infecções pode ser dividida em imunidade inata e adquirida. Na imunidade adquirida o organismo multiplica as células que apresentam receptores específicos para os antígenos invasores, permitindo que ocorra o desenvolvimento de uma memória imunológica, já que estas células são mantidas durante longos períodos. Já a imunidade inata está presente no organismo desde o nascimento e depende somente do reconhecimento e sinalização para acarretar na morte de patógenos invasores (FEARON, 1997). Em insetos, não ocorre a imunidade adquirida, apenas uma imunidade inata bem desenvolvida (LAVINE & STRAND, 2002).

A primeira linha de defesa, a imunidade inata, consiste de barreiras físicas e, após a invasão de patógenos na cavidade celomática, a resposta pode ser subdividida em celular e humoral (LAVINE & STRAND, 2002; MORET & MOREAU, 2012). A imunidade celular é caracterizada pela ação dos hemócitos (células de defesa) na resposta de fagocitose, agregação e encapsulação, enquanto que a imunidade humoral inclui a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS), complexos enzimáticos que regulam a cascata da melanização e coagulação (Fig. 4) (AZAMBUJA et al., 2016; HILLYER, 2016). Para a ativação do sistema imune inato é necessário o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs), que desencadeiam cascatas de sinalização induzindo a ativação das respostas imunes (ZHANG et al., 2015). Concomitante com o sistema imune, outros órgãos atuam contra a invasão de patógenos, como o intestino, corpo gorduroso e sistema circulatório (AZAMBUJA et al., 2016).

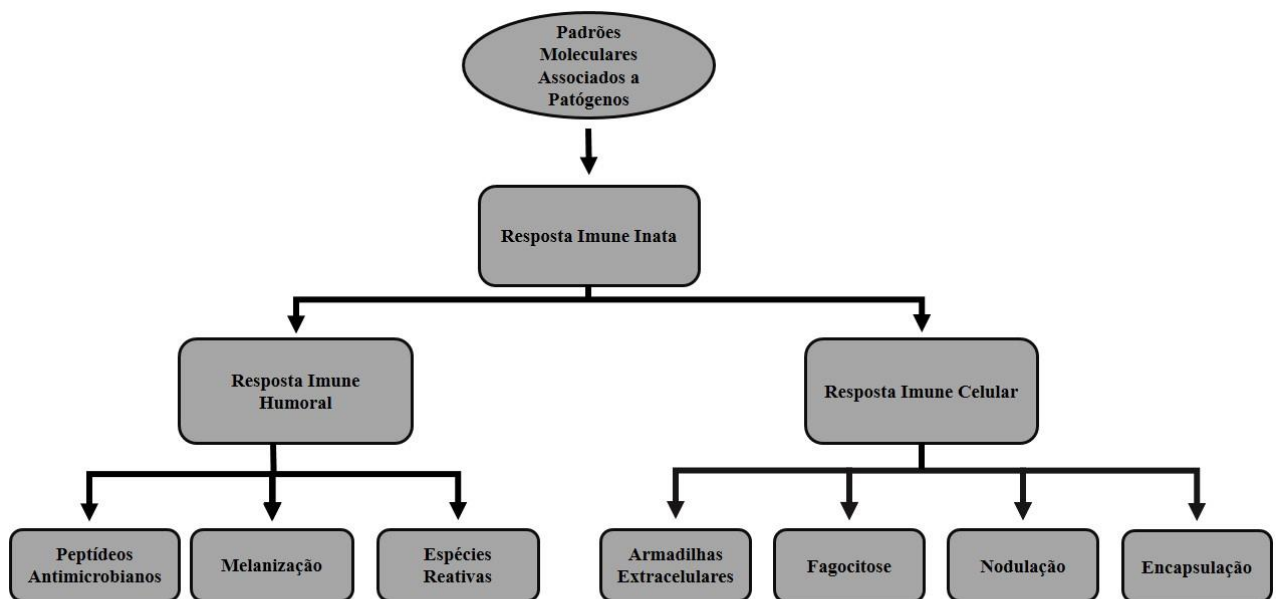


Figura 4. Esquema representativo da resposta imune de invertebrados.

1.3.1. Barreiras Físicas

A primeira linha de defesa dos artrópodes é seu exoesqueleto de quitina, um dos componentes da cutícula. Essa cutícula atua como uma barreira física diminuindo a probabilidade de infecções por parasitas ou micro-organismos (MORET & MOREAU, 2012). O exoesqueleto apresenta resistência mecânica em consequência de sua espessura e arquitetura. A cada muda, a cutícula se renova e torna-se necessária a esclerotização do exoesqueleto. Isto ocorre pela presença de enzimas como PO, lacase e tirosinase, que catalisam a formação de quinonas e, como consequência, formam depósitos de melanina nas proteínas cuticulares e quitina (ANDERSEN et al., 1996; ANDERSEN, 2010). A atividade destas enzimas também pode ser direcionada contra patógenos que ultrapassam a cutícula, representando uma barreira intermediária entre o exoesqueleto e a hemocele do inseto (GOLKAR et al., 1993). Associado a estes danos na cutícula, as células da epiderme apresentam outra resposta bioquímica, através da produção de AMPs, tais como as cecropinas (BREY et al., 1993).

1.3.2. Respostas Celulares

1.3.2.1. Fagocitose

A fagocitose é uma resposta imune conservada evolutivamente, sendo utilizada tanto por vertebrados quanto por invertebrados para destruição de pequenos organismos, que sejam reconhecidos como estranhos. Esta resposta é desencadeada rapidamente quando PAMPs são reconhecidos por receptores proteicos das células imunes, levando a internalização das partículas estranhas em um fagossomo, que então se funde a um lisossoma, formando um fagolisossoma, onde enzimas hidrolíticas digerem o corpo estranho (HILLYER, 2016; HILLYER & STRAND, 2014).

1.3.2.2. Encapsulação

A encapsulação é uma resposta imune utilizada quando patógenos são grandes demais para serem fagocitados. A encapsulação é desencadeada por proteínas do organismo invasor que são reconhecidas por hemócitos (PECH & STRAND, 1995). As

células granulares, quando ativadas, se aderem através da ligação de integrinas para formar uma camada de células que irá envolver o patógeno. Dentro da cápsula o invasor é morto pela degranulação ou lise dos granulócitos, que acabam por despejar seu conteúdo diretamente no patógeno, atraindo outras células do sistema imune. Esta resposta também pode ocorrer pela produção local de ROS e RNS ou por asfixia (NAPPI et al., 1995; PECH & STRAND, 1996). Além disso, a melanina produzida pela enzima PO (ver seção 1.3.3.2) pode ser depositada na superfície de parasitas encapsulados (AZAMBUJA et al., 2016).

1.3.2.3. Agregação ou Nodulação

A agregação é outra resposta imune conservada evolutivamente e também necessita de reconhecimento por PAMPs para ser desencadeada (LAVINE & STRAND, 2002). Neste processo, as células circulantes sofrem alterações morfológicas para que se tornem células aderentes e possam contribuir para uma resposta efetiva (SATYAVATHI & ASHA MINZ, 2014). A nodulação tem como finalidade a captura de micro-organismos através do envolvimento de múltiplos hemócitos para retenção e morte do patógeno. Esta resposta também está associada a melanização dos agregados e geração de ROS (RATCLIFFE & GAGEN, 1977).

1.3.2.4. Armadilhas extracelulares (ETs)

As ETs são um mecanismo de defesa que, aparentemente, foi conservado durante a evolução, sendo evidenciado desde plantas até humanos. Entretanto, sua descoberta é relativamente recente e existem poucos estudos avaliando esta resposta em insetos (TAKEI et al., 1996; WEN et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2018). As ETs são caracterizadas pela liberação dos ácidos nucleicos para o meio extracelular com a finalidade de capturar e matar patógenos. Não se sabe exatamente como é desencadeado seu mecanismo de liberação, havendo duas hipóteses propostas na literatura: a ETose suicida e ETose vital (YANG et al., 2016).

A ETose suicida ocorre quando receptores de membrana são acionados pelos seus ligantes, induzindo os estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático a liberarem íons Ca^{2+} no citoplasma (BRINKMANN et al., 2004; MUNKS et al., 2010; GARCIA-ROMO et al., 2011). A elevação de Ca^{2+} intracelular acaba aumentando a atividade da proteína quinase C (PKC) que realiza a fosforilação da proteína de membrana $\text{gp91}^{\text{phox}}$, permitindo que a

subunidade citosólica se ligue a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) para se agrupar em um complexo funcional designado como oxidase fagocítica (PHOX) nas membranas citoplasmáticas, levando a um aumento de ROS (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; KAPLAN, 2013). Em consequência do aumento de ROS, ocorre a inibição de caspases e o rompimento da membrana nuclear, liberando seu conteúdo para o citoplasma, onde se associa a proteínas citoplasmáticas, principalmente mieloperoxidase (MPO) e neutrofil elastase (NE) (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010). A ruptura da membrana plasmática permite que as ETs sejam liberadas, acarretando porém na perda de viabilidade da célula de origem (LI et al., 2010; HEMMERS et al., 2011). Concomitante a esse processo de rompimento do núcleo, ocorrem estímulos que levam a proteína peptidil arginina deaminase 4 (PAD4) a realizar uma modificação pós-traducional em histonas, convertendo uma arginina em citrulina e ocasionando a eliminação da carga positiva dos resíduos, enfraquecendo, assim, a ligação das histonas ao DNA, tornando-o desenovelado e favorecendo a interação com proteínas citosólicas (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

Em contrapartida, a ETose vital ocorre quando os receptores de membrana são estimulados e a célula, através de vesículas, libera uma porção dos seus ácidos nucléicos mitocondriais para o meio externo. Ainda não está claro o mecanismo exato dessa liberação, no entanto sabe-se que ROS estão envolvidas no processo (PILSCZEK et al., 2010; YIPP et al., 2012, 2013; BYRD et al., 2013). Independente da via, a captura dos micro-organismos fígados pelas ETs tem sido associada a uma possível interação eletrostática entre a superfície bacteriana carregada positivamente e as fibras de cromatina carregadas negativamente, enquanto que a morte dos patógenos tem sido proposta pela ação de peptídeos antimicrobianos ligados às redes de ácidos nucléicos (BRINKMANN et al, 2007; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

1.3.3. Resposta Humoral

1.3.3.1. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)

No ambiente em que os invertebrados vivem diversos micro-organismos desafiam constantemente o sistema imune dos insetos (LEHANE, 2005). Neste contexto, os insetos desenvolveram uma resposta imune para controlar a proliferação de micróbios, baseada na síntese de diversas moléculas, peptídeos ou enzimas com funções antimicrobianas

(HOFFMANN, 2014). Estas moléculas são produzidas em diferentes órgãos associados ao sistema imune, como o corpo gorduroso, células epiteliais, glândulas salivares, intestino e estruturas reprodutivas (SAMAKOVLIS et al., 1991; COCIANCICH et al., 1994; LANZMENDOZA et al., 1996; ROSETTO et al., 1996; BULET et al., 1999; HOFFMANN et al., 2014). AMPs oriundos dos hemócitos e do corpo gorduroso são diretamente secretados na hemolinfa, espalhando-se por todo o corpo do inseto, enquanto que os AMPs sintetizados pelos outros órgãos exercem uma resposta imune local.

Atualmente são conhecidos em torno de quatrocentos tipos de AMPs, tendo como os mais estudados as cecropinas, atacinas, defensinas e diptericinas (RATCLIFFE et al., 2011; AZAMBUJA et al., 2016). Existe uma grande variação entre as estruturas destas proteínas, bem como diversos mecanismos de ação antimicrobiana, como a capacidade de permeabilizar membranas microbianas, atuar como moléculas de adesão celular, regular a atividade de receptores de superfície celular ou atuar na transdução de sinal (LANZMENDOZA et al., 1996; ROSETTO et al., 1996; BULET et al., 1999; AZAMBUJA et al., 2016).

1.3.3.2. Melanização

Após a exposição ao micro-organismo, o sistema imune realiza o reconhecimento de PAMPs que desencadeiam a resposta de melanização, conduzida principalmente pelo zimogênio pro-fenoxidase (Pro-PO), derivado da lise de oenócitos (células do sistema imune) (HILLYER et al, 2003). A melanização é um processo de extrema importância para o inseto, uma vez que essa cascata enzimática está envolvida em diferentes respostas fisiológicas, como morte de bactérias, fungos, parasitas, vermes nematoides e ovos de vespas parasitoides (HILLYER et al, 2003). A melanização está associada a outros mecanismos mencionados anteriormente afetando, através da produção de melanina por hemócitos, patógenos encapsulados ou agregados. Na melanização, a morte do organismo ocorre devido à formação de uma camada de melanina entorno do patógeno invasor, formando um ambiente hostil mediado por danos oxidativos e isolamento de nutrientes oriundos da hemolinfa, acarretando em morte por inanição (CERENIUS et al, 2008; CHRISTENSEN et al., 2005; NAPPI & CHRISTENSEN, 2005). Além disso, a melanização auxilia no escurecimento e endurecimento do exoesqueleto do inseto após a muda (SUSSMAN, 1949; WYATT, 1961).

A principal cascata de melanização ocorre através de serino-proteases que acionam enzimas ativadoras de Pro-PO, clivando o zimogênio Pro-PO em PO. A PO hidroxila a tirosina formando dopa, a PO acaba por oxidar a dopa gerando dopaquinona que é então convertida em dopacromo. A enzima de conversão do dopacromo transforma este produto em 5,6-dihidroindol, que é oxidado pela PO originando indol-5,6-quinona que, juntamente com proteínas da hemolinfa, forma cápsulas melanóticas. Como consequência desta rota metabólica muitos produtos tóxicos são gerados, sendo necessária uma regulação da via. Os principais inibidores da cascata de PO são as serpinas (Fig. 5) (AZAMBUJA et al., 2016; HILLYER, 2016).

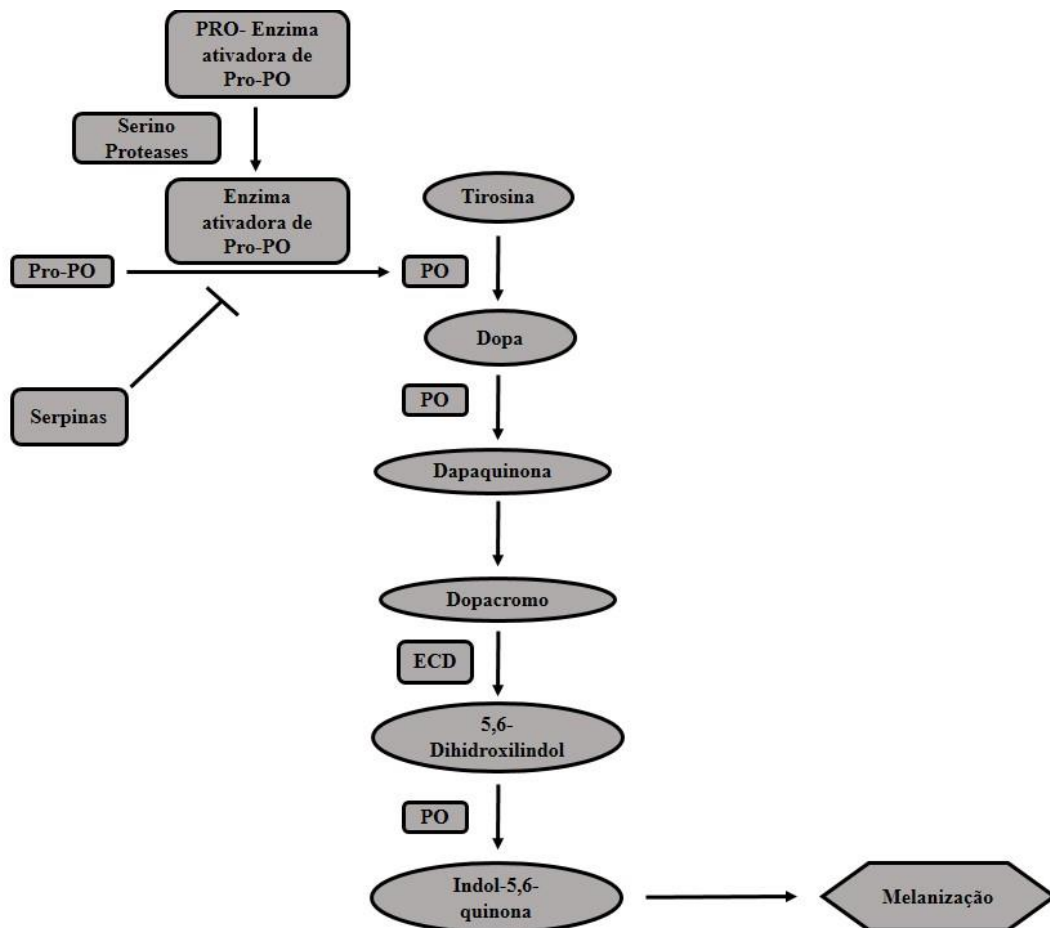


Figura 5. Principal via metabólica para formação da melanização. Cascata enzimática da Pro-fenoloxidase (Pro-PO). PO, fenoloxidase; ECD, enzima conversora de dopacromo. Obtido de HILLYER, 2016.

1.3.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio ou Nitrogênio (ROS ou RNS)

Espécies reativas são radicais livres, moléculas gasosas com um elétron desemparelhado na última camada eletrônica (BAYIR, 2005). Estas moléculas são produzidas normalmente durante o metabolismo pela família enzimas da NADPH oxidase (NOX) (ALDERTON et al., 2001). Os radicais livres são de extrema importância para funções fisiológicas e imunológicas em invertebrados, estando envolvidos em reações enzimáticas, transporte de elétrons mitocondriais, transdução de sinais, ativação de fatores de transcrição nuclear, expressão genica e ação antimicrobiana (NAPPI et al., 1995; BAYIR, 2005). Além disso, ROS e RNS induzem dano oxidativo ao DNA, desencadeiam a peroxidação lipídica de ácidos graxos das membranas celulares e também podem causar a oxidação de proteínas alterando suas funções fisiológicas ou levando a perda de função (SHACTER et al., 1995; BAYIR, 2005; NUNES-DA-FONSECA et al., 2016).

1.4. *Rhodnius prolixus*

R. prolixus é um inseto hematófago conhecido popularmente como “barbeiro”, pertencente a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Triatomíneos são importantes vetores da Doença de Chagas (SMYTH, 1990). Em decorrência dos seus hábitos alimentares, os insetos ingerem sangue infectado com o parasita *Trypanosoma cruzi* que penetram no organismo e passam para o sistema digestivo. Durante a próxima alimentação do inseto ocorre a injúria ao tecido do hospedeiro e o inseto, ao se alimentar, elimina junto com suas fezes o parasita. A injúria ocasionada é uma porta de entrada para o parasita. As consequências geradas pelo *T. cruzi* podem levar o hospedeiro definitivo, no caso o homem, à morte, tendo como principais implicações cardiomiopatia, megaesôfago e megacólon (NUNES-DA-FONSECA et al., 2016).

R. prolixus é um dos principais vetores da Doença de Chagas no norte da América do Sul podendo estar presente em ambientes urbanos, suburbanos ou agrícolas (SMYTH, 1990). Estes insetos possuem um ciclo de vida com metamorfose incompleta (hemimetábolo), passando durante seu desenvolvimento por sete etapas, necessitando sempre de uma nova alimentação de sangue para realizar uma muda (Fig. 6). As etapas vão de ovos, ninfas de primeiro a quinto instar até chegarem a fase adulta (NUNES-DA-FONSECA et al., 2016).

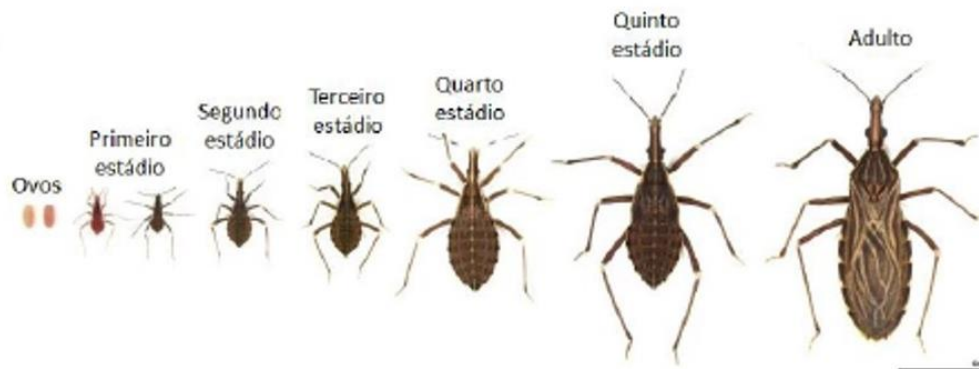


Figura 6. Ciclo evolutivo de *R. prolixus*. Modificado de <http://science-explained.com/blog/project/egg-immunity-in-the-kissing-bug-the-carrier-of-chagas-disease/>

Graças ao seu uso em estudos de fisiologia e bioquímica de insetos nos anos de 1930 pelo Dr. Vincent Wigglesworth, esta espécie tem sido utilizada como modelo em diversas pesquisas de âmbito morfológico, bioquímico, fisiológico e comportamental (WIGGLESWORTH, 1934, 1936, 1940a, 1940b; ALVARENGA et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; AZAMBUJA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; PAIM et al., 2017; TABARES et al., 2018). Além de uma base da literatura que apoie o uso destes insetos, características morfológicas e metabólicas adicionam razões para a utilização de *R. prolixus* como modelo, principalmente seu tamanho razoável e seu curto ciclo de vida (quando comparado com outros triatomíneos). Além disso, seu genoma foi recentemente sequenciado (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2013; MESQUITA et al., 2015).

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é determinar o papel dos ácidos nucleicos extracelulares na resposta dos insetos ao tratamento com o peptídeo Jbtx, aprofundando o conhecimento sobre o mecanismo de ação da toxina no sistema imune.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do Jbtx e o papel do RNA extracelular (RNAet) na resposta imune celular e humoral de *R. prolixus*;
- Averiguar a imunocompetência do inseto quando desafiado com o Jbtx associado ao RNAet;
- Compreender a resposta imune de ETose em um inseto modelo, bem como avaliar os efeitos da toxina nesta resposta;
- Avaliar se Jbtx é capaz de induzir alterações da viabilidade celular;
- Averiguar alterações da liberação de ROS em hemócitos tratados com Jbtx.

3. Manuscrito

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão dessa dissertação estão dispostas na forma de manuscrito, o qual será submetido para o periódico *Developmental & Comparative Immunology* (ISSN: 0145-305X). O título do manuscrito será “**The importance of extracellular nucleic acids for the immune system of *Rhodnius prolixus*: possible involvement in the response against the urease derived toxin, Jaburetox.**”. Posterior ao manuscrito está disposto apêndices referentes a diversas atividades complementares que foram realizadas ao longo deste período.

The importance of extracellular nucleic acids for the immune system of *Rhodnius prolixus*: possible involvement in the response against the urease derived toxin, Jaburetox.

Matheus V. Coste Grahl^a, Ana Paula A. Perin^a, Fernanda C. Lopes^a, Barbara N. Porto^b, Giancarlo Pasquali^{a,d}, Leonardo L. Fruttero^c, Fernanda Stanisçuaski^{a,d,*}

^aGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bInstitute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^cBrain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Building 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dDepartment of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eDepartment of Clinical Biochemistry, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Córdoba, Argentina.

* Corresponding author:

Fernanda Stanisçuaski

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431, laboratory 214 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: Fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (FS),

Co-authors e-mail addresses: anaperin.app@gmail.com (APAP), fernanda.cortez@ufrgs.br (FCL), barbara.porto@puhrs.br (BNP), pasquali@cbiot.ufrgs.br (GP), leonardofruttero@gmail.com (LLF), fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (FS)

Abstract

The insect defense system consists of a set of complex innate reactions that are fundamental for the survival of these species. Extracellular traps (ETs) are extracellular nucleic acids associated with cytoplasmic proteins that may aid in the capture and killing of pathogens. Jaburetox is a recombinant peptide derived from a urease of the plant *Canavalia ensiformis*. Jaburetox showed toxic effects in the Chagas' disease insect vector *Rhodnius prolixus*, affecting its immune response. The present study aims to evaluate the role of extracellular nucleic acids in the immune response and protection against the entomotoxic peptide Jaburetox. The insects were injected with extracellular RNA (RNAet) and/or Jaburetox and six or eighteen hours after the injections the cellular and humoral responses were assessed. We also evaluated the release of ETs by Jaburetox and performed immunocompetence assays using a pathogenic bacterium. Our results demonstrate the importance of RNAet in promoting an immunocompensation in the insect's defenses against Jaburetox.

Keywords

Immune system, mechanism of action, extracellular traps, extracellular nucleic acids, *Rhodnius prolixus*.

1. Introduction

Ureases (urea amidohydrolases, EC 3.5.1.5) are nickel-dependent metalloenzymes that hydrolyze urea, releasing ammonia and carbon dioxide (Mobley & Hausinger, 1989). These proteins are produced by a wide variety of organisms including plants, fungi, yeasts and bacteria, but are not synthesized by animals (Ligabue-Braun et al., 2013). Previous studies have shown that ureases display several properties independent of its ureolytic activity, including entomotoxic, antifungal and neurotoxic actions, among others (Stanisçuaski and Carlini et al., 2012; Carlini and Ligabue-Braun, 2016; Becker-Ritt et al., 2017).

Canatoxin, one of the urease isoforms produced by the legume *Canavalia ensiformis* demonstrated high toxicity to insects. When ingested, canatoxin is cleaved by cathepsin-like enzymes from the insect gut, releasing an entomotoxic peptide. However, insects with other types of digestive enzymes are not susceptible to the toxin (Carlini et al., 1997a; Ferreira-da Silva et al., 2000). The toxic peptide was produced in a recombinant system by *Escherichia coli* and was called Jaburetox-2Ec, after a new variant was named only Jaburetox (Jbtx) possessing ± 11 kDa (Mulinari et al., 2007; Postal et al., 2012). Jaburetox is toxic to insects from different orders, including those not susceptible to canatoxin, but presents no toxic effects for at least two mammal species, thus showing great biotechnological potential (Mulinari et al., 2007; Tomazetto et al., 2007b; Martinelli et al., 2014).

Insects do not have an adaptive immune response. Instead, they present well-developed innate immunity, consisting of cellular and humoral responses (Lavine and Strand, 2002). In the cellular response, the reactions are mediated by hemocytes and includes phagocytosis, nodulation and encapsulation (Azambuja et al., 2016). On the other hand, the humoral response is mediated by complex cascades and pattern recognition events that lead to the production of antimicrobial peptides (AMPs) (Lowenberger, 2001), hemolymph coagulation, melanization (Muta et al., 1996; Marmaras et al., 2009), reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) production (Bogdan et al., 2018) and prophenoloxidase activation (Lu et al., 2014).

Hemocytes are insect cells that display similar functions to neutrophils (Pancer et al., 2006). In mammals, neutrophils are capable of generating an important defense response against pathogens through the release of neutrophil extracellular traps (NETs).

This novel immune response mechanism, termed NETosis, is characterized by ROS-dependent release of loose chromatin into the cytoplasm where it is associated with proteins that showed antimicrobial properties. This complex is then released to the extracellular medium where it can trap and kill pathogens (Brinkmann et al., 2004; Urban et al., 2006). Due to the fact that other cell types such as monocytes, macrophages and eosinophiles present a similar response, the name of the mechanism of nucleic acid release was changed to ETosis (Bartneck et al., 2010; Webster et al., 2011; Andrea et al., 2016; Ko et al., 2018).

ETosis has been described in several species such as chickens, harbor seals, goats, fishes, cats, mice and cows (Lippolis et al., 2006; Ostojic et al., 2007; Andreassen et al., 2009; Wardini et al., 2010; Silva et al., 2014; Reichel et al., 2015; Andrea et al., 2016). In addition, ETosis was recently reported in invertebrate species including oysters, crabs, shrimps and cockroaches (Ng et al., 2013; Poirier et al., 2014; Robb et al., 2014; Nascimento et al., 2018), although is still uncharacterized in insects.

Previous findings of our group showed that Jbtx affects the immune system of *Rhodnius prolixus* (the main insect vector of the Chagas disease), triggering cellular and humoral responses. However, this activation of the immune response mediated by Jbtx does not protect the insect against pathogenic bacteria, inducing an immunosuppressive effect (Fruttero et al., 2016). It has been demonstrated that hemocytes are a target of Jbtx, and the peptide can be detected in different cell locations (nucleus, cytoplasm and cell surface) (Moyetta et al., 2017). Within this context, the aim of this work was to study the mechanism of action of the toxin in *R. prolixus* immune response. In particular, we focused on the interaction between Jbtx and extracellular nucleic acids, in order to investigate a possible modulation of the toxic response induced by the peptide. In addition, we contributed to increase the knowledge about the role of ETs in the insect immunity.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

PureLink[®] RNA Mini Kit, nitroblue tetrazolium (NBT), Qubit[™] dsDNA HS assay kit, Qubit[™] RNA HS assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), thiazolyl

blue tetrazolium bromide (MTT), L-DOPA, lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* O111:B4, poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were purchased from the indicated commercial sources.

2.2. Jaburetox production

The recombinant peptide used in this study was expressed and purified as described by Lopes et al. (2015) with modifications. The *E. coli* BL21 (DE3) RIL cells harboring the coding sequence for Jbtx were cultured in 20 mL of LB (Luria Bertani) Broth, supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 40 µg/mL chloramphenicol. The culture was grown overnight at 37 °C under agitation (180 rpm) and then used to inoculate 1 liter of auto induction medium [10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L glycerol, 3.3 g/L (NH₄)₂SO₄, 6.8 g/L KH₂PO₄, 7.1 g/L Na₂HPO₄, 0.12 g/L MgSO₄, 0.5 g/L glucose and 2 g/L lactose, with 100 µg/mL ampicillin and 40 µg/mL chloramphenicol], that was cultured at 37 °C, 180 rpm, until the culture absorbance (A₆₀₀) reached 0.6. Then, protein expression was induced overnight, at 20 °C with agitation (180 rpm). An extra dose of 200 µg/mL ampicillin was added before the induction period. After induction, the culture was centrifuged at 8000 × g for 10 min at 4 °C. The cells were resuspended in 50 mL buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole) and sonicated (20 cycles of 1 min, 20 kHz frequency). The final cell lysate was centrifuged at 14,000 × g for 40 min at 4 °C, to remove the cellular debris. The supernatant was submitted to a Ni(II)-loaded 5 mL Chelating Sepharose column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) previously equilibrated in buffer A. The supernatant was subjected to three passages through the column and then, the affinity resin was washed with more than 20 column volumes with buffer A. Weakly bound contaminants were removed by increasing the imidazole concentration of the buffer to 70 mM and washing the column exhaustively. Jbtx elution was performed using 500 mM imidazole and the flow through was collected in 5 mL fractions. The protein concentration was measured in each fraction by the Bradford method (Bradford, 1976) and the fractions with higher protein content were pooled and submitted to a size exclusion chromatography, using a HiLoad Superdex 200 prep grade 26/600 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pre-equilibrated with buffer B (50 mM

phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA and 1 mM TCEP). The protein elution was followed by absorbance at 280 nm. Sample purity was assessed by SDS-PAGE 12 % (Laemmli, 1970). Fractions containing Jbtx were pooled and concentrated using 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filters (Merk Millipore, Darmstadt, Germany).

2.3. Insects

The experiments were performed with fifth instar nymphs (~ 32 mg) of *Rhodnius prolixus*. The insects were kindly provided by Dr. João Aristeu da Rosa (Universidade Estadual Paulista, SP, Brazil), Dr. Mário Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil), Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and Dr. Denise Feder (Universidade Federal Fluminense, RJ, Brazil). The insects were kept under controlled conditions of light:dark cycle (L:D = 12:12, lights on at 9:00 a.m.), temperature (27 ± 1 °C) and relative humidity (60 %). The colony was fed in regular intervals of three weeks with human blood using acrylic plates covered with parafilm maintained at 37 °C on a warming table, as previously described (Fruttero et al., 2016).

2.4. RNA extraction

Total RNA was extracted from untreated *R. prolixus* tissues (except the hingt) using the PureLink[®] RNA Mini Kit, following the manufacturer's instructions. The organs were washed with sterile PB and homogenized in 1.2 mL of lysis buffer, at 4 °C. The homogenate was vortexed for 2 min and centrifuged at $12,000 \times g$ for 2 min (4 °C) and the supernatant was transferred to the column for total RNA separation and elution. Total RNA was eluted once in 50 µL of RNase free water, quantified at 260 nm and stored at -80 °C.

2.5 *In vivo* insect treatments

Insects (5th instar nymphs) were submitted to different injection treatments: Phosphate buffer (PB: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.5) as a control, RNA (1 µg/insect), Jbtx (1 µg/insect) or RNA plus Jbtx (1 µg

each/insect). Injections were performed in the posterior junction leg using a microsyringe, under a stereoscopic microscope.

2.6. Hemocyte aggregation assays

After six or eighteen hours of treatment, the hemolymph was collected with a micropipette from a cut in the insect leg. The collected hemolymph was immediately diluted in cold anticoagulant solution (10 mM Na₂EDTA, 100 mM glucose, 62 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, 26 mM citric acid, pH 4.6) (Azambuja et al., 1991) at a ratio of 1:5 (anticoagulant: hemolymph) and a few crystals of phenylthiourea were added to avoid melanization. The number of free cells and aggregates (defined as a cluster of five or more cells) (Garcia and Machado, 2004) in each sample was counted in a hemocytometer employing a bright field optical microscope (Miller et al., 2001; Defferrari et al., 2014).

2.7. Phenoloxidase activity assay

The phenoloxidase activity assay was performed according to Fruttero et al. (2016), with minor modifications. After six or eighteen hours of treatment, the hemolymph was collected with a micropipette from a cut in the insect leg. Protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976). The sample was diluted in 96 wells microplates with 33 μ L of hypotonic cacodylate buffer (0.01 M sodium cacodylate, 0.01 M CaCl₂, pH 7.4) and incubated at 37 °C for 20 min. The reaction began with the addition of 17 μ L of L-DOPA saturated solution (4 mg/mL). The formation of dopachrome was registered at 490 nm in a SpectraMax M3 plate reader (Molecular Devices Inc., Downingtown, PA, USA). The reaction was measured at 37 °C for 30 min and activity was expressed as A₄₉₀/μg of protein/s.

2.8. Immunocompetence assay

The bacteria clearance assay was performed as described by Fruttero et al. (2016) with modifications. Five hours after receiving the first treatment (as described in section 2.5), the insects were injected with $\sim 4.8 \times 10^8$ Colony-Forming Units (CFU) of

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (grown aerobically in LB medium at 37 °C). Five hours afterwards, the hemolymph was collected and the number of CFU was determined by the drop-plate method.

2.9. Quantification of ETs

Extracellular DNA and RNA were quantified after *in vitro* and *in vivo* treatments. For the *in vitro* assay, hemolymph was collected from the insects and centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min at room temperature. The supernatant was removed and the cells were resuspended in 50 μ L of *Rhodnius prolixus* saline (150 mM NaCl; 8.6 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 8.5 mM MgCl₂; 4 mM NaHCO₃; 34 mM glucose; 5 mM HEPES, pH 7.0), and incubated for 1 h with PB, Jbtx (15, 50, 200 nM or 6 μ M) or 10 μ g/mL LPS. After the incubations, samples were centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min and the extracellular DNA and RNA in supernatants were quantified using the Quant-iT dsDNA HS and Quant-iT RNA HS kits, respectively, employing a fluorometer (Invitrogen Qubit 1.0, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

For the *in vivo* assay, the insects were injected as described previously with different treatments: PB, 1 μ g Jbtx, 3 μ g LPS, $\sim 4.8 \times 10^8$ *S. aureus*, or 1 μ g Jbtx plus $\sim 4.8 \times 10^8$ *S. aureus*. Six hours afterwards, the hemolymph was collected, the sample was centrifuged and the extracellular DNA and RNA in the supernatants were quantified as described above.

2.10. Fluorescent microscopy

Hemolymph was collected and the hemocytes were adhered to a glass coverslip, previously pre-treated with 0.01 % poly-L-lysine and incubated with PB (control), 200 nM Jbtx, 6 μ M Jbtx or 10 μ g/mL LPS for 1 h. The cells were then fixed with 4 % paraformaldehyde for twenty minutes at room temperature. After the fixation step, cells were rinsed with *R. prolixus* saline and then stained with 300 nM DAPI. The slides were analyzed using a Leica DMI8 microscope and Las-X software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Cell counting was performed using ImageJ software.

2.11. Viability and ROS production in cell culture

The hemocytes culture was established as in Defferrari et al. 2014 with slight modifications. The insects were sterilized by immersion in 70 % ethanol for 5 min and the hemolymph from fifth stage nymphs (3 days after blood meal) was collected from a cut legs and mixed with supplemented Schneider's insect medium [2 mg/mL tryptose phosphate, 10 % inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.5 mg/mL glucose, 30 mg/mL L-glutamine, 1X insect medium supplement, 0.04 mg/mL tetracycline, 0.05 mg/mL amphotericin B and 0.05 mg/mL gentamicin, pH 7.0] at a ratio 1:1 (v/v). Twenty microliters of the cell suspension (~14,000 hemocytes) were placed in a 96-well plate along with 30 μ L of medium and the cells were incubated at 24 °C for 1 h. Thereafter, 100 μ L of the supplemented cultured medium were added and the plates were incubated at 24 °C, replacing the medium every 24 h.

The production of reactive oxygen species (ROS) was measured using the nitroblue tetrazolium (NBT) methodology according to Steele and Dockrell (1985) with modifications. The cultured cells were incubated for 24 h with PB (negative control), 6 μ M Jbtx or 6.7 μ g/mL LPS (positive control) and 0.1 % NBT. The supernatant was removed and a mixture of 120 μ L 2 M KOH and 140 μ L of 100 % DMSO were added, in order to solubilize the formazan deposits. The readings were performed at 620 nm in the Spectramax M3 reader.

Cell viability was estimated by means of the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) technique (Ying et al., 2008). Cells were incubated with PB (negative control), Triton X-100 2 % and 6 μ M Jbtx for 24 h. All incubation conditions contained 30 μ L of MTT (5 mg/mL). Thereafter, the supernatant was removed and the precipitate was homogenized in 150 μ L of 4 mM HCl, 0.1 % NP40 in isopropanol, with agitation for 15 min. OD was measured at 570 nm.

2.12. Statistical analysis

Student's t-test or one-way ANOVA were used for comparisons and a *p* value < 0.05 was considered statistically significant. Graphs and statistical tests were performed using the software programs GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA). Results were

expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and all the experiments were performed at least in triplicates.

3. Results

3.1. Cellular response

As demonstrated by Fruttero et al. (2016), Jbtx is able to induce cellular aggregation and therefore activate the immune system of *R. prolixus*. Here, we expanded those findings, assaying different times post-injection with the toxic peptide and including the RNAet treatment. To determine the dose of RNAet to be injected into the insects, we performed a dose-response curve of the nucleic acid effect on the nodulation response (Supplementary Figure 1). According to the results the dose chosen for the subsequent experiments was 1 μ g of RNA/insect. Six hours after injection, our data indicated that all treatments triggered the nodulation, increasing the amount of aggregates without significantly change in the number of free cells (Fig. 1). Regarding free cells, a similar profile was observed 18 h after treatment (Fig. 1). On the other hand, analysing the formation of aggregates, it was observed that the treatments involving Jbtx induced a significant increase of the number of nodules, thus demonstrating activation of the cellular response (Fig. 1). RNAet alone did not show significant differences in the number of aggregates when compared to control (Fig. 1).

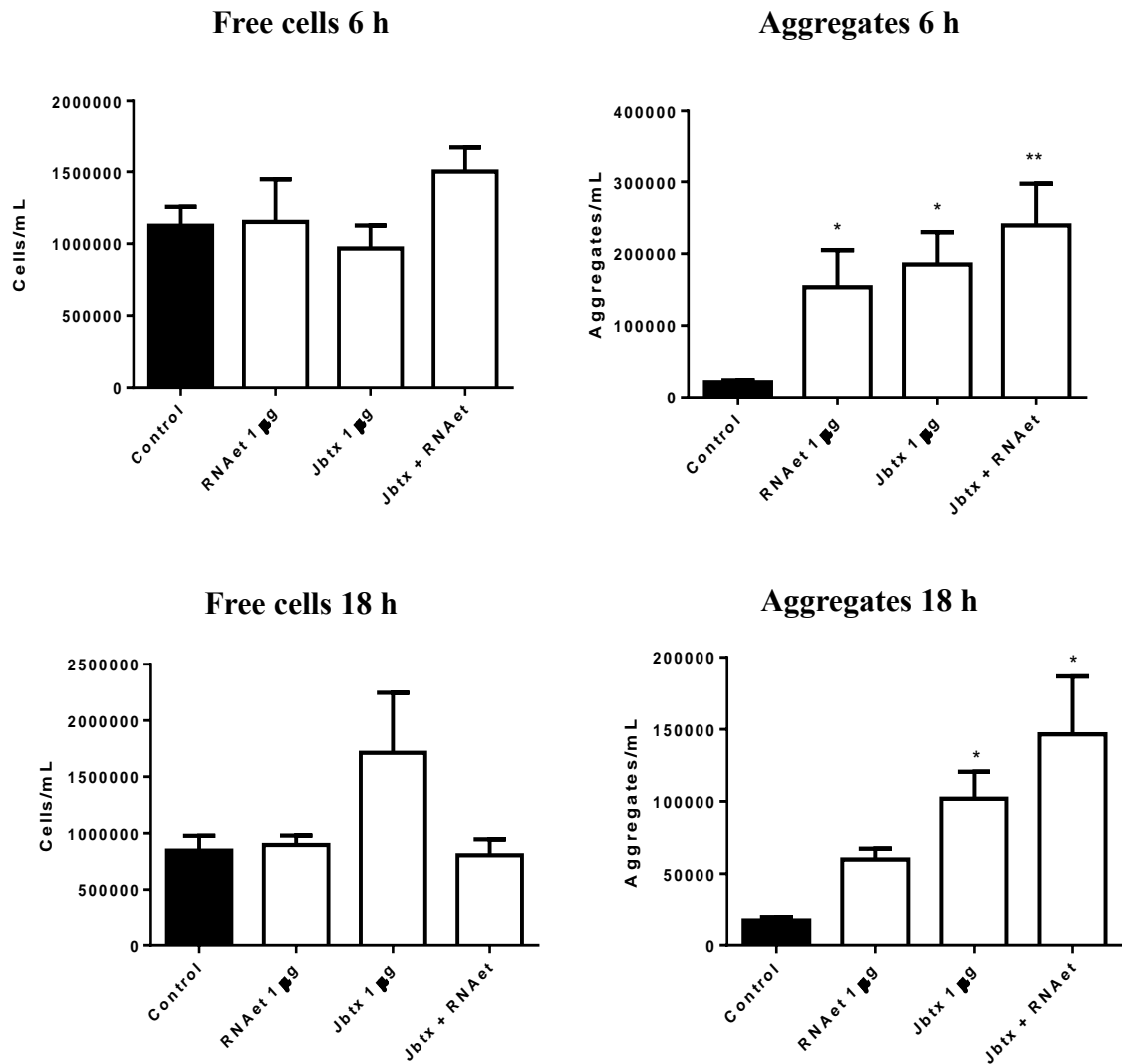


Fig. 1. Modulation of the cellular immune response by Jbtx and RNAet. Fifth-instar nymphs were injected with PB (phosphate buffer - control), 1 µg Jbtx, 1 µg RNAet and Jbtx plus RNAet (1 µg/insect each). After six and eighteen hours, the hemolymph was collected and diluted with anticoagulant solution (1:5). The number of free cells and aggregates was counted using a hemocytometer. The values were expressed as the number of free cells or the number of aggregates per mL of hemolymph and are expressed as mean \pm SEM (n = 4-7). The data was analyzed by one-way ANOVA non-parametric Kruskal-Wallis test. * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control.

3.2. Humoral response

The enzymatic cascade of phenoloxidase is one of the main components of the humoral response that leads to melanization (Cerenius et al., 2008). Fruttero et al. (2016) demonstrated that Jbtx activates the humoral response by means of increasing phenoloxidase activity. Here, it was observed that six hours after injection, all treatments significantly increased the enzymatic activity (Fig. 2). Interestingly, Jbtx plus RNAet seems to display a synergistic effect, being this response higher than that of the two separated treatments. Eighteen hours after injection, this profile was altered, and Jbtx alone was the only treatment maintaining an increased enzymatic activity. Both treatments including RNAet showed enzyme activity levels comparable to those of the control (Fig. 2).

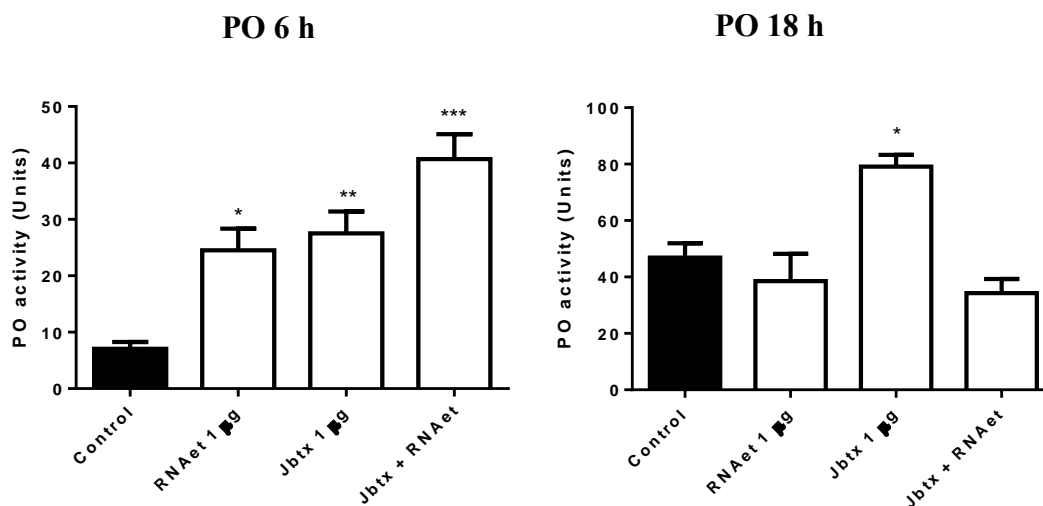


Fig. 2. Jbtx and RNAet affect phenoloxidase activity. Fifth-instar nymphs were injected with PB (phosphate buffer - control), 1 µg Jbtx, 1 µg RNAet and Jbtx plus RNAet. After six and eighteen hours the hemolymph was collected and the phenoloxidase activity was measured using L-DOPA as substrate and monitoring the formation of dopachrome. The values are expressed as phenoloxidase activity ($A_{490}/\mu\text{g}$ protein/30 min) and are the mean \pm SEM (n= 4-5). The data was analyzed by one-way parametric ANOVA. *** $P < 0.0001$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control; * $P < 0.05$ vs control.

3.3. Immunocompetence assay

In order to evaluate the immunocompetence of the insects after the treatments, we challenged them with the entomopathogenic bacterium *S. aureus*. Previous data obtained by our group (Fruttero et al., 2016) indicated that Jbtx decreases the capacity of the insect to clear the bacteria from circulation. Here, it was demonstrated that RNAet is capable of altering this profile prompted by the toxin because RNAet and Jbtx plus RNAet displayed bacterial growth no significantly different from the control whereas Jbtx alone induced a decreased capacity of bacteria clearance (Fig. 3).

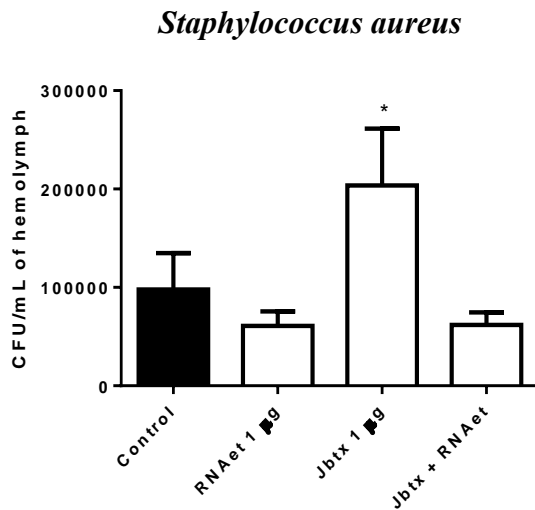


Fig. 3. RNAet increases the immunocompetence of insects against entomopathogenic bacteria. Fifth-instar nymphs (7 days after blood meal) were injected with PB (phosphate buffer - control), 1 µg Jbtx, 1 µg RNAet and Jbtx plus RNAet. Five hours later, the groups were injected with $\sim 4.8 \times 10^8$ CFU of *S. aureus* ATCC 25923. Five hours afterwards, the hemolymph was collected and the number of CFU was estimated by the drop-plate method. The values were expressed as the number of CFU per mL of hemolymph and are the mean \pm SEM (n = 13-15). The data was analyzed by one-way ANOVA non-parametric Kruskal-Wallis test. * $P < 0.05$ vs control.

3.4. ETs release

The release of ETs has been described as a process of extreme importance for the protection of the organism against pathogens (Brinkmann et al., 2004). This process is characteristic of the innate immunity of vertebrates and invertebrates (Yipp et al., 2012; Nascimento et al., 2018). In order to obtain insight regarding this response in insects, we studied nucleic acids release employing different approaches. Our data indicate that, *in vitro*, Jbtx was not able of inducing alterations in the release of nucleic acids from hemocytes (Fig. 4). On the contrary, LPS stimulated a significant increase in the release of DNA and RNA (Fig. 4). To the best of our knowledge, this is the first description of an increase in RNAet as part of an immune response.

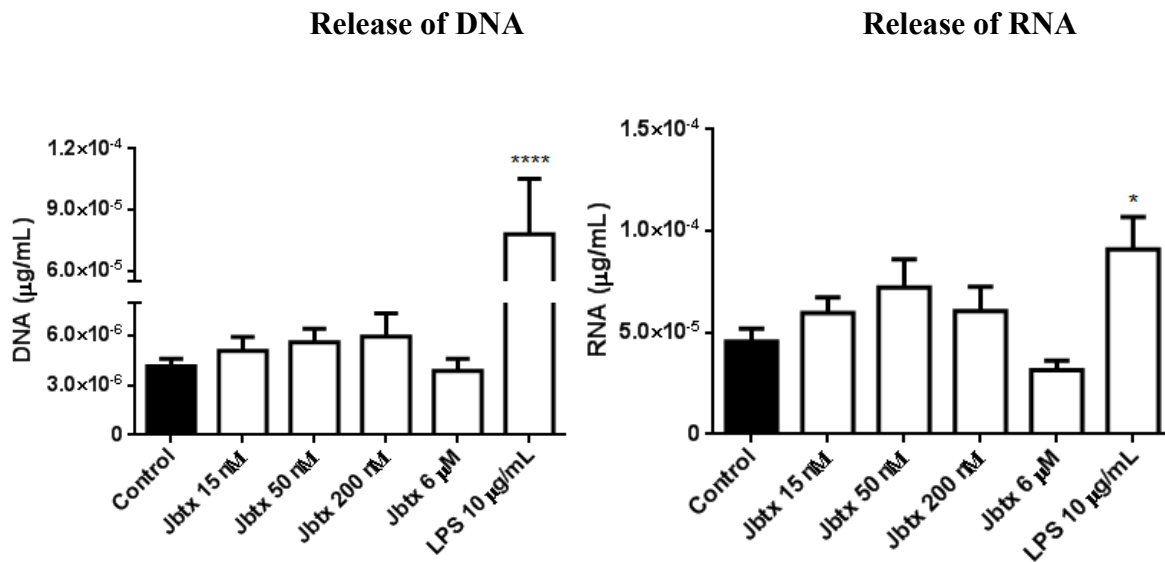


Fig. 4. Extracellular nucleic acid release *in vitro*. The hemolymph was extracted and centrifuged, the precipitate was resuspended in *R. prolixus* saline and incubated with different treatments for 1 h: PB (phosphate buffer - control), 15 nM Jbtx, 50 nM Jbtx, 200 nM Jbtx, 6 µM Jbtx and 10 µg/mL LPS. Thereafter, samples were centrifuged and the supernatants were quantified using Quant-iT dsDNA HS and RNA HS kits. The results were expressed as µg/mL of nucleic acid and are the mean ± SEM (n= 16 for the control and 9-13 for the treatments). The data was analyzed by one-way parametric ANOVA. * $P < 0.05$ vs control; **** $P < 0.0001$ vs control.

When we performed the same experiment *in vivo* we observed a similar pattern (i.e. no increased nucleic acid release) when insects were injected with Jbtx (Fig. 5). In contrast, injections with LPS or with the pathogenic bacteria *S. aureus* (alone or plus Jbtx) induced significantly increased DNA release (Fig. 5). No treatment was able to alter the release of RNA *in vivo* (Fig. 5).

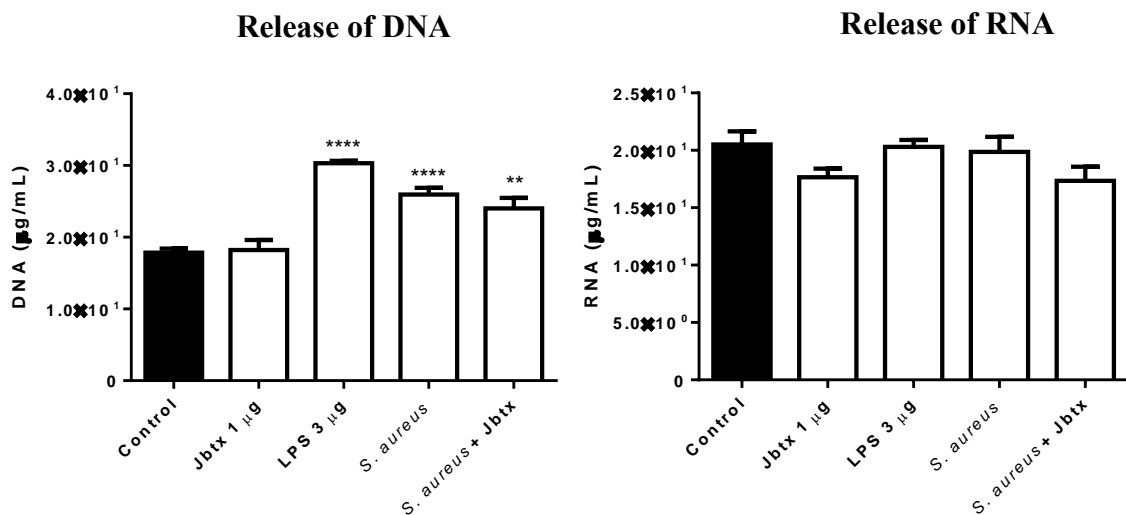


Fig. 5. Extracellular nucleic acid release *in vivo*. Insects were injected with PB (phosphate buffer - control), 1 µg Jbtx, 3 µg LPS, $\sim 4.8 \times 10^8$ *S. aureus*, 1 µg Jbtx plus $\sim 4.8 \times 10^8$ *S. aureus* and six hours afterwards, the hemolymph was centrifuged and the supernatants were quantified using Quant-iT dsDNA HS or RNA HS kits. The results were expressed as µg/mL of nucleic acid and are the mean \pm SEM (n= 9 for the control and 6-10 for the treatments). The data was analyzed by one-way parametric ANOVA. ** $P < 0.01$ vs control; **** $P < 0.0001$ vs control.

Our *in vitro* results of fluorescence microscopy, indicated that the incubation with 6 µM Jbtx or 10 µg/mL LPS stimulated the nucleic acid release, or at least its early events, since an increased number of comet-like structures (indicative of extracellular diffuse chromatin) was observed in those treatments (Fig. 6). Although the number of comet-like structures showed a trend by 200 nM Jbtx was higher than the control, this difference was

not statistically significant. LPS was the only treatment that prompted a significant decrease in the amount of cells (Fig. 6).

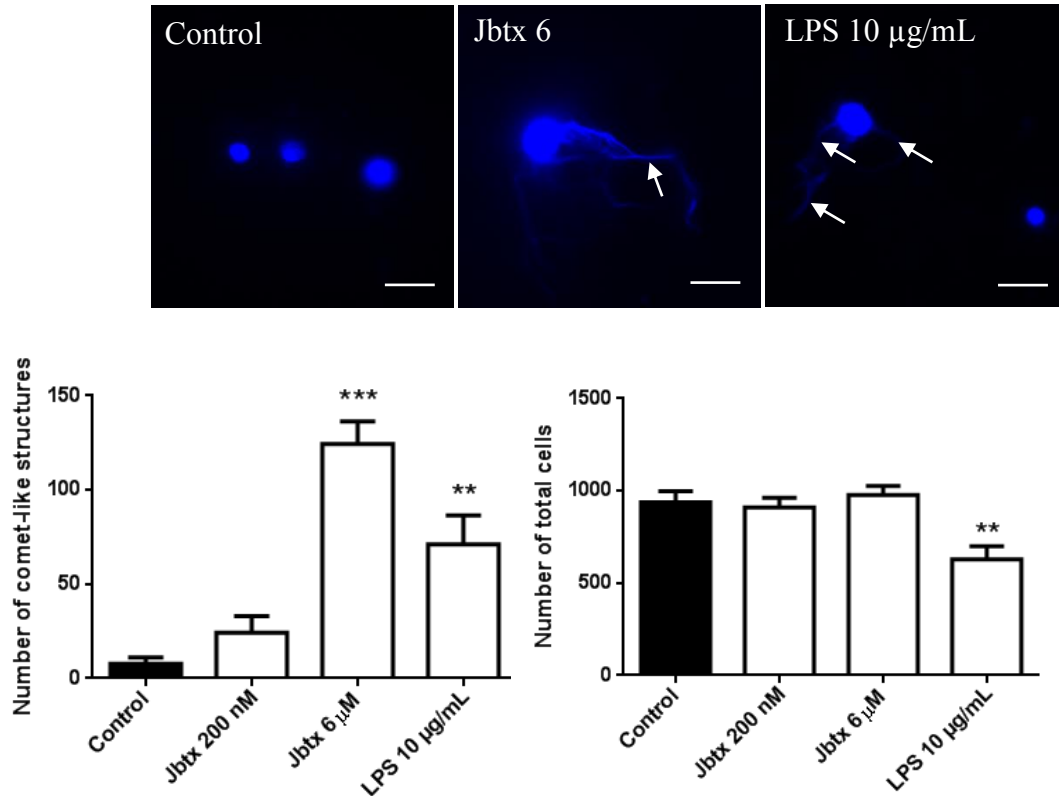


Fig. 6. Fluorescence microscopy analysis of extracellular nucleic acid release. Hemolymph was collected and incubated *in vitro* with 200 nM, 6 µM Jbtx and 10 µg/mL LPS for 1 h on poly-L-lysine-treated slides. Hemocytes were fixed and the nuclei stained with DAPI. The upper panel figure shows a representative experiment of five independent assays. Arrows indicate diffuse extracellular chromatin. Bars: 10 µm. The amount of comet-like structures and the number of cells was assessed using ImageJ software. Results are the mean ± SEM (n= 5). The data was analyzed by one-way parametric ANOVA. *** $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control.

3.5. Effect of Jbtx on ROS production and cell viability

For the release of ETs, the currently suggested metabolic pathways indicate that an increase in ROS production is required to rupture the nuclear membrane. After the release, the cells eventually lose their viability (Yipp et al., 2013). Therefore, we evaluated whether the Jbtx would be able to alter the production of ROS and the viability of the cells.

For this set of assays, cultured hemocytes were incubated for 24 h with Jbtx, LPS (positive control for ROS production) and Triton X-100 (positive control for the cell viability experiments). Although different concentrations were tested (data not shown), only 6 μ M Jbtx was able to significantly increase ROS production at similar levels when compared to LPS (Fig. 7). Nevertheless, the same Jbtx concentration was not able to modify cell viability (Fig 8).

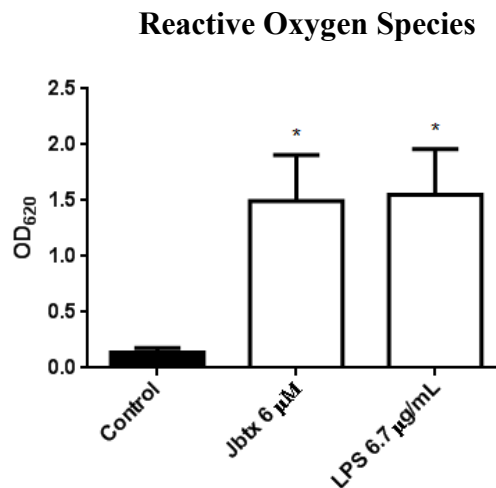


Fig. 7. ROS production in *R. prolixus* hemocytes in response to Jbtx treatment. Hemocytes were cultivated in 96-well plates with supplemented Schneider's insect medium (~14,000 cell/well) and the cells were incubated for 24 h with PB (phosphate buffer - control), 6 μ M Jbtx and 6.7 μ g/mL LPS. The production of ROS is expressed as OD₆₂₀ and results are the mean \pm SEM (n= 4 for control and 4-5 for the treatments). The data was analyzed by one-way ANOVA non-parametric Kruskal-Wallis test. * $P < 0.05$ vs control.

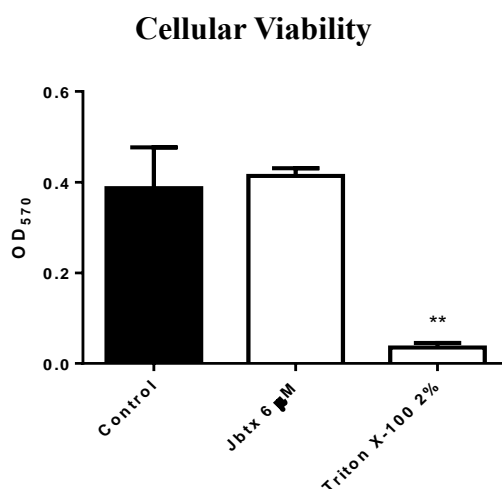


Fig. 8. Effects of the Jbtx on hemocyte viability. Cultured hemocytes were incubated for 24 h with PB (phosphate buffer - control), 6 μ M Jbtx and 2 % Triton X-100 and MTT (5 mg/mL). The precipitate was solubilized and read at OD₅₇₀. The data was analyzed by one-way parametric ANOVA and results are the mean \pm SEM (n= 7 for the control and 4-6 for treatments). ** $P < 0.01$ vs control.

4. Discussion

The high contamination of water, soil or air of different ecosystems due to exposure to pesticides is associated with the development of insect resistance to these compounds. This fact reinforces the need to find new molecules that can be used as insecticides, affecting specifically insect pests without harming the environment (Hardy, 2014; Souza et al., 2017). An alternative strategy to the use of pesticides is the utilization of transgenic plants expressing insecticidal peptides as a more environmentally safe approach (Follmer, 2008). Molecules that affect essential physiological processes, such as the insect's immune response, are of great interest for the development of biopesticides. The immune system is responsible for the most basic defenses against invading agents. A change in the homeostasis of this system compromises the immune response making it ineffective in combating pathogens. As a result of the lack of acquired immunity, the insect defense system consists of a set of complex innate reactions that are fundamental to the survival of these species (Lavine and Strand, 2002; Azambuja et al., 2016; Fruitt et al., 2018). In view of the importance of this system to the organism, our main objective is to explore the

cellular and humoral immune responses in the context of toxin effects, as well as to understand the importance of the nucleic acids associated with these mechanisms.

We evaluated the cellular immune response and observed that the group of insects treated with Jbtx alone significantly increased the amount of aggregated cells in both times assayed (Fig. 1). The results obtained 6 h after injection are in agreement with those observed with jack bean urease (JBU, a urease of *C. ensiformis*) and Jbtx by Defferrari et al. (2014) and Fruttero et al. (2016), respectively. Moyetta et al. (2017) demonstrated that, in cultured hemocytes, Jbtx interacts with the cells for at least up to 24 h after treatment. Here, it was demonstrated that the induction of modulation elicited by the peptide is maintained 18 h after injection. The difference between the number of cells at 6 and 18 h could be explained either as a consequence of the greater cell death at 18 h or due the fact that the aggregates are increasingly attached to the body of the insect, rendering more difficult their extraction (Hillyer and Strand, 2014).

None of the experimental groups exhibited significant changes in the amount of free cells at both times assayed. Cellular activation by RNAet at 6 h is statistically different from the control, however at 18 h the response triggered by RNAet has a lower activation profile. In line with our findings, Kennemeier et al. (2007) demonstrated that, in vertebrates, RNA acts as a natural procoagulant cofactor promoting the activation of proteins that lead to blood coagulation. Moreover, Altincicek et al. (2008) demonstrated that RNAet activates hemocytes of *Galleria mellonella*. In this work, the authors demonstrated the procoagulant potential that nucleic acids exert by means of the formation of fibrillar structures. Our results demonstrated that the Jbtx + RNAet treatment induced activation of nodulation in both periods after injection, evidencing an increase of the immune response.

The PO is responsible for the melanization reactions, part of the humoral response in invertebrates (Hillyer and Strand, 2014). Previous studies have shown that JBU and Jbtx increase PO enzymatic activity (Defferrari et al., 2014; Fruttero et al., 2016). Our results obtained with the peptide corroborated those findings and, in addition, we have demonstrated that the effect of increased enzyme activity persists 18 h after injection (Fig. 2). It was also observed that RNAet was able to induce the humoral response 6 h after injection, although the increment in PO activity did not remain during the 18 h period, probably due to the fact that the organism had already been rehabilitated to the state of

homeostasis. Other explanation is the possibility that the early activation of the PO activity causes a depletion of the enzyme in the hemocytes after a longer period of treatment (Genta et al., 2010). Altincicek et al. (2008) also demonstrated that RNAet is able to induce an increase in humoral response. They observed that high doses of RNAet were able to trigger the darkening of hemolymph in *G. mellonella*. In our hands, the combination of Jbtx + RNAet triggered the humoral response 6 h after injection but at 18 h post injection this activation ceased.

Taking into account that RNAet modulates the immunological responses of the insect, we evaluated the effects of these nucleic acids on the protection process against a pathogen. The group treated with Jbtx alone displayed an immunosuppressive response that enabled the pathogenic bacterium *S. aureus* to proliferate more easily in the hemolymph (Fig. 3). On the other hand, the group treated with RNAet alone did not present changes and, surprisingly, the Jbtx + RNAet group did not display statistical differences with respect to the control group (Fig. 3). Our data are in agreement with the immunosuppression caused by Jbtx that was observed by Fruttero et al. (2016). We believe that the environment found by the bacterium is a scenario of susceptibility due to the previous immunological activation of Jbtx. This fact, as previously mentioned, may be due to the exhaustion of the necessary resources to fight against the invading agent, among them the irreversibility of aggregate response and PO depletion in hemocytes (Hillyer et al., 2003; Genta et al., 2010). In addition, the immunocompensation caused in both the RNAet and Jbtx + RNAet groups is probably due to the protective role of the extracellular nucleic acid for the organism. Altincicek et al. (2008) demonstrated that insects injected with pathogens plus RNAet present a higher survival performance than insects injected only with the pathogen. The protective role of RNAet is probably due to the immunological response of ETosis where nucleic acids capture, render unviable and kill pathogens. Nascimento et al. (2018) characterized in *Periplaneta americana* the role of ETs in immune response. The authors demonstrated that the ETs impair bacterial growth and the addition of DNase to the medium restores the bacterial development.

More recent pieces of evidence indicate that ETs is evolutionarily conserved as was observed in the plant *Pisum sativum* (Wen et al., 2009), the amoebae *Dictyostelium discoideum* (Zhang et al., 2016), the oyster *Crassostrea gigas* (Poirier et al. 2014), the

shrimp *Litopenaeus vannamei* (Ng et al., 2013), the crab *Carcinus maenas* (Robb et al., 2014) and the cockroach *P. americana* (Nascimento et al., 2018b).

Our ET release results indicated that *R. prolixus* is another organism capable of taking advantage of this immune response. Our experiments were carried out *in vitro* and *in vivo* (Fig. 4 and Fig. 5) and it was observed that *in vitro*, at least under the conditions tested, Jbtx was not able to induce the release of nucleic acids at different concentrations. The demonstration that hemocytes of this species are capable of releasing ETs comes with the use of LPS as a positive control, a treatment which induced an increase in the amount of free DNA. Moreover, the treatment with LPS led for the first time to the description of an increase in the amount of RNA released, suggesting a role for the RNA in this immune response. Our *in vivo* results, under the conditions tested, do not indicate that Jbtx is able to induce the release of nucleic acids while the treatments with LPS, *S. aureus* and Jbtx + *S. aureus* were able to release DNA but not RNA (Fig. 5). The release of nucleic acids by LPS and the bacterium are in agreement with that observed by Nascimento et al. (2018). It is likely that the treatment of Jbtx + *S. aureus* triggered the release of ETs as a consequence of the presence of the pathogen.

Using another experimental approach we evaluated *in vitro* the early events in the release of ETs by immunofluorescence, and it was observed that LPS and 6 μ M Jbtx induced a significant increase in the number of cells exhibiting signs of extracellular diffuse chromatin (Fig. 6). The difference between results of release observed by the kit and by immunofluorescence can be due to the sensibility of assays. Through immunofluorescence we could be seeing moments before ETs release where the nucleic acids have not yet been fully released to the extracellular medium. Alternatively, other explanation is that the Jbtx only affects few cells, thus being the phenomenon insufficient to change the nucleic acid concentration of the medium. It is also possible that the alteration of nuclear integrity is not related to ETosis but to other cell death mechanism. Additional studies are needed to elucidate this point.

We investigated whether the toxin would be capable of altering ROS production in cultured cells. Our results indicated that 6 μ M Jbtx significantly increased ROS production (Fig. 7). For the release of ETs, the modulation of free radicals by nitric oxide (NO) seems to be involved in the acid nucleic release (Patel et al., 2010). However, the increase in ROS production observed here does not appear to be dependent on NO. Fruttero et al.

(2016) showed, in the hemolymph of Jbtx-treated insects, that the enzyme nitric oxide synthase (NOS), which is responsible for generating NO, maintains its enzymatic activity similar to the levels of the control. However, Moyetta et al. (2017) observed that treatment with Jbtx causes a local increase in NO production in aggregated cells.

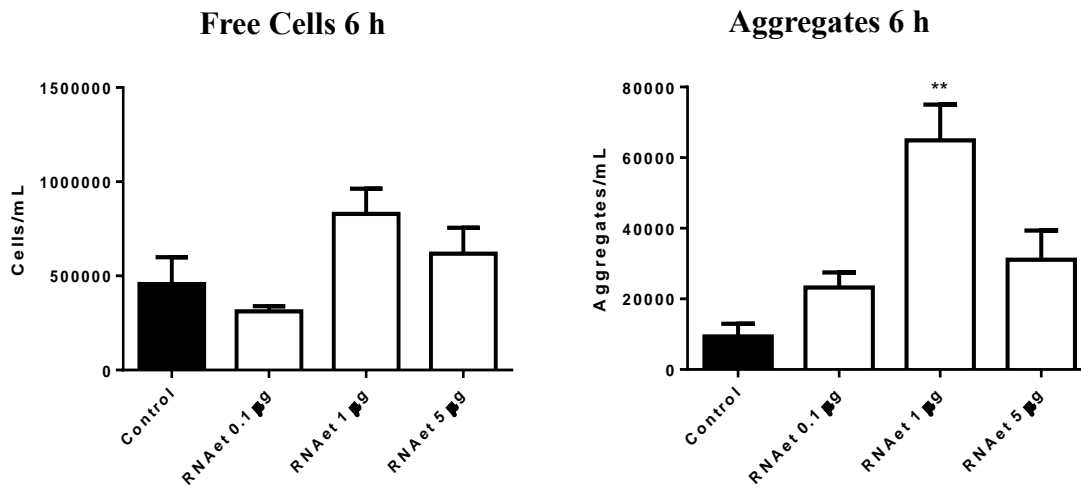
The release of ETs can either result in cell death or cell survival (released nucleic acid is of mitochondrial origin allowing the cell to remain alive but with mitochondrial deficiency). To further explore the Jbtx possible involvement in chromatin release, we investigated cell viability using MTT, which is converted by the mitochondria into formazan. Our results showed that the peptide did not alter cellular viability or at least their metabolic activity, also suggesting that Jbtx does not mediate the release of ETs (Fig. 8).

In conclusion we have shown that RNAet plays an important role in the activation of the cellular and humoral responses in *R. prolixus*. Thus, immunocompetence assays demonstrated that the RNAet modulates the immunological activity, either through the activation of innate responses or by capturing and killing pathogens acting as ETs. We found that *R. prolixus* is also an organism capable of inducing the release of ETs. Further investigation are still needed to fully elucidate the effects of Jbtx on the insects' immune system, particularly regarding the ETs. Our evidences support the hypothesis that Jbtx may modulate the immune system, rendering the insects more susceptible to microbial infections, effect counteracted by the ETs.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant PROEX 0487/2016-2 and by Edital Toxinologia 63/2010, grant 1205/2011. LLF received a Young Talent Fellowship from the Science without Borders Program (CNPq grant 400189/2014-3). MVCG received a master fellowship from CAPES.

Supplementary Figure



Supplementary Fig. 1. Modulation of the immune system by RNAet. Fifth-instar nymphs were injected with RNA free water (control), 0.1 µg RNAet, 1 µg RNAet and 5 µg RNAet. After six hours, the hemolymph was collected and diluted with anticoagulant solution (1:5). The number of free cells and aggregates was counted using a hemocytometer. The values were expressed as the number of free cells or the number of aggregates per mL of hemolymph and are the mean \pm SEM (n = 4-5). The data was analyzed by one-way ANOVA non-parametric Kruskal-Wallis test. * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control.

4. Discussão Geral

Uma vez que a alta toxicidade de agrotóxicos traz efeitos nocivos para o meio ambiente e os insetos têm desenvolvido resistência a estes compostos, uma alternativa para esta problemática é a utilização de plantas transgênicas expressando peptídeos inseticidas, por ser uma opção mais ecologicamente segura (FOLLMER, 2008; HARDY, 2014; SOUZA et al., 2017). Nessa linha de pensamento, Jbtx apresenta características cruciais que viabilizam sua utilização como um composto bioinseticida, sendo tóxico para várias espécies de insetos pragas e não demonstrando efeitos de toxicidade aguda em roedores, nem cito ou genotoxicidade para linhagens celulares de mamíferos (revisado em BECKER-RITT et al., 2017). Resultados preliminares com culturas de plantas transgênicas que expressam o Jbtx demonstram maior resistência ao ataque de insetos (revisado em CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

Em insetos, o sistema imune compreende somente uma resposta inata bem desenvolvida. Alterações da homeostase neste sistema podem afetar a resposta imunológica, impossibilitando o combate a patógenos e/ou injúrias. A imunidade inata consiste de um conjunto de diversas reações que são essenciais para a sobrevivência das espécies sendo, portanto, conservadas evolutivamente (VASS et al., 2001; LAVINE & STRAND, 2002; AZAMBUJA et al., 2016). Sabendo da importância do sistema imune para a sobrevivência dos insetos, nosso objetivo foi explorar a relevância dos ácidos nucleicos para as respostas imunológicas celulares e humorais, bem como compreender as alterações induzidas pelo tratamento com Jbtx.

O perfil observado na curva de doses de RNA indicou 1 µg de RNA/inseto como a melhor dose para realização dos ensaios posteriores. Esta dose é similar a utilizada por ALTINCICEK et al. (2008) para ensaios em *Galleria mellonella*. Não foi necessária a realização de uma curva para doses de Jbtx, uma vez que as doses/concentrações utilizadas da toxina já foram descritas, por nosso grupo anteriormente, por apresentarem efeitos entomotóxicos (FRUTTERO et al., 2016).

Neste trabalho, os efeitos do Jbtx sobre a resposta imune celular indicaram um aumento da quantidade de células agregadas, tanto 6 h quanto 18 h após as injeções (Fig. 1 – manuscrito), sendo que o perfil observado em 6 h corrobora com o visto por FRUTTERO et al. (2016). Nossos dados também se assemelham com os resultados obtidos com a JBU

por DEFFERRARI et al. (2014). Ambos os trabalhos avaliaram a resposta de agregação e observaram que tanto o Jbtx quanto a JBU, *in vitro* e *in vivo*, induzem o aumento da resposta de nodulação. MARTINELLI et al. (2017) observaram que a urease ubíqua recombinante de soja também foi capaz de ativar a resposta de nodulação *in vivo* e *in vitro*. Os trabalhos de DEFFERRARI et al. (2014) e FRUTTERO et al. (2016) descreveram que a resposta de nodulação é mediada pela via das cicloxigenases (COX) além de ser dependente de cátions extracelulares, provavelmente cálcio. MOYETTA e colaboradores (2017) observaram através de cultura de hemócitos e experimentos *in vivo* que o Jbtx interage com as células em diferentes períodos de tempo (1, 3, 5, 6, 18 e 24 h após tratamento), indicando que os efeitos da toxina não cessam em apenas 6 h. Aqui, demonstramos que ainda no período de 18 h o peptídeo é capaz de manter a ativação da nodulação conservando o mesmo perfil apresentado em 6 h. As diferenças observadas na quantidade total de células entre 6 h e 18 h pode ser decorrente de maior morte celular em 18 h ou, possivelmente, pela adesão das células agregadas nas paredes das cavidades internas do inseto, o que dificultaria sua extração através da hemolinfa (HILLYER & STRAND, 2014).

Nos grupos experimentais utilizados para avaliar a função dos ácidos nucleicos extracelulares ou os efeitos da toxina, nenhuma variação significativa foi observada entre o número de células livres, em ambos os tempos ensaiados. A ativação da nodulação pelo RNAet em 6 h é estatisticamente diferente do controle, entretanto em 18 h a resposta desencadeada pelo RNAet apresenta um perfil menor de ativação e o grupo do controle apresentou um perfil maior de nodulação. Corroborando com os dados obtidos aqui, KANNEMEIER e colaboradores (2007) demonstraram que em vertebrados o RNA age como um cofator natural procoagulante, promovendo a ativação de proteínas que levam a coagulação. ALTINCICEK e colaboradores (2008) descreveram a importância do RNAet para ativar os hemócitos de *G. mellonella* indicando que os ácidos nucleicos também atuam nos insetos como um fator procoagulante, capaz de induzir a formação de estruturas fibrilares e, portanto, auxiliando na resposta de agregação. ALTINCICEK e colaboradores (2008) também observaram que quando RNAet era injetado em *G. mellonella* os insetos diminuíam a quantidade de células livres totais, provavelmente em decorrência do aumento de células agregadas, e quando o inseto era injetado com bactéria mais RNAet essa resposta de agregação era ainda maior do que a observada nos tratamentos com RNAet

isoladamente. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que injeções de RNase aumentavam as células livres totais. Tendo em vista a relevância dos ácidos nucleicos para a imunidade celular, demonstramos aqui que em ambos os períodos de tratamento, Jbtx + RNAet induziu a ativação da nodulação, indicando que a toxina, associada ao fator procoagulante RNAet, induz o aumento da resposta imune.

Experimentos de citometria de fluxo foram realizados para aprofundar os resultados obtidos nos experimentos de agregação, visando observar, por outro método, alterações das subpopulações de hemócitos. Entretanto, devido a enorme variabilidade individual dos perfis encontrados (Figura suplementar 1 anexo B) e a ausência de marcadores específicos para hemócitos, nossa tentativa tornou-se frustrada. Este resultado obtido pela citometria vem ao encontro com o descrito na literatura em que argumenta-se a grande variação entre as populações de hemócitos de cada indivíduo (AZAMBUJA et al., 1991; MARRINGA et al., 2014).

A PO é a principal via da resposta de melanização da ecdise após a muda, além de estar envolvida na produção de quinonas, que possuem atividade antimicrobiana, e em outros processos imunológicos. Em resultados prévios do nosso grupo foi observado que a JBU e o Jbtx afetam a resposta humoral de insetos através do aumento da atividade enzimática de PO indicando, portanto, que esta via também é comprometida pelas toxinas (DEFFERRARI et al., 2014; FRUTTERO et al., 2016). Os resultados observados aqui corroboram com estes trabalhos, entretanto, demonstramos que a elevação da atividade enzimática persiste em 18 h (Fig. 2 – manuscrito). Outros grupos demonstraram que em *G. mellonella*, *Spodoptera exigua* e em *R. prolixus* a ativação da PO é dependente de produtos derivados da COX (DOWNER et al., 1997; GARCIA et al., 2004; SHRESTHA et al., 2008). De acordo com estes achados, a dependência de COX observada em FRUTTERO et al. (2016) para que o Jbtx afete a nodulação é possível que também ocorra para os efeitos do Jbtx na atividade de PO. Também demonstramos que o RNAet induziu o aumento da atividade da PO em 6 h, mas esse mesmo perfil não se manteve em 18 h após injeção. Nossa hipótese é de que em 18 h tenha ocorrido a depleção/esgotamento da enzima nos hemócitos ou, alternativamente, que 18 h seja tempo suficiente para que o inseto recupere seu estado de homeostasia (GENTA et al., 2010).

A produção de peptídeos antimicrobianos constitui um dos diferentes tipos de respostas humorais. ALTINCICEK e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos do RNAet

sobre a resposta humoral através de atividade antibacteriana. Os resultados observados por ALTINCICEK e colaboradores (2008) demonstraram que o RNAet foi capaz de elevar os níveis da atividade antibacteriana, e em doses mais elevadas, foi capaz de desencadear em *G. mellonella* o aumento da melanização nas amostras. Nos tratamentos de Jbtx + RNAet observamos que, no período de 6 h, há o desencadeamento da resposta humoral através da ativação da PO, porém no período de 18 h essa ativação cessa, e os níveis regredem ao perfil do controle. Nossa hipótese é de que ocorra a depleção enzimática dos hemócitos em decorrência da soma dos tratamentos concomitante a um tempo maior de exposição (GENTA et al., 2010).

Sabendo sobre a importante modulação do RNAet para as defesas do organismo, avaliamos os efeitos dos ácidos nucleicos no processo de proteção contra patógenos. Observamos que os insetos tratados com Jbtx sofreram uma imunossupressão, que facilitou a proliferação da bactéria patogênica *S. aureus*, resultados que vão ao encontro com os achados de FRUTTERO e colaboradores (2016). No tratamento com Jbtx + RNAet (Fig. 3 – manuscrito), o RNAet parece estar atuando como uma forma de imunocompensação para as defesas fisiológicas combaterem o patógeno. NASCIMENTO et al. (2018) demonstrou em insetos a necessidade de ácidos nucleicos para combater micro-organismos invasores. Possivelmente, a tentativa de combater o patógeno na presença de Jbtx é inviabilizada pela requisição das respostas inatas que, devido ao tratamento prévio com a toxina, podem ter sofrido esgotamento, pela irreversibilidade da resposta de agregação e a depleção da PO nos hemócitos (HILLYER et al., 2003; GENTA et al., 2010). Os achados de sobrevivência observados por ALTINCICEK e colaboradores (2008) demonstraram que quando insetos eram injetados com patógenos mais ácidos nucleicos este grupo apresentava uma maior sobrevivência do que os insetos injetados somente com a bactéria. O papel protetor do RNAet deve-se em grande parte pela resposta imunológica de ETose, onde os ácidos nucleicos capturam, inviabilizam e matam os patógenos, sendo este processo caracterizado no invertebrado *P. americana* (NASCIMENTO et al., 2018).

A primeira descrição da ETose ocorreu em 2004 quando BRINKMANN e colaboradores (2004) descreveram em neutrófilos de vertebrados uma nova resposta imune celular, a qual foi cunhada como armadilha extracelular de neutrófilos (NETs; do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*). Porém esse processo não se limita somente a neutrófilos, sendo observado em diversos outros grupos de células como eosinófilos (YOUSEFI et al.,

2012), mastócitos (KO et al., 2018) e macrófagos (CHOW et al., 2011). Como consequência, o termo de NETs foi modificado para armadilhas extracelulares (ETs; do inglês *Extracellular traps*). Evidências mais recentes indicam que essa resposta imunológica é evolutivamente conservada entre as espécies, tendo já sido descrita em ervilha (*Pisum sativum*) (WEN et al., 2009), amebas (*Dictyostelium discoideum*) (ZHANG et al., 2016), ostras (*Crassostrea gigas*) (POIRIER et al., 2014), camarão (*Litopenaeus vannamei*) (NG et al., 2013), caranguejo (*Carcinus maenas*) (ROBB et al., 2014) e barata (*P. americana*) (NASCIMENTO et al., 2018).

Os resultados de liberação de ETs indicam que *R. prolixus* é outro organismo capaz de aproveitar-se desta resposta imunológica. Nossos experimentos foram realizados *in vitro* e *in vivo* (Fig. 4 e Fig. 5 - manuscrito). *In vitro*, nas condições testadas, Jbtx não foi capaz de induzir a liberação tanto de DNA quanto de RNA. Ensaios preliminares *in vitro* com 2 e 3 h de incubação com diferentes concentrações de Jbtx também não indicaram liberação de ácidos nucleicos pela toxina (dados não mostrados). Assim como NASCIMENTO et al. (2018) descreveu para *P. americana*, lipopolissacarídeos (LPS) são capazes de induzir a liberação de ácidos nucleicos, aqui demonstrado que em *R. prolixus* este composto também induz o aumento da quantidade de DNA livre. Pela primeira vez, descrevemos o aumento da quantidade de RNA liberado em resposta ao tratamento com LPS, sugerindo um papel para o RNA nesta resposta imune. *In vivo*, nas condições testadas, novamente não observamos indução da liberação de ácidos nucleicos por Jbtx, enquanto que os tratamentos com LPS, *S. aureus* e Jbtx + *S. aureus* foram capazes de aumentar significativamente a liberação de DNA. Entretanto, a liberação de RNA não foi observada nos tratamentos.

Nos ensaios de fluorescência, observamos que tanto LPS quanto Jbtx 6 μ M induzem alterações da localização de DNA (Fig. 6 – manuscrito), produzindo estruturas semelhantes a cometas. Contudo, não é possível afirmar que essa alteração está relacionada a ETose ou outro tipo de morte celular. Achados prévios de nosso grupo demonstram que, em cultura de hemócitos, em condições diferentes das testadas neste trabalho, é possível observar que algumas células sofrem condensação da sua cromatina (FRUTTERO et al., 2014). Essa resposta é oposta ao observado no mecanismo de ETose, onde a cromatina precisa ser descompactada para ser associada aos peptídeos antimicrobianos e então liberada para o meio extracelular (HEMMERS et al., 2011). Também em cultura de

hemócitos, FRUTTERO et al. (2016) demonstraram através de imunofluorescência que o Jbtx leva ao aumento da marcação de caspases ativadas, o que conduz a célula a apoptose. A produção de caspases é típico da morte celular por apoptose, entretanto caspases ativadas não estão presentes na ETose, devido a inibição por ROS (HAMPTON et al., 2002; FADEEL et al., 2015). Ambos processos de condensação da cromatina e ativação das caspases são característicos da morte celular por apoptose e não estão descritas na ativação da ETose (GOLDMANN et al., 2012). Ensaios complementares são necessários para elucidação da hipótese de Jbtx alterar a resposta imune em insetos através da ETose.

Investigamos também se Jbtx seria capaz de induzir alterações na produção de ROS, demonstrando que a dose de Jbtx 6 μ M foi capaz de induzir um aumento de ROS (Fig. 7 – manuscrito). Uma dose menor de Jbtx (1 μ M) não foi capaz de alterar a produção de ROS (dados não mostrados). FRUTTERO et al. (2016) e MOYETTA et al. (2017) não observaram alterações na expressão proteica e na atividade da enzima óxido nítrico síntase (NOS), enzima responsável por gerar óxido nítrico (NO; gás associado na produção de ROS), em resposta ao Jbtx, sugerindo que o aumento de ROS é oriundo de outra via metabólica. No entanto, MOYETTA et al. (2017) demonstraram que após tratamento com Jbtx, células agregadas apresentam uma maior marcação de NO do que o grupo controle. Corroborando com nossos resultados, KAPPAUN (2018) demonstrou que o soyuretox (peptídeo similar ao Jbtx, derivado de uma das ureases de soja) foi capaz de elevar os níveis de ROS em leveduras. Existem evidências na literatura de que, para a formação de ETs, ROS seria um fator crucial para a liberação dos ácidos nucleicos. Portanto, a modulação de radicais livres por NO parece estar envolvida na resposta imune (PATEL et al., 2010).

Para melhor explorar os efeitos da toxina sobre o sistema imune, avaliamos alterações da viabilidade celular dos hemócitos, uma vez que trabalhos anteriores descrevem que o peptídeo é capaz de interagir diretamente com estas células (MOYETTA et al., 2017). Nossos resultados demonstram que o peptídeo não alterou a viabilidade celular (ou pelo menos a sua atividade metabólica) nas condições testadas (Fig. 8 - manuscrito). Nos ensaios realizados por FRUTTERO et al. (2016) foi demonstrado que em 24 h de cultura de hemócitos o Jbtx é capaz de elevar a marcação de caspases ativadas em algumas células. No entanto a utilização de outra abordagem experimental, para avaliar a viabilidade, seja importante para poder corroborar com nossos achados. Provavelmente

tempos superiores aos realizados aqui e no trabalho de FRUTTERO e colaboradores (2016) sejam cruciais para observar alterações na viabilidade das células. Na ETose vital o DNA mitocondrial é liberado para o meio extracelular tornando a mitocôndria não funcional. Uma vez que o ensaio de viabilidade realizado aqui requer a conversão mitocondrial de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazam, podemos inferir que possivelmente o Jbtx não é capaz de induzir o processo de ETose vital.

5. Conclusão geral

Em conclusão, demonstramos que o RNAet exerce um papel de extrema importância na ativação da resposta celular e humoral em *R. prolixus*, modulando a atividade imunológica, seja através da ativação das respostas inatas ou da captura e morte dos patógenos, agindo como ETs. Comprovamos que *R. prolixus* também é um organismo capaz de induzir a liberação de ETs e que o Jbtx possivelmente não induz a liberação de ácidos nucleicos. Nossas evidências indicam que a toxina é capaz de modular o sistema imune do inseto, tornando-o mais susceptível a infecções enquanto que o RNAet modula as respostas de defesa para compensar a imunossupressão ocasionada pela toxina.

6. Perspectivas

A fim de aprofundar os resultados obtidos neste trabalho, é necessário averiguar se tempos maiores de tratamento com a toxina alteram a liberação dos ácidos nucleicos. Outra abordagem complementar necessária é a avaliação por meio de imunofluorescência a liberação de ETs, utilizando anticorpos para proteínas associadas aos ácidos nucleicos e marcadores do citoesqueleto celular. Também por meio de imunofluorescência, temos o interesse de avaliar o papel de ROS na liberação de ETs, utilizando inibidores de ROS. Tendo em vista a necessidade da via das COX para que o Jbtx induza as respostas de nodulação, fica em aberto a pergunta se o processo de ETose também é dependente desta via para induzir a liberação dos ácidos nucleicos em diferentes tipos de tratamentos. Além disso, a avaliação do papel de DNAet para o sistema imune dos insetos também é importante.

7. Referências

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 615, p. 593–615, 2001.

ALTINCICEK, B.; STOTZEL, S.; WYGRECKA, M.; PREISSNER, K. T.; VILCINSKAS, A. Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2705–2712, 2008.

ALVARENGA, E. S. L.; MANSUR, J. F.; JUSTI, S. A.; FIGUEIRA-MANSUR, J.; VIVIAN, M.; LOPEZ, S. G.; MASUDA, H.; LARA, F. A.; MELO, A. C. A.; MOREIRA, M. F. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 1–10, 2015.

ANDERSEN, S. O. Insect cuticular sclerotization: A review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 166–178, 2010.

ANDERSEN, S. O.; PETER, M. G.; ROEPSTORFF, P. Cuticular sclerotization in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 689–705, 1996.

ANDREA, A.; NUÑEZ, N. K.; SOUZA, R. G. De; HENRIQUE, M.; VARGAS, M.; SILVEIRA, J. S.; LUANA, G.; DURANTE, S.; PORTO, B. N.; MARCZAK, E. S.; JONES, M. H.; PITREZ, P. M.; HENRIQUE, M.; VARGAS, M.; SILVEIRA, J. S.; ANTUNES, G. L.; SILVA, L.; PORTO, B. N.; MARCZAK, E. S.; JONES, M. H.; MÁRCIO, P. Recombinant human deoxyribonuclease therapy improves airway resistance and reduces DNA extracellular traps in a murine acute asthma model. **Experimental Lung Research**, v. 42, p. 66-74, 2016.

ANDREASEN, C. B.; REDMOND, S. B.; LAMONT, S. J. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 126–131, 2009.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.; RATCLIFFE, N. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86 (1), p. 1–10, 1991.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; WANIEK, P. J.; VIEIRA, C. S.; FIGUEIREDO, M. B.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; CASTRO, D. P.; RATCLIFFE, N. A.

Rhodnius prolixus: from physiology by Wiggleworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Journal of Insect Physiology**, v. 97, p. 45-65, 2016.

BARJA-FIDALGO, C., et al. Lipoxigenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia Ensiformis* sedds. **Toxicon**, v. 29, p. 453–459, 1991.

BARROS, P. R.; STASSEN, H.; FREITAS, M. S.; CARLINI, C. R.; NASCIMENTO, M. A. C.; FOLLMER, C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec : Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 1848–1854, 2009.

BARTNECK, M.; KEUL, H. A.; ZWADLO-KLARWASSER, G. Phagocytosis Independent Extracellular Nanoparticle Clearance by Human Immune Cells. **NANO LETTERS**, v. 10, p. 59–63, 2010.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 SUPPL., 2005.

BECKER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: Update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2017.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, 2000

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BREY, P. T.; LEE, W. J.; YAMAKAWA, M.; KOIZUMI, Y.; PERROT, S.; FRANÇOIS, M.; ASHIDA, M. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6275–6279, 1993.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532–1535, 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 577–582, 2007.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 329–344, 1999.

BYRD, A. S.; O'BRIEN, X. M.; JOHNSON, C. M.; LAVIGNE, L. M.; REICHNER, J. S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. **The Journal of immunology**, v. 190, p. 4136–4148, 2013.

CARLINI, C. R.; GOMES, C.; GUIMARAES, J. A.; MARKUS, R. P.; SATO, H.; TROLIN, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. **Acta Pharmacologica et Toxicologica (Copenh)**, v. 54, n. 3, p. 161–166, 1984.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 551–560, 1985.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90–109, 2016.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin like enzymes. **Journal of economic entomology**, v. 90, n. 2, p. 340–348, 1997.

CARLINI, C. R.; POLACCO, J. C. Toxic properties of urease. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1665–1672, 2008.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 6, p. 263–271, 2008.

CHOW, O. A.; KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. VON; BRIGHT, A. T.; HENSLER, M. E.; ZINKERNAGEL, A. S.; COGEN, A. L.; GALLO, R. L.;

MONESTIER, M.; GLASS, C. K.; NIZET, V. Statins Enhance Formation of Phagocyte Extracellular Traps. **Cell host Microbe**, v. 8, n. 5, p. 445–454, 2011.

CHRISTENSEN, B. M.; LI, J.; CHEN, C. C.; NAPPI, A. J. Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 192–199, 2005.

COCIANCICH, S.; BULET, P.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitology Today**, v. 10, n. 4, p. 132–139, 1994.

DEFFERRARI, M. S.; DA SILVA, R.; ORCHARD, I.; CARLINI, C. R. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Toxicon**, v. 82, p. 18–25, 2014.

FADEEL, B. B.; ÅHLIN, A.; HENTER, J.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M. B. Involvement of Caspases in Neutrophil Apoptosis: Regulation by Reactive Oxygen Species. **Blood** v. 92, n. 12, p. 4808–4818, 2015.

FEARON, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 323–324, 1997.

FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 44, n. April, p. 162–171, 2000.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 18–28, 2008.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **The Biochemical journal**, v. 360, p. 217–224, 2001.

FOLLMER, C.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science**, v. 167, n. 2, p. 241–246, 2004.

VASS, E. & NAPPI, A. J. Fruit Fly Immunity. **Bioscience**. v. 51, n. 7, p. 529–535, 2001.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; SIEBRA, M.; BROLL, V.; COSTE, M. V;

REAL-GUERRA, R.; STANISC, F.; CARLINI, C. R. Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. **Acta Tropica**, v. 168, p. 54–63, 2017.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V. C.; LOPES, F. C.; BROLL, V.; FEDER, D.; CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1–14, 2016.

GALVANI, G. L.; FRUTTERO, L. L.; CORONEL, M. F.; NOWICKI, S.; DEMARTINI, D. R.; DEFFERRARI, M. S.; POSTAL, M.; CANAVOSO, L. E.; CARLINI, C. R.; SETTEMBRINI, B. P. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 2, p. 255–262, 2015.

GARCIA-ROMO, G. S.; CAIELLI, S.; VEGA, B.; CONNOLLY, J.; XU, Z.; PUNARO, M.; BAISCH, J.; GUIDUCCI, C.; COFFMAN, L.; BARRAT, F. J.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, p 73 - 93, 2011.

GARCIA, E. S.; MACHADO, E. M.; AZAMBUJA, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **Experimental Parasitology**, v. 107, p. 31–38, 2004.

GARCIA, E. S.; MACHADO, E. M. M.; AZAMBUJA, P. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 2–3, p. 157–165, 2004.

GENTA, F. A.; SOUZA, R. S.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1253–1259, 2010.

GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

GOLKAR, L.; LEBRUN, R. A.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; PAPIEROK, B.; BREY, P. T. Variation of larval susceptibility to *Lagenidium giganteum* in three mosquito species. **Journal of invertebrate pathology**, v. 63, p 1-8, 1993.

HAMPTON, M. B.; STAMENKOVIC, I.; WINTERBOURN, C. C. Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 517, n. 1–3, p. 229–232, 2002.

HARDY, M. C. Resistance is not Futile : It Shapes Insecticide Discovery. **Insects**, v. 5, p. 227–242, 2014.

HEMMERS, S.; TEIJARO, J. R.; ARANDJELOVIC, S.; MOWEN, K. A. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

HILLYER, J. F. insect immunology and hematopoieses. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 2, n. 2, p. 102–118, 2016.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. **Cell and Tissue Research**, v. 313, n. 1, p. 117–127, 2003.

HILLYER, J. F.; STRAND, M. R. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. **Current Opinion in Insect Science**, v. 3, p. 14–21, 2014.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JR, C. A. J. Phylogenetic Perspectives Immunity in Innate. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313–1318, 2014.

KANNEMEIER, C.; SHIBAMIYA, A.; NAKAZAWA, F.; TRUSHEIM, H.; RUPPERT, C.; MARKART, P.; SONG, Y.; TZIMA, E.; KENNERKNECHT, E.; NIEPMANN, M.; VON BRUEHL, M.-L.; SEDDING, D.; MASSBERG, S.; GUNTHER, A.; ENGELMANN, B.; PREISSNER, K. T. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6388–6393, 2007.

KAPLAN JM. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. **Journal of immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 2013.

KAPPAUN, K. Soyuretox, a recombinant peptide derived from soybean (*Glycine max*) ubiquitous urease: Biostructural properties and toxicity screening in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Tese de doutorado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, 2018.

KO, M. VON; GOLDMANN, O.; THULIN, P.; HEINEMANN, K.; NORRBY-TEGLUND, A.; ROHDE, M.; MEDINA, E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p.

3070–3081, 2018.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, 2009.

LANZMENDOZA, H.; BETTENCOURT, R.; FABBRI, M.; FAYE, I. Regulation of the insect immune-response - the effect of hemolin on cellular immune-mechanisms. **Cellular Immunology**, v. 169, n. 1, p. 47–54, 1996.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M.; LAZZARI, C. R.; GUARNERI, A. A.; MOTA, T.; OMONDI, B. A.; LORENZO, M. G. Genetic basis of triatomine behavior: lessons from available insect genomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 63–73, 2013.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1295–1309, 2002.

LEHANE, M. J. The biology of blood-sucking in insects, second edition, 2005

LI, P.; LI, M.; LINDBERG, M. R.; KENNETT, M. J.; XIONG, N.; WANG, Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 9, p. 1853–1862, 2010.

LIGABUE-BRAUN, R.; ANDREIS, F. C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R. 3-to-1: Unraveling structural transitions in ureases. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 5, p. 459–467, 2013.

LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 248–255, 2006.

LOPES, F. C.; DOBROVOLSKA, O.; REAL-GUERRA, R.; BROLL, V.; ZAMBELLI, B.; CARLINI, R.; CIURLI, S.; MUSIANI, F.; UVERSKY, V. N. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **The FEBS Journal** v. 282, p. 1043–1064, 2015.

LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 219–229, 2001.

LU, A.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; YANG, B.; WU, K.; XIE, W.; LUAN, Y.; LING, E. Insect prophenoloxidase : the view beyond immunity. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–15, 2014.

MANDATO, C. A.; L. DIEHL-JONES, W.; MOORE, S. J.; DOWNER, R. G. H.

The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 1, p. 1–8, 1997.

MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 2, p. 186–195, 2009.

MARRINGA, W. J.; KRUEGER, M. J.; BURRITT, N. L.; BURRITT, J. B. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 39–41, 2014.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D. R.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C. G. M.; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R.; PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; BROLL, V.; DEFFERRARI, M. S.; LIGABUE-BRAUN, R.; KAPPAUN, K.; TICHOTA, D. M.; FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; DEMARTINI, D. R.; POSTAL, M.; MEDEIROS-SILVA, M.; BECKER-RITT, A. B.; PASQUALI, G.; CARLINI, C. R. Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 245–258, 2017.

MESQUITA, R. D.; VIONETTE-AMARAL, R. J.; LOWENBERGER, C.; RIVERA-POMAR, R.; DANSA, M.; DAUMAS-FILHO, C. R. O.; DE-PAULA, I. F.; DIAS, F. A.; DIMOPOULOS, G. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 2015.

MILLER, J. S.; STANLEY, D. W. Eicosanoids mediate microaggregation reactions to bacterial challenge in isolated insect hemocyte preparations. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 1409–1417, 2001.

MORET, Y.; MOREAU, J. The immune role of the arthropod exoskeleton. **Équipe Écologie Évolutive**, v. 9, p. 200–206, 2012.

MOYETTA, N. R.; BROLL, V.; PERIN, A. P. A.; UBERTI, A. F.; COSTE GRAHL, M. V.; STANISCUASKI, F.; CARLINI, C. R.; FRUTTERO, L. L. Jaburetox-

induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: *Reduviidae*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 200, n. May, p. 17–26, 2017.

MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

MUNKS, M. W.; MCKEE, A. S.; MACLEOD, M. K.; POWELL, R. L.; DEGEN, J. L.; REISDORPH, N. A.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. **Blood**, v. 116, n. 24, p. 5191–5199, 2010.

NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 443–459, 2005.

NAPPI, A. J.; VASS, E.; FREY, F.; CARTON, Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European journal of cell biology**, v. 68, n. 4, p. 450–6, 1995.

NASCIMENTO, M. T. C.; SILVA, K. P.; GARCIA, M. C. F.; MEDEIROS, M. N.; MACHADO, E. A.; NASCIMENTO, S. B.; SARAIVA, E. M. DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 84, p. 62–70, 2018.

NG, T. H.; CHANG, S.; WU, M.; WANG, H. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, p. 644–651, 2013.

NUNES-DA-FONSECA, R.; BERNI, M.; TOBIAS-DOS-SANTOS, V.; PANE, A.; ARAUJO, H. M. *Rhodnius prolixus*: From classical physiology to modern developmental biology. **Genesis**, v. 55, 2016.

OLIVEIRA, D. S.; BRITO, N. F.; NOGUEIRA, F. C. S.; MOREIRA, M. F.; LEAL, W. S.; SOARES, M. R.; MELO, A. C. A. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. **Journal of Insect Physiology**, v. 100, n. June, p. 108–118, 2017.

MOBLEY HLT & HAUSINGER RP. Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 85-108, 1989.

MUTA, T.; IWANAGA, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p 41-47, 1996.

OSTOJIC, J.; ANDREASEN, C. B.; ROTH, J. A.; PALIC, D. & Comparative Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 805–816, 2007.

PAIM, R. M. M.; NASCIMENTO, B. W. L.; NASCIMENTO, A. M. D.; PACHECO, D. E.; SOARES, A. C.; ARAUJO, R. N.; SANT'ANNA, M. R. V.; PESSOA, G. C. D.; GONTIJO, N. F.; PEREIRA, M. H. Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, *Reduviidae*) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

PANCER, Z.; COOPER, M. D. The Evolution of Adaptive Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 497-518, 2006.

PAPAYANNOPOULOS, V.; METZLER, K. D.; HAKKIM, A.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010.

PATEL, S.; KUMAR, S.; JYOTI, A.; SRINAG, B. S.; KESHARI, R. S.; SALUJA, R.; VERMA, A.; MITRA, K.; BARTHWAL, M. K.; KRISHNAMURTHY, H.; BAJPAI, V. K.; DIKSHIT, M. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 226–234, 2010.

PECH, L. L.; STRAND, M. R. Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: *Noctuidae*) involves an RGD-dependent cell adhesion mechanism. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 6, p. 481–488, 1995.

PECH, L. L.; STRAND, M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 2053–2060, 1996.

PILSCZEK, F. H.; SALINA, D.; POON, K. K. H.; FAHEY, C.; YIPP, B. G.; SIBLEY, C. D.; ROBBINS, S. M.; GREEN, F. H. Y.; SURETTE, M. G.; SUGAI, M.; BOWDEN, M. G.; HUSSAIN, M.; ZHANG, K.; KUBES, P. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7413–7425, 2010.

PIOVESAN, A. R.; MARTINELLI, A. H. S.; LIGABUE-BRAUN, R.;

SCHWARTZ, J. L.; CARLINI, C. R. *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 547, p. 6–17, 2014.

POIRIER, A. C.; SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; VANHOVE, A. S.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; RUBIO, T. P.; CHARRIÈRE, G. M.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 24821–24831, 2014.

POSTAL, M.; MARTINELLI, A. H. S.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F. F.; PASQUALI, G.; GOMES, V. M.; CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

RATCLIFFE, N. A.; GAGEN, S. J. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. **Tissue and Cell**, v. 9, n. 1, p. 73–85, 1977.

RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 10, p. 747–769, 2011.

REICHEL, A. M.; MUÑOZ-CARO, T.; CONTRERAS, G. S.; GARCÍA, A. R.; MAGDOWSKI, G.; GÄRTNER, U.; TAUBERT, A. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 50, p. 106–115, 2015.

RIBEIRO-DASILVA, G.; PRADO, J. F. Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. **Toxicon**, v. 31, n. 9, p. 1131–1136, 1993.

ROBB, C. T.; DYRYNDA, E. A.; GRAY, R. D.; ROSSI, A. G.; SMITH, V. J. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–11, 2014.

ROSETTO, M.; MANETTI, A. G. O.; GIORDANO, P. C.; MARRI, L.; AMONS, R.; BALDARI, C. T.; MARCHINI, D.; DALLAI, R. Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, n. 2, p. 330–337, 1996.

SAMAKOVLIS, C.; KYLSTEN, P.; KIMBRELL, D. A.; ENGSTRÖM, A.;

HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; HULTMARK, D. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 1, p. 163–9, 1991.

SATYAVATHI, V. V.; ASHA MINZ, N. J. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 8, p. 1753–1763, 2014.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J. A.; LEVINE, R. L. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 4, p. 815–821, 1995.

SHRESTHA, S.; KIM, Y. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 99–112, 2008.

SILVA, L. M. R.; CARO, T. M.; GERSTBERGER, R.; VILA-VIÇOSA, M.J.; CORTES, H.C.; HERMOSILLA, C.; TAUBERT, A. The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. **Parasitol Research**, v. 113, p. 2797-2807, 2014.

SMYTH, J. D. **Foundations of parasitology (8th edition)**. 2008

SOUZA, G.; COSTA, L. C. A.; MACIEL, A. C.; REIS, F. D. V.; PAMPLONA, Y. Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3269–3280, 2017.

STANISÇUASKI, F.; BRUGGE, V.; CARLINI, C. R.; ORCHARD, I. *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 255–263, 2009.

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, v. 4, n. 2, p. 55–67, 2012.

STEELE, J.; DOCKRELL, H. M. A Simple Method for the Solubilisation of Reduced NBT, and Its Use as a Colorimetric Assay for Activation of Human Macrophages by γ -Interferon. **Journal of Immunological Methods**, v. 82, p. 161–167, 1985.

SUSSMAN, S. The functions of tyrosinase in insects. **The Quarterly review of biology**, v. 24, n. 4, p. 328–341, 1949.

TABARES, M.; ORTIZ, M.; GONZALEZ, M.; CARAZZONE, C.; VIVES FLOREZ, M. J.; MOLINA, J. Behavioral responses of *Rhodnius prolixus* to volatile

organic compounds released in vitro by bacteria isolated from human facial skin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2018.

TAKEI, H.; ARAKI, A.; WATANABE, H.; ICHINOSE, A.; SENDO, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 2, p. 229–240, 1996.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINI, B.; CARLINI, C. R.; AYUB, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6–7, p. 821–827, 2007.

URBAN, C. F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 668–676, 2006.

WARDINI, A. B.; GUIMARA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; NADAES, N. R.; DANELLI, M. G. M.; MAZUR, C.; BENJAMIM, C. F.; SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 259–264, 2010.

WEBSTER, S. J.; DAIGNEAULT, M.; BEWLEY, M. A.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WALMSLEY, S. R.; READ, R. C.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 2968–2979, 2011.

WEN, F.; WHITE, G. J.; VANETTEN, H. D.; XIONG, Z.; HAWES, M. C. Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 820–829, 2009.

WIGGLESWORTH, B. Y. V. B. Local and General Factors in the Development of “Pattern” in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, v. 17, p. 180–200, 1940a.

WIGGLESWORTH, V. B. The Physiology of Ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling Moulting and “Metamorphosis”. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 77, p. 193–221, 1934.

WIGGLESWORTH, V. B. The function of the Corpus Allatum in the Growth and

Reproduction of *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 79, n. 313, p. 91–121, 1936.

WIGGLESWORTH, V. B. the Determination of Characters At Metamorphosis in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, v. 17, p. 180–200, 1940b.

WYATT, G. R. The Biochemistry of Insect Hemolymph. **Annual Review of Entomology**, v. 6, n. 1, p. 75–102, 1961.

YANG, H.; BIERMANN, M. H.; BRAUNER, J. M.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; HERRMANN, M. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

YIPP, B. G.; KUBES, P.; DC, W.; YIPP, B. G.; KUBES, P. NETosis : how vital is it ? **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2784–2794, 2013.

YIPP, B.; PETRI, B.; SALINA, D.; JENNE, C.; SCOTT, B.; ZBYTNUIK, L.; PITTMAN, K.; ASADUZZAMAN, M.; WU, K.; MEIJNDERT, C.; MALAWISTA, S.; CHEVANCE, A.; ZHANG, K.; CONLY, J.; KUBES, P. Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection. **Nature Medicine**, v. 18, p. 1386-1393, 2012.

YOUSEFI, S.; SIMON, D.; SIMON, H. U. Eosinophil extracellular DNA traps: Molecular mechanisms and potential roles in disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 736–737, 2012.

ZHANG, X.; HE, Y.; CAO, X.; GUNARATNA, R.; CHEN, Y.; BLISSARD, G.; KANOST, M. R.; JIANG, H. Phylogenetic analysis and expression profiling of the pattern recognition receptors: insights into molecular recognition of invading pathogens in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 405, p. 38–50, 2015.

ZHANG, X.; ZHUCHENKO, O.; KUSPA, A.; SOLDATI, T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–9, 2016.

Apêndice A

Estudos sobre a interação do Jaburetox e a enzima UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase em *Rhodnius prolixus*.

1. Introdução

UAPs (E.C. 2.7.7.23) são enzimas responsáveis por realizar a catálise de uridina trifosfato e *N*-acetilglicosamina fosfato para formar o composto UDP-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) a forma biologicamente ativa de *N*-acetilglicosamina. É uma proteína amplamente distribuída entre eucariontes e procariontes (MARUYAMA et al., 2007; STOKES et al., 2008; FANG et al., 2013; PIACENTE et al., 2014). O UDP-GlcNAc está envolvido em muitos processos fisiológicos como na síntese de quitina, formação de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicosilação de proteínas, formação de metabólitos secundários e na estrutura e função de matrizes celulares (MIO et al., 1998, 1999; COHEN, 2001; TONNING et al., 2006; ARAKANE et al., 2011; LIU et al., 2013; URBANIAK et al., 2013; YANG et al., 2015).

A formação de quitina é um processo essencial para a parede celular de diferentes organismos e, em insetos, ela apresenta grande importância decorrente da construção da cutícula e epitélios ectodérmicos (exoesqueleto, revestimento cuticular das traqueias, do intestino anterior, do intestino posterior e membrana peritrófica) (MERZENDORFER, 2006, 2011). A rota da formação da quitina é complexa e envolve várias enzimas, tendo a quitina sintase e a UAP um papel muito importante nesse processo (MERZENDORFER, 2003).

Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIA) são moléculas compostas por fosfolípídeos, resíduos de açúcares e um grupamento inositol. As âncoras de GPIs são amplamente encontradas em protozoários, leveduras, fungos, plantas, insetos e nos vertebrados, no entanto não estão presentes nas bactérias (IKEZAWA, 2002). Estão anexadas na superfície externa da membrana plasmática e covalentemente ligadas às proteínas pelas suas porções carboxi-terminais, sendo um mediador entre essas duas estruturas (FERGUSON & WILLIAMS, 1988). Proteínas ancoradas à membrana por GPIA podem desempenhar diversas funções celulares, servindo como receptoras específicas, moléculas de adesão, na resposta imune ou como catalisadoras de processos que ocorrem na membrana (TARTAKOFF & SINGH, 1992; NOSJEAN et al., 1997; KINOSHITA, 2014).

A glicosilação é uma das modificações de biomoléculas mais frequentes, realizada através da adição de sacarídeos em sítios específicos de proteínas e lipídeos. Este processo é essencial para a formação das proteínas de membrana, secretórias, e também é responsável pelo dobramento correto das mesmas (ZHANG et al., 2012). Os tipos mais comuns de glicosilação são nitrogênio-glicosilação (*N*-glicosilação), que ocorre no nitrogênio da amida de cadeias laterais de asparagina, e a oxigênio-glicosilação (*O*-glicosilação), que ocorre no hidróxi oxigênio da serina, tirosina e treonina (SPIRO, 2002). Além das funções básicas da glicosilação, há trabalhos demonstrando que esse processo também está envolvido na resposta imune dos insetos (HERRERO et al., 2007; MORTIMER et al., 2012).

UAP é crucial para a sobrevivência de fungos, bactérias e insetos, tornando a proteína um potencial alvo para estratégias de controle biológico. Nos últimos anos, uma crescente tentativa de desenvolver inibidores desta proteína tem sido proposta com o objetivo de controlar insetos pragas e organismos patogênicos (FANG et al., 2013; LIU et al., 2013; RANI & KHAN, 2016).

Tendo em vista a importância da UAP para a vitalidade dos organismos, recentemente GALVANI et al. (2015) demonstraram que o sistema nervoso central (SNC) de *Triatoma infestans* (inseto hematófago vetor da doença de Chagas) é alvo do Jbtx. Através de uma abordagem imunoproteômica os autores reportaram uma interação física entre a UAP e o peptídeo. Seguindo nessa linha experimental, FRUTTERO et al. (2016) observaram que a toxina altera a atividade enzimática da UAP no SNC e glândulas salivares de *R. prolixus* entretanto MOYETTA et al. (2017) demonstraram que na hemolinfa a atividade da UAP não é alterada indicando, portanto, que o efeito é tecido específico. A fim de elucidar esta interação observada entre a UAP e o Jbtx utilizamos abordagens *in silico* e *in vitro* para investigar a interação física observada por GALVANI et al. (2015).

2. Materiais e métodos

2.1. Imunofluorescência

Os tratamentos foram realizados através da injeção de Jbtx 1 µg/inseto ou PB (tampão fosfato como controle). Após 18 h, a hemolinfa dos insetos foi coletada com uma pipeta, a partir de um corte das patas. As amostras foram recebidas em solução anticoagulante (10 mM Na₂EDTA, 100 mM glicose, 62 mM NaCl, 30 mM citrato de sódio, 26 mM ácido cítrico, pH 4.6) (Azambuja et al., 1991) (5:1 anticoagulante:hemolinfa) com poucos cristais de feniltiureia. Os hemócitos foram aderidos durante 1 h em lâminas tratadas com poli-L-lisina 0,1 %. Após este período, as lâminas foram lavadas com salina de *R. prolixus* (150 mM NaCl, 8.6 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 8.5 mM MgCl₂, 4 mM NaHCO₃, 34 mM glicose, 5 mM HEPES, pH 7), seguida de fixação com formaldeído 4 % em PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.5) durante 25 min em temperatura ambiente (TA). Após a fixação, a amostra foi lavada duas vezes por 5 min e então foi realizado o bloqueio/permeabilização [soro fetal bovino (FBS) 5 %, albumina sérica bovina 1 % e Triton X-100 0,1 %] por 30 min a TA. O procedimento de lavagem com PBS foi repetido e as amostras foram então incubadas com FBS 1 % na presença de anticorpo anti-UAP (na diluição de 1:1.500) e anti- α -tubulina (na diluição de 1:400) durante 1 h em TA. Após lavagem, as amostras foram incubadas com FBS 1 % na presença dos anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 para anti-UAP e Alexa 594 para anti- α -tubulina (ambos na diluição de 1:400). A amostra foi lavada novamente e então corada com DAPI 300 nM por 5 min. As lâminas foram lavadas e secas, seguidas da montagem através de Fluorsave. As lâminas foram analisadas com um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 200 acoplado com uma câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Germany). A intensidade de fluorescência das imagens foi determinada através do valor médio de cinza (*mean grey value*) dos *pixels* definidas manualmente nas áreas das células usando o software ImageJ. O fundo foi subtraído tomando como referência uma área livre de células. O ensaio foi repetido cinco vezes e os dados digitais de 50 células individuais para cada tratamento foram registrados.

2.2. Modelagem molecular e atracamento molecular

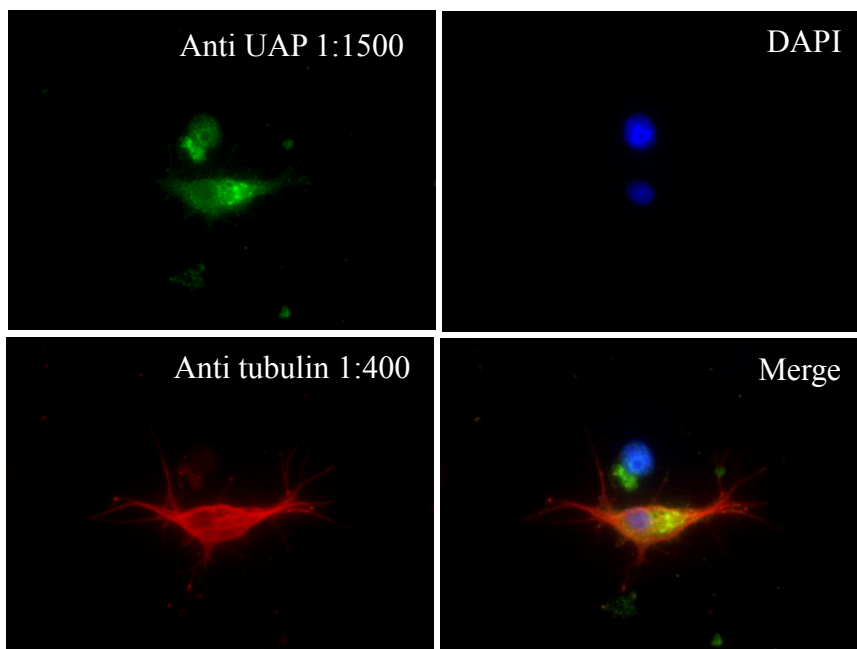
A modelagem molecular para a UAP de *R. prolixus* foi realizada através do programa Modeller 9.19 (<https://salilab.org/modeller/>) usando como molde a estrutura da UAP de *Homo sapiens* (PDB ID: 1JVD) que apresenta um grau de identidade em torno de 56,5 % com a proteína de *R. prolixus*. As sequências foram alinhadas em Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e então submetidas a plataforma Modeller 9.19. Através do algoritmo inserido solicitamos que fossem gerados dez possíveis modelos da proteína. Os modelos propostos pelo programa foram analisados quanto a suas qualidades estereoquímicas através da plataforma SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

O atracamento molecular entre a UAP de *R. prolixus* e o peptídeo entomotóxico, Jaburetox (PDB ID: 2mm8) foi realizado através da plataforma PATCHDOCK (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). Devido ao Jbtx ser uma proteína intrinsecamente desordenada, foram realizadas simulações considerando as cinco conformações do peptídeo obtidas por ressonância magnética nuclear (Lopes et al., 2015). Não foram adicionadas zonas de restrição para a interação proteína-proteína. Cada um dos cinco confôrmeros de Jbtx foi analisado individualmente para interagir com a UAP. Os dez melhores modelos para cada confôrmero, decorrente do escore proposto pela plataforma, foram selecionados para posterior análise. Para refinar os modelos e selecionar os mais fidedignos, com o que possivelmente ocorre *in vivo*, analisamos todas as interações entre os resíduos da UAP com os resíduos do Jbtx a fim de encontrar as interações mais recorrentes. Essa abordagem foi realizada através do PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>) onde obtivemos todas as interações de aminoácidos para cada modelo e então classificamos os melhores candidatos.

3. Resultados e discussão

A UAP encontra-se distribuída no citoplasma dos hemócitos de *R. prolixus* (Fig. 1A). Após tratamento com o Jbtx, não foi observada nenhuma alteração neste padrão de distribuição da UAP na célula (Fig. 1B). No entanto, quando comparamos as células tratadas com a toxina e as células do grupo controle, o peptídeo parece induzir alterações morfológicas no citoplasma dos hemócitos (Fig. 1B). Ensaio preliminares de citometria de fluxo indicam que a morfologia dos hemócitos apresenta alta variabilidade entre as amostras (Fig. suplementar – anexo B). Corroborando com os dados apresentados aqui, AZAMBUJA et al. (1991) descreveram que entre os artigos dispostos na literatura não existe um consenso sobre a morfologia destas células. Nossos achados também demonstram que a intensidade da marcação fluorescente da UAP em hemócitos não é alterada (Fig. 1B-C), indicando que os níveis de expressão da UAP não são alterados em resposta ao tratamento com Jbtx

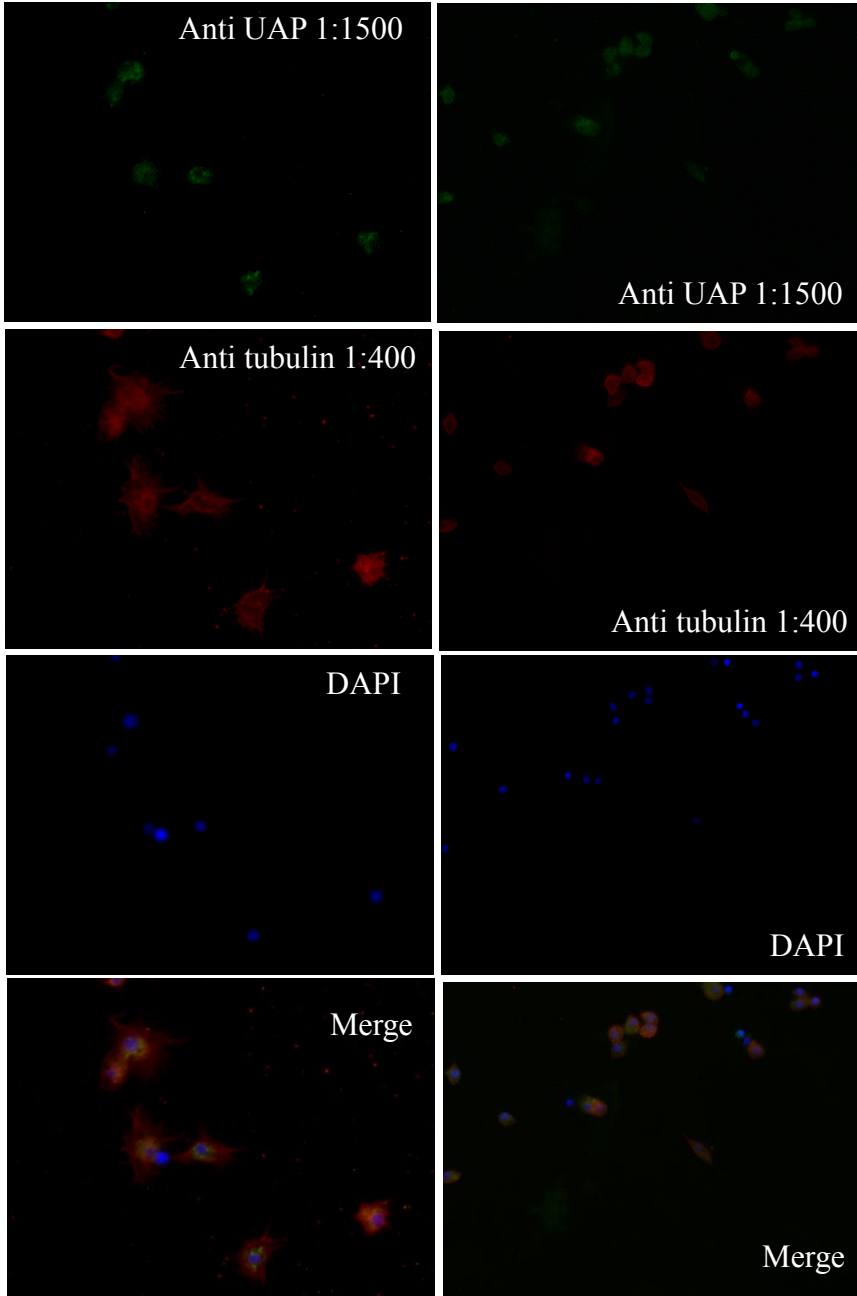
A



B

Jaburetox

Controle



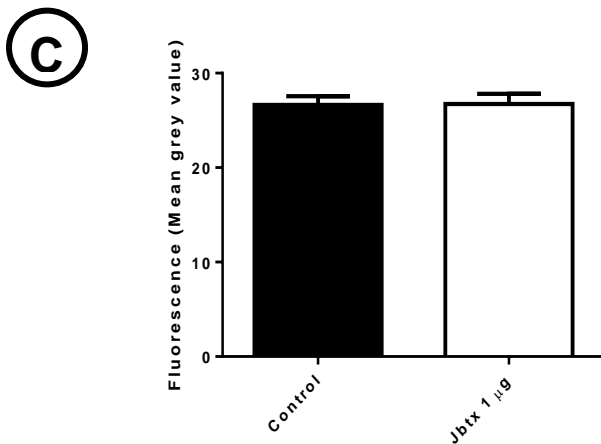


Fig 1. Distribuição da proteína UAP em hemócitos. O padrão de fluorescência nas imagens é demonstrado pelas cores verde (anti-UAP/Alexa 488), vermelho (anti- α -tubulina/Alexa 594). A barra de escala representa 20 μ m. A) Imagem representativa da distribuição da UAP em hemócitos no aumento de 100x. B) Painel de imagens representativos da fluorescência entre grupos tratados e controle 18 h após tratamento. Imagens obtidas no aumento de 40x. C) Quantificação da fluorescência. 50 células foram contadas individualmente para cada experimento utilizando o software ImageJ e os dados foram expressos como “Fluorescence (Mean grey value)”. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5).

Corroborando com nossos resultados, PERIN et al. (2018) não observou alterações entre a quantidade proteica da UAP no sistema nervoso central de *Nauphoeta cinerea*. Entretanto, MOYETTA et al. (2017) demonstrou que a toxina é capaz de induzir um aumento da expressão do RNAm da UAP de *R. prolixus*, enquanto que a expressão proteica e a atividade enzimática na hemolinfa não é alterada pelo tratamento com o peptídeo. Contudo, esse efeito da toxina parece ser tecido específico. FRUTTERO et al. (2017) demonstrou que a expressão do RNAm da UAP não é alterada em glândulas salivares e sistema nervoso central de *R. prolixus*, mas em ambos os tecidos a atividade enzimática é aumentada após tratamento com Jbtx. Nossos resultados de modelagem associados aos de atracamento indicam que o Jbtx interage diretamente com o sítio ativo da enzima (Fig. 2 e 3), em todas as suas conformações, sugerindo que o aumento da atividade enzimática observada nos tecidos é decorrente da interação de Jbtx com a UAP, corroborando que a observação de que não há alterações dos níveis de expressão da enzima.

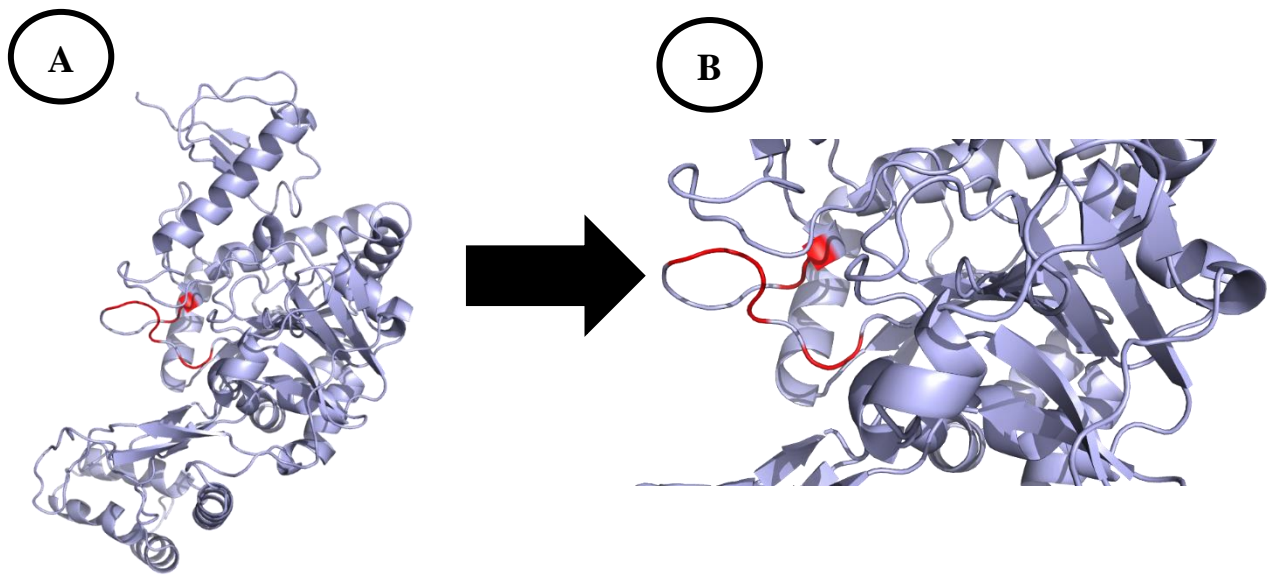


Fig 2. UAP de *R. prolixus* modelada a partir da sequência da UAP de *Homo sapiens*. Modelo da estrutura terciária da proteína (A). Sítio ativo da enzima (B), destacando em vermelho os aminoácidos que o compõe, como proposto por MIO et al., 1998.

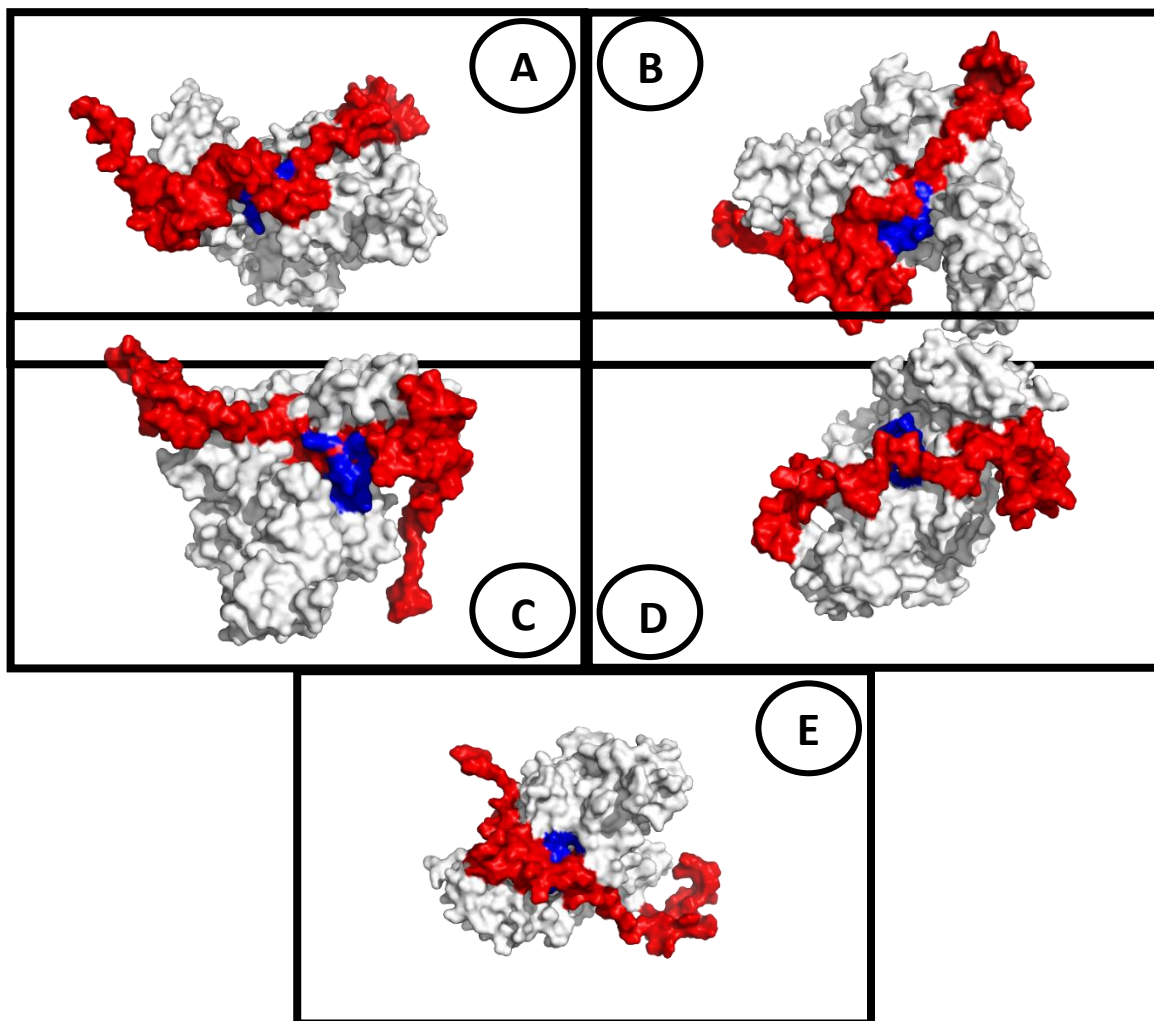


Fig 3. Atracamento molecular entre Jbtx (vermelho) e a proteína UAP (branco). O sítio ativo da enzima está destacado em azul. As imagens A, B, C, D e E representam o melhor modelo dentro dos dez analisados dentro de cada grupo de conformero de Jbtx.

Realçamos que nestes ensaios não foi realizada uma restrição de ligação entre as proteínas. Corroborando com nossos resultados de bioinformática, GALVANI et al. (2015) já havia demonstrado, através de ensaios de imunoprecipitação, que a toxina interage fisicamente com a UAP e quando sua atividade enzimática foi avaliada em sistema nervoso de *Triatoma infestans*, a elevação da atividade foi constatada. Entretanto, FRUTTERO et al. (2017) não observaram alterações induzidas pela toxina na atividade da UAP recombinante, indicando que outros fatores celulares podem estar envolvidos na ativação da enzima *in vivo*. Em *N. cinerea*, PERIN et al. (2018) demonstraram que no sistema

nervoso de baratas, a atividade enzimática da UAP é diminuída em períodos mais longos de tratamento (18 h). Nos mesmos períodos de tratamento onde são observados aumento da atividade enzimática da UAP em *R. prolixus* (FRUTTERO et al., 2017; MOYETTA et al., 2017) não se observam alterações da atividade enzimática nas baratas. Assim, é possível que a interação observada aqui entre o Jbtx e a UAP esteja ausente ou ocorra de maneira distinta em *N. cinerea*. Não há informações de sequência da UAP de *N. cinerea*, impossibilitando uma análise de conservação de sequência entre as proteínas destas duas espécies.

4. Perspectivas

A fim de elucidar as diferentes respostas observadas por FRUTTERO et al. (2016) e PERIN et al. (2018) quando modelos de insetos distintos são utilizados, é necessário realizar experimentos de modelagem com a UAP de *N. cinerea* (ou de um organismo mais próximo à barata) e posteriormente utilizar algoritmos de atracamento molecular para averiguar a interação entre o peptídeo e a UAP. Experimentos de interação *in vitro*, por ultracentrifugação analítica entre UAP e Jbtx, para avaliar afinidade e estequiometria de união, são complementares para averiguar a força das interações entre os resíduos das proteínas. A realização de análises filogenéticas da UAP de diferentes organismos também é de nosso interesse para integrar este trabalho.

5. Referências

ARAKANE, Y.; BAGUINON, M. C.; JASRAPURIA, S.; CHAUDHARI, S.; DOYUNGAN, A.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R. W. Both UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 42–50, 2011.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.; RATCLIFFE, N. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86 (1), p. 1–10, 1991.

COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: A revisit. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 946–950, 2001.

FANG, W.; DU, T.; RAIMI, O. G.; HURTADO-GUERRERO, R.; URBANIAK, M. D.; IBRAHIM, A. F. M.; FERGUSON, M. A. J.; JIN, C.; VAN AALTEN, D. M. F. Genetic and structural validation of *Aspergillus fumigatus* UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase as an antifungal target. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 479–493, 2013.

FERGUSON, M. J.; WILLIAMS, F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. **Annal Review of Biochemistry**, v. 57, p. 285–320, 1988.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V. C.; LOPES, F. C.; BROLL, V.; FEDER, D.; CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1–14, 2016.

FRUTTERO, L.L., MOYETTA, N.R., KRUG, M.S., BROLL, V., COSTE GRAHL, M.V., REAL-GUERRA, R., STANISÇUASKI, F., CARLINI, C.R., 2017. Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. **Acta Tropica**, v. 168, 54–63.

GALVANI, G. L.; FRUTTERO, L. L.; CORONEL, M. F.; NOWICKI, S.; DEMARTINI, D. R.; DEFFERRARI, M. S.; POSTAL, M.; CANAVOSO, L. E.; CARLINI, C. R.; SETTEMBRINI, B. P. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta : *Heteroptera*). **BBA - General**

Subjects, v. 1850, n. 2, p. 255–262, 2015.

HERRERO, S.; ANSEMS, M.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; BAKKER, P. L.; DE MAAGD, R. A. REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 11, p. 1109–1118, 2007.

IKEZAWA, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. April, p. 409–417, 2002.

KINOSHITA, T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 90, n. 4, p. 130–143, 2014.

LIU, X.; LI, F.; LI, D.; MA, E.; ZHANG, W.; ZHU, K. Y.; ZHANG, J. Molecular and Functional Analysis of UDP-*N*-Acetylglucosamine Pyrophosphorylases from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. **PlosOne**, v. 8, n. 8, 2013.

MARUYAMA, D.; NISHITANI, Y.; NONAKA, T.; KITA, A.; FUKAMI, T. A.; MIO, T.; YAMADA-OKABE, H.; YAMADA-OKABE, T.; MIKI, K. Crystal structure of uridine-diphospho-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans* and catalytic reaction mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 23, p. 17221–17230, 2007.

MERZENDORFER, H. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393–4412, 2003.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology**, v. 176, p. 1–15, 2006.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759–769, 2011.

MIO, T.; YABE, T.; ARISAWA, M.; YAMADA-OKABE, H. The Eukaryotic UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14392–14397, 1998.

MIO, T.; YAMADA-OKABE, T.; ARISAWA, M.; YAMADA-OKABE, H. *Saccharomyces cerevisiae* GNA1, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-*N*-acetylglucosamine. **Journal of Biological chemistry**, v. 274, n. 1, p.

424–429, 1999.

MORTIMER, N. T.; KACSOH, B. Z.; KEEBAUGH, E. S.; SCHLENKE, T. A. *Mgat1*-dependent *N*-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 31, 2012.

MOYETTA, N. R.; BROLL, V.; PERIN, A. P. A.; UBERTI, A. F.; COSTE GRAHL, M. V.; STANISCUASKI, F.; CARLINI, C. R.; FRUTTERO, L. L. Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: *Reduviidae*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 200, p. 17–26, 2017.

NOSJEAN, O.; BRIOLAY, A.; ROUX, B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1331, n. 2, p. 153–186, 1997.

PERIN, A. P. . Jaburetox, peptídeo derivado de ureases: Efeitos sobre as vias enzimáticas da barata *Nauphoeta cinerea*. **Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2018.

PIACENTE, F.; BERNARDI, C.; MARIN, M.; BLANC, G.; ABERGEL, C.; TONETTI, M. G. Characterization of a UDP-*N*-acetylglucosamine biosynthetic pathway encoded by the giant DNA virus Mimivirus. **Glycobiology**, v. 24, n. 1, p. 51–61, 2014.

RANI, C.; KHAN, I. A. UDP-GlcNAc pathway: Potential target for inhibitor discovery against *M. tuberculosis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 62–70, 2016.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, 2002.

STOKES, M. J.; GÜTHER, M. L. S.; TURNOCK, D. C.; PRESCOTT, A. R.; MARTIN, K. L.; ALPHEY, M. S.; FERGUSON, M. A. J. The synthesis of UDP-*N*-acetylglucosamine is essential for bloodstream form *Trypanosoma brucei* *in vitro* and *in vivo* and UDP-*N*-acetylglucosamine starvation reveals a hierarchy in parasite protein glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 16147–16161, 2008.

TARTAKOFF, A. M.; SINGH, N. How to make a glycoinositol phospholipid anchor. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 11, p. 470–473, 1992.

TONNING, A.; HELMS, S.; SCHWARZ, H.; UV, A. E.; MOUSSIAN, B.

Hormonal regulation of *mummy* is needed for apical extracellular matrix formation and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. **Development** v. 133, p. 331–341, 2006.

URBANIAK, M. D.; COLLIE, I. T.; FANG, W.; ARISTOTELOUS, T.; ESKILSSON, S.; RAIMI, O. G.; HARRISON, J.; NAVRATILOVA, I. H.; FREARSON, J. A.; VAN AALTEN, D. M. F.; FERGUSON, M. A. J. A novel allosteric inhibitor of the uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Trypanosoma brucei*. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 9, p. 1981–1987, 2013.

YANG, W.; WU, Y.; CHEN, L. I.; XU, K.; XIE, Y. Two Chitin Biosynthesis Pathway Genes in *Bactrocera dorsalis* (Diptera : *Tephritidae*): Molecular Characteristics, Expression Patterns , and Roles in Larval – Pupal Transition. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 1–10, 2015.

ZHANG, Y.; YIN, H.; LU, H. Recent progress in quantitative glycoproteomics. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 5–6, p. 249–258, 2012.

Apêndice B

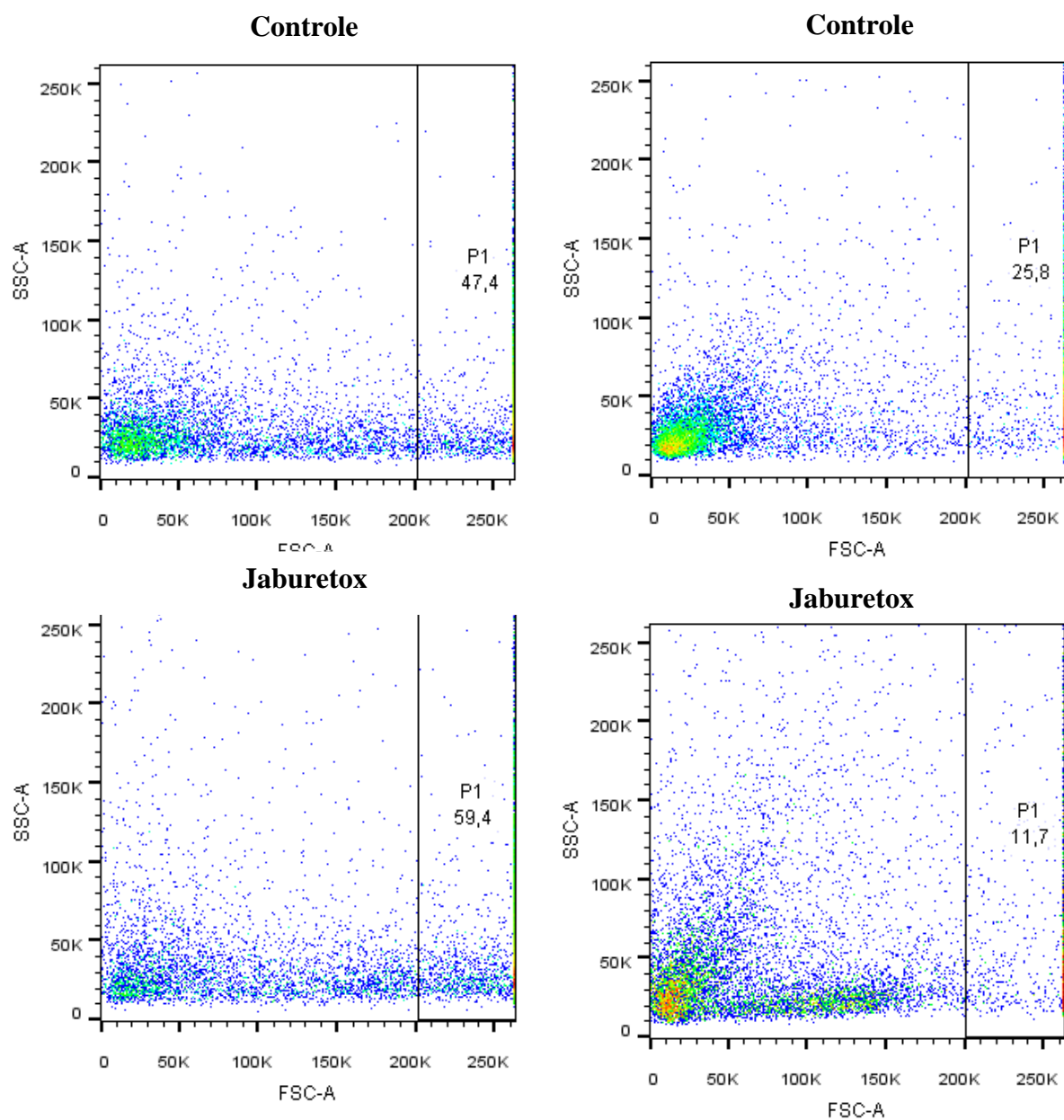


Fig suplementar 1. Distribuição entre populações de hemócitos. Ninfas de quinto instar de *R. prolixus* foram injetadas com Jbtx (1 μ g/inseto) ou com o mesmo volume de PBS (controle). Cada grupo continha 3 insetos. 18 h após injeções a hemolinfa foi coletada em solução anticoagulante e feniltiuréia e em seguida diluída com solução salina de *Rhodnius* para um volume final de 400 μ L. As amostras foram submetidas à citometria de fluxo em um equipamento BD FACSCanto II™ (BD Biosciences) com a configuração de potência do laser em *side-scattered light* (SSC) 550 e *forward-scattered ligh* (FSC) 430. As imagens indicam a distribuição populacional das células. O número abaixo de P1 (população 1) demonstra em % a quantidade de células neste quadrante.

Apêndice C

-----Mediante el presente, se deja constancia que el estudiante de Maestría **Matheus Vinicius Coste Grahl**, CPF: 853.784.700-30, matriculado en el programa de pos-graduación en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 00246847), realizó como parte complementaria de su formación una pasantía en el Departamento de Bioquímica Clínica – CIBICI – CONICET de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. La pasantía fue realizada durante el periodo del 15/07/2018 al 03/08/2018, comprendió una carga horaria de 120 horas y fue supervisada por los Doctores Lilián E. Canavoso y Leonardo L. Fruttero. Las actividades experimentales realizadas incluyeron ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia con el objetivo de caracterizar el efecto de Jaburetox, una toxina de origen vegetal, en la respuesta inmune del insecto vector de la enfermedad de Chagas *Rhodnius prolixus*.

Por otro lado, el alumno participó en el curso de doctorado titulado "Insectos con importancia médica, económica y forense: Avances en el conocimiento de su fisiología, bioquímica y estrategias para control", organizado por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. El curso, dirigido por la Dra. Lilián E. Canavoso y coordinado por el Dr. Leonardo L. Fruttero, fue realizado entre el 23/07/2018 y el 28/07/2018 y presentó una duración total de 24 hs. Dicho curso cuenta con aprobación del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba según Res. 305/2018.

A pedido del interesado, se emite el presente a los siete días del mes de agosto del año dos mil dieciocho.-----



Prof. Dra. Lilián E. Canavoso
Directora de la Escuela de Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba



Dr. Leonardo L. Fruttero
CIBICI - CONICET
Depart. de Bioq. Clínica
Fac. de Ciencias Quím. - UNC

Apêndice D



Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)



Natalia R. Moyetta^a, Valquiria Broll^b, Ana Paula A. Perin^b, Augusto F. Uberti^a,
Matheus V. Coste Grahl^a, Fernanda Staniscuaski^{b,c}, Celia R. Carlini^{a,c}, Leonardo L. Fruttero^{a,*}

^a Brain Institute (Instituto do Cérebro-INSCEB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Hemocytes

Insect control

Jaburetox

Mechanism of action

Rhodnius prolixus

Toxicity

ABSTRACT

Jaburetox is a recombinant peptide derived from a *Canavalia ensiformis* urease that presents toxic effects upon several species of insects, phytopathogenic fungi and yeasts of medical importance. So far, no toxicity of Jaburetox to mammals has been shown. Previous reports have identified biochemical targets of this toxic peptide in insect models, although its mechanism of action is not completely understood. In this work, we aimed to characterize the effects of Jaburetox in hemolymphatic insect cells. For this purpose, the model insect and Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* was used. *In vivo* and *in vitro* experiments indicated that Jaburetox interacts with a subset of hemocytes and it can be found in various subcellular compartments. In insects injected with Jaburetox there was an increase in the gene expression of the enzymes UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), chitin synthase and nitric oxide synthase (NOS). Nevertheless, the expression of NOS protein, the enzyme activities of UAP and acid phosphatase (a possible link between UAP and NOS) as well as the phosphorylation state of proteins remained unchanged upon the *in vivo* Jaburetox treatment. Nitric oxide (NO) imaging using fluorescent probes showed that Jaburetox augmented NO production in the hemocyte aggregates when compared to controls. Even though Jaburetox activated the hemocytes, as demonstrated by wheat germ agglutinin binding assays, the peptide did not lead to an increase of their phagocytic behavior. Taken together, these findings contribute to our understanding of toxic effects of Jaburetox, a peptide with biotechnological applications and a prospective tool for rational insect control.

1. Introduction

Jaburetox is a recombinant peptide of ~11 kDa derived from one of the isoforms of urease from *Canavalia ensiformis*, a leguminous plant commonly known as jack bean (Mulinari et al., 2007). The various biological effects of urease isoforms, independent of their enzymatic activity, have been reviewed elsewhere (Real-Guerra et al., 2013; Carlini and Ligabue-Braun, 2016) and include entomo- and fungitoxicity, as well as exocytosis induction in several cell models. Jaburetox was also reported as toxic for several species of phytopathogenic filamentous fungi and yeasts of medical importance (Postal et al., 2012) and to insect species from the orders Lepidoptera (Mulinari et al.,

2007), Blattodea (Mulinari et al., 2007) and Hemiptera (Defferrari et al., 2011; Martinelli et al., 2014; Galvani et al., 2015). Nevertheless, high doses of Jaburetox are not lethal nor caused symptoms of acute toxicity in mice or neonate rats when given orally or via injection, indicating that the peptide has potential as an option of a safe insecticide (Mulinari et al., 2007). Moreover, preliminary results with maize, sugarcane and soybean transgenic plants expressing Jaburetox indicated that those crops present higher resistance to the attack of insect pests, making this peptide a prospective tool for rational insect control (Carlini and Ligabue-Braun, 2016).

Due to its physiological characteristics and ease of raising, triatomines (Hemiptera: Reduviidae) have been used as models for

Abbreviations: CNS, central nervous system; NOS, nitric oxide synthase; UAP, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase; WGA, wheat germ agglutinin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; DAF-FM, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, diamino fluorescein-FM; PB, sodium phosphate buffer; FBS, fetal bovine serum; DTT, dithiothreitol; AP, acid phosphatase; JBU, jack bean urease; NO, nitric oxide; PAMP, pathogen associated molecular pattern; SG, salivary glands; Jbx, Jaburetox

* Corresponding author at: Instituto do Cérebro (InsCeb), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: valbroll@ufrgs.br (V. Broll), fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (F. Staniscuaski), celia.carlini@pucrs.br (C.R. Carlini), lfruttero@cbiot.ufrgs.br (L.L. Fruttero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.001>

Received 1 May 2017; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 6 June 2017

Available online 08 June 2017

1532-0456/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Matheus Grahl

Curriculum Vitae

Porto Alegre, outubro de 2018

CURRICULUM VITAE

Grahl, M.V.C; Grahl, M

DADOS PESSOAIS

Nome: Matheus Vinicius Coste Grahl

Local e data de nascimento: Porto Alegre-RS, Brasil. 31 de Março de 1995

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43.431 - Sala 209. Agronomia - Porto Alegre. 91501970, RS - Brasil

E-mail: matheusgrahl@hotmail.com

FORMAÇÃO:

2018

Doutorado em andamento em Medicina e Ciências da Saúde. (Conceito CAPES 6).

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
Orientador: Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2017

Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Um novo repertório imunológico de insetos e a necessidade de ácidos nucleicos extracelulares para o combate a toxina derivada de urease, Jaburetox.

Orientador: Fernanda Stanisçuaski.

Co-orientador: Leonardo Luis Fruttero.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2013 - 2016

Graduação em Biomedicina.

Centro Universitário Ritter dos Reis, UNIRITTER, Brasil.

Título: Efeitos Tóxicos do Peptídeo derivado de ureases, Jaburetox, no sistema nervoso central e glândulas salivares do inseto modelo *Rhodnius prolixus*.

Orientador: Leonardo Luis Fruttero.

Bolsista do(a): Programa Universidade para todos, PROUNI, Brasil.

ESTÁGIOS:

2015 - 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vínculo: Iniciação científica, Enquadramento Funcional: Bolsista de iniciação científica (CNPq), Carga horária: 20 h;

2015 - 2017

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Carga horária: 20 h;

2016 - 2016

Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Vínculo: Perfusão extracorpórea, estágio curricular, Carga horária: 30 h;

2016 - 2016

Clínica do Sono

Vínculo: Técnico em polissonografia, estágio curricular, Carga horária: 40h;

2014 - 2015

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Vínculo: Iniciação científica, Bolsista de iniciação científica (FAPERGS), Carga horária: 20 h;

2014 - 2014

Centro Universitário Ritter dos Reis

Vínculo: Monitor Acadêmico, estágio extracurricular, Carga horária: 4 h.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2016

Destaque da sessão conjunta de Biomedicina entre XVIII Jornada de iniciação científica e o XII salão de extensão universitária, Centro Universitário Ritter dos Reis.

2015

Destaque de Sessão da Biomedicina na XVII Jornada de Iniciação Científica, Centro Universitário Ritter dos Reis.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

MOYETTA, NATALIA R.; BROLL, VALQUIRIA; PERIN, ANA PAULA A.; UBERTI, AUGUSTO F.; **COSTE GRAHL, MATHEUS V.**; STANISCUASKI, FERNANDA; CARLINI, CELIA R.; FRUTTERO, LEONARDO L. Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology Pharmacology **JCR**, v. 200, p. 17-26, 2017.

FRUTTERO, LEONARDO L.; MOYETTA, NATALIA R.; KRUG, MONIQUE SIEBRA; BROLL, VALQUIRIA; **GRAHL, MATHEUS V. COSTE**; REAL-GUERRA, RAFAEL; STANISÇUASKI, FERNANDA; CARLINI, CELIA R. Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Acta Tropica JCR*, v. 168, p. 54-63, 2017.

FRUTTERO, LEONARDO L.; MOYETTA, NATALIA R.; UBERTI, AUGUSTO F.; **GRAHL, MATHEUS V. COSTE**; LOPES, FERNANDA C.; BROLL, VALQUIRIA; FEDER, DENISE; CARLINI, CELIA R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors JCR*, v. 9, p. 412, 2016.

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. Apresentação de Poster no: **II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology**. Effects of the peptide Jaburetox on the immune system of *Rhodnius prolixus*. 2018.

2. Apresentação de Poster no: **46° Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**. Neurotoxicity of Jaburetox, a Urease-Derived Peptide: Effects on Enzymes Activities in Tissues of Two Insect Species, 2017