

## O gene da quitina sintase na competência vetorial do barbeiro *Rhodnius prolixus*: ciclo de *Trypanosoma cruzi* e produção de EROs.

EVELYN S.L. ALVARENGA<sup>1</sup>(PG); BRUNO J. PESSOA (IC)<sup>1</sup>; FRANCIS M. SARAIVA,<sup>2</sup> (PG); GEORGIA C. ATELLA<sup>1</sup> (PQ); MARCIA C. PAES,<sup>2</sup>(PQ); MOREIRA CARVALHO CARDOSO, <sup>1</sup>(PQ)<sup>3</sup>

<sup>1</sup>.UNIV. FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL; <sup>2</sup>.UNIV. DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

E-MAIL: MONICA@IQ.UFRJ.BR

Palavras Chave: QUITINA, RHODNIUS PROLIXUS, RNAI

### Introdução

O *Rhodnius prolixus* é um vetor de inseto da doença de Chagas. A quitina é um biopolímero essencial das estruturas de insetos sintetizadas pela enzima quitina sintase (CHS). Nos insetos, a quitina pode ser encontrada em estruturas como cutícula, ovário e matriz peritrófica (PM). Em alguns grupos de insetos, a PM é substituída por uma estrutura análoga chamada membrana perimicrovilar. Fêmeas adultas de *R. prolixus* e ninfas do 5o estágio foram alimentadas em coelho e infectadas (ou não) com *T. cruzi*. Para a confecção do dsRNA foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos com a sequência do promotor T7 e os clones do gene de CHS do intestino do *R. prolixus* em vetor pGem T-easy (PROMEGA) em reação de PCR. O clone CHS contém uma sequência gênica de domínio catalítico que foi usada como modelo para a síntese de dsRNA específica para CHS (dsRNACHS), que foi injetada (1µg) na cavidade metatorácica 3 dias antes da alimentação. O objetivo deste trabalho é investigar o papel do gene CHS no *R. prolixus*: avaliando os efeitos do silenciamento do gene CHS na produção de EROs e no ciclo de vida do *T. cruzi*.

### Resultados e Discussão

O fenótipo de silenciamento gênico foi avaliado em insetos infectados, em grupos controle (gene não relacionado dsRNA injetado / sem injeção) e em grupos tratados com dsRNACHS por observação e análise, onde observamos que o intestino do inseto dsRNACHS tratado era muito frágil, com menos traquéia, ovários e oviposição. O crescimento e a diferenciação parasitária no intestino de *R. prolixus* foram monitorados no 5o e 11o dias após a ingestão da contagem de células (câmara de Neubauer). O nível de estresse oxidativo em insetos silenciados para o gene CHS foi medido por ensaios de peroxidação lipídica pelo método do MDA (malondialdeído). No presente estudo, observou-se um nível de estresse oxidativo mais alto nos

intestinos injetados com dsRNACHS, que apresentaram níveis de MDA / mg de tecido 21 vezes maiores que o controle, sugerindo um aumento no nível de estresse oxidativo na CHS silenciada. Nos intestinos tratados ocorreu redução da presença de tripomastigotas de *T. cruzi* e aumento das formas epimastigotas em relação aos controles, indicando uma mudança no ciclo de vida do parasita.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados. \*F: Forward, R: Reverse.

OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES			
Nome	Tamanho (pb)	Direção	Sequência (5'-3')
T7	-	-	TAATACGACTCACTATAGGG
RNAi1 CHS	516	F	TAATACGACTCACTATAGGGCAACCTCATGCTGA
RNAi2 CHS		R	TAATACGACTCACTATAGGATACCAAAATATAAGGAAG
Rp18S F	104	F	TCG GCC AAC AAA AGT ACA CA
Rp18S R		R	TGT CGG TGT AAC TGG CAT GT
RT F1	112	F	CGTATTCACCCTGTAGGATC
RT R1		R	TACAAAGTACACAGCCAATCAT

### Conclusões

Esses resultados indicam que o silenciamento do gene CHS em *R. prolixus* afeta a digestão sanguínea, aumenta o estresse oxidativo e interfere no ciclo de vida do *T. cruzi*.

### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, CNPq, FAPERJ pelo suporte financeiro.

<sup>1</sup> ALVARENGA, E.S.L. et. al. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. and Mol Biol.* 69: 61-70, 2016.

<sup>2</sup> MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology* 90: 759-769, 2011.

<sup>3</sup>JAIN, S. Evidence for lipid peroxidation during in vivo aging of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 937: 201-21, 1988.