

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

INTERAÇÃO DE *Rhodnius prolixus* COM *Trypanosoma rangeli*:
AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA CELULAR E HUMORAL E
MICROBIOTA INTESTINAL

DÉBORA PASSOS DE MATTOS

Rio de Janeiro
Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Débora Passos de Mattos

Interação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli*: avaliação do sistema de defesa celular e humoral e microbiota intestinal.

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

Orientador: Prof. Dr. Patrícia de Azambuja Penna

RIO DE JANEIRO

Março de 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: DÉBORA PASSOS DE MATTOS

Interação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli*: avaliação do sistema de defesa celular e humoral e microbiota intestinal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Patrícia de Azambuja Penna

Aprovada em: 27/03/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez	(UFF)	- Presidente
Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque	(FIOCRUZ)	
Prof. Dr. Marli Maria Lima	(FIOCRUZ)	
Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas	(FIOCRUZ)	
Prof. Dr. Maria Denise Feder	(UFF)	

Rio de Janeiro, 27 de março de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Aos meus pais, que são meus melhores amigos.

Sem eles eu nada seria.

Aos meus avôs, pelo incentivo e amor.

Aos meus irmãos pelo companheirismo incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos que recebi e recebo em minha vida, por me dar ânimo todos os dias e por ser a grande força que move o meu universo.

À meus anjos da guarda: meu pai José Alberto e minha mãe Nilcelia. Que me dão o seu melhor e que graças a Deus voltaram a viver comigo. Por serem a minha vida e estarem ao meu lado em todos os momentos.

À meus irmãos Cristiane e Henrique, exemplos de companheirismo. E por todo o amor que nos une.

À minha orientadora Patrícia Azambuja, agradeço por todos os momentos de companheirismo. Muito obrigada não só por me orientar em um momento tão único como esse. Agradeço por todo o apoio e amizade que temos e todos os ensinamentos relacionados ao mestrado e também à vida.

Às minhas amigas de laboratório: Cecília Stahl, Marcela Figueiredo, Márcia Gumiel e Raquel Souza agradeço pelo auxílio em todo momento, ajuda em experimentos e disponibilidade em sempre sanar minhas dúvidas.

À todos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos pelo ambiente agradável de trabalho constituído por todos (Andressa Alencastre, Bianca Henriques, Bruno Gomes, Carol Moraes, Eloi Garcia, Hector Diaz, José Carlos Nascimento, Maiara do Valle, Natalia Gonzalez, Reginaldo Brazil, Samara Costa, Severino Lucena, Vanessa Rizzo, Zildo Alves, Jaime entre outros). Um agradecimento especial à Daniele Castro, Fábio Mota, Fernando Genta e Peter Waniek pelo apoio nas várias reuniões para discussão de resultados e confecção do trabalho.

Ao Marcelo Gonzalez por revisar esta dissertação e pela ajuda em muitos momentos da minha vida.

Aos doutores André Luiz Rodrigues Roque, Marli Maria Lima, Rafael Maciel de Freitas e Maria Denise Feder por aceitarem participar da banca examinadora e de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À meus avôs: Newton (*in memoriam*), Célia, Thereza e Alankardette, por serem minhas estrelinhas guia. Não existem pessoas mais especiais no mundo! Muito obrigada simplesmente por existirem!

Aos meus grandes amores: Francisco e Clara. Por terem me ensinado a amar de maneira diferente, inexplicavelmente infinita. Meu príncipe e minha princesa, donos do meu coração.

Ao meu amado namorado, Carlos Júnior. Por ter me transformado em uma outra Débora: uma totalmente diferente que só ele poderia modificar!

A minha família: primos, tios e tios- avôs, por serem meus primeiros melhores amigos.

Aos meus padrinhos e madrinhas: Shirley, Armando, Sueli e Luiz Alan, por todo o carinho e amor dado ao longo destes anos.

Um agradecimento especial à minha amiga Monique Florambel, por ser mais do que amiga e ter se tornado minha irmã. Agradeço igualmente à Clarice Anjos pelo seu exemplo de força de vontade e determinação e pela amizade verdadeira. Amo muito.

À meus amigos da UFF: todos são muito especiais para mim. Agradeço em especial à Lyana Lima que sempre será minha marida, me falou sobre a prova da Biologia Parasitária e é uma amiga que levarei para a vida inteira. Amo você.

Aos amigos de longa data por compartilhar suas experiências e me proporcionarem momentos muito felizes: Bárbara Priscila, Natália Lanzarini, Adrienne Cristine e Gabriel Leal.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária da FIOCRUZ/IOC e aos funcionários, em especial à Rita da secretaria acadêmica, pelo meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- FAPERJ e Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde- Papes, pelo auxílio financeiro.

O sonho encheu a noite
Extravasou pro meu dia
Encheu minha vida
E é dele que eu vou viver
Porque sonho não morre
(Adélia Prado)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Interação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli*: avaliação do sistema de defesa celular e humoral e microbiota intestinal.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Débora Passos de Mattos

A susceptibilidade de *Rhodnius prolixus* ao *T. rangeli* depende da cepa do parasita e das interações moleculares no intestino e na hemocele do vetor. *T. rangeli* pode modular a resposta imune do vetor, preparando o hospedeiro à invasão e a sobrevivência dos parasitas na hemocele, superando assim as adversidades encontradas nos diferentes órgãos do inseto. Neste trabalho, são discutidos os mecanismos destas interações, destacando também o papel da microbiota intestinal e outros mecanismos importantes para o desenvolvimento do parasita.

Inicialmente nossas investigações foram realizadas para comparar aspectos da imunidade celular e humoral de ninfas de 4^o e 5^o estágio de *R. prolixus* em resposta a uma infecção oral com a cepa Macias de *T. rangeli*.

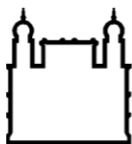
Na infecção oral em 4^o estágio (acompanhamento em longo prazo), não foi observada diferença na mortalidade e muda ao comparar com os insetos controle não infectados. Constatou-se um número aumentado de flagelados no intestino das ninfas de 5^o estágio durante o curso da infecção. Também, não houve alteração significativa na contagem de microagregados hemocitários (nódulos) em infecções de 4^o estágio, enquanto em ninfas infectadas em 5^o estágio houve um aumento no número de nódulos. Por outro lado, não houve diferença no número de hemócitos em ambas as infecções.

Demonstramos nos dois tipos de infecção oral com *T. rangeli* em *R. prolixus*, em comparação com os insetos controle não infectados, que o intestino médio atenuou a atividade de fenoloxidase, aumentou as atividades antibacterianas testadas *in vitro* contra *Serratia marcescens*, e alterou a expressão relativa de genes que codificam para defensinas (DefA, DefB, DefC), prolixicina e lisozimas (LisA e LisB). Isto sugere a influência destas atividades sobre a contagem de unidades formadoras de colônias, encontradas diminuídas no trato digestivo do inseto.

Em uma segunda etapa do estudo, foram comparadas as respostas de defesa em ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus* inoculadas com *T. rangeli*, cepas Macias e H14. A cepa Macias de *T. rangeli* não aumentou a mortalidade desses insetos, apresentou capacidade de sobreviver e se multiplicar na hemolinfa, aumentou o número de hemócitos, e induziu alta atividade de fenoloxidase. Em contraste, estes mesmos parâmetros medidos em insetos inoculados com a cepa

H14 de *T. rangeli* foram diferentes daqueles encontrados com inoculação de insetos usando a cepa Macias.

Conclui-se que *R. prolixus* responde de forma distinta frente a vias de infecção oral ou por inoculação com *T. rangeli*, sugerindo que a capacidade infectiva deste protozoário, pode ser alterada por modulação do sistema imune do vetor.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TESE (em inglês)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Débora Passos de Mattos

The *Rhodnius prolixus* permissiveness to *T. rangeli* depends on the parasite strain and the molecular interactions in the gut, and in the hemocoel of the insect. *T. rangeli* may modulate the vector's immune response, preparing the host for hemocoelic invasion and the survival of the parasites, overcoming the adversity found in different organs of the insect. In this work, the mechanisms of these interactions are discussed, also highlighting the role of the intestinal microbiota and other important mechanisms for the development of the parasite.

Initially our investigations were carried out to compare aspects of the cellular and humoral immunity of 4th and 5th-instar larvae of *R. prolixus* in response to oral infection with *T. rangeli* Macias strain.

In oral infection in 4th instar (long-term accompaniment), there was no difference in mortality and moult in comparison with uninfected control insects. We noticed the enhanced number of flagellates in the gut of 5th-instar larvae during the infection course. Also, there was no significant change in microaggregation reactions (called nodules) on infection in 4th instar, while in 5th instar nymphs we showed that nodules were also increased. In the other hand, there was no difference in hemocyte number on either infections.

We demonstrate in both oral infection with *T. rangeli* in *R. prolixus*, in comparison with uninfected control insects, that the midgut attenuated the phenoloxidase activity, increased in vitro antibacterial activities against *Serratia marcescens*, and showed alterations in the relative expression of genes encoding defensins (DefA, DefB, DefC), prolixicin and lysozymes (LisA e LisB). Suggesting the influence of these activities on the count of colony forming units, decreased in the midgut of the insect.

In a second stage of the study, we compared the responses of cellular and humoral defense in 5th-instar larvae of *R. prolixus* inoculated with *T. rangeli*, strains Macias and H14. *T. rangeli* strain Macias don't increased mortality of these insects, has ability to survive and multiply in the hemolymph, enhanced number of hemocytes, and stimulated high levels of prophenoloxidase activity. In contrast, all results about inoculation of *T. rangeli* strain H14 was different from that showed in the infection with Macias strain.

We conclude that *R. prolixus* has differently responses to oral infection and inoculation with *T. rangeli*, suggesting that the infectivity of this protozoan, can be modified by interference on the vector's immune system.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Triatomíneos vetores de tripanosomatídeos	1
1.2 <i>Rhodnius prolixus</i>	2
1.3 <i>Trypanosoma rangeli</i>	3
1.4 Interação parasita – vetor	6
1.5 Imunidade dos insetos	7
1.5.1 Defesa celular.....	8
1.5.2 Defesa humoral	10
1.5.3 Coagulação da hemolinfa em insetos	20
1.6 Microbiota bacteriana intestinal em insetos	21
1.6.1 Interação da microbiota bacteriana com parasita	22
1.7 Justificativa	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Desenho experimental:	27
3.2 Manutenção da colônia de <i>Rhodnius prolixus</i> :	28
3.3 Manutenção das culturas de epimastigotas:	29
3.4 Métodos de infecção de <i>Rhodnius prolixus</i> : Infecção via oral e acompanhamento de infecção em curto e longo prazo	29
3.5 Métodos de infecção de <i>Rhodnius prolixus</i> : Infecção por inoculação.....	30
3.6 Ensaios:	31
3.6.1 Ecdise e Mortalidade.	31
3.6.2 Contagem de parasitas no trato digestivo do inseto vetor:	31
3.6.3 Contagem de epimastigotas, hemócitos e nódulos na hemolinfa do inseto vetor:.....	32

3.6.4	Avaliação da ativação da profenoloxidase (PPO):.....	32
3.6.5	Expressão de peptídeos antimicrobianos:	34
3.6.6	Atividade antimicrobiana (ensaio por turbidimetria):	35
3.6.7	Alterações na microbiota intestinal: avaliação da população bacteriana.....	37
3.7	Análise estatística	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Infecção oral de ninfas de 4º ou 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> por cepa <i>Macias</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i>	39
4.1.1	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação dos efeitos sobre mortalidade e muda em longo prazo de infecção	39
4.1.2	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação em longo prazo de infecção	40
4.1.3	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação em curto prazo de infecção	42
4.1.4	Infecção oral em <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : efeitos sobre a imunidade celular do vetor em longo prazo de infecção	43
4.1.5	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : efeitos sobre a imunidade celular do vetor em curto prazo	44
4.1.6	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação do sistema de ativação da PPO em longo prazo de infecção	44
4.1.7	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação do sistema de ativação da PPO em curto prazo de infecção	46
4.1.8	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma</i> <i>rangeli</i> : avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos em longo prazo de infecção	47

4.1.9	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma rangeli</i> : avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos em curto prazo de infecção.....	49
4.1.10	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma rangeli</i> : avaliação da atividade antimicrobiana e da microbiota em longo prazo de infecção	51
4.1.11	Infecção oral de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma rangeli</i> : avaliação da atividade antimicrobiana e da microbiota em curto prazo de infecção	52
4.2	Infecção por inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com cepas Macias e H14 de <i>Trypanosoma rangeli</i>:	53
4.2.1	Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com <i>Trypanosoma rangeli</i> cepas Macias e H14: Avaliação dos efeitos sobre a mortalidade	53
4.2.2	Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com <i>Trypanosoma rangeli</i> cepas Macias e H14: Avaliação da infecção	54
4.2.3	Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com <i>Trypanosoma rangeli</i> cepas Macias e H14: Avaliação da imunidade celular	55
4.2.4	Inoculação de <i>Rhodnius prolixus</i> com <i>Trypanosoma rangeli</i> cepas Macias e H14: Avaliação do sistema profenoloxidase (PPO).....	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8	ANEXO 1- ARTIGO	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Via da fenoloxidase na síntese de melanina.....	16
Figura 2: Cascatas de sinalização que ativam genes de peptídeos antimicrobianos no corpo gorduroso de Drosophila.....	20
Figura 3: Efeito sobre a mortalidade e muda de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas oralmente com Trypanosoma rangeli: Avaliação em longo prazo de infecção.	39
Figura 4: Contagem de Trypanosoma rangeli em amostras de trato digestivo de ninfas de 4º e 5º estágio de Rhodnius prolixus: Avaliação em longo prazo de infecção.....	41
Figura 5: Desenvolvimento de Trypanosoma rangeli no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus: Avaliação em curto prazo de infecção.....	42
Figura 6: Efeitos da infecção oral de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus por Trypanosoma rangeli sobre a contagem de hemócitos e nódulos: Avaliação em longo prazo de infecção.	43
Figura 7: Efeitos da infecção oral de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus por Trypanosoma rangeli sobre a contagem de hemócitos e nódulos: Avaliação em curto prazo de infecção.	44
Figura 8: Atividade de fenoloxidase no conteúdo estomacal de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas com Trypanosoma rangeli: Avaliação em longo prazo de infecção.	45
Figura 9: Atividade de fenoloxidase no conteúdo do estomacal de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas com Trypanosoma rangeli: Avaliação em curto prazo de infecção.....	46
Figura 10: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do estômago de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em longo prazo de infecção.	47
Figura 11: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do intestino de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em longo prazo de infecção.	48

Figura 12: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do estômago de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em curto prazo de infecção.	49
Figura 13: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do intestino de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em curto prazo de infecção.	50
Figura 14: Atividade antibacteriana e análise da microbiota do conteúdo do estômago de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em longo prazo de infecção.....	51
Figura 15: Atividade antibacteriana e análise da microbiota do conteúdo do estômago de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas por via oral com Trypanosoma rangeli: Avaliação em curto prazo de infecção.....	52
Figura 16: Efeito sobre a mortalidade de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus inoculadas com Trypanosoma rangeli cepas Macias e H14.....	53
Figura 17: Contagem de Trypanosoma rangeli cepas Macias e H14 na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus após a inoculação. ...	54
Figura 18: Contagem de hemócitos e nódulos em ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus inoculadas com Trypanosoma rangeli cepas Macias e H14.	55
Figura 19: Atividade de fenoloxidase na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus inoculadas com Trypanosoma rangeli cepas Macias e H14.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema experimental de infecção por via oral de ninfas de Rhodnius prolixus com epimastigotas de cultura de Trypanosoma rangeli.	28
Tabela 2: Esquema experimental de infecção por inoculação em ninfas de Rhodnius prolixus com epimastigotas de cultura de Trypanosoma rangeli.	28
Tabela 3: Lista de primers usados.....	35
Tabela 4: Percentagem de ninfas de 4º e 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas com Trypanosoma rangeli. Avaliação em longo prazo de infecção.	40
Tabela 5: Percentagem de ninfas de 5º estágio de Rhodnius prolixus infectadas com Trypanosoma rangeli . Avaliação em curto prazo de infecção.....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
Água Milli-Q	Água deionizada purificada no sistema Milli-Q
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
BHI	Meio de cultura de infusão de cérebro e coração
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidade formadora de colônia
DefA	Defensina A
DefB	Defensina B
DefC	Defensina C
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	Dihidroxifenilalanina
HR	Humidade relativa
IMD	Imunodeficiência (via de sinalização)
KDa	Quilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LisA	Lisozima A
LisB	Lisozima B
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	milímetros
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanometros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus Celcius
PAP	Enzima ativadora da PPO
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PO	Fenoloxidase

PPO	Profenoloxidase
Prol	Prolixicina
P/V	Peso/volume
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA rimossômico
RT	Transcrição reversa
Tm	Temperatura de Melting
TSB	Meio de cultura caldo triptona de soja

1 INTRODUÇÃO

1.1 Triatomíneos vetores de tripanosomatídeos

A classificação atual dos insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae reconhece 140 espécies agrupadas em seis tribos e 18 gêneros. Destas, duas tribos – Rhodniini e Triatomini – têm maior importância epidemiológica como vetores de tripanosomatídeos (Vallejo *et al.* 2009). Atualmente assume-se que todas as espécies de Triatominae têm a capacidade potencial de transmitir o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (Garcia & Azambuja 1991; Kollien & Schaub 2000), e que várias, especialmente do gênero *Rhodnius*, também podem transmitir o *Trypanosoma rangeli* (Watkins 1971; D' Alessandro-Bacigalupo & Saraiva 1992) que, em geral, é inofensivo para os seres humanos, mas pode ser patogênico para o inseto vetor (Watkins 1971; Hecker *et al.* 1990). Na natureza, os triatomíneos são freqüentemente encontrados infectados com *T. cruzi* e *T. rangeli* podendo assim transmitir ambos parasitas e provocar infecções mistas aos homens (Sousa & Johnson 1971) e outros mamíferos (Jansen & Roque 2010).

Mamíferos de 100 diferentes ordens já foram descritos como reservatórios potenciais de *T. cruzi* sugerindo que esta zoonose não pode ser erradicada (Jansen & Roque 2010). Outros estudos demonstraram o sucesso da transmissão da infecção de *T. rangeli* em morcegos e confirmaram a observação prévia de que eles podem ser hospedeiros deste tripanossoma (Marinkelle 1966; D'Alessandro 1976).

Embora a presença de *T. cruzi* no intestino do triatomíneo indique risco de transmissão ao vertebrado, a presença de *T. rangeli* neste órgão não indica sua capacidade infectiva (Guhl & Vallejo 2003). Enquanto a forma infectante de *T. cruzi* predomina no reto, podendo ser transmitida pelas fezes do inseto vetor, a prova definitiva da capacidade infectiva de *T. rangeli* é a presença de tripomastigotas metacíclicos nas glândulas salivares, por onde podem ser transmitidos aos vertebrados durante a ingestão de sangue em ato de salivação (Guhl & Vallejo 2003). Até o momento, apenas espécies do gênero *Rhodnius* demonstraram ter formas infectantes do parasita em suas glândulas salivares, e 12 espécies de *Rhodnius* foram notificadas com a infecção natural ou experimental de *T. rangeli* em

suas glândulas salivares: *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. robustus* (Guhl & Vallejo 2003). Porém, pesquisas atuais indicam associações mais específicas entre espécies particulares de Triatominae e genótipos definidos não só de *T. cruzi* como também de *T. rangeli* (Vallejo *et al.* 2009).

Assim, uma nova abordagem para o controle da transmissão de parasitas seria interromper o seu ciclo biológico no inseto vetor, visando mecanismos fundamentais para o desenvolvimento da infecção parasitária. Neste sentido, torna-se importante uma investigação detalhada das interações entre parasitas e seus insetos-vetores, tais como *R. prolixus*, especialmente, identificando e caracterizando mecanismos cruciais para o bom desenvolvimento do *T. rangeli*. Os dados poderão também servir de modelo de estudo de interação com o *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

1.2 *Rhodnius prolixus*

R. prolixus é um hemíptero exclusivamente hematófago, pertencente à família Reduviidae, subfamília Triatominae (Lent 1948). O mapa de distribuição do *R. prolixus* é abrangente, incluindo as Américas do Sul e Central. Na Venezuela, esta espécie é encontrada em cerca de 90% da população de triatomíneos capturados dentro das casas, principalmente em tetos de palha, em regiões de até 2000 metros acima do nível do mar (Rey 1991).

O ciclo de vida deste inseto hemimetábolo consiste em passagens por ovo, cinco estádios ninfais e fase adulta, macho ou fêmea, cujo desenvolvimento depende de uma metamorfose incompleta. A cada estágio, durante a muda após a alimentação sanguínea, o exoesqueleto antigo é lentamente substituído por um novo (Carcavallo *et al.* 1997) culminando o processo de muda em um evento denominado ecdise, quando o inseto libera a cutícula velha (Wigglesworth 1972). Assim, a alimentação é essencial para que ocorra a muda de todos os cinco estádios ninfais bem como está associada à reprodução (Buxton 1930; Garcia *et al.* 1975). Normalmente para *R. prolixus*, assim como outros triatomíneos de maneira geral, um único repasto sanguíneo saturante é suficiente para induzir a ecdise em cada estágio ninfal ou estimular a ovipostura em adultos (Garcia *et al.* 1975).

O desenvolvimento adequado deste inseto está diretamente relacionado à temperatura ideal (de 27 à 30°C). Alterações na temperatura ambiental podem acarretar anormalidades morfológicas e até mesmo a morte do inseto (Azambuja & Garcia 1991). As condições controladas de temperatura e umidade constantes de 28°C e 75% HR, respectivamente, tem facilitado a manutenção de colônias de *R. prolixus* em laboratórios de pesquisa, também pelo uso de aparatos artificiais de alimentação dos insetos como o descrito por Garcia *et al.* (1984b).

1.3 Trypanosoma rangeli

T. rangeli é um hemoflagelado dixênico que por possuir características biológicas e distribuição geográfica em muitas regiões coincidentes com a do *T. cruzi*, tem sido estudado também no contexto epidemiológico da doença de Chagas (Guhl & Vallejo 2003). Este hemoflagelado é amplamente encontrado infectando mamíferos, incluindo o homem (Steindel *et al.* 1991; Coura *et al.* 1996). Apesar de a parasitemia poder persistir por meses ou anos, este, em geral, não é patogênico para o homem e outros mamíferos (Herbig-Sandreuter 1957). A infecção no homem estimula uma resposta imune capaz de produzir anticorpos contra *T. rangeli*, com os quais pode ocorrer uma reação cruzada com *T. cruzi* (Groggl & Kuhn 1984; Guhl *et al.* 1987; Hudson *et al.* 1988). Algumas evidências sugerem que a proliferação de *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado ocorra no interior dos monócitos (Osorio *et al.* 1995), e mais raramente em outros tipos celulares de vertebrados (Eger-Mangrich *et al.* 2001).

Enquanto, aparentemente o *T. cruzi* afeta apenas o inseto vetor sob condição de jejum prolongado (Schaub 1989), *T. rangeli* pode causar danos no triatomíneo (Watkins 1971). No hospedeiro invertebrado o ciclo do *T. rangeli* começa com a ingestão de tripomastigotas do sangue do vertebrado. No interior do intestino do inseto vetor, os parasitas se diferenciam em epimastigotas, sofrem multiplicação, se aderem e penetram nas células epiteliais do intestino médio (Hecker *et al.* 1990). Um dos aspectos da interação de *T. rangeli* com o *R. prolixus* ocorre quando o parasita entra em contato com as células epiteliais do intestino do inseto vetor. A adesão do parasita através do flagelo, à superfície de algumas células epiteliais do intestino médio, é sucedida de penetração, em geral, nas células que apresentam organelas citoplasmáticas menos densas (Oliveira & Souza 2001). Trabalhos realizados com

microscopia eletrônica mostram que *T. rangeli* induz a desorganização ultra-estrutural das células intestinais epiteliais, especialmente das microvilosidades bem como das membranas perimicrovilares, facilitando o processo de invasão à hemocele (Gomes *et al.* 2002). Os flagelados atravessam o epitélio intestinal por uma via intracelular (Hecker *et al.* 1990). Depois de danificar a superfície, o parasita se move dentro do citoplasma da célula epitelial, atinge a região basal, atravessa a lâmina basal, e entra na hemocele (Oliveira & Souza 2001). No entanto, a taxa de penetração do intestino é de menos de 10% dos parasitas (Hecker *et al.* 1990).

Na hemolinfa, as formas curtas livres de epimastigotas entram em intensa multiplicação (Tobie 1970; Mello *et al.* 1995; Garcia *et al.* 2004,a,b) e se diferenciam em epimastigotas longas (Mello *et al.* 1995). O parasita é reconhecido como partícula estranha e posteriormente pode ser visualizado no interior de vacúolos parasitóforos dos plasmatócitos, não estando claro se esta invasão é mediada somente pela fagocitose ou ativamente pelo flagelo (Oliveira & De Souza 2003). Durante o curso da infecção, alguns plasmatócitos aparecem rompidos, liberando parasitas (Oliveira & De Souza 2003).

T. rangeli, na hemolinfa do inseto vetor capta a lipoforina, a principal proteína transportadora lipídica, podendo estocá-la perto da bolsa flagelar, em vesículas (Folly *et al.* 2003). Curiosamente, os parasitas não absorvem nenhuma outra proteína da hemolinfa (Folly *et al.* 2003).

Na hemocele, *T. rangeli* migra para as glândulas salivares. Bassery *et al.* (2002) demonstraram que alguns açúcares são capazes de bloquear os receptores das superfícies das glândulas salivares de triatomíneo em ensaios de inibição da adesão *in vitro* utilizando epimastigotas longos de *T. rangeli*. Entre os açúcares testados, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, e galactose apresentaram o maior efeito inibitório nos testes de adesão (Basseri *et al.* 2002). Os mesmos autores sugeriram que os carboidratos e as lectinas são importantes para as interações parasita- vetor, principalmente para facilitar a invasão do parasita nas glândulas salivares do hospedeiro invertebrado. Após a ligação à superfície, os flagelados penetram nas membranas externas das glândulas salivares, rompendo a camada interna para passar entre as células musculares e atingir a membrana basal da glândula. O parasita alcança o lúmen central da glândula através de um vacúolo (Ellis *et al.* 1980).

Nas glândulas salivares ocorre a metaciclogênese, em que se produzem as formas tripomastigotas infectantes (D' Alessandro & Mandel 1969; Hecker *et al.* 1990; D' Alessandro-Bacigalupo & Saraiva 1992). Neste sentido, *T. rangeli* completa o seu ciclo sendo transmitido para novos hospedeiros vertebrados através da secreção salivar durante a alimentação (Garcia *et al.* 1994).

T. rangeli aparentemente modifica a habilidade do vetor de localizar vasos sanguíneos através das alterações dos componentes antihemostáticos da saliva, aumentando assim, a possibilidade da inoculação intradérmica do parasita no hospedeiro vertebrado (Garcia *et al.* 1994). Insetos com infecções nas glândulas salivares perfuram a pele do hospedeiro mais vezes, ingerem menos sangue e mais lentamente que insetos controles não infectados (Garcia *et al.* 1994). Neste sentido, glândulas salivares de insetos infectados tem redução significativa da atividade de apirase (enzima anticoagulante) e dos grupos reativos de nitrogênio (com propriedade de vaso dilatação) (Garcia *et al.* 1994), dois processos associados à dificuldade do inseto de ingerir o sangue do hospedeiro vertebrado.

Quanto aos efeitos patogênicos de *T. rangeli* sobre *R. prolixus*, tem sido sugerido que as lesões mecânicas levam a uma perda de citoplasma das células epiteliais do intestino e musculares das glândulas salivares durante a penetração dos parasitas (Tobie 1961; Hecker *et al.* 1990; Garcia *et al.* 1994).

Quanto a variabilidade dos isolados, *T. rangeli* pode ser classificado de acordo com as diferenças na organização do DNA do cinetoplasto (kDNA) em dois grupos: *T. rangeli* KP1 + e KP1- (Vallejo *et al.* 2009). O primeiro grupo de estirpes (*T. rangeli* KP1 +) apresenta três tipos de minicírculos de DNA do cinetoplasto denominados KP1, KP2 e KP3, enquanto o outro grupo (*T. rangeli* KP1-) apresenta apenas os minicírculos KP2 e KP3. Os dois grupos de *T. rangeli* foram confirmados pela amplificação de kDNA com os *primers* S35/S36/KP1L (Vallejo *et al.* 2002, 2003, 2007; Urrea *et al.* 2005).

Outros polimorfismos moleculares, como diferenças no intergene mini-exon e na subunidade menor de RNA rimossômico (rRNA) confirmam a existência de cinco subpopulações denominadas *T. rangeli* A, B, C, D e E (Maia da Silva *et al.* 2004,a,b, 2007,2009; Vallejo *et al.* 2009). O genótipo A é predominante na região noroeste da América do Sul (Colômbia e Venezuela), América Central (Guatemala e Honduras) e Brasil (regiões ocidental e oriental da Amazônia) e o genótipo B foi encontrado na Amazônia brasileira. O genótipo C foi encontrado na Colômbia e no Panamá. O

genótipo D foi representado por um único isolado, SC58, que foi obtido a partir de hemoculturas do roedor *Echymys dasythrix* de Santa Catarina (Sul do Brasil) (Maia da Silva *et al.* 2004,a,b, 2007). E o genótipo E foi obtido a partir do isolado Tra643, do morcego *Platyrrhinus lineatus*, proveniente do estado do Mato Grosso do Sul na zona central do Brasil (Maia da Silva *et al.* 2009)).

A análise comparativa dos sistemas de genotipagem indicou que a linhagem A corresponde às estirpes de *T. rangeli* KP1 + e a linhagem C ao *T. rangeli* KP1-. A cepa brasileira SC58 pertencente à linhagem D tem o perfil de *T. rangeli* KP1-. Porém perfil de kDNA de cepas da linhagem B, isoladas na região amazônica, é desconhecido (Maia da Silva *et al.* 2004,a,b, 2007).

1.4 Interação parasita – vetor

Alguns mecanismos facilitam ou impedem a transmissão dos parasitas em diferentes espécies de vetores (Garcia & Azambuja 1991; Kollien & Schaub 2000; Vallejo *et al.* 2009). Dentre estes, estão envolvidas as bactérias intestinais, especialmente os simbiossitos que são necessários para que os insetos vetores completem seu desenvolvimento ninfal e produzam ovos (Vallejo *et al.* 2009). Há sugestões de que *T. rangeli* é patogênico para *Rhodnius*, em parte, devido à redução do número de simbiossitos (Tobie 1961; Vallejo *et al.* 2009).

A caracterização das cepas de *T. rangeli* isoladas a partir de espécies *Rhodnius* do grupo *Pallescens* (*R. pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*), mostra que todos apresentam o perfil de *T. rangeli* KP1-, enquanto que as estirpes isoladas a partir do Grupo *Prolixus* (*R. prolixus*, *R. neglectus*) apresentam o perfil de *T. rangeli* KP1 + (D'Alessandro 1976; Urrea *et al.* 2005; Vallejo *et al.* 2007). Em outras análises de *T. rangeli*, o genótipo A foi associado com infecções de *R. prolixus* e *R. robustus*; o genótipo B exclusivamente com *R. brethesi*, e em algumas regiões, também com *R. pictipes*, enquanto o genótipo C foi associado com *R. pallescens* (Maia da Silva *et al.* 2007).

Estes resultados sugerem que, em seu estado natural, as espécies de *Rhodnius* são filtros biológicos para certas populações de parasitas. A hipótese sobre o papel de vetores como filtros biológicos na transmissão de subpopulações de *T. rangeli* geneticamente definidas foi consolidada por Vallejo *et al.* (2004). Os autores mostram que *R. colombiensis* pode ser infectado em condições naturais por

T. rangeli KP1- e por KP1 +, mas transmite pela picada apenas KP1- (Vallejo *et al.* 2004). Da mesma forma, *R. prolixus* também pode ser infectado com os dois grupos de *T. rangeli* mas transmite apenas subpopulações de KP1 + pelo ato de salivação no hospedeiro vertebrado (Vallejo *et al.* 2002, 2003).

1.5 Imunidade dos insetos

Os insetos possuem muitas formas de defesa que não envolvem apenas as ações diretas, como as mecânicas associadas ao rígido exoesqueleto, mas que indiretamente, também servem para impedir o estabelecimento das infecções (Armstrong *et al.* 1996). A cutícula externa dos insetos é a primeira linha de proteção que fornece uma barreira física efetiva contra os patógenos e previne a perda de hemolinfa a partir de uma lesão (Armstrong *et al.* 1996; Muta & Iwanaga 1996; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Outra forma de proteção natural ocorre quando os microorganismos ingeridos na alimentação são mortos no trato digestivo pelo pH, condição redox ou por enzimas, como por exemplo, amilases, tripsinas, nos dípteros e no caso de triatomíneos, carboxipeptases, aminopeptidases, catepsinas e outras hidrolases (Garcia & Azambuja 1987; Armstrong *et al.* 1996).

Uma vez que o intestino de *R. prolixus* é o primeiro ambiente para o estabelecimento da infecção por *T. rangeli*, há a possibilidade de influência das enzimas digestivas e do fator hemolítico do estômago (Azambuja *et al.* 1983, 1989, 2004). Mas ainda não está claro se as enzimas proteolíticas estão implicadas no desenvolvimento do tripanosoma no hospedeiro invertebrado, pois a alimentação de *R. prolixus* com pepstatina, um inibidor de proteinase, não resultou em qualquer efeito nas taxas de infecção por *T. cruzi* (Garcia & Gilliam 1980; Borges *et al.* 2006).

Os insetos e outros invertebrados carecem das características do sistema imune adaptativo que conferem aos vertebrados a memória imunológica. Ao invés disso, em sua defesa contra microorganismos invasores, os invertebrados possuem uma resposta imune do tipo inata (Ratcliffe 1985; Iwanga & Lee, 2005; Ferrandon *et al.* 2007). Assim, após romper estas barreiras passivas, os microorganismos e parasitas, em insetos, ainda se deparam com as reações de defesa celular e humoral (Armstrong *et al.* 1996).

A imunidade inata dos insetos é classificada em duas categorias que atuam de maneira integrada tornando o sistema mais eficiente: a imunidade humoral e a

celular (Azambuja *et al.* 1999; Stanley 2006). A primeira é baseada no efeito de fatores humorais que podem destruir completamente ou suprimir o desenvolvimento de qualquer invasor (Bettencourt *et al.* 1997; Hoffmann & Reichhard 2002). Esta inclui a ativação transcricional de um conjunto de genes que lideram a produção de peptídeos e de moléculas efetoras com propriedades antimicrobianas (Hetru *et al.* 2003; Brennan & Anderson 2004). Em geral as reações de defesa humoral em insetos podem estar associadas às atividades de lisozimas e em alguns casos tripanolíticas (Mello *et al.* 1995, 1999; Gomes *et al.* 1999), ativação da L- DOPA (Dihidroxifenilalanina) oxigênio redutase ou ao sistema profenoloxidase (PPO) (Mello *et al.* 1995; Gomes *et al.* 1999, 2003; Garcia *et al.* 2004,a) bem como a aglutinação do organismo invasor por lectinas presentes na hemolinfa (Mello *et al.* 1996). Entre as respostas imunes inatas há implicações também na produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio (Strand 2008,a), como a geração de superóxido e óxido nítrico (NO) (Conte & Ottaviani 1995; Whitten *et al.* 2001, 2007). A segunda é baseada na defesa celular onde os hemócitos, especialmente os plasmatócitos e as células granulares, participam ativamente no processo (Ho *et al.* 1982; Chikilian *et al.* 1994; Pech & Strand 1996; Brehélin & Duvic 1999; Levine & Strand 2002). Organismos muito grandes para a fagocitose, como ovos de parasitóides, são encapsulados por ações coordenadas dos hemócitos (Stanley 2006). Assim, a fagocitose, encapsulação e a microagregação de hemócitos, também denominada de formação de nódulos, são as principais linhas de defesa celular do inseto (Mello *et al.* 1995; Garcia *et al.* 2004,a,b).

1.5.1 Defesa celular

Hemócitos são células presentes na hemolinfa de invertebrados que se desenvolvem durante a embriogênese (Ratcliffe *et al.* 1985). Durante a fase larval ou estádios ninfais, os insetos continuam a produzir hemócitos, ou por divisão continuada de hemócitos circulantes ou através da divisão de prohemócitos oriundos de órgãos hematopoiéticos (Ratcliffe *et al.* 1985). Gardiner e Strand (2000), utilizando anticorpos específicos marcados com bromodeoxiuridina, observaram que prohemócitos presentes nos órgãos hematopoiéticos diferenciam-se inicialmente em plasmatócitos, enquanto outros tipos de hemócitos formam-se após a liberação dos plasmatócitos na hemolinfa. Também observaram que a manutenção da população

de hemócitos na hemolinfa está diretamente relacionada à divisão continuada das células já diferenciadas presentes na hemolinfa (Gardiner & Strand 2000).

Jones (1965) e Azambuja et al. (1991,c), utilizando a técnica de microscopia de contraste de fase, descreveram detalhadamente diferentes tipos de hemócitos na hemolinfa de *R. prolixus*, dentre eles: prohemócitos, plasmatócitos, células granulares, oenócitos, adipohemócitos e células gigantes.

Prohemócitos, adipócitos, plasmatócitos células oenocitóides e células granulares podem ser identificados pela microscopia ótica e eletrônica. As células encontradas em maior quantidade na hemolinfa de *R. prolixus* são os prohemócitos, plasmatócitos e células granulares. E as encontradas em menor quantidade são os adipócitos e os oenocitóides (Oliveira & de Souza, 2003).

Oliveira e de Souza (2003) demonstraram que após a infecção oral e inoculação de *R. prolixus* com a cepa de *T. rangeli* Choachí o número de plasmatócitos e oenocitóides aumenta e o de prohemócitos, adipócitos e células granulares diminui. Além disso, quando há a presença de *T. rangeli* na hemolinfa, muitos plasmatócitos apresentam o parasita em forma esferomastigota em seu interior, porém este não se apresenta em divisão. Algumas evidências indicam que há a fusão de lisossomos com vacúolos contendo o parasita no plasmatócito, degradando então o protozoário São elas: a presença de debris de parasitas dentro dos vacúolos de plasmatócitos, a observação de estruturas semelhantes a lisossomos perto dos vacúolos e a presença de material amorfo com eletro densidade similar a lisossomos. O número de parasitas livres na hemolinfa diminui gradativamente durante o curso da infecção de *T. rangeli* cepa Choachí (Oliveira & de Souza 2003).

1.5.1.1 Fagocitose

A fagocitose é um processo de defesa celular altamente conservado, constituindo a primeira resposta dos hemócitos à invasão do organismo por partículas estranhas (Lavine & Strand 2002).

A fagocitose de uma partícula estranha envolve diferentes passos tais como: adesão, reconhecimento, transdução de sinal, formação de pseudópodos, ingestão, fusão de lisossomos e eliminação da partícula fagocitada. Este processo tem início com a ligação da partícula invasora a receptores presentes na superfície de células fagocíticas. A ligação desencadeia uma série de eventos de sinalização em cascata

que regulam a formação de fagossomos, ingestão e digestão da partícula estranha (Gillespie *et al.* 1997).

1.5.1.2 Formação de nódulos

A formação de nódulos, também denominada de microagregação de hemócitos, demanda uma mudança nos hemócitos circulantes, que passam de células livres circulantes para células aderentes aptas a se ligarem ao alvo (Levine & Strand 2002). A formação de nódulos pode ser induzida por lipopolissacarídeos (LPS), zimosan, laminarina e algumas glicoproteínas presentes na superfície externa da parede celular de bactérias e outros microrganismos (Lackie 1988,a; Brookman *et al.* 1988).

1.5.1.3 Encapsulação

A encapsulação é um processo de defesa celular formado por camadas de hemócitos sobrepostas ao redor do organismo invasor. O processo de encapsulação ocorre quando o organismo invasor é excessivamente grande para ser fagocitado, como por exemplo, protozoários, nematóides, ovos ou larvas de parasitos (Ratcliffe & Gotz 1990; Vilmos & Kurucz 1998). O processo de encapsulação está também associado à ativação da PPO resultando, em alguns casos, na melanização e conseqüente morte do organismo invasor (Vilmos & Kurucz 1998).

1.5.2 Defesa humoral

Os fatores humorais podem ser secretados diretamente na hemocele ou dentro do lúmen do intestino, sendo assim considerados componentes da resposta imunitária para eliminar patógenos potenciais adquiridos pelos insetos (Garcia *et al.* 2010,a,b; Genta *et al.* 2010).

Gregorio e Ratcliffe (1991) estudaram a aglutinação e a atividade lítica de tecidos de *R. prolixus* e *Triatoma infestans* contra eritrócitos e epimastigotas de *T. rangeli*. A atividade de aglutinação contra hemácias foi encontrada no intestino médio de *T. infestans* e na hemolinfa de *R. prolixus*. Além disso, os extratos de glândulas salivares de *T. infestans*, mas não os de *R. prolixus*, mostraram uma atividade lítica contra *T. rangeli* (Gregorio & Ratcliffe 1991). Amino *et al.* (2002) caracterizaram uma proteína lítica com propriedade de formação de poros a partir de amostras de saliva de *T. infestans*. Esta proteína, denominada trialisina, lisou

protozoários e bactérias, indicando que ela desempenha um papel no controle do crescimento de microorganismos nas glândulas salivares (Amino *et al.* 2002).

1.5.2.1 Lectinas

Um composto importante envolvido na interação parasito- vetor é a lectina, proteína classicamente associada ao reconhecimento de carboidratos (Bradley *et al.* 1989). Tanto em insetos como em outros invertebrados, as lectinas podem funcionar de modo semelhante às opsoninas (Bradley *et al.* 1989). Algumas lectinas, em ensaios *in vitro*, não bloqueiam somente carboidratos expostos na superfície do parasita, mas também inibem a adesão de *T. rangeli* em glândulas salivares (Basseri *et al.* 2002) e no intestino (Oliveira & de Souza 1997) de *R. prolixus*.

Uma lectina purificada ligante à galactose, em ensaio *in vitro*, foi capaz de aumentar a formação do agregado celular na monocamada de hemócitos de *R. prolixus* na presença de *T. rangeli* (Azambuja *et al.* 1999; Mello *et al.* 1999). Mello *et al.* (1995) observaram que a lectina purificada da hemolinfa reduz significativamente a mobilidade e aumenta a morte de formas curtas de epimastigotas obtidos de cultura de *T. rangeli*, mas não obteve o mesmo efeito em formas longas.

1.5.2.2 Óxido nítrico (NO)

As pesquisas sobre as funções do (NO) em vertebrados têm demonstrado que o NO é uma molécula efetora chave no sistema imune inato e de sinalização em muitos organismos (Bogdan *et al.* 2000; Atkan 2004; Pryor *et al.* 2006). A evidência também sugere que ambos os papéis de NO foram conservados na imunidade inata de invertebrados (Radomski *et al.* 1991; Luckhart *et al.* 1998; Nappi *et al.* 2004). Em moluscos e insetos o NO, como um ativador imunitário, está fortemente associado com respostas antimicrobiana, anti-viral e antiparasitária, atuando como uma molécula citotóxica diretamente contra o organismo invasor, e também indiretamente, por produção de diferentes radicais livres (Torreilles & Guerin 1999; Weiske & Wiesner 1999,a,b ; Nappi *et al.* 2000; Beck *et al.* 2001; Novoa *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2006). A atividade de óxido nítrico sintase (NOS), é induzida por infecções por parasitas em invertebrados, tais como mosquitos e caramujos, e tem sido implicada no controle de parasitas ou correlacionada com a capacidade vetorial de algumas espécies (Luckhart *et al.* 1998; Dimopoulos *et al.* 1998; Bayne *et al.*

2001; Hahn *et al.* 2001; Ascenzi & Gradoni 2002; Kumar *et al.* 2004; Ratcliffe & Whitten 2004).

NO também desempenha um papel essencial na sinalização da resposta imune do inseto (Stefano & Ottaviani 2002). Em *Drosophila*, o NO gerado por hemócitos em resposta a uma infecção bacteriana, ativa a dipterina pela via de sinalização do IMD (imunodeficiência) (Nappi *et al.* 2000; Foley & O'Farrell 2003).

Foi demonstrado que NO modula as respostas de *R. prolixus* à infecção por *T. rangeli* na hemolinfa e observado que o NO também regula a infecção por *T. cruzi* na mesma espécie de inseto (Whitten *et al.* 2007). Whitten *et al.* (2007) reportaram que a expressão do gene da NO sintase e a produção de NO são moduladas de formas diferentes por infecções pelo *T. rangeli* e *T. cruzi* em vários tecidos de *R. prolixus*. Seus resultados mostraram que *R. prolixus* infectados com o *T. cruzi* e *T. rangeli* apresentam alta concentração de nitrito após 1-2 dias da alimentação sanguínea, mas diminuem após 2 semanas de infecção parasitária.

A NADPH oxidase e a NOS estão envolvidas na resposta imune de *R. prolixus* contra a infecção por *T. rangeli* (Whitten *et al.* 2001). Whitten *et al.* (2001) mostrou que quando o inibidor da NADPH oxidase, N-etilmaleimida, e o inibidor da NOS induzível, S-metil isotiourea sulfamida, são injetados em *R. prolixus*, causam uma alta mortalidade nos insetos após a inoculação das cepas H14 e Choachi de *T. rangeli* se comparados com os insetos do grupo controle, não infectados. Neste inseto a expressão do gene da NOS e os níveis de nitrito são modulados no estômago, intestino e corpo gorduroso quando há o desafio com *T. cruzi* e *T. rangeli*. O aumento de nitrito na parede do trato digestório ocorreu durante a resposta à infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli*, mas foi particularmente maior com a infecção do primeiro parasita. Este aumento pode explicar porque o *T. cruzi* não consegue atravessar a parede intestinal e invadir a hemocele (observações pessoais de N. A. Ratcliffe).

1.5.2.3 Eicosanóides

Prostaglandinas e outros eicosanóides são metabólitos oxigenados do ácido araquidônico e outros dois ácidos graxos poliinsaturados com 20 carbonos. São conhecidos três grandes grupos de eicosanóides: prostaglandinas, ácido epoxieicosatrienóico e os metabólitos da lipoxigenase (Von Euler 1936).

A biossíntese dos eicosanóides se inicia com a hidrólise do ácido araquidônico de fosfolípidios de biomembranas celulares e intracelulares, geralmente pela ação da fosfolipase A2 (PLA₂) (Six & Dennis 2000). São conhecidos muitos grupos de PLA₂, as quais geralmente ocorrem em duas formas: a secretada e a citosólica (Six & Dennis 2000). As prostaglandinas são produtos da via da ciclooxigenase enquanto que a lipoxigenase é responsável pela produção dos ácidos hidroperoxieicosatetraenóico e hidroxieicosatetraenóico, além de outros produtos biologicamente ativos (Stanley 2000, 2004).

Os eicosanóides aparentemente agem em vários aspectos da biologia do inseto como o transporte de íons, o tráfego de proteínas, a reprodução e a imunidade (Six & Dennis 2000). Em relação a este último aspecto em insetos, estas moléculas modulam a fagocitose, nodulação, e encapsulação em reações contra bactérias, fungos (Armstrong *et al.* 1996) ou parasitóides (Buyukguzel *et al.* 2002). Também agem na sinalização pela via do IMD e na expressão de certos genes de proteínas antibacterianas (Stanley 2006).

A biossíntese dos eicosanóides foi caracterizada em dois tecidos da mariposa, *Manduca sexta*: no corpo gorduroso e nos hemócitos (Stanley-Samuelson & Ogg 1994; Gadelhak *et al.* 1995) e somente no corpo gorduroso na lagarta de pastagem, *Pseudaletia unipuncta*, e no besouro, *Zophobas atratus* (Tunaz *et al.* 2001,2002). Além do corpo gorduroso, a biossíntese de prostaglandinas foi detectada também no epitélio do trato digestório da mariposa, *M. sexta* (Buyukguzel *et al.* 2002).

Stanley- Samuelson *et al.* (1991) observaram que *M. sexta* tratada com inibidores da biossíntese dos eicosanóides é incapaz de combater infecções bacterianas na circulação. A partir de algumas observações, Miller *et al.* (1994) sugeriram que os eicosanóides coordenam e medeiam as ações celulares que resultam na formação do nódulo. Na mariposa da cera, *Galleria mellonella*, foi observado que os eicosanóides atuam na fagocitose, na extensão da célula e na ativação da PPO (Mandato *et al.* 1997). Garcia *et al.* (2004,a) observou a redução da microagregação e da ativação do sistema de PPO na hemolinfa e o aumento da parasitemia e mortalidade após a inoculação de *T. rangeli* em *R. prolixus* alimentado previamente com sangue contendo o inibidor da PLA₂, dexametasona, um inibidor específico da via da ciclooxigenase, indometacina, e um inibidor não seletivo da lipoxigenase, NDGA. O mesmo grupo mostrou que todos os efeitos obtidos pela

dexametasona administrada por via oral foram neutralizados pela inoculação de ácido araquidônico sugerindo que os eicosanóides modulam as respostas imunes de *R. prolixus* contra a infecção com *T. rangeli* (Garcia *et al* 2004,a). Porém, alguns outros trabalhos mostram que os eicosanóides não influenciam na via da PPO em outros insetos como, por exemplo, no gafanhoto *Locusta migratória* (Goldsworthy *et al.* 2003).

Os eicosanóides também estão relacionados a outras vias da imunidade. Morishima *et al.* (1997), relataram que os eicosanóides estão envolvidos na expressão de dois genes que codificam proteínas antibacterianas (cecropina e lisozima) no corpo gorduroso do bicho da seda *Bombyx mori*. Da mesma maneira, Yajima *et al.* (2003) descobriram uma ligação funcional entre a via do IMD e a síntese de eicosanóides em *Drosophila melanogaster*.

1.5.2.4 Profenoloxidase (PPO)

Outro ramo da imunidade de insetos é a melanogenese (Asada *et al.* 1999; Amparyup *et al.* 2009; Eleftherianos & Revenis 2011), que envolve a rápida síntese e resulta no depósito de um pigmento marrom escuro, a melanina, no local da infecção e dano. A melanização começa quando um alvo estranho é identificado por proteínas de reconhecimento e então uma cascata de proteolítica é disparada (revisado por Strand 2008,b). Em insetos esta resposta é rápida e independe da expressão de genes (Cerenius *et al.* 2010). Como reação, alguns hemócitos envolvem o corpo estranho e liberam proteínas que promovem a quimiotaxia, atraindo plasmatócitos (Levine & Strand 2002) e formando uma parede multicelular de plasmatócitos e células granulares (encapsulação) (Wood *et al.* 2006). A melanina é depositada na direção do corpo estranho (WOOD, *et al.*, 2006). A cápsula de melanina previne o crescimento e a reprodução do patógeno e eventualmente leva este à morte principalmente pela falta de nutrientes ou oxigênio (Gillespie *et al.* 1997).

A enzima chave na síntese da melanina é a fenoloxidase (PO), que produz grupos do tipo indol os quais, subsequentemente são polimerizados em melanina (Soderhall & Cerenius 1998; Christensen *et al.* 2005; González-Santoyo & Aguilar 2012). As reações enzimáticas por sua vez produzem um conjunto de produtos intermediários como quinona, difenol, superóxido, peróxido de hidrogênio e reativos intermediários de nitrogênio, que são importantes na defesa contra bactérias Gram

positivas e Gram negativas, fungos e agente virais (González-Santoyo & Aguilar 2012) durante o processo de reparo de lesões (Jiravanichpaisal *et al.* 2006; Nappi & Christensen 2005).

Estudos prévios em muitos insetos mostraram que em condições fisiológicas normais a PO é expressa como zimogênio inativo chamado de PPO (Kanost *et al.* 2004). PPO são polipeptídeos que contém dois átomos de cobre por molécula de proteína com um peso molecular de 70-80 KDa, em sua forma inativa, e de 50-60 em sua forma enzimaticamente ativa (Ashida & Brey 1997). A síntese de PPO ocorre em sua maioria nos hemócitos com variações espécie – específicas em relação ao tipo de hemócito (Cerenius & Soderhall 2004). Como exemplo, Hillyer e Christensen (2002) detectaram a PO em células oenocitoides de *Aedes aegypti*. Com uma injúria física ou desafio por microorganismos a PPO é ativada por uma proteólise limitada através da ação da cascata de serino proteases (Ashida *et al.* 1974; Ashida & Dohke 1980; Kanost *et al.* 2004).

Serino proteases são hidrolases com o aminoácido serina em seu centro ativo, as quais estão incluídas a tripsina, quimiotripsina e subtilisina (Hedstrom 2002). Sabe-se que estas proteases quebram a cadeia polipeptídica no lado carboxil de aminoácidos específicos, resultando na quebra da ligação peptídica (Hedstrom 2002). Estudos em laboratório geralmente usam a quimiotripsina como ativador da PPO. Esse ativador se tornou uma ferramenta experimental para o ensaio da PO em insetos (Sugumaran *et al.* 1985; Saul & Sugumaran 1987; Adamo 2004).

A primeira enzima ativadora da PPO, chamada de protease ativadora da PPO (PAP), foi purificada e extraída da cutícula de *M. sexta* (Aso *et al.* 1985). Em alguns casos as PAPs requerem a presença de cofatores protéicos ou homólogos da serinoprotease para sua ativação (Jiang *et al.* 1998; Kwon *et al.* 2000).

Mecanismos regulatórios da atividade de PO são necessários para produzir a resposta (Cerenius & Soderhall 2004; Nappi & Christensen 2005; Kanost & Gorman 2008). Neste sentido, ocorre a transcrição de certos genes incluindo aqueles que codificam inibidores de serino proteases (Kanost & Jiang 1996; Kanost 1999), como as serpinas, as quais previnem a ativação prematura e excessiva por regulação negativa (Silverman *et al.* 2001; Gettins 2002; Cerenius *et al.* 2008, 2010; Zou *et al.* 2010). A pacifastina, uma molécula inibidora de serino proteases, foi isolada da lagosta *Pacifastacus leniusculus* (Hergenhahn *et al.* 1987; Liang *et al.* 1997).

Outro regulador da PO é a dopacromo isomerase. Estudos em *M. sexta* mostraram que esta enzima é ativada pelo inseto na presença de PO, atuando como uma regulação negativa da melanização (Sugumaran *et al.* 2000).

A via de melanização mais comumente estudada tem sido relacionada aos processos de reação contra ovos de parasitóides em *D. melanogaster* (revisado por Nappi & Vass 1993). A formação de melanina ocorre a partir do aminoácido fenilalanina, que é, primeiramente, hidroxilado à tirosina pela fenilalanina hidroxilase. A tirosina é então hidroxilada pela PO para produzir DOPA. DOPA é posteriormente oxidado em dopaquinona sendo convertido imediatamente em dopacromo por uma reação espontânea e não enzimática. O rearranjo estrutural não enzimático do dopacromo, seguido da decarboxilação gera o 5-6 dihidroxiindol. O dihidroxiindol é oxidado pela PO para formar o indol-5,6-quinona. Finalmente, as indolquinonas são polimerizadas em eumelanina ou, na presença de compostos tiol, feomelaninas (Nappi & Christensen 2005). Além disso, o dihidroxiindol também pode ser produzido por uma via alternativa, onde a DOPA descarboxilase remove CO₂ do DOPA para formar a dopamina (Nappi & Christensen 2005). A melanina mais comum é a eumelanina que é formada pelo polímero do dihidroxiindol que vem da dopaquinona (dopacromo), e produz uma cor marrom escura (Napolitano *et al.* 2000). Figura 1 ilustra esta via.

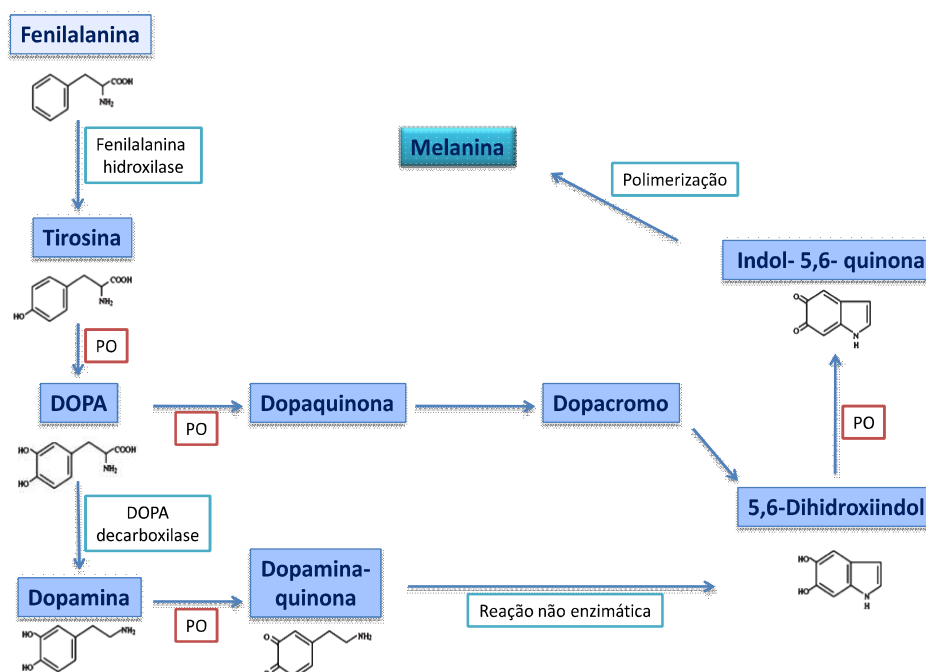


Figura 1: Via da fenoloxidase na síntese de melanina.

Adaptado de González-Santoyo e Aguilar (2012)

1.5.2.5 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

As respostas humorais envolvem principalmente a síntese e a liberação de diferentes tipos de peptídeos antimicrobianos (AMP) na hemolinfa de insetos após uma infecção microbiana (Bulet *et al.* 1999). AMPs apresentam baixo peso molecular, resistem ao aquecimento, são tipicamente catiônicos e muitas vezes compostos de menos de 100 resíduos de aminoácidos (Wang & Lai 2010). Os AMPs são altamente conservados numa ampla variedade de táxons incluindo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (Yeaman & Yount 2003; Ravi *et al.* 2011).

De uma maneira geral, os AMPs são derivados de precursores maiores, incluindo uma sequência sinal. Modificações pós-traducionais incluem o processamento proteolítico, e, em alguns casos a glicosilação (Bulet *et al.* 1993), amidação do terminal carboxila e isomerização de aminoácido (Simmaco *et al.* 1998), e halogenação (Shinnar e Al 1996). AMPs têm como alvo as membranas de microorganismos, sendo hoje bem compreendidos os mecanismos de ação contra bactérias.

A diferença mais marcante em membranas citoplasmáticas entre células procarióticas e eucarióticas é a composição e o arranjo topológico de lipídeos (Graham & Higgins 1997). A superfície (monocamada externa) das membranas celulares de mamíferos é composta exclusivamente por fosfolipídios eletricamente neutros, zwitteriônicos, principalmente a fosfatidilcolina e esfingomiélna, ao passo que as membranas bacterianas contêm grandes quantidades de fosfolipídios de carga negativa, como o fosfatidilglicerol e a cardiolipina (Matsuzaki 1999). As membranas exteriores de bactérias gram-negativas são cobertas com LPS polianiónicos (Matsuzaki 1999).

AMPs, em sua maioria, podem ser classificados em um número limitado de famílias (Bulet & Stocklin 2005) nomeadas como: cecropinas (Hultmark *et al.* 1980; Boman & Hultmark 1987; Kaaya *et al.* 1987; Dickenson *et al.* 1988; Kylsten *et al.* 1990; Samkovlis *et al.* 1990, 1991), defensinas (Lambert *et al.* 1989; Dimarcq *et al.* 1990), atacinas (Hultmark *et al.* 1983; Kockum *et al.* 1984; Casteels *et al.* 1990; Sun *et al.* 1991), lisozimas (Mohrig & Messner 1968; Powning & Davidson 1976; Jolles *et al.* 1979; Hultmark *et al.* 1980; Engstrom *et al.* 1985), e dipterocinas (Wicker *et al.* 1990; Dimarcq *et al.* 1990).

Embora as cecropinas tenham sido isoladas de várias espécies de insetos lepidópteros e dípteros, elas não têm sido encontradas em outras ordens de insetos

(Cociancich *et al.* 1994). Estas têm estrutura em alfa- hélices e atuam nas bactérias Gram-negativas com mais eficiência (Yamano *et al.* 1998; Yang *et al.* 1999).

As defensinas de insetos são altamente eficazes contra as bactérias gram positivas (Hetru *et al.* 2003), incluindo algumas bactérias patogênicas ao homem, tais como *Staphylococcus aureus*, mas não apresentam uma atividade eficaz contra bactérias Gram-negativas (Okada & Natori 1984, 1985; Matsuyama & Natori 1990; Cociancich *et al.* 1993; Yamada & Natori 1994). Ao contrário das cecropinas, primeiramente isolada de *Hyalophora cecropia*, uma espécie Lepidoptera, e restrita também a Diptera, as defensinas tem sido caracterizadas em várias ordens de insetos (Hoffmann & Hetru 1992; Cociancich *et al.* 1994). Lowenberger *et al.* (1995) foi o primeiro trabalho em que se purificou e descreveu três isoformas da família de defensinas de insetos encontradas na hemolinfa de *Aedes aegypti*. Neste trabalho, as defensinas foram potencialmente ativas contra bactérias Gram-positivas e contra uma das bactérias Gram-negativas testadas. Waniek *et al.* (2011), demonstraram um aumento significativo de um transcrito de defensina em *Triatoma brasiliensis* em resposta a infecção por *T. cruzi* e sugeriram uma função potencial da defensina no controle da população deste parasita.

A atacina é ativa contra as bactérias Gram-negativas, inibindo a síntese de proteínas da membrana externa, enquanto a moricina (um AMP da mesma família), aumenta a permeabilidade da membrana, matando então, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Hara & Yamakawa 1995).

Lizosimas são muramidases que hidrolizam a ligação glicosídica β - 1,4 na N-acetil- glucosamina e resíduos de ácido N- acetil murâmico na camada de peptidoglicano da célula bacteriana provocando a sua lise (Lee & Brey 1995; Jain *et al.* 2001). A lizozima do tipo A e C foram caracterizadas a partir dos bichos da seda domésticos e selvagens, *B. mori* e *Antheraea mylitta*, respectivamente (Lee & Brey 1995; Jain *et al.* 2001).

Diptericinas são peptídeos antibacterianos de 9kDa descritos em *Phormia terranova* (Dimarcq *et al.* 1988), *D. melanogaster* (Wicker *et al.* 1990), e *Sarcophaga peregrine* (Ishikawa *et al.* 1992). Diptericinas possuem ação contra uma gama limitada de bactérias Gram - negativas (Dimarcq *et al.* 1988).

Ursic-Bedoya *et al.* (2011) descreveram recentemente um novo peptídeo antimicrobiano, a prolixicina, isolada de *R. prolixus* com atividade contra ambas as

bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas com nenhuma toxicidade para *T. cruzi*.

O corpo gorduroso dos insetos é o principal responsável pela produção de AMPs (Brey & Hultmark 1998; Hoffmann *et al.* 1999; Schmid-Hempel 2005). Em *Drosophila* (Kylsten *et al.* 1990) e *H. cecropia* (Steiner *et al.* 1981) os genes codificadores de AMPs são expressos em hemócitos, células do epitélio e corpo gorduroso. A iniciação do sinal da via Toll ocorre através da geração proteolítica da proteína Spaetzle a partir do seu precursor; a interação presumida do Spaetzle com um receptor chamado Toll; a comunicação subsequente através de uma série de proteínas intracelulares que resultam na modificação química da Cactus citoplasmática, que é, em seguida, desvinculada da proteína Dif. Há a translocação da Dif para o núcleo, onde esta ativa a transcrição dos genes relacionados aos AMPs. A drosomicina, um importante peptídeo antifúngico em *Drosophila*, parece ser regulada por esta via (Imler & Hoffmann 2001).

Insetos mutantes com defeitos na via Toll ainda podem expressar AMPs como a cecropina e a diptericina (Imler & Hoffmann 2001). O circuito residual é chamado da via IMD, regulada por uma proteína relacionada com a Dif chamada relish (Stoven *et al.* 2000). O receptor atual que se transforma na via intracelular IMD ainda não foi identificado (Zasloff 2002).

A via Toll parece ter um papel importante também na defesa contra fungos, enquanto a via IMD envolve um conjunto diferente de estratégias antimicrobianas para combater especialmente as bactérias, o que sugere que essas duas vias são intrinsecamente projetadas para responder a diferentes injúrias fisiológicas (Zasloff 2002).

Um trabalho aponta uma proteína de ligação a proteoglicano circulando na hemolinfa de *Drosophila* (seml) como o receptor proximal que inicia os sinais da via Toll quando o inseto é invadido por bactérias Gram-positivas (mas não fungos) (Michel *et al.* 2001). Ainda não está claro como a ligação deste receptor de reconhecimento ativa a cascata proteolítica que resulta na geração de Spaetzle madura e processada a partir da sua proteína precursora (Zasloff 2002).

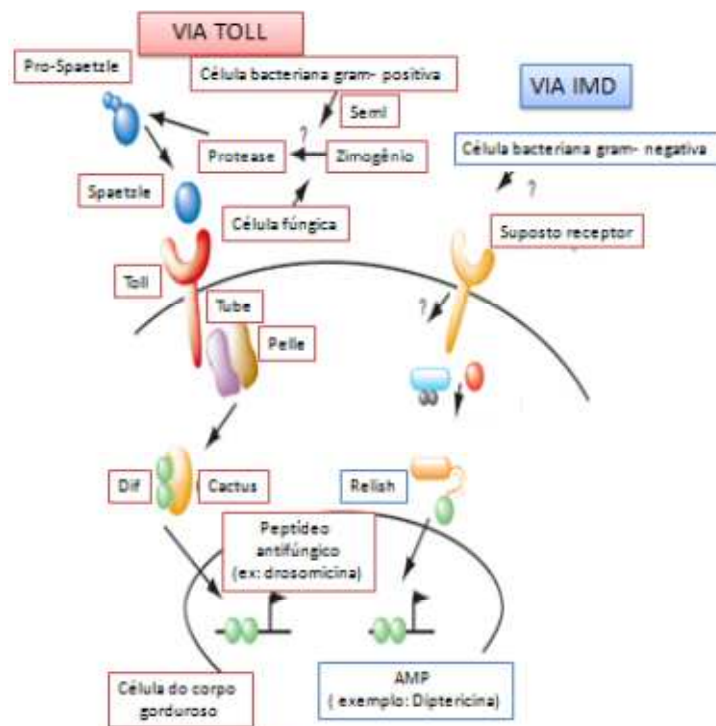


Figura 2: Cascatas de sinalização que ativam genes de peptídeos antimicrobianos no corpo gorduroso de *Drosophila*. Fonte: adaptado de Zasloff (2002)

Recentemente, a incubação de *T. rangeli* em amostras de hemolinfa de *R. prolixus* indicou a existência de uma proteína tripanolítica que age contra o *T. rangeli* KP1- isolado de *R. colombiensis* da Colômbia, mas não contra a cepa de *T. rangeli* KP1 + de *R. prolixus* da Colômbia (Pulido *et al.* 2008). A presença de um fator tripanolítico na hemolinfa de *R. prolixus* indica uma adaptação específica das subpopulações confirmando o papel dos vetores como filtros biológicos para a transmissão dos parasitas (Vallejo *et al.* 2009).

Mello *et al.* (1995) demonstraram que após a inoculação de *T. rangeli* na hemocele de *R. prolixus*, o parasita sofre divisões sucessivas durante o desenvolvimento extracelular, e os níveis da atividade de lisozima na hemolinfa aumentam. Eles também mostraram que a infecção por *T. rangeli* não induziu as atividades tripanolíticas e nem uma atividade antibacteriana ensaiadas na presença de hemolinfa.

1.5.3 Coagulação da hemolinfa em insetos

A coagulação é um processo que sobrepõe às defesas humoral e celular e envolve a combinação de fatores solúveis e derivados celulares (Theopold *et al.* 2002; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Os mecanismos de coagulação variam entre

espécies de insetos, e apenas algumas similaridades são encontradas entre estágios de vida diferentes dentro da mesma espécie (Bidla *et al.* 2005). A coagulação da hemolinfa é um mecanismo eficiente que atua vedando lesões e bloqueando a entrada de microorganismos na cavidade do corpo do inseto (Bidla *et al.* 2005). Em processo de coagulação, os agentes invasores podem ser também imobilizados e mortos por lectinas e AMPs (Muta & Iwanaga 1996).

Estão sendo descritos diferentes padrões de coagulação baseados no aspecto microscópico dos hemócitos e sua interação com fatores do plasma, os quais são muito importantes para a formação do coágulo nos insetos (Dushay 2009). Em algumas espécies de insetos, as células granulares e plasmatócitos estão envolvidas no processo de formação do coágulo que consiste em quatro estágios consecutivos. Primeiro uma subpopulação de células granulares se desintegra e a matriz extracelular é sintetizada, a qual forma o primeiro coágulo que é responsável por selar a lesão. Depois, a via da PPO, juntamente com a transglutaminase, é ativada e o coágulo denso é formado. No terceiro estágio os plasmatócitos cobrem bem o coágulo, isolando-o da hemocele, e, por último, a epiderme se regenera sobre a lesão, substituindo eventualmente a cicatriz (Lavine & Strand 2002; Theopold *et al.* 2004; Jiravanichpaisal *et al.* 2006; Strand 2008,a).

Scherfer *et al.* (2004) confirmaram que a hemolectina é a proteína mais abundante no coágulo da hemolinfa de larvas de *D. melanogaster*. O mesmo grupo mostrou também que o coágulo aprisiona as bactérias e pode formar-se na ausência da atividade de PO (Scherfer *et al.* 2004). Em vez disso a PO de *D. melanogaster* pode contribuir para a morte dos microorganismos por meio da produção de reativos intermediários durante a formação do coágulo e sua subsequente melanização (Scherfer *et al.* 2004; Theopold *et al.* 2004).

1.6 Microbiota bacteriana intestinal em insetos

Sabe-se que comunidades de diversos microorganismos residem em insetos em uma grande concentração no intestino (Dillon & Dillon 2004). De forma semelhante aos seres humanos, o intestino dos insetos abriga uma microbiota natural, que é necessária para manter as funções fisiológicas normais, incluindo o metabolismo e a homeostase imune do hospedeiro (Dillon & Dillon 2004).

A primeira indicação de colonização bacteriana do intestino de triatomíneos foi indicada por Duncan, em 1926. Ele analisou *R. prolixus* e encontrou um bacilo Gram-positivo no intestino (Duncan 1926). Dias (1934) confirmou este dado em *Panstrongylus megistus* e sugeriu uma função simbiótica. Dois anos depois, um bacilo difteróide foi encontrado no intestino de *R. prolixus*, *Triatoma rubrofasciata*, *T. infestans* e *T. flavida* (Wigglesworth 1936). Posteriormente, esta bactéria foi classificada como gênero *Nocardia* e, finalmente, reclassificada como *Rhodococcus* (Tsukamura 1974; Zakrzewska-Czerwinska *et al.* 1988).

Para avaliar a importância destes simbioss, Brecher e Wigglesworth (1944) produziram ninfas de *R. prolixus* aposimbióticas a partir da desinfecção da superfície de ovos. Estas ninfas desenvolveram uma síndrome aposimbiótica grave, especialmente durante o 4º e 5º estádios, os quais em raros casos atingiram a fase adulta (Brecher & Wigglesworth 1944). As ninfas aposimbióticas apresentaram muitas vezes uma cutícula menos melanizada, anomalias durante a muda, e perturbações da digestão e excreção (Geigy *et al.* 1953; Bewig & Schwartz 1954; Baines 1956; Harington 1960; Gumpert & Schwartz 1962; Auden 1974; Ben-Yakir 1987). Um efeito muito crítico é a redução do sistema traqueal (Eichler & Schaub 1998).

1.6.1 Interação da microbiota bacteriana com parasita

Sabe-se que a microbiota modula a competência vetorial do inseto hospedeiro por meio de interação direta com parasitas ou por competição por recursos no intestino (Azambuja *et al.* 1983; Mello *et al.* 1996; Garcia *et al.* 2007, 2010,a,b). Além disso, a microbiota pode restringir o desenvolvimento de um patógeno indiretamente, por uma atividade antiparasitária da própria bactéria ou fungo ou através da indução de fatores de defesa imunológica humoral do vetor (Eichler & Schaub 2002; Azambuja *et al.* 2005; Boulanger *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2010,b; Mcgwire & Kulkarni 2010; Weiss & Aksoy 2011).

Em algumas espécies de mosquito, a microbiota bacteriana natural está envolvida na supressão de certos organismos patogênicos (Dong *et al.* 2009). Alguns estudos sugerem que a flora microbiana estimula a atividade imunológica basal como, por exemplo, no mosquito *Anopheles gambiae*, em que os mesmos fatores do sistema imunológico que são necessários para controlar a microbiota do

mosquito são também a defesa contra o parasita da malária *Plasmodium* (Dong *et al.* 2009). Neste sentido, o tratamento com tetraciclina em *Culex bitaeniorhynchus* tornou este mosquito mais suscetível ao vírus da encefalite japonesa (Mourya & Soman 1985). Esta interação complexa entre a microbiota do mosquito, o sistema imune inato e o desenvolvimento do parasita *Plasmodium* pode ter implicações significativas para a epidemiologia da malária (Dong *et al.* 2009).

Em moscas tsé-tsé, a infecção bacteriana reforça a imunidade e bloqueia a capacidade do tripanosoma de estabelecer infecções, indicando que as bactérias, por regulação de genes de resposta imune do inseto, podem agir de forma a bloquear a transmissão do parasita (Hao *et al.* 2001).

Castro *et al.* (2012,a), demonstraram que insetos infectados com o clone Dm28c de *T. cruzi* e tratados com antibióticos, após a alimentação, apresentam mais parasitas do que insetos infectados e não tratados com antibióticos.

Investigações de bactérias intestinais em insetos vetores, mais recentemente, focam em *Serratia marcescens*, uma espécie Gram negativa que é comumente encontrada colonizando o trato digestivo. Isolada do intestino médio de *R. prolixus* (Azambuja *et al.* 2004), em experimentos *in vitro* na presença de *T. cruzi*, foi identificada como um interferente ao desenvolvimento parasitário de algumas cepas de *T. cruzi*, por sua atividade lítica contra o parasita (Azambuja *et al.* 2004, 2005; Castro *et al.* 2007,a,b; Garcia *et al.* 2010,a). Azambuja *et al.* (2004) concluiu que as atividades tripanolíticas de *S. marcescens*, linhagens SM365 e RPH são distintas da atividade hemolítica e que somente as bactérias produtoras de prodigiosina possuem ação tripanolítica. Além disso, *S. marcescens* isolada de *R. prolixus*, foi capaz de matar epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y, se mostrando menos ativa contra a cepa Dm28c (Azambuja *et al.* 2004, 2005). A atividade lítica de *S. marcescens* contra *T. cruzi* cepa Y é inibida por D manose (Castro *et al.* 2007, a,b). Este efeito se dá ao fato de *S. marcescens* possuir fímbrias manose-sensível que medeiam a adesão e, conseqüentemente, por algum outro fator, a lise de tripanosoma (Castro *et al.* 2007, a,b).

Por outro lado, a infecção por tripanosomatídeo pode afetar a microbiota. Por exemplo, a síndrome da patologia do triatomíneo infectado com *T. rangeli* é muito semelhante ao de uma aposimbiose (Schaub 1992, 1994). Um efeito direto foi postulado por Watkins (1969) uma vez que os sobrenadantes de meios de cultura de *T. rangeli* inibiram o crescimento dos simbiossomas naturais de triatomíneos sobre meio

de cultura contendo ágar. Eichler e Schaub (2002) mostraram que *R. prolixus* infectado com *T. rangeli* cepa Choachi, mas não com a cepa de *T. cruzi* 'Chile 5', reduziu a concentração do simbionte *Rhodococcus rhodnii* em 50%. Além disso, em *R. prolixus*, *T. cruzi* clone Dm28c estabelece uma infecção, com aumento da população de parasitas e redução da microbiota bacteriana no intestino médio, enquanto a cepa Y de *T. cruzi* não consegue infectar o mesmo inseto sendo que a microbiota permanece em níveis significativamente mais elevados (Castro *et al.* 2012,a). Foi demonstrado também que com esta mudança na população microbiana do trato digestivo, há aumento da atividade antibacteriana das amostras de conteúdo intestinal do *R. prolixus* infectados com o clone DM28c, contribuindo assim para o desenvolvimento do parasita no hospedeiro (Castro *et al.* 2012,a).

Essa interação íntima de microorganismos intestinais com o inseto vetor destaca a complexidade do ambiente intestinal e a importância da manutenção da homeostase já que muitas bactérias, fungos e parasitas, tais como o *T. cruzi*, sobrevivem e desenvolvem-se no trato digestivo sem matar o hospedeiro (Eichler & Schaub 2002; Vallejo *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2010,a,b).

1.7 Justificativa

Como o conhecimento da modulação do sistema imunológico por parasitas naturais de triatomíneos, tal como o *T. rangeli*, é ainda escasso e fragmentado, este trabalho serve de ferramenta para esclarecer aspectos de como determinadas cepas são consideradas bem adaptadas se desenvolvendo bem no trato digestivo e invadindo a hemocele do inseto, e como outras, após serem ingeridas juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado, são rapidamente destruídas. O inseto modelo de estudo é o *R. prolixus*, por sua facilidade de manipulação e manutenção em laboratório.

A utilização de metodologias modernas de bioquímica e biologia molecular, associadas aos aspectos fisiológicos dos triatomíneos, buscando o reconhecimento de componentes envolvidos no processo evolutivo da interação *T. rangeli* com o seu vetor, elucidam alguns pontos até então obscuros desta interação. Neste sentido, torna-se fundamental acoplar o estudo do desenvolvimento do *T. rangeli*, analisar as reações de defesa e da microbiota intestinal do inseto-vetor.

Finalmente, os resultados gerados neste estudo poderão ser aplicados ou utilizados em investigações voltadas a outras interações parasitas – insetos vetores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da infecção com *T. rangeli* sobre a resposta imunológica e microbiota intestinal de *R. prolixus*.

2.2 Objetivos específicos

A partir de ninfas de 4^o e 5^o estágio de *R. prolixus* infectadas oralmente com cepa Macias de *T. rangeli*, em diferentes dias após a alimentação avaliar:

- O efeito biológico da infecção verificando alterações de ecdise e a mortalidade do inseto;
- O desenvolvimento do epimastigota no trato digestivo e a capacidade invasiva do parasita à hemocele do inseto;
- O sistema humoral (ativação do sistema PPO e expressão de AMPs do inseto).
- A imunidade celular (número de hemócitos e formação de nódulos do inseto);
- A alteração da microbiota bacteriana do trato digestivo.

A partir de ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus* infectadas por inoculação com cepa Macias ou H14 de *T. rangeli*, em diferentes dias após a infecção avaliar:

- O efeito biológico da infecção verificando alterações de mortalidade do inseto;
- O desenvolvimento do epimastigota na hemocele do inseto;
- O sistema humoral (ativação do sistema PPO).
- A imunidade celular (número de hemócitos e formação de nódulos do inseto);
- A alteração da microbiota bacteriana do trato digestivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental:

O presente estudo analisou a infecção oral de *R. prolixus* por *T. rangeli* cepa Macias em dois parâmetros diferentes. Inicialmente foi realizada uma infecção e acompanhamento em longo prazo, na qual os insetos foram infectados no 4º estágio e acompanhados até completarem sua muda para 5º estágio. Estes mesmos insetos após um período de jejum de 38 dias, foram realimentados com sangue livre de parasitas. Este período de jejum foi necessário para que ocorresse a ecdise dos insetos, e seus aparelhos bucais endurecessem para que pudessem se nutrir novamente. Alguns ensaios, portanto foram realizados com observações até a metamorfose para adultos. Concomitantemente, a infecção para avaliação dos efeitos em curto prazo foi efetuada também. Neste caso, os insetos foram infectados no 5º estágio e alguns aspectos fisiológicos foram acompanhados em diferentes dias após a infecção. Em ambos os modelos, as análises foram feitas em ninfas de 5º estágio.

As análises se agruparam em quatro naturezas: o efeito biológico da infecção, alterações na imunidade celular e humoral, e alterações na microbiota. Como efeito biológico as observações foram: muda, mortalidade e a contagem de parasitas nos diferentes órgãos. Nas investigações das respostas de defesa celular, foram feitas contagens de número de hemócitos e de nódulos na hemolinfa. Quanto as avaliações relacionadas a imunidade humoral foram analisadas a ativação da PPO, as expressões gênicas de AMPs bem como as atividades antibacterianas por ensaios de turbidimetria. Neste trabalho, a análise de alteração de microbiota foi realizada por contagem de CFU do trato digestivo em todos os grupos de insetos infectados ou não (controle) (Tabela 1).

Como não foi observada a invasão de *T. rangeli* cepa Macias na hemolinfa do vetor, observamos o desenvolvimento do parasita na hemocele em ensaios de infecção por inoculação em ninfas de 5º estágio. O intuito destes testes foi analisar as diferenças nas respostas imunológicas do inseto, em infecções com as cepas de *T. rangeli* Macias e a cepa H14. Também, foram analisados os efeitos sobre a biologia, mortalidade e contagem de parasitas, hemócitos e nódulos na hemolinfa. E,

por fim, a imunidade humoral foi avaliada pela análise da ativação do sistema PPO. A Tabela 2 mostra um esquema das abordagens metodológicas das infecções oral e por inoculação de *T. rangeli* em *R. prolixus*, bem como dos métodos empregados para as avaliações dos diferentes efeitos fisiológicos e imunológicos.

Tabela 1: Esquema experimental de infecção por via oral de ninfas de *Rhodnius prolixus* com epimastigotas de cultura de *Trypanosoma rangeli*.

<u>Infecção oral com cepa Macias de <i>Trypanosoma rangeli</i> e avaliação dos efeitos em <i>Rhodnius prolixus</i></u>	
Em longo prazo: Infecção em 4º estágio e realimentação sem parasitas em 5º.	Em curto prazo: Infecção em 5º estágio
Efeito Biológico: Mortalidade e muda (apenas em infecção em longo prazo)	
Efeito Biológico: Contagem de parasitas nos diferentes órgãos	
Imunidade Celular: Contagem de hemócitos e nódulos na hemolinfa	
Imunidade Humoral: Atividade da fenoloxidase (PO)	
Imunidade Humoral: Expressão de AMPs e atividade antibacteriana (turbidimetria)	
Alteração na Microbiota: Contagem de CFU	

Tabela 2: Esquema experimental de infecção por inoculação em ninfas de *Rhodnius prolixus* com epimastigotas de cultura de *Trypanosoma rangeli*.

<u>Infecção via inoculação na hemocele com cepas Macias ou H14 de <i>Trypanosoma rangeli</i> e avaliação dos efeitos em <i>Rhodnius prolixus</i></u>
Efeito Biológico: Mortalidade e contagem de parasitas na hemolinfa
Imunidade Celular: Contagem de hemócitos e nódulos na hemolinfa
Imunidade Humoral: Atividade da fenoloxidase (PO)

3.2 Manutenção da colônia de *Rhodnius prolixus*:

No presente trabalho, foram empregados *R. prolixus*, provenientes da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC/FIOCRUZ os quais eram mantidos em temperatura de 28°C de acordo com Garcia *et al.* (1975), Garcia *et al.* (1984,a,b). A alimentação da colônia é normalmente efetuada com sangue

desfibrinado de coelho, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL). Os procedimentos adotados no presente trabalho, como de alimentação e infecções, seguiram os princípios éticos na experimentação animal tendo sido previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/FIOCRUZ), sob a licença número de protocolo L-0061/08.

3.3 Manutenção das culturas de epimastigotas:

Foram utilizadas duas cepas de *T. rangeli* caracterizadas com o genótipo KP1+. *T. rangeli* cepa Macias, originalmente isolada do homem (hospedeiro) na Venezuela (Steindel *et al.* 1994) e *T. rangeli* cepa H14 (CT-IOC 038), isolada do homem (hospedeiro) em Honduras (Acosta *et al.* 1991) foram gentilmente cedidas pela Dra. Suzete Araujo Oliveira Gomes (UFF) e pela Dr. M.A. Souza, IOC/Fiocruz, respectivamente.

T. rangeli foi mantido a 28°C em meio de cultura de infusão de cérebro e coração (BHI, DIFCO) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor, de acordo com Azambuja e Garcia (1997). O repique da cultura de parasitas foi feito duas vezes por semana ao longo da pesquisa. Nestas condições, a cultura obtida três dias após o repique, em fase log do crescimento, mantinha predominância da formas curtas de epimastigotas (99% de pureza) (Whitten *et al.* 2001). A concentração de células por mililitro (mL) era calculada pela contagem de parasitas em câmara de Neubauer.

3.4 Métodos de infecção de *Rhodnius prolixus*: Infecção via oral e acompanhamento de infecção em curto e longo prazo

A alimentação dos insetos foi conduzida utilizando um aparato artificial de acordo com Azambuja & Garcia (1997). Foi calculado em média 200 µL e 300 µL de sangue desfibrinado de coelho, fornecido pelo Cecal, para o consumo de cada ninfa de 4º e 5º estádios de *R. prolixus*, respectivamente. Para lavagem das hemácias, o sangue foi centrifugado a 1.890 xg por 10 minutos em 4º C, o sobrenadante descartado e o volume completado com a solução ringer (0.2 M Na₂CO₃, 0.2 M NaHCO₃, pH 9.4) descrita por Castro (2012 b). A centrifugação para lavagem das

hemácias foi repetida três vezes em solução ringer. Ao final da última centrifugação, o volume inicial do sangue foi restituído com meio de cultura BHI modificado, adicionado de epimastigotas de *T. rangeli*, para obtenção de uma concentração final de 10^6 parasitas por mL.

Para os experimentos de avaliação dos efeitos da infecção oral em longo prazo, ninfas de 4º estágio, receberam a dieta sanguínea contendo 1×10^6 epimastigotas/mL (grupo infectado oralmente) ou livre de parasitas (grupo controle). Estes insetos, após sofrerem muda para 5º estágio, foram então realimentados com sangue livre de parasitas, precisamente, 38 dias após a primeira alimentação em 4º estágio.

Em outros experimentos de avaliação dos efeitos infecção em curto prazo, ninfas de 5º estágio foram alimentadas com dieta sanguínea contendo 1×10^6 epimastigotas/mL (grupo infectado oralmente) ou livre de parasitas (grupo controle).

Após as alimentações, os insetos eram pesados e armazenados em frascos de vidro e mantidos em incubadora a 27°C. Insetos que não se alimentavam devidamente eram descartados (menos de 20% em todos os grupos).

3.5 Métodos de infecção de *Rhodnius prolixus*: Infecção por inoculação

Para infecção por inoculação na hemocele, cada ninfa de 5º estágio de *R. prolixus*, no quinto dia após a alimentação com sangue desfibrinado de coelho, foi inoculada com 1 µL de uma suspensão de *T. rangeli* (cepa Macias ou H14) contendo 10^2 epimastigotas de forma curta, ou somente BHI (controle) na região do mesotórax, logo abaixo da coxa mediana direita. Para este fim, foi utilizado uma agulha de insulina ultra fina, com medidas de 13 x 4,5 milímetros (mm) adaptada a uma seringa de Hamilton sendo o procedimento executado em microscópio estereoscópio (marca: Quimis, modelo 9714zt1). Alguns insetos foram selecionados para compor um segundo grupo controle, os quais não foram perfurados.

3.6 Ensaios:

3.6.1 Ecdise e Mortalidade.

Para observação da percentagem de ecdise e mortalidade, foi feito um acompanhamento dos insetos que foram alimentados com *T. rangeli* cepa Macias em 4º estágio. Estes insetos foram acompanhados até a muda para 5º estágio, e, posteriormente, após a realimentação em dieta sanguínea livre de parasitas (pó 36 dias alternados) para avaliação dos efeitos em longo prazo de infecção. Cinco grupos com quinze ninfas de 5º estágio infectadas em 4º estágio foram usadas para este ensaio totalizando 75 insetos por grupo. Paralelamente, foram acompanhados os grupos de insetos controle.

Nos insetos inoculados com cepa Macias ou H14 de *T. rangeli* foram feitas observações de mortalidade durante sete dias após a infecção. Para cada cepa de *T. rangeli*, grupos de 10 insetos foram injetados com parasitas, em quatro repetições totalizando 40 insetos por grupo.

3.6.2 Contagem de parasitas no trato digestivo do inseto vetor:

As análises de infecção por via oral de ninfas 4º ou 5º estádios de *R. prolixus*, foram feitas, em curto prazo ou em longo prazo, por contagens de parasitas em amostras de estômago (intestino médio anterior) e, separadamente, de intestino (intestino médio posterior) juntamente com o reto. Estas análises foram feitas em diferentes dias após a alimentação infectiva ou não (dias 2, 7 e 12 em curto prazo e dias 2 e 7 em longo prazo). Em cada dia de análise, foram utilizados 5 insetos de cada grupo.

Ninfas de 4º ou 5º estádios foram dissecadas para a retirada do trato digestivo. Primeiramente, o estômago foi transferido para um tubo de microcentrífuga. A membrana estomacal foi rompida e o material homogeneizado. Para contar o número de parasitas, foi feita uma diluição de 10 vezes com solução ringer sendo o conteúdo estomacal avaliado na câmara de Neubauer. O resultado foi calculado por ml de conteúdo estomacal. Já o intestino e o reto foram depositados na parede do tubo de microcentrífuga juntamente com 10 µL de solução ringer. Este conteúdo foi macerado com uma agulha ou pinça bem fina para que a parede do órgão se rompesse. Então, alíquotas de 40 µL de solução ringer foram adicionadas

às amostras e feitas as contagens dos parasitas em câmara de Neubauer considerando o resultado por mL da suspensão do intestino e reto em 50 µL de ringer.

3.6.3 Contagem de epimastigotas, hemócitos e nódulos na hemolinfa do inseto vetor:

Todos os grupos de insetos infectados com *T. rangeli*, por via oral e por inoculação, foram avaliados neste parâmetro. Nos ensaios de infecção por via oral por cepa Macias, foram utilizados 5 insetos de cada grupo em cada dia de análise. Este parâmetro foi avaliado nos dias 7 e 12 após a alimentação.

No ensaio de inoculação, a contagem do número de hemócitos e nódulos seguiu o mesmo perfil das análises por infecção oral, sendo os seguintes grupos ensaiados: controle não inoculado, controle inoculado com BHI, inoculado com *T. rangeli* cepa Macias e inoculado com *T. rangeli* cepa H14. Porém, na contagem de parasitas, somente o sétimo dia após a infecção foi avaliado. Nesta análise, foram utilizados 6 insetos de cada grupo em cada dia de análise.

Para análise da hemolinfa, primeiramente, uma das coxas anteriores do inseto era cortada e, com a ajuda de um microcapilar calibrado (Sigma Chemical, USA), recolhia-se 10 µL de hemolinfa. Este conteúdo era adicionado a 10µL da solução anticoagulante (0,01M ácido etileno diamino tetra-acético, 0,1M glicose, 0,062M cloreto de sódio, 0,03M citrato trissódico, 0,026M ácido cítrico, pH 4,6) descrita por Azambuja *et al.* (1991a) e observado em câmara de Neubauer ao microscópio de contraste de fases (modelo: Nikon- Eclipse 50i) para avaliação da presença ou não de parasitas, bem como para a contagem de parasita, hemócitos e nódulos. Como formação de nódulos, tomou-se como definição microagregados contendo cinco ou mais hemócitos. Posteriormente, o inseto era dissecado para outras análises da hemolinfa e para retirada dos órgãos.

3.6.4 Avaliação da ativação da profenoloxidase (PPO):

A atividade de fenoloxidase foi avaliada em insetos infectados oralmente, em observação em curto e em longo prazo, bem como por inoculação. Em cada dia de análise, foram utilizados 5 insetos de cada grupo. Estas análises foram feitas em diferentes dias após a alimentação infectiva ou não, ou inoculação (dia 7 e 12). Nos experimentos de infecção por inoculação, foram analisados quatro grupos: controle,

não inoculado; controle inoculado com BHI; inoculado com *T. rangeli* cepa Macias e inoculado com *T. rangeli* cepa H14.

A atividade fenoloxidásica foi analisada em hemolinfa (em infecção por inoculação) e no conteúdo do estômago (em infecção oral) seguindo uma metodologia descrita por Genta *et al.* (2010). Resumidamente, as amostras de hemolinfa (10µL) obtidas a partir do corte da coxa anterior do triatomíneo e as de conteúdo estomacal obtidas a partir de dissecação e remoção da parede do estômago foram acondicionadas em tubos de polipropileno contendo 200 µl de água deionizada (Milli-Q), sendo o conteúdo estomacal diluído 10 vezes para o ensaio PO.

Dois ensaios de atividade PO foram efetuados em cada amostra. O primeiro é referente à medição da atividade fenoloxidásica espontânea, em que o material não é exposto a nenhum tratamento antes da adição do substrato dihidroxifenilalanina (DOPA) e durante a medição da curva enzimática. Já o segundo é referente à medição da atividade fenoloxidásica total, em que PPO é ativada a PO por tratamento da amostra do inseto com tripsina. Neste ensaio as amostras foram tratadas por vinte minutos na presença de tripsina (Sigma T1426), em concentração de 0,17 mg/mL para as de hemolinfa e $1,7 \times 10^{-3}$ mg/mL para as de conteúdo do estômago em tampão cacodilato (10 mM de cacodilato de sódio, pH 7,4, contendo 10 mM CaCl₂). A reação é desenvolvida no mesmo tampão com as amostras previamente expostas à ação da tripsina (PO Total) ou não (PO espontânea) e iniciada pela adição de uma solução saturada de 4 mg de DOPA (Sigma Chemical, USA)/ mL. Para os ensaios de atividade PO as amostras provenientes dos testes de infecção oral, em conteúdo estomacal, foram incubadas a 37° C, e amostras de obtidas dos ensaios de inoculação, em hemolinfa, foram incubadas a 28° C conforme descrito por Genta *et al.* (2010) e Gomes *et al.* (2003), respectivamente. A absorbância foi então medida a 490 nm no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices, California, USA) em diferentes intervalos de tempo por até duas horas (Genta *et al.* 2010).

Resumidamente, em cada poço da microplaca, foi adicionado 25µL de amostra, 10µL de tampão cacodilato (no caso de avaliação da atividade de PO espontânea) ou 10µL da diluição de tripsina (na avaliação da atividade da PO total), foi feita a encubação para a ação da tripsina, e então adicionado 25µL da solução saturada de DOPA. Após o preparo a leitura foi efetuada no leitor de microplacas.

3.6.5 Expressão de peptídeos antimicrobianos:

Este ensaio foi feito com os dois tipos de análise de infecção por via oral, em curto e longo prazo. Os níveis de RNA mensageiro (mRNA) que codificam peptídeos envolvidos na imunidade inata de *R. prolixus* foram testados por transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Antes da dissecação, os insetos foram imersos em água a 55 ° C por 15 segundos para liberar os hemócitos dos tecidos (Whitten *et al.* 2007). O epitélio do estômago e intestino de ninfas de 5º estágio (n = 10), 1 e 7 dias após a alimentação infectiva, ou não (grupo controle), foi dissecado e armazenado a -70 ° C. O RNA total foi extraído usando o kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente medido pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit First-Strand cDNA Synthesis (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo o protocolo do fabricante usando 1,25 ou 2,5 µg de RNA total. Os *primers* de *R. prolixus* utilizados foram desenhados segundo as sequências codificantes de defensina A, B e C, lisozima A e B, prolixicina e β-actina, sendo todos baseados em publicações de outros autores, como listado na Tabela 3 (Lopez *et al.* 2003; Ursic-Bedoya *et al.* 2008, 2011; Paim *et al.* 2012). Todos os genes que codificam defensinas e prolixicina possuem um intron e puderam, portanto, também serem usados como controle interno de contaminação com DNA genômico.

Os PCRs foram realizados usando a Taq DNA polimerase Illustra (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 ° C por 5 minutos; etapa do anelamento a 94 ° C por 25 segundos, 54 ° C durante 25 segundos, 72 ° C durante 30 segundos e a etapa final de alongamento a 72 ° C, por 7 minutos. A amplificação da prolixicina foi conduzida a uma temperatura de anelamento de 48 ° C. O número de ciclos (25 e 30) foi experimentalmente otimizado com a expressão do gene da actina para eliminar a saturação do sinal (Waniek *et al.* 2012). Para verificar a especificidade do *primer*, fragmentos amplificados de todos os genes foram retirados do gel de agarose, purificados e seqüenciados em ambas as direções pela Plataforma Gen mica - Sequenciamento de DNA / PDTIS-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. As PCRs foram realizadas três vezes sob as mesmas condições, usando replicatas. Como controles negativos reações de PCR foram realizadas sem a fita molde. Todos os experimentos foram realizados no termociclador Veriti 96 - Well Fast (Applied Biosystems, Carlsbad, CA,

EUA). Os produtos da amplificação (5 µL) foram separados em eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio a 2%. A documentação foi realizada com o programa Gel Doc™ XR + System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e medida a intensidade das bandas com o programa ImageJ (versão 1.47q). Médias e desvios padrão das diferentes amostras foram calculados.

Tabela 3: Lista de primers usados

Gene/nome	Sequencia 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho do amplicon
RPDEFAP	GAATACTCCACTCAACCGCAAC	62,7	
RPDEFAR	TAGTTCCTTTACATCGGCCA	58,4	295bp
RPDEFBF	CAGTACCTAGGATATTCCACTCAAC	62,9	
RPDEFBR	TAGTTCCTTTACAATGGCCG	58,4	304bp
RPDEFAP	CAGTACAGTCCTAATACCTAGCC	62,8	
RPDEFAR	CAGTTCCTACGCAACGGCCT	64,5	300bp
RPLYS1F	TTCTTACTGGCTATTTTCGCC	58,7	
RPLYS1R	CGACCTCTGCAATGGTACTG	62,4	377bp
RPLYS2F	CTAGTTTTAACACTATTGCTGCTG	59,4	
RPLYS2R	GCCCTTACATTTCTTGATCC	58,4	378bp
RPPROLF	CTATAACGAGTGAACATAAGACAA	50,0	
RPPROLR	GTGTTTAATGGCGGTAACAAATTAC	53,2	406bp
RPACTF	CACGAGGCTGTATACAATTCCA	60,8	
RPACTR	GTAGCTGTTTAGAAGCATTGCG	61,0	314bp

OBS: Temperatura de Melting (Tm)

3.6.6 Atividade antimicrobiana (ensaio por turbidimetria):

A partir da infecção oral de ninfas de 4º estágio de *R. prolixus*, após a muda e realimentação com sangue livre de parasitas, foram testadas as atividades antibacterianas em amostras de conteúdo estomacal de 5º estágio 7 dias após a alimentação (análise de infecção em longo prazo). Grupos controles, não infectados receberam todas as dietas constituídas somente de sangue livre de parasita. Em um outro experimento, utilizou-se ninfas de 5º estágio, sete dias após a alimentação infectiva do mesmo estágio (infecção em curto prazo). Cada amostra correspondeu

a um pool de conteúdo estomacal de 3 insetos. Foram utilizadas 3 amostras de cada grupo.

Para a preparação das amostras de conteúdo estomacal, os insetos foram dissecados, retirado o estômago (porção anterior do intestino médio), rompido a parede do órgão para obtenção somente do conteúdo o qual foi disposto em tubo de polipropileno. Após diluição com 200µL de água Milli-Q, o material foi homogeneizado, centrifugado (10000g por 10 minutos a 4°C), e submetido a filtração em membrana 0,22 µm de fluoreto de polivinilideno (PVDF -Millipore). As amostras foram mantidas congeladas à -20°C até o uso.

Para medição das atividades antibacterianas do conteúdo estomacal das ninfas de 5º estágio infectadas ou não com *T. rangeli*, uma colônia de *S. marcescens* previamente isoladas de *R. prolixus*, mantidas em Ágar Nutriente ou criopreservada, foi semeada em 20 ml do meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) e incubadas à 30° C com agitação de 90 rotações por minuto por aproximadamente 18 horas. Após este período 100 µl desta cultura foi semeada em 10 ml de meio TSB e incubada nas mesmas condições por 4 horas. Ao fim deste procedimento, a cultura bacteriana se encontrava em uma concentração na ordem de 10⁸ bactérias por mL. As bactérias foram lavadas duas vezes em tampão fosfato salina (PBS) (0.01 M fosfato de sódio, 2.7 mM cloreto de potássio e 0.137 M cloreto de sódio, pH 7.4) por centrifugação a 10.000g por 10 minutos, descartando o sobrenadante em cada lavagem. Na última centrifugação o pellet foi ressuspensão em TSB e diluído no mesmo meio para correção da concentração de bactéria em 10⁴/ mL e mantida à 4°C até o uso.

O ensaio turbidimétrico para medição da atividade antibacteriana foi adaptado previamente por Castro *et al.* (2012 a), a partir dos trabalhos de Thomas *et al.* (1999) e Bexfield *et al.* (2004). O teste foi desenvolvido em placa 96 poços de fundo chato estéril (Nunc, Fisher Scientific, Leicestershire, UK), onde era adicionado a cada poço 45 µl da amostra estomacal do inseto, mais 5 µl de peptona a 10%. Aos poços das extremidades da placa de 96 poços adicionou-se água milli-Q estéril para que as amostras não perdessem água durante o ensaio. Em todos os poços de ensaio a concentração final de peptona foi de 1% em PBS (p/v). Finalmente, a cada poço foi então adicionado 10 µl da suspensão de 10⁴ bactérias/ ml, ou 10 µl de PBS nos controles, sem bactéria. Cada amostra foi preparada em dois poços para leitura. A densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 550nm a cada 60 minutos

durante 19 horas, em temperatura constante de 37°C em uso de um leitor de Elisa automático marca Spectra Max 190 (Molecular Devices, California, USA). Amostras do grupo controle foram ensaiadas na ausência da preparação de conteúdo estomacal, onde continha somente bactéria em meio peptona a 1%. Os dados referentes a 19 horas de ensaio foram plotados em gráfico e todos os dados foram subsequentemente subtraídos do tempo zero para levar em consideração a opacidade das amostras do estômago.

3.6.7 Alterações na microbiota intestinal: avaliação da população bacteriana.

Os ensaios de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) das amostras estomacais foram feitos apenas com ninfas de 5º estágio infectadas ou não (controle). Resumidamente, para infecção de ninfas de 5º estágio, em longo prazo, os insetos eram infectados oralmente em 4º estágio. Na avaliação de infecção em curto prazo, procedeu-se a infecção de ninfas já em 5º estágio de desenvolvimento.

A microbiota do trato digestivo de *R. prolixus* foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônia (CFUs) sete e doze dias após alimentação dos insetos em todos os grupos de análise de infecção oral e controles não infectados. Em cada dia de análise, foram utilizadas 3 amostras de cada grupo. Os estômagos foram dispostos em pool de três insetos cada em tubos de microcentrifuga. Procedeu-se então a homogeneização e diluição seriada das amostras frescas com uso de PBS estéril. Vinte µL de cada amostra diluída com auxílio de uma alça de Drigalski foi então, espalhado na superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido (BHI contendo 1,6% de ágar). As placas foram incubadas a 30° C e após 24 horas contadas as CFUs. Uma alíquota de PBS foi também plaqueada como controle para garantir a esterilidade.

3.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetido 3 vezes, e o resultado final incluiu as repetições.

Os resultados foram analisados com o GraphPad Prism 5 usando o ANOVA de medidas repetidas, 1- way ANOVA, 2- way ANOVA, teste T, teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, dependendo da

distribuição de dados e do número de tratamentos. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente não significativas quando $p > 0,05$. Os níveis de probabilidade são especificados nas legendas.

4 RESULTADOS

4.1 Infecção oral de ninfas de 4º ou 5º estágio de *Rhodnius prolixus* por cepa Macias de *Trypanosoma rangeli*

4.1.1 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação dos efeitos sobre mortalidade e muda em longo prazo de infecção

As curvas de porcentagem de muda e de mortalidade que foram plotadas até 36 dias alternados após a realimentação dos insetos infectados, não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle (Figura 3).

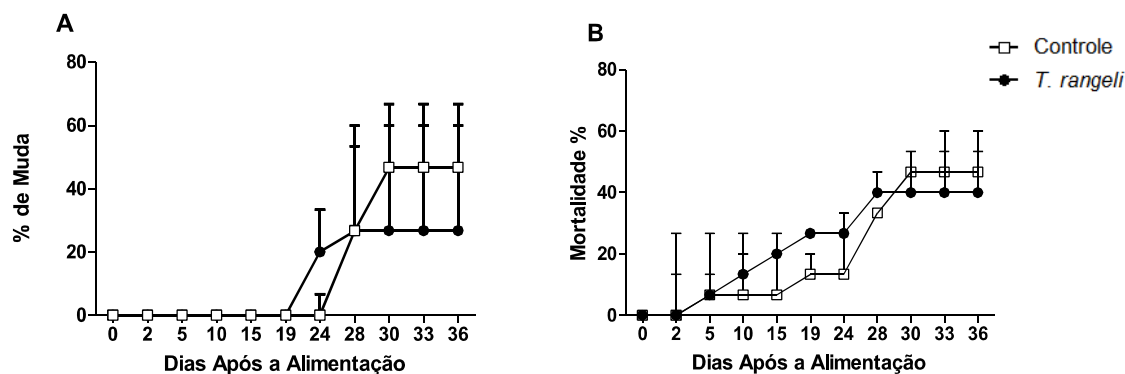


Figura 3: Efeito sobre a mortalidade e muda de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas oralmente com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em longo prazo de infecção.

Acompanhamento de: (A) muda e (B) mortalidade de 5º estágio para adulto (□) Controle, não infectado; (●) Infectado com *T. rangeli*. Cada ponto representa a média de 5 grupos contendo 15 insetos cada. As barras verticais indicam o erro padrão (±EP). As médias foram comparadas usando o Anova de medidas repetidas.

4.1.2 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação em longo prazo de infecção

4.1.2.1 Contagem de parasitas no trato digestivo do inseto vetor

A infecção de ninfas de 4º estágio foi confirmada. Nestas, a percentagem máxima de insetos positivos para a presença de tripanosomas no trato digestivo foi encontrada no estômago sete dias após a alimentação infectiva (93,34%). Houve também neste órgão um aumento na concentração dos epimastigotas por mL no conteúdo estomacal ao longo dos dias analisados. Porém no intestino e reto dos mesmos insetos, este aumento no número de parasitas ao longo dos dias não foi observado (Tabela 4).

Tabela 4: Percentagem de ninfas de 4º e 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias. Avaliação em longo prazo de infecção.

Ninfas analisadas	Estômago (%)		Intestino + Reto (%)	
	Dias após a alimentação		Dias após a alimentação	
	2	7	2	7
4º estágio	86,67	93,34	60,00	53,33
5º estágio	0	6,66	46,66	73,33

Cada dado representa o percentual de insetos positivos: presença de flagelado em concentração de pelo menos 1×10^4 /mL da amostra do trato digestivo em três repetições de experimento com 5 insetos, totalizando 15 insetos por dia analisado.

Após a muda para 5º estágio e a realimentação das mesmas, a maioria dos insetos continuou positiva para a presença de flagelados no intestino e ampola retal (73,33% no dia 7). O número de parasitas no estômago foi zero ou muito baixo, porém, no intestino e reto se manteve sem diferenças significativas do dia 2 ao dia 7 após a alimentação (Tabela 4).

Foi observado um aumento na contagem de *Trypanosoma rangeli* em amostras de estômago de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius prolixus* ($p < 0,05$), enquanto que nas amostras de estômago de 5º estágio, não foi possível observar a presença de parasitas na maioria dos insetos analisados. Já no intestino não foi

observada qualquer mudança no número de tripanosomas em ambos os estádios (Figura 4).

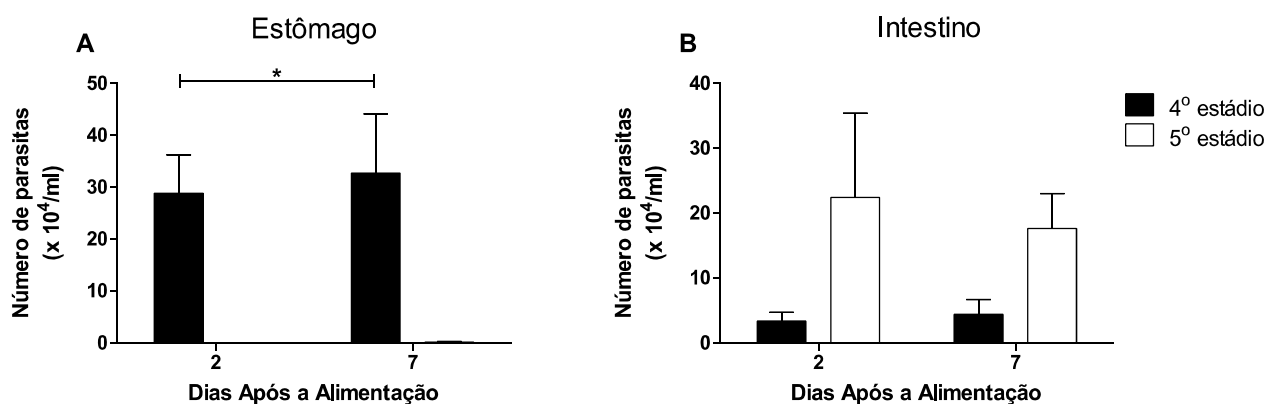


Figura 4: Contagem de Trypanosoma rangeli cepa Macias em amostras de trato digestivo de ninfas de 4º e 5º estágio de Rhodnius prolixus: Avaliação em longo prazo de infecção.

Contagem de parasitas no (A) estômago e (B) intestino incluindo o reto em diferentes dias após a alimentação de (■) 4º estágio e (□) 5º estágio. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). As médias foram comparadas usando o teste T. *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

4.1.2.2 Contagem de Epimastigotas na hemolinfa do inseto vetor

Não foram encontrados epimastigotas livres nas amostras de hemolinfa dos insetos analisados.

4.1.3 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação em curto prazo de infecção

4.1.3.1 Contagem de parasitas no trato digestivo do inseto vetor

Após a alimentação infectiva em 5º estágio a infecção das ninfas foi confirmada em 100% dos insetos pela análise do estômago no segundo dia após a alimentação (Tabela 5). Houve também em todos os órgãos analisados uma diminuição na concentração dos epimastigotas no decorrer dos dias de análise ($p < 0,001$) (Figura 5).

Tabela 5: Percentagem de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias. Avaliação em curto prazo de infecção.

Ninfa infectada	Estômago (%)			Intestino + Reto (%)		
	Dias após a infecção			Dias após a infecção		
	2	7	12	2	7	12
5º estágio	100,0	26,6	0	86,6	13,3	6,6

Na presença de ao menos 1×10^4 parasitas/mL da amostra do órgão, o inseto foi considerado positivo. Cada dado representa o percentual de insetos positivos em três repetições de experimento com 5 insetos, totalizando 15 insetos por dia analisado.

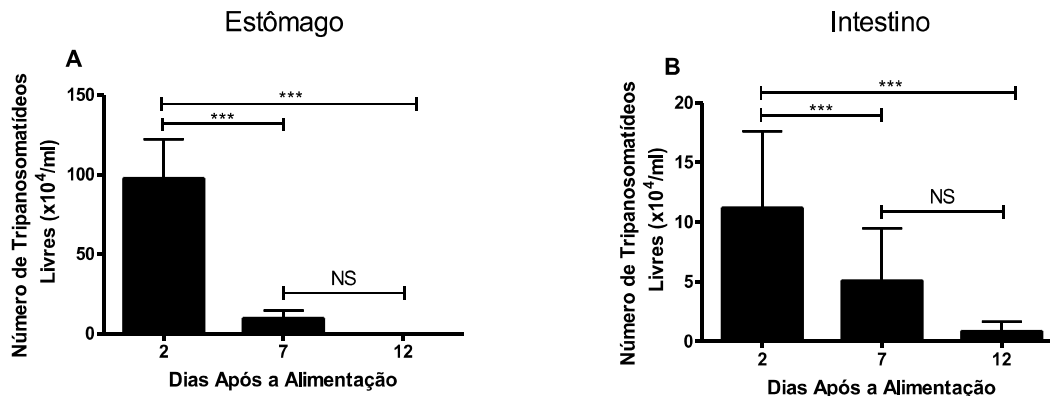


Figura 5: Desenvolvimento de *Trypanosoma rangeli* cepa Macias no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus*: Avaliação em curto prazo de infecção.

Contagem de parasitas no (A) estômago e no (B) intestino incluindo o reto foi feita em diferentes dias após a alimentação infectiva. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os valores foram comparados nos diferentes dias com o ANOVA one-way.*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ e NS = Diferença não-significativa.

4.1.3.2 Contagem de Epimastigotas na hemolinfa do inseto vetor

Não foram encontrados epimastigotas livres nas amostras de hemolinfa dos insetos analisados.

4.1.4 Infecção oral em *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: efeitos sobre a imunidade celular do vetor em longo prazo de infecção

Conforme mostra a Figura 6, nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de hemócitos e nódulos na hemolinfa ao comparar ambos os grupos infectados com *T. rangeli* ou não (controle).

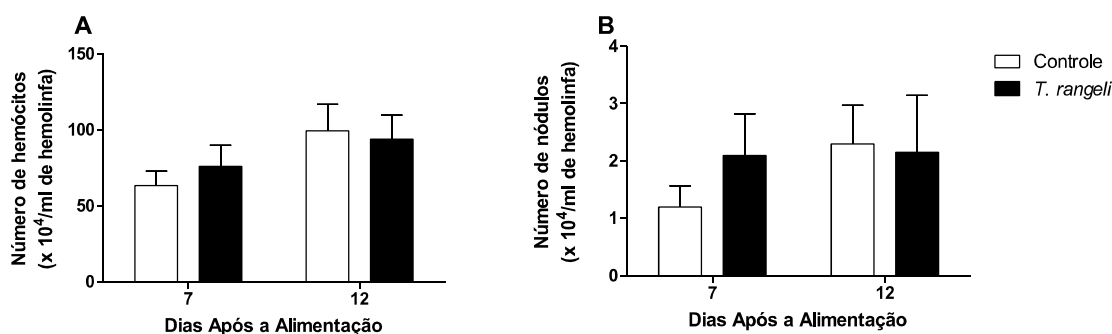


Figura 6: Efeitos da infecção oral de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli* cepa Macias sobre a contagem de hemócitos e nódulos: Avaliação em longo prazo de infecção.

Contagem de (A) hemócitos e (B) nódulos na hemolinfa medida nos diferentes dias após a alimentação com sangue livre de parasitas. (□) Controle não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP).

4.1.5 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: efeitos sobre a imunidade celular do vetor em curto prazo

Após a alimentação infectiva em 5º estágio o efeito da alimentação de *T. rangeli* sobre a imunidade celular foi analisado. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de hemócitos na hemolinfa ao comparar ambos os grupos (controle e infectado). Porém, houve um aumento significativo no número de nódulos 12 dias após a alimentação nos insetos infectados quando comparados aos controle ($p < 0,05$) (Figura 7).

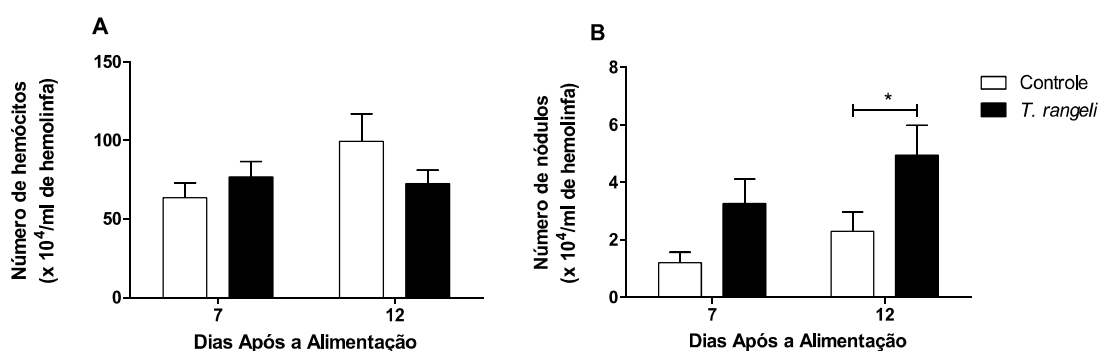


Figura 7: Efeitos da infecção oral de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli* cepa Macias sobre a contagem de hemócitos e nódulos: Avaliação em curto prazo de infecção.

Contagem de (A) hemócitos e de (B) nódulos na hemolinfa nos dias 7 e 12 dias após a alimentação infectiva. (□) Controle, não infectado; (■) Infectado. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, com um teste t ou teste de Mann-Whitney. $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ e NS = Diferença não-significativa.

4.1.6 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação do sistema de ativação da PPO em longo prazo de infecção

No modelo de infecção em longo prazo, os resultados mostraram que o sistema de ativação da PPO foi suprimido no conteúdo estomacal de *R. prolixus* previamente infectado em 4º estágio, após os insetos mudarem para 5º estágio e receberem nova alimentação com sangue livre de parasita. No conteúdo do estômago esta supressão pode ser observada em todos os dias de análise com

diferenças significativas, tanto em relação a PO espontânea (no dia 7 $p < 0,001$ e no dia 12 $p < 0,05$), quanto com a PO total (no dia 7 $p < 0,001$ e no dia 12 $p < 0,01$), quando comparados os grupos infectados com o controle não infectados (Figura 8).

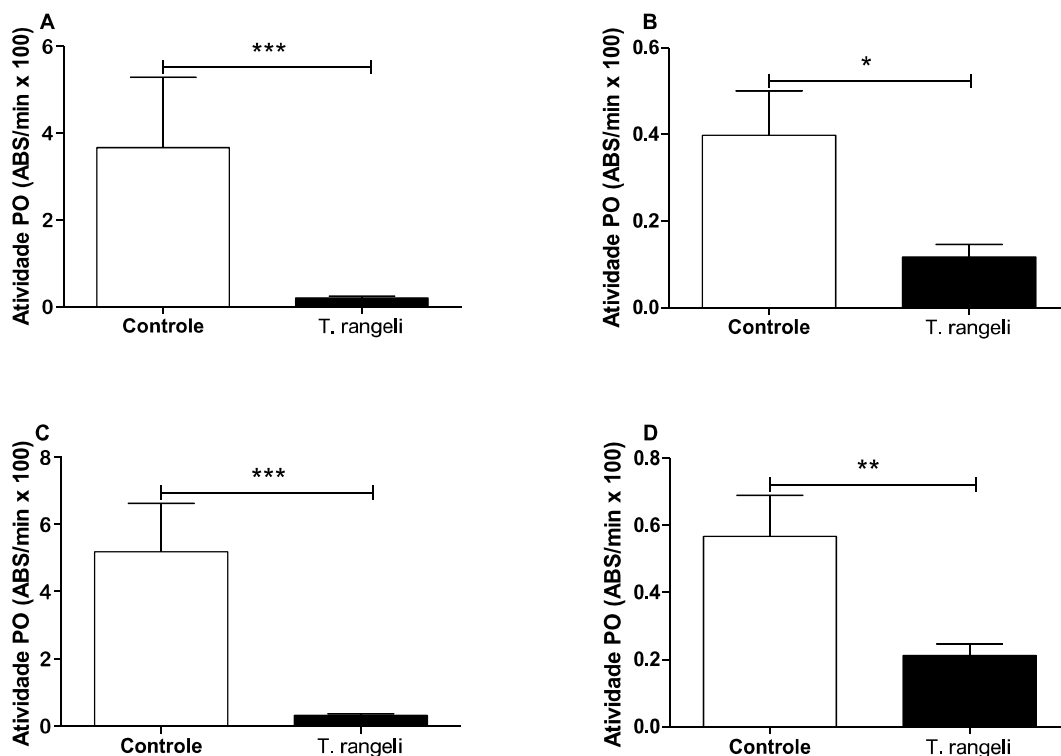


Figura 8: Atividade de fenoloxidase no conteúdo estomacal de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em longo prazo de infecção.

(A) Atividade de PO espontânea no dia 7; (B) Atividade de PO espontânea no dia 12. (C) Atividade PO total, ou seja, com tratamento prévio com tripsina, no dia 7 (D) Atividade PO total, no dia 12. (□) Controle, não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (±EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.1.7 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação do sistema de ativação da PPO em curto prazo de infecção

No modelo de infecção em curto prazo, os resultados mostraram que o sistema de ativação da PPO foi suprimido no conteúdo estomacal de *R. prolixus* infectado em 5º estágio. Esta supressão pode ser observada somente no dia 12 após a alimentação com diferenças significativas, tanto em relação à PO espontânea ($p < 0,01$), quanto com a PO total ($p < 0,05$), quando comparados os grupos infectados com o controle não infectados (Figura 9).

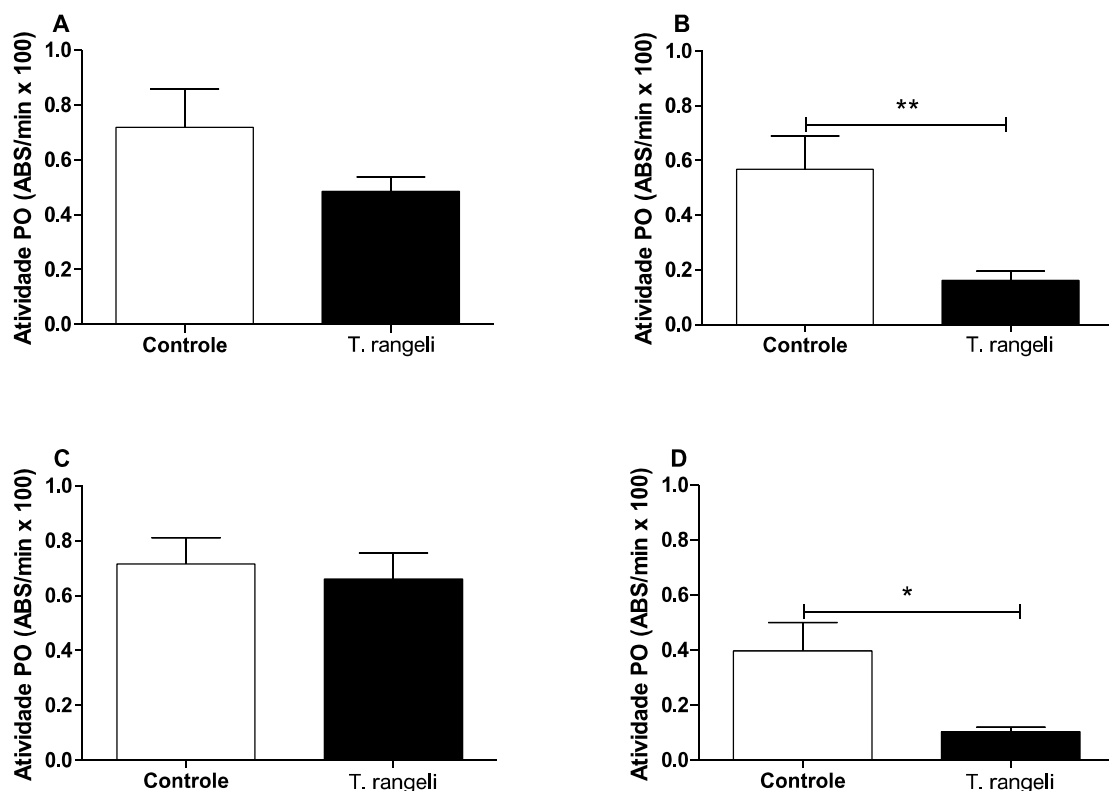


Figura 9: Atividade de fenoloxidase no conteúdo do estomacal de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em curto prazo de infecção.

(A) Atividade de PO espontânea no dia 7. (B) Atividade de PO espontânea no dia 12. (C) Atividade PO total, ou seja, com tratamento prévio com tripsina, no dia 7 (D) Atividade PO total no dia 12. (□) Controle não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa a média de três repetições de 5 insetos totalizando 15 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de Mann-Whitney. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.1.8 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos em longo prazo de infecção

A quantificação relativa de mRNA codificante do epitélio do estômago no primeiro dia após a alimentação, em insetos infectados mostrou uma baixa significativa da expressão da defensina C ($p < 0,001$), e de lisozima B ($p < 0,001$) que se manteve baixa no dia 7 quando comparada ao inseto controle ($p < 0,05$). No dia 7 a expressão de lisozima A ($p < 0,05$) e de prolixicina ($p < 0,001$) também foram diminuídas no mesmo órgão (Figura 10).

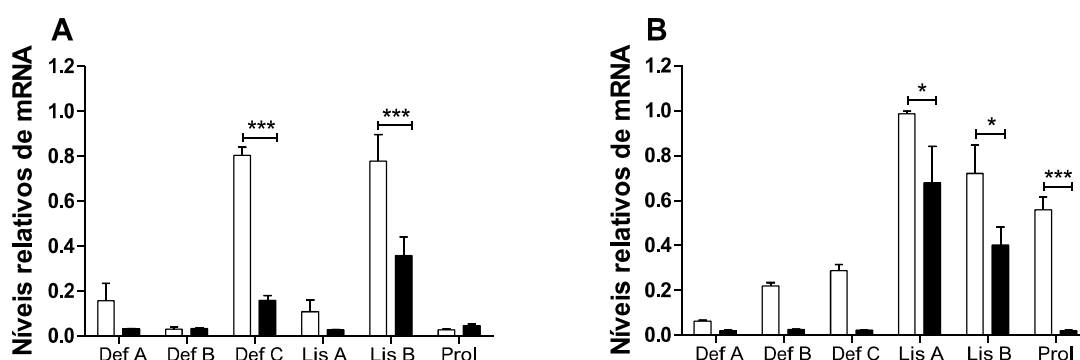


Figura 10: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do estômago de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em longo prazo de infecção.

Quantificação relativa de mRNA no epitélio do estômago para lisozima A (LisA), lisozima B (LisB), prolixicina (Prol), defensinas A (DefA), B (DefB) e C (DefC) em (A) 24 horas e (B) 7 dias após a alimentação de 5º estágio com sangue livre de parasitas. (□) Controle, não infectado (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa 10 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de one-way ANOVA. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Já no intestino, foi observada diferença significativa na expressão de defensina C no primeiro dia a qual se mostrou alta ($p < 0,001$). Foi observada também uma baixa expressão de lisozima B (no dia 1 $p < 0,001$ e no dia 7 $p < 0,01$) e prolixicina (no dia 1 $p < 0,01$ e no dia 7 $p < 0,001$) nos dois dias de análise e baixa de defensina B ($p < 0,01$) no dia 7 neste órgão (Figura 11).

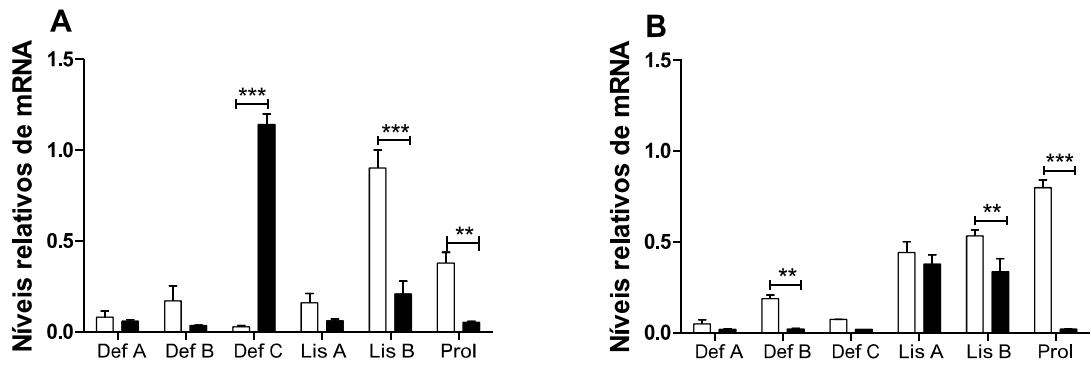


Figura 11: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do intestino de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em longo prazo de infecção.

Quantificação relativa de mRNA no epitélio do intestino para lisozima A (LisA), lisozima B (LisB), prolíxina (Prol), defensinas A (DefA), B (DefB) e C (DefC) em (A) 24 horas e (B) 7 dias após a alimentação de 5º estágio com sangue livre de parasitas. (□) Controle, não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa 10 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de one-way ANOVA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.1.9 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos em curto prazo de infecção

A quantificação relativa de mRNA codificante do epitélio do estômago no primeiro dia após a alimentação, em insetos infectados mostrou uma alta significativa da expressão da defensina B ($p < 0,05$), que contrasta com os valores mais baixos dessa no dia 7 quando comparada ao inseto controle ($p < 0,001$). Já a expressão de lisozima B foi diminuída nos dois dias de análise ($p < 0,05$ nos dois dias) nos insetos infectados, e a prolixicina também diminuída ($p < 0,001$) no sétimo dia no mesmo órgão. Já a expressão de defensina C apresentou-se aumentada ($p < 0,001$) no dia 7 no epitélio do estômago (Figura 12).

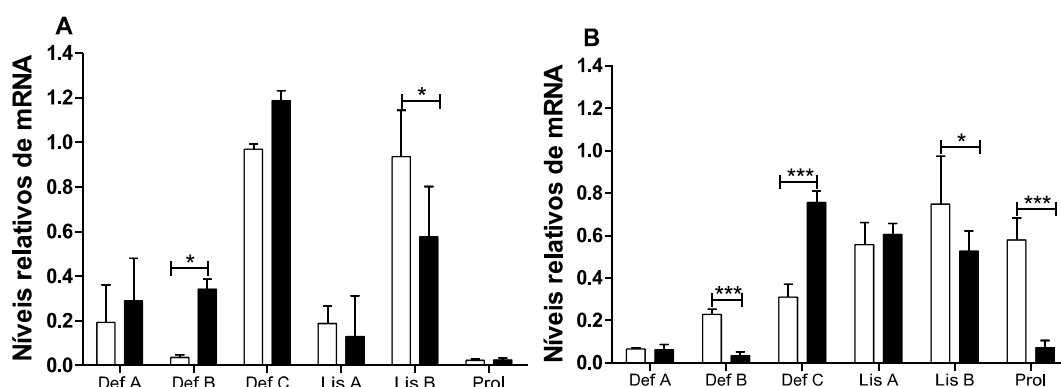


Figura 12: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do estômago de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em curto prazo de infecção.

Quantificação relativa de mRNA no epitélio do estômago para lisozima A (LisA), lisozima B (LisB), prolixicina (Prol), defensinas A (DefA), B (DefB) e C (DefC) em (A) 24 horas e (B) 7 dias após a alimentação de 5º estágio com sangue livre de parasitas. (□) Controle, não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa 10 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de one-way ANOVA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Já no intestino, foi observada diferença significativa na expressão de defensina C no primeiro dia a qual se mostrou alta em insetos infectados ($p < 0,001$) e da prolixicina no dia 7 ($p < 0,001$), com níveis menores, ambas comparadas as encontradas no grupo controle, não infectado (Figura 13).

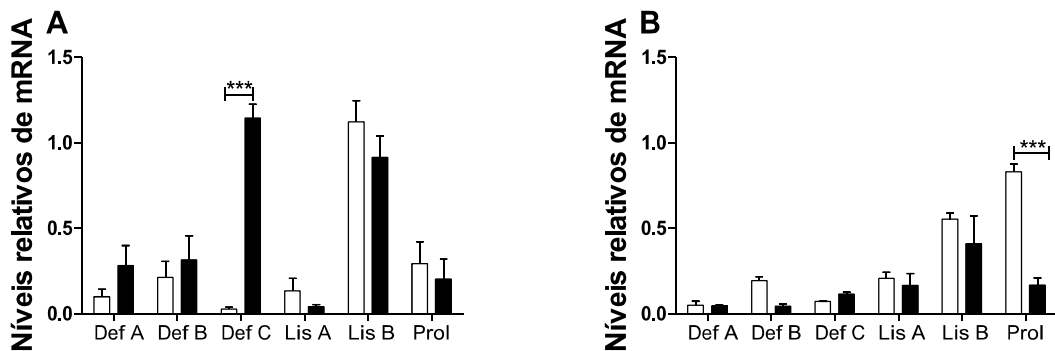


Figura 13: Expressão relativa de mRNA codificante de peptídeos antimicrobianos e de lisozimas no epitélio do intestino de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em curto prazo de infecção.

Quantificação relativa de mRNA no epitélio do intestino para lisozima A (LisA), lisozima B (LisB), prolixicina (Prol), defensinas A (DefA), B (DefB) e C (DefC) em (A) 24 horas e (B) 7 dias após a alimentação de 5º estágio com sangue livre de parasitas. (□) Controle, não infectado; (■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado representa 10 insetos em cada grupo por dia analisado. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de one-way ANOVA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

4.1.10 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação da atividade antimicrobiana e da microbiota em longo prazo de infecção

A atividade antimicrobiana testada com amostras de estômago de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* infectadas por via oral no 4º estágio se apresentou significativamente alta 7 dias após a alimentação sanguínea livre de parasitas, em relação ao grupo controle de insetos que não receberam parasitas nas duas alimentações (grupo controle) ($p < 0,001$) (Figura 14 A). Em paralelo, a microbiota destes insetos infectados sofreram uma redução significativa na contagem de CFU nos dias 7 e 12 após a alimentação em 5º estágio quando comparados com os grupos controles não infectados no mesmo dia (no dia 7 $p < 0,05$ e no dia 7 $p < 0,01$) (Figura 14B).

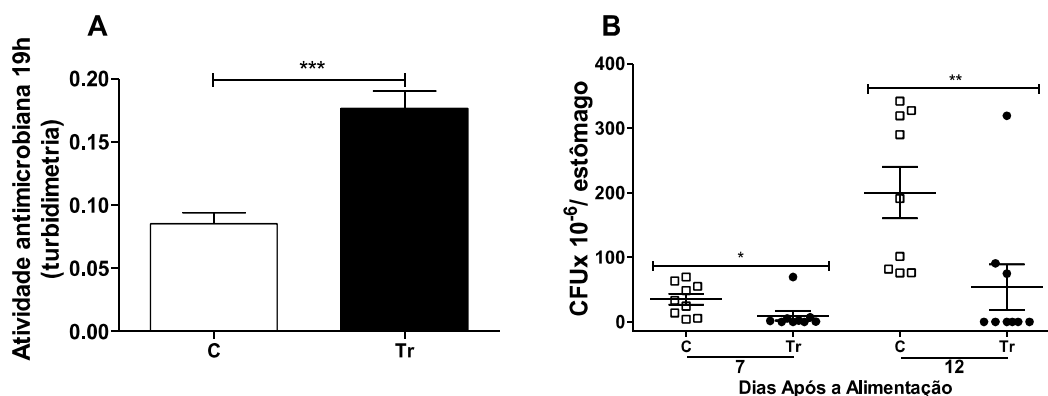


Figura 14: Atividade antibacteriana e análise da microbiota do conteúdo do estômago de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em longo prazo de infecção. (A) Atividade antibacteriana de amostras d estômago 7 dias após a alimentação. (B) Análise de microbiota por contagem de CFU/mL. (C=□) Controle não infectado; (Tr=■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado do gráfico (A) representa a média de quatro repetições de três pools de 3 insetos. Cada dado do gráfico (B) representa o número de CFU de um pool de 3 insetos. Foram feitos 9 pools, totalizando 27 insetos por dia em cada grupo. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de Mann-Whitney. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

4.1.11 Infecção oral de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli*: avaliação da atividade antimicrobiana e da microbiota em curto prazo de infecção

A atividade antimicrobiana foi ensaiada nas amostras de conteúdo estomacal obtidas de ninfas de 5º estágio *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli*. Esta atividade se apresentou significativamente maior do que a do grupo de insetos controle não infectados ($p < 0,001$) (Figura 15 A). Em paralelo, a microbiota destes insetos infectados apresentou-se aumentada no sétimo dia ($p < 0,01$), porém diminuiu no dia 12 ($p < 0,01$) em relação aos insetos controle (Figura 15 B)

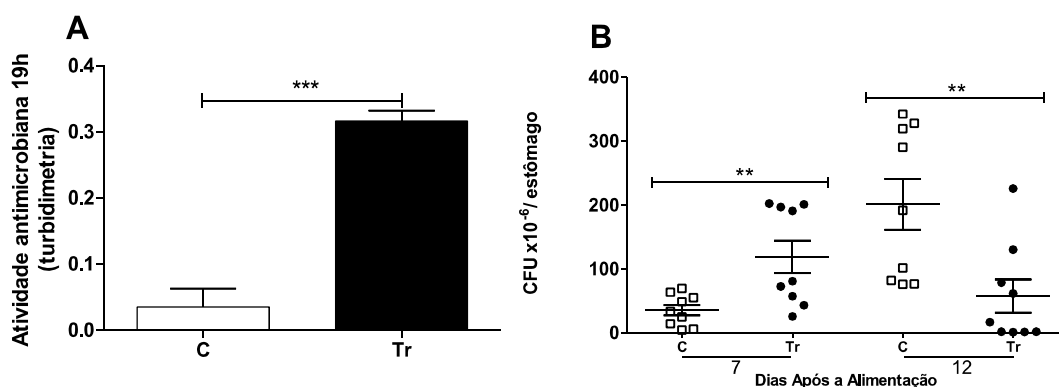


Figura 15: Atividade antibacteriana e análise da microbiota do conteúdo do estômago de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por via oral com *Trypanosoma rangeli* cepa Macias: Avaliação em curto prazo de infecção.

(A) Atividade antibacteriana das amostras de conteúdo estomacal 7 dias após a alimentação.. (B) Análise de microbiota por contagem de CFU/mL nos dias 7 e 12. (C=□) Controle não infectado; (Tr=■) Infectado com *T. rangeli*. Cada dado do gráfico (A) representa a média de quatro repetições de três pools de 3 insetos. Cada dado do gráfico B representa o número de CFU de um pool de 3 insetos. Foram feitos 9 pools, totalizando 27 insetos por dia em cada grupo. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). Os controles e os tratamentos foram comparados, para cada dia, usando-se o teste T ou teste de Mann-Whitney. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e NS= não significativo.

4.2 Infecção por inoculação de *Rhodnius prolixus* com cepas Macias e H14 de *Trypanosoma rangeli*:

4.2.1 Inoculação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* cepas Macias e H14: Avaliação dos efeitos sobre a mortalidade

A curva de mortalidade que foi plotada até 7 dias alternados após a inoculação dos insetos, mostrou que os insetos inoculados com *T. rangeli* cepa H14 apresentaram uma mortalidade significativamente maior ($p < 0,05$) que os outros dois grupos: controle não inoculado e inoculado com *T. rangeli* cepa Macias (Figura 16).

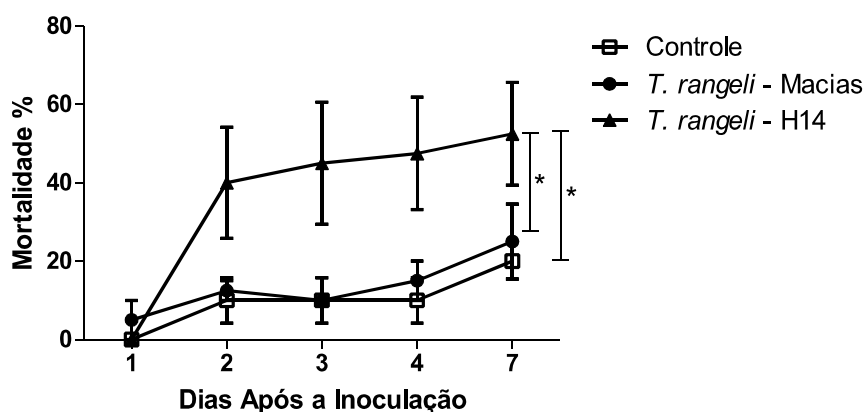


Figura 16: Efeito sobre a mortalidade de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas com *Trypanosoma rangeli* (cepas Macias e H14).

(□) Controle não infectado; (●) Inoculado com *T. rangeli* cepa Macias; (▲) Inoculado com *T. rangeli* cepa H14. Cada ponto representa a média de 4 grupos contendo 10 insetos cada. As barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$). As médias foram comparadas usando o teste T não pareado. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ e NS= não significativo.

4.2.2 Inoculação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* cepas Macias e H14: Avaliação da infecção

A Figura 17, mostra que *T. rangeli* cepa Macias foi capaz de se multiplicar na hemolinfa enquanto que a cepa H14 apresentou um número de parasitas na hemolinfa significativamente menor ($p < 0,01$).

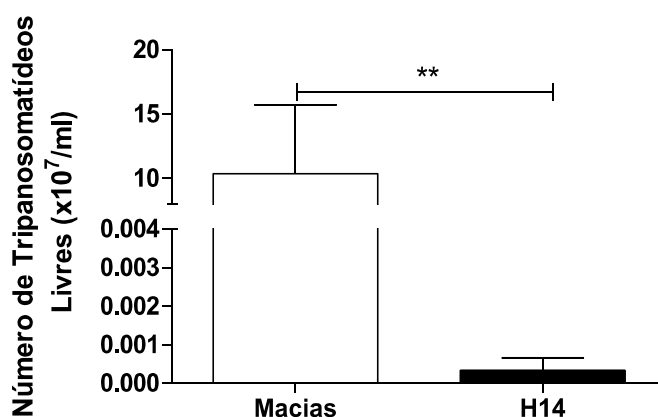


Figura 17: Contagem de *Trypanosoma rangeli* (cepas Macias e H14) na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* 7 dias após a inoculação.

(□) Inoculado com *T. rangeli* cepa Macias; (■) Inoculado com *T. rangeli* cepa H14. Cada ponto representa a média de 6 insetos. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). As médias foram comparadas usando o teste T. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e NS= não significativo.

4.2.3 Inoculação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* cepas Macias e H14: Avaliação da imunidade celular

As contagens de nódulos e de hemócitos livres na hemolinfa de ninfas de 5º estágio em diferentes dias após a inoculação de meio de cultura BHI, epimastigotas curtos de *T. rangeli* cepa Macias e cepa H14, resultaram em diferença significativa somente 7 dias após a inoculação com a cepa Macias quando comparado com o controle não inoculado (Figura 18). Estes insetos apresentaram um número maior de hemócitos na hemolinfa ($p < 0,05$).

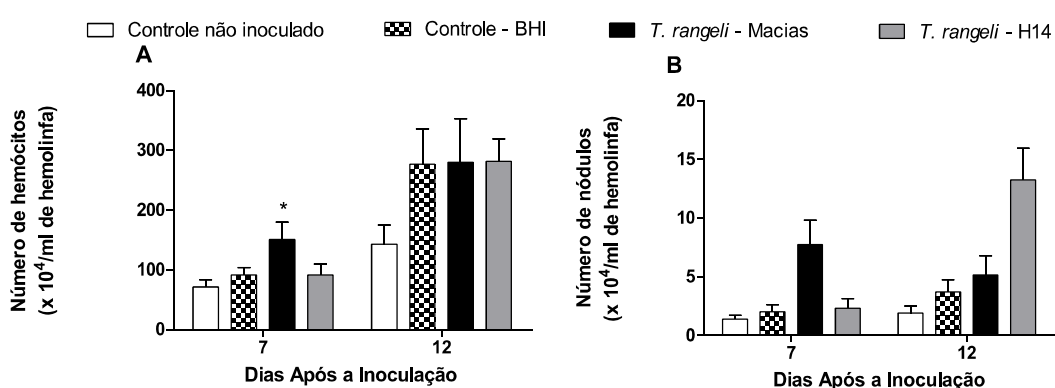


Figura 18: Contagem de hemócitos e nódulos em ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas com *Trypanosoma rangeli* (cepas Macias e H14). Contagem de (A) hemócitos e de (B) nódulos na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* 7 e 12 dias após a inoculação. (□) Controle não inoculado; (▣) Controle inoculado com BHI; (■) Inoculado com *T. rangeli* cepa Macias; (■) Inoculado com *T. rangeli* cepa H14. Cada ponto representa a média de 15 insetos. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). As médias foram comparadas usando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e NS= não significativo.

4.2.4 Inoculação de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* cepas Macias e H14: Avaliação do sistema profenoxidase (PPO)

Os ensaios das atividades de PO espontânea e total da hemolinfa das ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* inoculadas com meio de cultura BHI, epimastigotas curtos de *T. rangeli* cepa Macias e cepa H14, resultou em ativação significativamente maior somente 12 dias após a inoculação com a cepa Macias de *T. rangeli* quando comparadas aos controles, não inoculados ou inoculados com BHI ($p < 0,05$). O grupo controle inoculado com BHI e os insetos inoculados com *T.*

rangeli cepa H14 não sofreram alteração em sua atividade de PO quando comparados aos controles não inoculados ($p < 0,05$) (Figura 19).

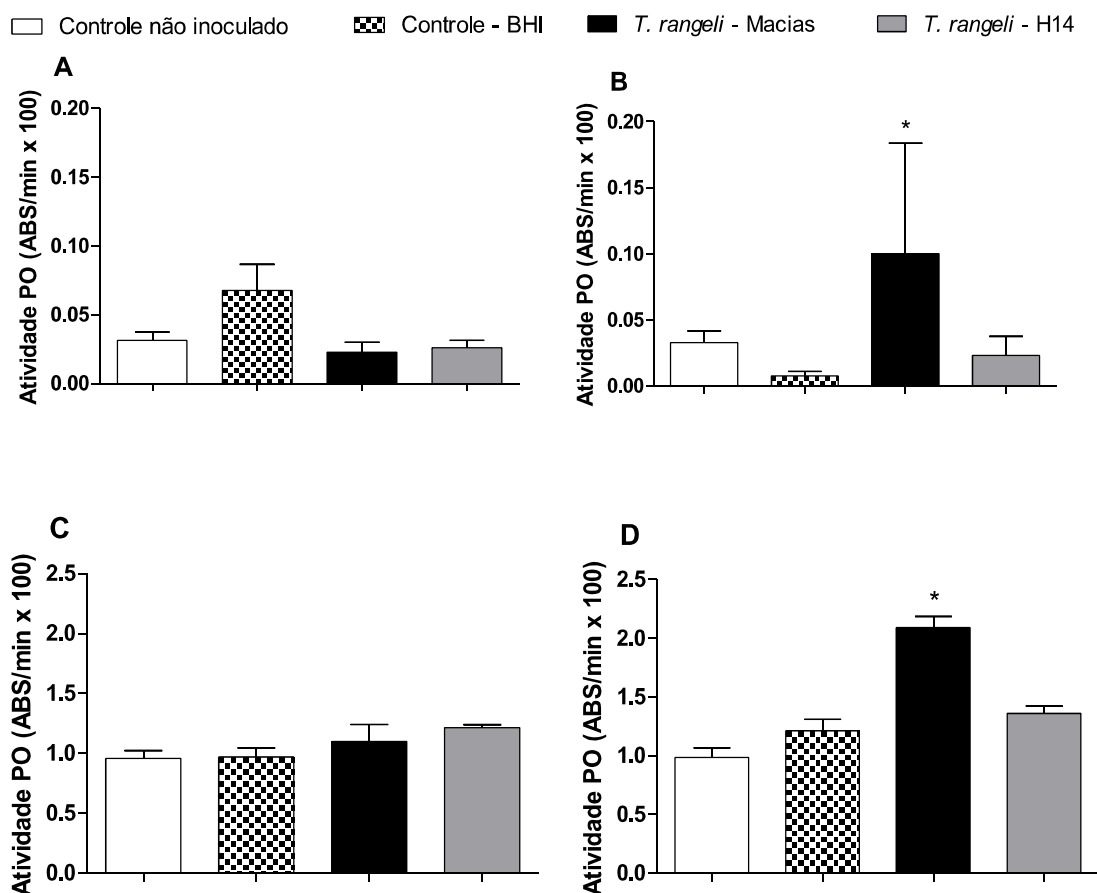


Figura 19: Atividade de fenoloxidase na hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas com *Trypanosoma rangeli* (cepas Macias e H14). (A) Atividade de PO espontânea no dia 7. (B) Atividade de PO espontânea no dia 12. (C) Atividade PO total, ou seja, com tratamento prévio com tripsina, no dia 7 (D) Atividade PO total no dia 12. (□) Controle não inoculado; (▣) Controle inoculado com BHI; (■) Inoculado com *T. rangeli* cepa Macias; (▤) Inoculado com *T. rangeli* cepa H14. Cada ponto representa a média de 15 insetos. As barras verticais indicam o erro padrão (\pm EP). As médias foram comparadas usando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e NS= não significativo.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da infecção oral com *T. rangeli* cepa Macias, sobre o sistema de defesa celular e humoral e a microbiota bacteriana do trato digestivo de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*. Gomes *et al.* (1999, 2003), estudando aspectos da interação de *T. rangeli* com o mesmo inseto vetor, observaram que somente epimastigota de forma curta era capaz de ativar o sistema profenoloxidase, entretanto neste trabalho a cepa de *T. rangeli* utilizada era a H14. A infecção pelo *T. rangeli* foi inicialmente descrita por Tejera (1920) e desde então uma série de trabalhos vêm estudando as interações do parasito com seus hospedeiros.

Inicialmente, a taxa de infecção foi analisada por visualização ao microscópio ótico e procura de parasitas nas amostras do trato digestivo do inseto. Foi possível confirmar a infecção em 93,34% dos insetos infectados em 4º estágio, 73,33% dos triatomíneos que mudaram para 5º estágio (infecção em longo prazo) e em 100% dos infectados em 5º estágio (infecção em curto prazo). Como a câmara de Neubauer permite contagem estimativa em concentração celular maior que 10^4 por mL, os valores inferiores de infecção menores do que 100% podem corresponder a falso-negativos. Outra explicação seria uma variação na suscetibilidade individual à infecção. Técnicas mais sensíveis, como emprego de PCR, poderiam avaliar melhor esta questão. Ferreira (2013), descreveu a dificuldade da análise quantitativa da infecção de ninfas de *R. prolixus* quando o número de parasitos presentes no intestino médio anterior de insetos recém-alimentados com *T. rangeli* não era suficiente para ser detectado através da contagem em câmara de Neubauer. No presente estudo, a alta incidência de positividade dos insetos analisados para a pesquisa de parasitas no trato digestivo, valida todos os ensaios feitos posteriormente, indicando o estabelecimento da infecção dos insetos em análises em curto e longo prazo, com número relativamente alto de parasitas distribuídos nos compartimentos do intestino médio, anterior (estômago), e posterior (intestino), além do reto.

Ninfas de 5º estágio apresentaram, entretanto, uma resposta diferente da observada no 4º estágio, ambas em infecção em curto prazo. Em amostras do estômago, foi possível observar um aumento no número de parasitas até o dia sete

após a alimentação infectiva das ninfas de 4º estágio, enquanto nos insetos de 5º estágio (curto prazo), houve uma diminuição neste número nos dias seguintes a alimentação, mostrando que o desenvolvimento do parasita no trato digestivo do inseto possivelmente varia de acordo com o estágio ninfal. Ninfas de quinto estágio infectadas em longo prazo apresentaram número de parasitas no estômago próximos a zero.

Existem relatos na literatura de que o *T. rangeli* necessita de passagens constantes pelos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados para que a sua infectividade seja mantida (Tobie 1964; Vallejo *et al.* 1986). A invasão da hemolinfa pelos parasitas presentes no trato intestinal parece ocorrer ao acaso, e rapidamente, em apenas 24 horas após a realização da alimentação infectiva (Añez 1980) ou em algumas semanas após o início da infecção (Groot 1954; Grewal 1957; D'Alessandro 1972). Machado *et al.* (2001), demonstrou que *R. prolixus* alimentados em camundongos infectados com *T. rangeli* cepa Macias resultou em uma taxa de infecção na hemolinfa de 33,3% sendo que todos estes insetos positivos, apresentavam parasitas também em suas glândulas salivares. No entanto, no presente estudo aparentemente não houve a invasão a hemolinfa, nem mesmo na infecção em longo prazo. Uma possível explicação para a ausência de parasita na hemolinfa pode estar relacionada a manutenção da cepa Macias no laboratório, criopreservada ou mantida em repiques frequentes em meio de cultura por longo período, o que pode ter selecionado subpopulações adaptadas ao crescimento no meio artificial, mas não ao inseto.

Em infecções massivas, principalmente na hemolinfa, um grande número de insetos morre, e os que sobrevivem prolongam o período intermudas, além de apresentarem diferentes alterações morfológicas (Grewal 1957; Tobie 1961; Añez 1984; D' Alessandro-Bacigalupo & Saraiva 1992). No presente estudo, foi constatado que não houve alteração da muda e mortalidade de ninfas de *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli* cepa Macias quer seja em curto ou longo prazo, após a primeira ou segunda alimentação, em 4º ou 5º estágios. Este efeito pouco patogênico para o inseto está provavelmente ligado ao fato de que o parasita não invadiu a hemolinfa, ou se houve invasão, estes foram rapidamente eliminados. Apesar disto, foi observado que alguns dos insetos se apresentavam com aspecto moribundo tal como Tobie (1970) descreveu.

Apesar de não ter sido observado parasitas livres, foi constatada a presença de nódulos na hemolinfa dos insetos infectados em curto prazo. Isso provavelmente se deve a uma resposta prévia do vetor à possível invasão do flagelado à hemocele. A nodulação ocorre em resposta a infecções experimentais ou naturais, sendo freqüentemente uma reação rápida (Gillespie *et al.* 1997). Mello *et al.* (1999) em experimentos *in vitro* mostraram a capacidade de *T. rangeli* de induzir a formação do microagregado em amostras de hemolinfa coletadas de *R. prolixus*. A formação de microagregados de hemócitos pode ser induzida por lipopolissacarídeos, zimosan, laminarina e algumas glicoproteínas presentes na parte externa da parede celular de bactérias e outros microrganismos (Lackie 1988,b; Brookman *et al.* 1989). Essa reação demanda uma mudança nos hemócitos circulantes, que passam de células não adesivas para células adesivas aptas a se ligar ao alvo (Lavine & Strand 2002). No presente trabalho, o quadro na infecção em longo prazo foi diferente, fazendo com que o número de nódulos na hemolinfa destes insetos fosse igual ao dos controles, e não aumentasse como observado em infecção em curto prazo. Ainda analisando a resposta celular, não houve qualquer diferença no número de hemócitos em todas as análises. A contagem do número de hemócitos a partir da infecção oral no presente trabalho, com variações de 8×10^5 /mL a 1×10^6 /mL, foi semelhante a encontrada trabalho de Garcia *et al.* (2004,b).

Um evento biológico importante no ciclo de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado é a sua capacidade de modular o sistema PPO de *R. prolixus*. A via da PPO é ativada quando âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), especificamente glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e GPI-mucinas purificadas de epimastigotas de *T. rangeli*, são inoculados no inseto (Gomes *et al.* 2001). O ensaio referente à atividade de PO revelou que a alimentação com *T. rangeli* cepa Macias deprime este sistema em *R. prolixus*, referente tanto a PO espontânea quanto a total. Porém este efeito não é imediato, sendo observado apenas no dia 12 após a alimentação em curto prazo e nas duas análises de infecção em longo prazo.

Da mesma maneira, Gregorio e Ratcliffe (1991) demonstraram que em ensaios *in vitro*, a presença de *T. rangeli* na hemolinfa de *R. prolixus* com laminarina reduz o nível de ativação da PPO. Os autores sugeriram que o efeito da laminarina, similar a resposta *in vivo*, poderia revelar a natureza inibitória do parasita no inseto vetor susceptível (Gregorio & Ratcliffe 1991). Adicionalmente, Gomes *et al.*, 2003 reportaram que esta supressão decorre de uma inibição da atividade proteolítica no

corpo gorduroso. Segundo os autores, a ativação da cascata proteolítica é um evento prévio fundamental e responsável pela ativação do sistema PPO (Gomes *et al.* 2003).

Assim como ocorre em vertebrados, em determinados insetos, microrganismos comensais participam da modulação das respostas imunes ativando ou inibindo a expressão de vários genes, influenciando ativamente a fisiologia e imunologia do hospedeiro (Lee 2008; Ha *et al.* 2009). Nossos resultados também indicam a modulação da resposta imune do *R. prolixus* para controle e diminuição da concentração de bactérias presentes no trato digestivo quando o inseto está infectado.

No presente estudo a atividade antimicrobiana contra *S. marcescens* no estômago de insetos alimentados com *T. rangeli*, apresentou-se alta em ambas as análises de infecção em curto e longo prazo, indicando uma alteração fisiológica no órgão. O aumento na atividade antimicrobiana contra bactérias intestinais, já foi observado anteriormente no estômago de *R. prolixus* infectado por *T. cruzi* clone Dm28c (Castro *et al.* 2012,a).

Os efeitos patológicos da diminuição de simbioses podem ser evitados ou desaparecer se a larva aposimbiótica for infectada com o simbiote ou alimentada com uma dieta rica em vitaminas do complexo B (Gumpert & Schwartz 1962; Lake & Friend 1968; Eichler & Schaub 1998). Uma melhor compreensão dos papéis das espécies bacterianas que compõem a microbiota intestinal sobre a imunidade do hospedeiro contra patógenos poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias de controle das doenças relacionadas.

A densidade de simbioses no trato intestinal dos triatomíneos depende principalmente do estágio larval e do estado de alimentação do vetor (Wigglesworth 1936; Hill *et al.* 1976; Ben-Yakir 1987). Eichler e Schaub (2002) observaram a preferência de simbioses pelas regiões intestinais anteriores, quando avaliaram o número de CFU em compartimentos da cárdia, estômago, intestino e reto de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*. No presente trabalho também foi constatado uma contagem maior de CFU no estômago do inseto quando comparado ao intestino (dados não mostrados).

Embora em *R. prolixus* nos primeiros dias após a infecção oral por *T. rangeli*, aparentemente, não observou-se efeito sobre a contagem de CFU da microbiota intestinal, após alguns dias, houve uma diminuição na população bacteriana do trato

digestivo dos insetos infectados. A diminuição da contagem foi observada mesmo nas infecções em longo prazo. Estes dados indicam que há inicialmente um período de adaptação da microbiota, para finalmente cair a densidade populacional. A diminuição na contagem de CFU também foi observada anteriormente em um trabalho utilizando *T. rangeli* cepa Coachi (Eichler & Schaub 2002). Com outra metodologia, por microscopia eletrônica, Watkins (1969) também demonstrou a redução da densidade de simbioses no intestino de *R. prolixus* infectado com *T. rangeli*.

Os ensaios de cultura sólida, à base de BHI agar, têm algumas limitações no fornecimento de uma análise completa da composição da microbiota intestinal, pois uma grande parte das bactérias não é cultivável em meios clássicos de cultivo (Dong *et al.* 2009). Por isso, abordagens moleculares futuras baseadas em seqüenciamentos gênicos, em análises quantitativas e qualitativas, poderão fornecer informações mais completas sobre a composição da microbiota intestinal.

A diminuição significativa da microbiota do intestino do inseto vetor infectado com *T. rangeli* está provavelmente relacionada com o aumento nas atividades antimicrobianas (AMPs). Porém, dependendo da espécie de inseto ou parasita associado à infecção, várias outras enzimas digestivas (isto é, glicosidases e proteases) podem estar envolvidas no processo de morte dos simbioses dentro do intestino (Ghuysen *et al.* 1966), além de reativos de oxigênio e nitrogênio, bem como a atividade PO conforme resultados obtidos por Castro *et al.* (2012,b), em infecção de *R. prolixus* com *T. cruzi*.

Em *Drosophila* observou-se que a ativação de vias de sinalização relacionadas à resposta imune como, por exemplo, Toll e IMD bem como a síntese de peptídeos antimicrobianos, produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio dependem do tipo de microrganismos predominante no trato digestivo (Nehme *et al.* 2007; Ryu *et al.* 2008; Marmaras & Lampropoulou 2009). Diversos trabalhos demonstram que as células do epitélio intestinal do inseto estão aptas a reconhecer e diferenciar microrganismos comensais de microrganismos infecciosos e desenvolver reações imune inatas eficientes (Hao *et al.* 2003; Lee 2008; Leulier & Royet 2009). As vias Toll, Imd e Jak / STAT se iniciam após o reconhecimento de moléculas “não próprias” conhecidas como os *padrões moleculares associados a patógenos* (PAMPs) (Bulet & Stocklin 2005; Nuenberger *et al.* 2004). A infecção em *R. prolixus* por bactérias Gram-positivas ativa a via Toll

enquanto a infecção por Gram-negativas induz a via IMD (Charroux & Royet 2010). A produção de AMPs no intestino do inseto é vital para manter a homeostase da microbiota intestinal que além de fornecer nutrientes essenciais, ajuda na digestão e no controle de microrganismos patogênicos através da modulação da resposta imune (Dillon & Dillon 2004; Schaub 2009).

Neste trabalho, para maior compreensão do aumento observado na atividade antibacteriana no trato digestivo de *R. prolixus* infectado por via oral com *T. rangeli* cepa Macias, foram analisados os perfis de expressão gênica de AMPs na parede do estômago e no intestino. Dois compartimentos foram analisados separadamente pois cada um possui características fisiológicas diferentes. Além das diferenças fisiológicas destes dois compartimentos (Lehane 1997,2005), o estômago desses vetores, tem um valor de pH que varia de neutro a básico, e é onde ocorre a colonização da maioria das bactérias simbiotes (Terra 1990; Waniek *et al.* 2012). Em contraste, no intestino, o pH é ácido e corresponde a região onde ocorre a digestão protéica (Terra 1990; Waniek *et al.* 2012).

A análise da expressão relativa de mRNA codificante de AMPs no epitélio do estômago e intestino de *R. prolixus* infectado oralmente com *T. rangeli* (cepa Macias) mostrou um padrão diferente nas infecções em curto e em longo prazo. Porém, em todas as análises de infecção em curto prazo e na análise após 24 horas da segunda alimentação do grupo infectado em longo prazo, a expressão relativa do gene codificante para lisozima B (Lis B) encontrou-se suprimida tanto no estômago quanto no intestino. Esta é uma forte indicação de que a supressão da expressão de Lis B está envolvida com a modulação da resposta imune deste parasita no interior do trato digestivo do vetor. Mello *et al.* (1995), demonstraram que após a inoculação de *T. rangeli* na hemocele de *R. prolixus*, os níveis da atividade de lisozima na hemolinfa aumentam, confirmando uma possível atividade contra *T. rangeli*. A supressão da expressão de Lis B sugere um mecanismo de escape para a sobrevivência do parasita. Ensaio *in vitro* de lisozima contra o parasita poderiam esclarecer melhor este aspecto da defesa do inseto, muito embora não se possa destacar os efeitos *in vivo* e sinérgicos de lisozimas e AMPs em ações conjuntas.

Por outro lado, a expressão relativa do gene que codifica para lisozima A (Lis A) só foi suprimida na infecção em longo prazo, 7 dias após a segunda alimentação, mostrando um possível efeito tardio da infecção. Assim, lisozima A e lisozima B parecem ter diferentes papéis em diferentes compartimentos do intestino. Lis A se

expressa predominantemente no intestino médio e Lis B no corpo gorduroso (Ursic-Bedoya *et al.* 2008). Vieira *et al.* (2014) , observou-se um rápido aumento nos níveis de RNAm de Lis B e, em menor grau de Lis A, após a alimentação de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* do grupo controle, não infectado (Vieira *et al.* 2014). Este resultado sugere que a expressão de Lis A tenha um papel na digestão do inseto embora possa estar também relacionada à uma resposta da multiplicação bacteriana no intestino, tal como observado em outros triatomíneos como *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Algumas análises filogenéticas indicam que Lis A de *R. prolixus* se agrupa com lisozimas que desempenham um papel digestivo em outros triatomíneos (Kollien *et al.* 2003; Araujo *et al.* 2006; Ursic-Bedoya *et al.* 2008).

As lisozimas possuem uma atividade predominantemente contra bactérias Gram-positivas, como por exemplo o *R. rhodnii* (Ribeiro & Pereira 1984; Grunclova *et al.* 2003). Porém, já foi relatada a ação de lisozimas em Gram-negativas admitindo-se que a lisozima atue juntamente com outros fatores (sinergismo), sendo ainda, neste caso, o seu mecanismo de ação desconhecido (Kinoshita & Inoue 1977). Quanto a prolixicina, foram verificadas atividades contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas com nenhuma toxicidade para o protozoário *T. cruzi* (Ursic-Bedoya *et al.* 2011). Neste presente trabalho, a Prol apresentou expressão diminuída no sétimo dia de análise em ambos os órgãos (estômago e intestino) de *R. prolixus* e nas duas formas de infecção oral, em curto e longo prazo, com *T. rangeli*, indicando uma relação direta de interação do parasita com a supressão deste AMP. Em ambos os casos, houve diminuição na expressão de Lis B e de Prol, indicando assim a rápida resposta ao contato do parasita com o trato digestivo.

Defensinas de insetos são ativas predominantemente contra bactérias Gram-positivas (Bulet *et al.* 1992), e, em alguns casos contra Gram-negativas (Lambert *et al.* 1989). Waniek *et al.* (2009) mostraram uma alta similaridade entre os genes que codificam as defensinas A e B, enquanto Def C difere significativamente, formando dois grupos distintos após uma análise filogenética. Em ninfas de *R. prolixus* em jejum, apenas transcritos de Def C estavam abundantes no intestino, indicando assim um possível papel sobre a homeostasia e controle de simbioses (Vieira *et al.* 2014). Por outro lado, a supra-regulação da expressão Def A e Def B, depois de infecções com bactérias que não façam parte da microbiota intestinal, ou tripanosomatídeos, parasitas naturais, sugeriu uma provável função destes AMPs

correspondentes no controle de agentes estranhos ou invasores (Vieira *et al.* 2014). Aparentemente a infecção de *R. prolixus* com *T. rangeli* aumenta a expressão de defensinas em diferentes perfis. O intestino superexpressa Def C logo nas primeiras 24 horas e após a alimentação infectiva ou nos insetos infectados oralmente em longo prazo de observação. Por outro lado, o estômago só apresenta aumento na expressão de defensinas quando o inseto é infectado oralmente em curto prazo. Neste caso, após as 24 horas, há um aumento na expressão de Def B e em sete dias há o aumento de mRNA de Def C. Podemos concluir que a atividade antimicrobiana observada no sétimo dia no estômago destes insetos infectados em curto prazo pode estar associada a presença de defensina B acumulada desde as 24 horas após a alimentação, apesar deste AMP apresentar sua expressão diminuída no sétimo dia, e ao aumento da expressão de defensina C observada no sétimo dia.

Waniek *et al.* (2011), sugeriram uma função potencial da defensina no controle da população de *T. cruzi* em *T. brasiliensis*. No presente estudo, observamos que no dia sete após a alimentação infectiva seguindo o modelo de análise dos efeitos em curto prazo, quando sabidamente os insetos abrigavam em sua maioria o parasita no estômago, este órgão apresentou uma supressão nos níveis de mRNA de Def B. Da mesma maneira, houve uma supressão de Def B no intestino de insetos infectados em longo prazo, órgão em que, coincidentemente neste momento, se localizavam a maior parte dos parasitas. Este dados indicam que *T. rangeli* para sobreviver no trato digestivo, associado também ao potencial invasor do parasita à hemocele, interage com o *R. prolixus* de alguma forma modulando a resposta imune, com supressão ou super expressão de mRNA dos diferentes AMPs, ou da Def B e Lis B.

Na análise de infecção em longo prazo no estômago, não foi observada a superexpressão de nenhum AMP: houve uma diminuição nos níveis relativos de mRNA de Def C e Lis A neste compartimento do trato digestivo nos dias 1 e 7, respectivamente, o que sugere que a atividade antimicrobiana observada neste dia contra *S. marcescens* possa estar associada a outros peptídeos antimicrobianos desconhecidos. Por outro lado, Lehane (1997); Whitten *et al.* (2007); Garcia *et al.* (2010,a), têm reportado a ação de reativos de nitrogênio e oxigênio no controle de parasitas e bactérias intestinais.

O estudo de AMPs presentes no trato digestivo dos insetos pode estender a compreensão de como insetos interagem com sua microbiota e ainda são capazes de montar uma resposta imune eficaz contra possíveis agentes patogênicos ingeridos. Portanto, este tipo de estudo pode ter potencial para fornecer novos alvos para estratégias de controle das doenças transmitidas pelo vetor.

Devido ao fato de não ter sido encontrado nenhum parasita livre na hemolinfa durante os ensaios de infecção por via oral, um segundo bloco de trabalho foi desenvolvido. Neste, os ensaios de inoculação foram feitos com o intuito de observar diferenças na resposta imunológica de *R. prolixus* na presença do flagelado na hemolinfa. Um Segundo objetivo foi diferenciar duas cepas de *T. rangeli* a partir da inoculação da cepa H14, que vem sendo estudada pelo grupo de pesquisa há alguns anos, e da cepa Macias que foi cedida recentemente ao grupo.

As análises dos efeitos da infecção sobre a mortalidade do inseto e número de parasitas presentes na hemolinfa, mostraram que a cepa Macias apresenta-se muito melhor adaptada a hemolinfa de *R. prolixus* que a cepa H14, que perdeu ao longo do tempo características de virulência em relação ao seu vetor, provavelmente devido a passagens sucessivas em meio de cultura. Enquanto a inoculação de *T. rangeli* cepa H14 promoveu a alta mortalidade, em mais de 50% dos insetos nos sete primeiros dias após a inoculação na hemocele, a cepa Macias, apesar da intensa multiplicação sob a forma livre na hemolinfa, apresentou mortalidade semelhante ao controle (20%). Este resultado está de acordo com o trabalho de Machado *et al.* (2001), quando ao inocularem *R. prolixus* com *T. rangeli* cepa Macias e constataram uma baixa mortalidade dos insetos, que variava de 8,0 a 23%.

Em relação ao número de parasitas, enquanto a cepa H14 de *T. rangeli* não é visualizada livre na hemolinfa em sete dias, a cepa Macias rapidamente se multiplica. A cepa H14 parece não ter capacidade de enfrentar as barreiras impostas pelos fatores tripanolíticos presentes ou são fagocitados por hemócitos do inseto, enquanto que a cepa Macias supera essas barreiras. O resultado encontrado com a cepa H14 foi visto anteriormente por Garcia *et al.* (2004,a) em que as contagens desta cepa diminuem ao longo dos dias de análise até o desaparecimento do parasita. O comportamento da cepa Macias se assemelha ao encontrado no trabalho com *R. prolixus* de Mello *et al.* (1995) que observaram que após a inoculação de *T. rangeli* cepa San Agustin, a infecção na hemolinfa aumentou se estabilizando em aproximadamente 10^7 flagelados por mL de hemolinfa.

A presença de um alto número de *T. rangeli* cepa Macias livre na hemolinfa observado no 7º dia após a inoculação em *R. prolixus*, induziu também o aumento do número de hemócitos se comparado aos grupos controles não inoculado ou inoculado com BHI e ao grupo inoculado com a cepa H14. Ao contrário do que foi observado na infecção oral em curto prazo, a nodulação não foi estimulada com a injeção de parasitas no tórax do inseto. Mello *et al.* (1995) observaram que a inoculação de *R. prolixus* com *T. rangeli* cepa San Agustin resulta em um aumento significativo no número de hemócitos, mas sem um estímulo tão rápido na formação dos nódulos.

O aumento do número de hemócitos pode ser explicado pela liberação destas células na circulação quando o inseto passa pelo processo de muda ou é desafiado com algum patógeno ou partícula abiótica (Lanot *et al.* 2001; Moita *et al.* 2005; Castilho *et al.* 2006). Tem sido sugerido que hemócitos, provavelmente os plasmatócitos, ficam aderidos fracamente à superfície interna de alguns órgãos e respondem prontamente sendo liberados na hemolinfa em situações adversas (Lanot *et al.* 2001; Moita *et al.* 2005; Castilho *et al.* 2006).

No que concerne ao sistema PPO, a presença da cepa Macias de *T. rangeli* na hemolinfa aumentou a atividade espontânea e total da enzima PO no 12º dia após a inoculação. Enquanto que os insetos do grupo controle e os insetos inoculados com H14 não apresentaram diferenças. Este dado é muito interessante, pois como observado anteriormente, em ensaios de infecção oral por *T. rangeli* (cepa Macias) o parasita é capaz de suprimir a ativação do sistema PPO, já a inoculação do mesmo parasita resultou no estímulo deste sistema e com detecção do aumento da atividade PO. Assim, resumidamente, a alimentação com *T. rangeli* resultou na inibição do sistema PPO de *R. prolixus*, o que de alguma forma poderia facilitar a invasão do parasita à hemocele, apesar da cepa Macias, no presente trabalho, não ter sido detectada na hemolinfa.

Estudos anteriores já indicavam esta relação. Experimentos *in vivo* com *R. prolixus* demonstraram que, em insetos controle, a inoculação torácica de epimastigotas de *T. rangeli*, em formas curtas, resultou na alta atividade da PO (Gomes *et al.* 2003). Em contraste, a alimentação prévia com sangue contendo epimastigotas curtos ou longos, vivos ou lisados, foi capaz de suprimir a ativação da PPO induzida por inoculação torácica de formas curtas (Gomes *et al.* 2003). O mesmo grupo mostrou também que em ensaios *in vitro* na presença de

epimastigotas curtas de *T. rangeli*, a atividade proteolítica nos homogenatos de corpo gorduroso de *R. prolixus* controle foi significativamente maior do que naqueles obtidos a partir do corpo gorduroso de insetos previamente alimentados com epimastigotas (Gomes *et al.* 1999, 2003). Estes resultados indicam que a redução das atividades proteolíticas, no corpo de gorduroso de insetos alimentados com sangue infectado inibiu a ativação do sistema PPO contra o parasita (Gomes *et al.* 1999, 2003).

Além disso, estudos sobre o efeito da infecção de *R. prolixus* por *T. rangeli* indicam que após 24 horas a cepa H14 não é capaz de se multiplicar na hemolinfa e nem invadir as glândulas salivares (Whitten *et al.* 2001). Whitten *et al.* (2007) mostrou igualmente que duas cepas do parasita *T. rangeli* podem ativar o sistema PPO diferentemente na hemolinfa *in vivo* e que esta ativação está envolvida na modulação das infecções. Por exemplo, Mello *et al.* (1995) mostraram que a atividade de PO em *R. prolixus* inoculado com *T. rangeli* cepa San Agustin, apresenta um pico no dia 1 após a inoculação, e vai diminuindo até o dia 5.

Há possibilidade da cepa H14 ou Macias terem alterado a atividade de PO em momentos em que este parâmetro não foi analisado, se comparado os dados com outros autores que também trabalharam com o modelo *R. prolixus* e diferentes cepas de *T. rangeli*. A comparação dos resultados reportados pelos autores (Mello *et al.* 1995; Machado *et al.* 2001; Garcia *et al.* 2004,b) com os obtidos no presente trabalho mostram, portanto, que cepas distintas de *T. rangeli* podem desencadear reações humorais e celulares diferentes no mesmo vetor.

Portanto *R. prolixus* responde de forma distinta frente a vias de infecção oral ou por inoculação com *T. rangeli*, sugerindo que a capacidade infectiva deste protozoário, pode ser alterada por modulação do sistema imune do vetor.

6 CONCLUSÕES

- A partir da infecção oral de ninfas de *R. prolixus* por *T. rangeli* cepa Macias, as conclusões são:

- O estabelecimento da infecção em análises em curto e longo prazo mostrou que o desenvolvimento do flagelado no intestino do vetor varia de acordo com o estágio ninfal.

- A infecção apresenta efeito pouco patogênico para o inseto no que diz respeito à mortalidade e ecdise.

- Não foi observada a invasão do parasita à hemocele

- Não há alteração no número de hemócitos.

- A nodulação aumenta logo após a infecção oral em infecção em curto prazo. Este efeito não foi observado em longo prazo.

- Há a depressão do sistema de PO e o aumento da atividade antimicrobiana contra *S. marcescens* no estômago.

- Há uma diminuição da microbiota do intestino do vetor alguns dias após a alimentação.

- A modulação da resposta imune no interior do trato digestivo do vetor após a alimentação infectiva é caracterizada pela supressão da expressão de lisozima e prolíxina.

- O aumento da expressão de defensas no trato digestório do vetor pode ser relacionado a diminuição da microbiota e a atividade antimicrobiana nos primeiros momentos após a infecção.

- Em análises em longo prazo, a atividade antimicrobiana provavelmente está associada a outros peptídeos antimicrobianos desconhecidos ou ação de reativos de nitrogênio e oxigênio.

- A partir da infecção por inoculação de ninfas de *R. Prolixus* com *T. rangeli* (cepa Macias ou H14), podemos concluir que :

- *T. rangeli* cepa Macias se mantém e multiplica na hemolinfa do vetor, porém não altera a mortalidade dos insetos. Contrário do observado na inoculação de *T. rangeli* cepa H14.

- Na inoculação de *T. rangeli* (cepa Macias) a resposta celular segue um padrão diferente da infecção por via oral: há o aumento do número de hemócitos e não de nódulos.

- A inoculação com *T. rangeli* cepa Macias induziu o aumento da atividade do sistema PO de *R. prolixus*, ação contrária da observada na infecção por via oral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta L, Romanha AJ, Cosenza H, Krettli AU 1991. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg* 44: 676-683.
- Adamo SA 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *J Insect Physiol* 50: 209–216.
- Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano MA, Schenkman S 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem* 277: 6207-6213.
- Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 33: 247-256.
- Añez N 1980. Early invasion of *Trypanosoma rangeli* into the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 422 - 423.
- Añez N 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII – Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 249-255.
- Araújo CA, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM, Schaub GA 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 547-560.
- Armstrong PB, Melchior R, Quigley J P 1996. Humoral immunity in long-lived arthropods. *J Insect Physiol* 42: 53–64.
- Asada N, Kawamoto N, Sezaki H 1999. Deleterious effect of null phenoloxidase mutation on the survival rate in *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 23: 535-543.
- Ascenzi P, Gradoni L 2002. Nitric oxide limits parasite development in vectors and in invertebrate intermediate hosts. *IUBMB Life* 53: 121–123.
- Ashida M, Dohke K, Onishi E 1974. Activation of prephenoloxidase. 3. Release of a peptide from prephenoloxidase by the activating enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 57: 1089–1095.
- Ashida M, Dohke K 1980. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem* 10: 37–47.

- Ashida M, Brey P 1997. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In PT Brey, DE Hultmark (eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, Chapman & hall, London, p. 135-171.
- Aso Y, Kramer KJ, Hopkins TL, Lookhart GL 1985. Characterization of hemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem* 15: 9–17.
- Atkan F 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75: 639-653.
- Auden DT 1974. Studies on the development of *Rhodnius prolixus* and the effects of its symbiote *Nocardia rhodnii*. *J Med Entomol* 11: 68–71.
- Azambuja P, Guimarães JA, Garcia ES 1983. Hemolytic factor from the stomach of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J Insect Physiol* 29: 833–837.
- Azambuja P, Mello CB, D'Escoffier LN, Garcia ES 1989. In vitro cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res* 22: 597-599.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA, Warthen Jr JD 1991. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, Azadirachtin. *J Insect Physiol* 37: 771-777.
- Azambuja P, Garcia ES 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 7: 240-244.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 1991. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 1-10.
- Azambuja P, Garcia ES 1997. Care and maintenance of triatomine colonies. In JM Crampton, CB Beard, C Louis (eds.), *Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*, Chapman and Hall, London, p. 56–64.
- Azambuja P, Feder D, Mello CB, Gomes SAO, Garcia ES 1999. Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector Interactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 219-222.
- Azambuja P, Feder D, Garcia ES 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol* 107: 89-96.

- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568–572.
- Baines S 1956. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J Exp Biol* 33: 533–541.
- Basseri HR, Tew IF, Ratcliffe NA 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 100: 226-234.
- Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123: 159–167.
- Beck G, Ellis T, Zhang H, Lin W, Beauregard K, Habicht GS, Truong N 2001. Nitric oxide production by coelomocytes of *Asterias forbesi*. *Dev Comp Immunol* 25: 1–10.
- Ben-Yakir D 1987. Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii*. *J. Insect Physiol* 33: 379–383.
- Bettencourt R, Lanz-Mendoza H, Lindquist KR, Faye I 1997. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *Eur J Biochem* 250: 630-637.
- Bewig F, Schwartz W 1954. Untersuchungen über die Symbiose der Triatominen *Rhodnius prolixus* Stal und *Triatoma infestans*. *Naturwissenschaften* 41: 435-435.
- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA 2004. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and infection* 6: 1297-1304.
- Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol* 29: 669–679.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26.
- Boman HG, Hultmark D 1987. Cell free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol* 41: 103-126.
- Borges EC, Machado EMM, Garcia ES, Azambuja P 2006. *Trypanosoma cruzi*: Effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology* 112: 130-133.

- Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol* 22: 262–268.
- Bradley RS, Stuart GS, Stiles B, Hapner KD 1989. Grasshopper haemagglutinin: immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. *J Insect physiol* 35: 353-361.
- Brecher G, Wigglesworth VB 1944. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology* 35: 220–224.
- Brehélin M, Duvic B 1999. Cellular defence reactions and their depression in insects. *J Soc Biol* 193: 325-328.
- Brennan CA, Anderson, KV 2004. *Drosophila* : the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* 22: 457– 483.
- Brey PT, Hultmark D 1998. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & HaLL, London.
- Brookman JL, Ratcliffe NA, Rowley AF 1989. Optimization of a monolayer phagocytosis and its applications for studying the role of prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 34: 337-346.
- Brookman JL, Rowley AF, Ratcliffe NA 1989. Studies on nodule formation in locusts following injection of microbial products. *J Invertebr Pathol* 53: 315–323.
- Bulet P, Cociancich S, Reuland M, Sauber F, Bischoff R, Hegy G, Van Dorsselaer A, Hetru C, Hoffmann JA 1992. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *Eur J Biochem* 209: 977-984.
- Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorsselaerand A, Hoffmann JA 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* 268: 14893-14897.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 23: 329 – 344.
- Bulet P, Stocklin R 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett* 12: 3-11.
- Buxton PA 1930. Biology of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans Ent Soc London* 78:227-236.

- Büyükgüzel K, Tunaz H, Putnam SM, Stanley D 2002. Prostaglandin biosynthesis by midgut tissue isolated from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 435–443.
- Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H 1997. *Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Ed Fiocruz, Rio de Janeiro, 2, p. 715 – 727.
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, Damme JV, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the Honey bee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem* 187: 381-386.
- Castillo JC, Robertson AE, Strand MR 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 891-903.
- Castro DP, Moraes CS, Garcia ES, Azambuja P 2007,a. Inhibitory effects of dmannose on trypanosomatid lysis induced by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol* 115: 200–204.
- Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, Souza W, Azambuja P 2007,b. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol* 117: 201–207.
- Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES 2012,a. *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *PLOS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0036591.
- Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ribeiro IM, Tomassini TCB, Azambuja P, Garcia ES 2012,b. Physalin B inhibits *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology** 58: 1620–1625.
- Cerenius L, Soderhall K 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198: 116–126.
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K 2008. The proPO system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 29: 263–271.
- Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci* 35: 578–583.

- Charroux B, Royet J 2010. *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly* 4: 40-47.
- Chikilian ML, Bradley TJ, Nayar JK 1994. Ultrastructural Comparison of Extracellular and Intracellular Encapsulation of *Brugia malayi* in *Anopheles quadrimaculatus*. *J Parasitol* 80: 133-140.
- Christensen BM, Li J, Chen CC, Nappi AJ 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol* 21: 192–199.
- Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* 268: 19239 – 19245.
- Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol Today* 10: 132 –139.
- Conte A, Ottaviani E 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Lett* 365: 120–24.
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degrave W, Campbell DA 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 278-279.
- D' Alessandro A, Mandel S 1969. Natural Infections and Behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J Parasitol* 55: 846-852.
- D'Alessandro A 1972. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. *J Med Entomol* 9: 187-195.
- D'Alessandro A 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera. In VHR Lumsden, DA Evans (eds.), *Biology of Kinetoplastida*, Academic Press, London, 1: p. 327–493.
- D' Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG 1992. *Trypanosoma rangeli*. In JP Kreir, J Baker (eds.), *Parasitic Protozoa*, Academic Press, London, p. 1-54.
- Dias E 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 28: 1–110.
- Dickenson L, Russell V, Dunn PE 1988. A family of bacteria-regulated, Cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 263: 19424 – 19429.
- Dillon RJ, Dillon VM 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49: 71–92.

- Dimarcq JL, Keppi E, Dunbar B, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Rankine SM, Fothergill JE, Hoffmann JA 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur J Biochem* 171: 17–22.
- Dimarcq JL, Zachary D, Hoffmann JA, Hoffmann D, Reichhart JM 1990. Insect immunity: Expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and diptricin, in *Phormia terranova*. *EMBO J* 9: 2507-2515.
- Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J* 17: 6115–6123.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLoS Pathog* doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
- Duncan JT 1926. On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids. *Parasitology* 18: 238–252.
- Dushay M S 2009. Insect hemolymph clotting. *Cell Mol Life Sci* 66: 2643–2650.
- Eger-Mangrich I, de Oliveira M, Grisard EC, De Souza W, Steindel M 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitol Res* 87: 505-509.
- Eichler S, Schaub GA 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 44: 131–140.
- Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 100: 17–27.
- Eleftherianos I, Revenis C 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J Innate Immun* 3: 28-33.
- Ellis DS, Evans DA, Stamford S 1980. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. *Z Parasitenkd* 62: 63-74.
- Engstrom A, Xanthopoulos KG, Boman HG, Bennich H 1985. Amino acid and cDNA sequences of lysozyme from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 4: 2119-2122.

- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7: 862–874.
- Ferreira LL 2013. *Hospedeiros vertebrados são eficientes reservatórios para a transmissão do Trypanosoma rangeli ao inseto vetor*, Master dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, BH.
- Foley E, O’Farrell PH 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* 17: 115–125.
- Folly E, Silva NLC, Lopes AHCS, Silva-Neto MAC, Atella GC 2003. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. *Biochem Biophys Res Commun* 10: 555-561.
- Gadelhak GG, Pedibhotla VK, Stanley- Samuelson DW 1995. Eicosanoid biosynthesis by hemocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 743–749.
- Garcia ES, Macarini JD, Garcia ML, Ubatuba FB 1975. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *An Acad Bras Cienc* 47: 537-545.
- Garcia ES, Gilliam FC 1980. *Trypanosoma cruzi* development is independent of the protein digestion in the gut of *Rhodnius prolixus*. *J Parasitol* 66: 1052-1053.
- Garcia ES, Azambuja P, Forster H, Rembold H 1984,a. Feeding and molt inhibition by azadirachtin-A, azadirachtin-B, and 7-acetyl-azadirachtin-A in *Rhodnius prolixus*. *Z Naturforschung C* 39: 1155–1158.
- Garcia ES, Azambuja P, Contreras VT 1984,b. Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and preparation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. In CM Morel (eds.), *Genes and Antigens of Parasites, A Laboratory Manual*, 2 ed, UNDP/World Bank/WHO/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 43–46.
- Garcia ES, Azambuja P 1987. Characterization of inducible lysozyme activity in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Brazilian J Med Biol Res* 20: 539-548.
- Garcia ES, Azambuja P 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 7: 240-244.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* 78: 287-293.
- Garcia ES, Machado EM, Azambuja P 2004,a. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation

- reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol* 50:157-165.
- Garcia ES, Machado EM, Azambuja P 2004,b. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 107: 31-38.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*- *Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* 53: 11–21.
- Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P 2010,a. Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae)—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 605- 610.
- Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA 2010,b. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol* 26: 499-505.
- Gardiner EM, Strand MR 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem Physiol* 43: 147-164.
- Geigy R, Halff LA, Kocher V 1953. Untersuchungen über die physiologischen Beziehungen zwischen einem Überträger der Chagas-Krankheit *Triatoma infestans* und dessen Darmsymbionten. *Schweiz Med Wochenschr* 83: 928–930.
- Genta FA, Souza RS, Garcia ES, Azambuja P 2010. Phenoloxidases from *Rhodnius prolixus*: temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. *J Insect Physiol* 56: 1253-1259.
- Gettins PG 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102: 4751–4804.
- Ghuysen JM, Tipper DJ, Strominger J 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymology* 8: 685–699.
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 42: 611-643.
- Goldsworthy G, Mullen L, Opoku-Ware K, Chandrakant S 2003. Interactions between the endocrine and immune systems in locusts. *Physiol Entomol* 28: 54–61.
- Gomes SA, Feder D, Thomas NES, Garcia ES, Azambuja P 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: In vivo and in vitro experiments. *J Invertebr Pathol* 73: 289-293.

- Gomes SAO, Almeida IC, Oliveira MF, Garcia ES, Azambuja P 2001. Prophenoloxidase activation by *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*: effects of membrane components isolated from short and long epimastigotes. *Soc Bras Protozool* 1: 47-48.
- Gomes SAO, Graciano GL, Nogueira NFS, De Souza W, Garcia ES, Azambuja P 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 79: 86-92.
- Gomes SAO, Feder D, Garcia ES, Azambuja P, 2003. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol* 49: 829-837.
- González-Santoyo I, Aguilar AC 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol Exp Appl* 142: 1–16.
- Graham JM, Higgins JA 1997. *Membrane Analysis*, Springer, New York .
- Gregorio EA, Ratcliffe NA 1991. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 181-186.
- Grewal MS 1957. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Exp Parasitol* 6: 123-130.
- Grogl M, Kuhn RE 1984. Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. *J Parasitol* 70: 822-824.
- Groot H 1954. Estudios sobre los trypanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariarii*). *Ann Soc Biol* 6: 109-126.
- Grunclová L, Fouquier H, Hypša V, Kopáček P 2003. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol* 27: 651-660.
- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D 1987. Clinical *Trypanosoma Rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94: 475-484.
- Guhl F, Vallejo GA 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 435–442.
- Gumpert J, Schwartz W 1962. Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien X. Die Symbiose der Triatomen. 2. Infektion symbiont

- enfreier Triatominen mit symbiontischen und saprophytischen Mikroorganismen und gemeinsame Eigenschaften der symbiontischen Stamme. *Z Allg Mikrobiol* 2: 290–302.
- Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, Kim J, Lee WJ 2009. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. *Nat Immunol* 10: 949-957.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ 2001. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 87: 778–785.
- Hao Z, Kasumba I, Lehane MJ, Gibson WC, Kwon J, Aksoy S 2001. *Tsetse* immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12648–12653.
- Hao Z, Kasumba I, Aksoy S 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1155–1164.
- Hara S, Yamakawa M 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 270: 29923 – 29927.
- Harrington JS 1960. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology* 50: 279–286.
- Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res* 76: 311-318.
- Hedstrom L 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102: 4501–4524.
- Herbig-Sandreuter A 1957. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. *Acta Trop* 4: 193-207.
- Hergenbahn HG, Aspan A, Soderhall K 1987. Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma. *Biochemistry Journal* 248: 223–228.
- Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis* 187: 327–334.

- Hill P, Campbell JA, Petrie IA 1976. *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 194: 501-525.
- Hillyer JF, Christensen BM 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem and Cell Biol* 117: 431-440.
- Ho BC, Yap EH, Singh M 1982. Melanization and encapsulation in *Aedes aegypti* and *Aedes togoi* in response to parasitization by a filarioid nematode (*Breinvia booliati*). *Parasitology* 85: 567-575.
- Hoffmann JA, Hetru C 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol Today* 13: 411 – 415.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway Jr CA, Ezekowitz RAB 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.
- Hoffmann JA, Reichard JM 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3: 121– 126.
- Hudson L, Guhl F, De Sánchez N, Bridge D, Jaramillo CA, Young A 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T.rangeli*. *Parasitology* 96: 449-460.
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106: 7–16.
- Hultmark D, Engstrom A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 2: 571 – 576.
- Imler JL, Hoffmann JA 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 11: 304-311.
- Ishikawa M, Kubo T, Natori S 1992. Purification and characterization of a dipterin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem J* 287: 573-578.
- Iwanga S, Lee BL 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Bio Mol Biol* 38: 128-150.
- Jain D, Nair DT, Swaminathan GJ, Abraham EG, Nagaraju J, Salunke DM 2001. Structure of the induced antibacterial protein from tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Implications to molecular evolution. *J Biol Chem* 276: 41377 – 41382.
- Jansen AM, Roque AL 2010. Domestic and wild mammalian reservoirs. In T Jenny, T Michel (eds.), *American trypanosomiasis*, Elsevier, London, p.249-276.

- Jiang G, Yu R, Zhou M 2006. Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection. *Nitric Oxide* 14: 219–227.
- Jiang H, Wang Y, Kanost MR 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria inducible protein similar to *Drosophila easter*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12220–12225.
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K 2006. Cellmediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213–236.
- Jollès J, Schoentgen F, Croizier G, Croizier L, Jollès P 1979. Insect lysozyme from three species of Lepidoptera: Their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J Mol Evol* 14: 267 – 271.
- Jones JC 1965. The hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Biol Bull Woods Hole* 129: 282-294.
- Kaaya GP, Flyg C, Boman HG 1987. Insect immunity. Induction of cecropins and attacin like antibacterial factors I the haemolymph of *Glossina morsitans*. *Insect Biochem* 17: 309 – 315.
- Kanost MR, Jiang H 1996. Proteinase inhibitors in invertebrate immunity. In K Soderhall, S Iwanaga, G Vanta (eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, p. 155–173.
- Kanost MR 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* 23: 291–301.
- Kanost MR, Jiang H, Yu X 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 198: 97–105.
- Kanost MR, Gorman MJ 2008. Phenoloxidases in insect immunity. In N Beckage. *Insect Immunology*, Academic Press, San Diego p. 69–96.
- Kinoshita T, Inque K 1977. Bactericidal activity of the normal, cell-free hemolymph of silkworms (*Bombyx mori*). *Infect Immun* 16: 32-36.
- Kockum K, Faye I, Hofsten PV, Lee JY, Xanthopoulos KG, Boman HG 1984. Insect immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and basic attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 3: 2071-2075.
- Kollien AH, Schaub GA 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 16: 381-387.

- Kollien AH, Fechner S, Waniek PJ, Schaub GA 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Arch Insect Biochem Physiol* 53: 134-145.
- Kumar S, Gupta L, Han YS, Barillas-Mury C, 2004. Inducible peroxidases mediate nitration of *Anopheles* midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *J Biol Chem* 279: 53475–53482.
- Kwon TH, Kim MS, Choi HW, Joo CH, Cho MY, Lee BL 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 267: 6188–6196.
- Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D 1990. The cecropin locus in *Drosophila*: a compact gene cluster involved in response to infection. *EMBO J* 9: 217-224.
- Lackie AM 1988,a. Haemocyte behaviour. *Adv Insect Physiol* 21: 85-178.
- Lackie AM 1988,b. Immune mechanisms in insects. *Parasitol Today* 4: 98-105.
- Lake P, Friend WG 1968. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 14: 543-562.
- Lambert J, Keppi E, Dimarcq JL, Wicker C, Reichhart JM, Dunbar B, Lepage P, van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Fothergill J, Hoffmann D 1989. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 262-266.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230: 243-257.
- Lavine MD, Strand MR 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1295-1309.
- Lee WJ, Brey PT 1995. Isolation and characterization of the lysozyme encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene* 161: 199 – 203.
- Lee WJ 2008. Bacterial-modulated signaling pathways in gut homeostasis. *Science Signalling* 1: 24.
- Lehane MJ 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42: 525-550.

- Lehane MJ 2005. *The biology of blood-sucking in insects, 2th ed.*, Cambridge University Press, New York.
- Lent H 1948. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Bras Biol* 8: 297-339.
- Leulier F, Royet J 2009. Maintaining immune homeostasis in fly gut. *Nat Immunol* 10: 936-938.
- Levine MD, Strand MR 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1295–1309.
- Liang Z, Sottrup-Jensen L, Aspán A, Hall M, Soderhall K 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6682–6687.
- Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowneberger 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect biochem mol biol* 33: 439-447.
- Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, Hoffmann JA 1995. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 867-873.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 5700-5705.
- Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC, Steindel M 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Int J Parasitol* 31: 632-634.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira ACV, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MMG 2004,a. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129: 549–561.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MMG 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon

- disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology* 128: 283–294.
- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MMG 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol* 16: 3361–3373.
- Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr M, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes ULB, Camargo EP, Teixeira MMG 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica* 109: 199-207.
- Mandato CA, Diehl-Jones WL, Moore SJ, Downer RGH 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 43: 1–8.
- Marinkelle CJ 1966. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 109-116
- Marmaras VJ, Lampropoulou M 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal* 21: 186-95.
- Matsuyama K, Natori S 1990. Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biochem (Tokyo)* 108: 128 – 132.
- Matsuzaki K 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462: 1-10.
- McGwire BS, Kulkarni MM 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp Parasitol* 126: 397–405.
- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 65: 261-268.
- Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 1996. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 91: 112-268.

- Mello CB, Nigan Y, Garcia ES, Azambuja P, Newton RP, Ratcliffe NA 1999. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 91: 289-296.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria via a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414: 756-759.
- Miller JS, Nguyen T, Stanley-Samuelson DW 1994. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12418–12422.
- Mohrig W, Messner B 1968. Immunoreaktionen bei Insecten II, Lysozymals antimicrobielles Agens im Darmtrakt von Insectem. *Biol Zbl* 87: 707-718.
- Moita LF, Wang-Sattler R, Michel K, Zimmermann T, Blandin S, Levashina EA, Kafatos FC 2005. In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *Anopheles gambiae*. *Immunity* 23: 65-73.
- Morishima I, Yamano Y, Inoue K, Matsuo N 1997. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Lett* 419: 83–86.
- Mourya DT, Soman RS 1985. Effect of gregarine parasite, *Ascogregarina culicis* & tetracycline on the susceptibility of *Culex bitaeniorhynchus* to JE virus. *Indian J Méd Res* 81: 247–250.
- Muta T, Iwanaga S 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8: 41–47.
- Napolitano A, Di Donato P, Prota G 2000. New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1, 4- benzothiazine-o-quinonimine intermediate. *Biochim Biophys Acta* 1475: 47–54.
- Nappi AJ, Vass E 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research* 6: 117–126.
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423–430.
- Nappi AJ, Kohler L, Mastore M 2004. Signaling pathways implicated in the cellular innate immune response of *Drosophila*. *Invertebr Survival J* 1: 5-33.
- Nappi AJ, Christensen BM 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 443–459.

- Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, Ewbank JJ, Ferrandon D 2007. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* doi: 10.1371/journal.ppat.0030173
- Novoa B, Tafalla C, Guerra A, Figueras A 2002. Cellular immunological parameters of the octopus, *Octopus vulgaris*. *J Shellfish Res* 21: 243–248.
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198: 249-266.
- Okada M, Natori S 1984. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J* 222: 119 – 124.
- Okada M, Natori S 1985. Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem J* 229: 453 – 458.
- Oliveira MA, De Souza W 1997. Interaction of *Trypanosoma rangeli* with midgut cells of *Rhodnius prolixus* treated with lectins. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, abstract 093.
- Oliveira MA, Souza W 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 77: 22-26.
- Oliveira MA, De Souza W 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Int* 52: 299-307.
- Osorio Y, Travi BL, Palma GI, Saraiva NG 1995. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol* 81: 687-693.
- Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araújo RN 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BMC res notes* 5: 128.
- Pech LL, Strand MR 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* 109: 2053-2060.
- Powning RF, Davidson WJ 1976. Studies on insect bacteriolytic enzymes, II. some physical and enzymatic properties of Lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp Biochem Physiol* 55B: 221 - 228.

- Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJA 2006. Free radical biology and medicine: its a gas man! *Am J Physiol Regul Integrative Comp Physiol* 291:R491-R511.
- Pulido XC, Perez G, Vallejo GA 2008. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 172–179.
- Radomski MW, Martin F, Moncada S 1991. Synthesis of nitric oxide by the hemocytes of the American Horseshoe-Crab (*Limulus polyphemus*). *Philos Trans R Soc London Ser B* 334: 129-133.
- Ratcliffe NA 1985. Invertebrate immunity for the non-specialist. *Immunol Lett* 10: 253–270
- Ratcliffe NA, Rowley A, Fitzgerald S, Rhodes C 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytosol* 97: 183-350.
- Ratcliffe NA, Gotz P 1990. Functional studies on insect haemocytes including non-self recognition. *Res Immunol* 141: 919-923.
- Ratcliffe NA, Whitten MMA 2004. Vector immunity. In SH Gillespie, GL Smith, A Osborne (eds.), *Microbe–vector Interactions in Vector Borne Diseases*. SGM Symposium 63, Cambridge University Press, Cambridge p. 199–262.
- Ravi C, Jeyashree A, Renuka Devi K 2011. Antimicrobial peptides from insects: an overview. *Research in Biotechnology* 2: 01-07.
- Rey L 1991. *Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*, 2 th ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ribeiro JMC, Pereira MEA 1984. Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry* 14: 103-108.
- Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319: 777-782.
- Samkovlis C, Kimbrell DA, Kylsten P, Engstrom A, Hultmark D 1990. The immune response in *Drosophila*: Pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J* 9: 2969 - 2976.
- Samkovlis C, Kylsten P, Kimbrell DA, Engstrom A, Hultmark D 1991. The Andropin gene and its products: A male specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 10: 163-169.

- Saul SJ, Sugumaran M 1987. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 5: 1–11.
- Schaub GA 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol Today* 5: 185–188.
- Schaub GA 1992. The effects of trypanosomatids on insects. *Adv Parasitol* 31: 255–319.
- Schaub GA 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol Today* 10: 463–468.
- Schaub GA 2009. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. *Adv In Insect Phys* 37: 177-242.
- Scherfer C, Karlsson C, Loseva O, Bidla G, Goto A, Havemann J, Dushay MS, Theopold U, 2004. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* 14: 625–629.
- Schmid-Hempel P 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu Rev Entomol* 50: 529 – 551.
- Shinnar AE, Al E 1996. *Peptides; Chemistry and Biology. Proc. 14th Am. Peptide Symp.* May ower Scient, Leiden, p. 189-191.
- Silverman GA, Bird PL, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JA, Lomast DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, O'Donnell ER, Salvesen GS, Travist J, Whisstock JC 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276: 33293–33296.
- Simmaco M, Mignogna G, Barra D 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47: 435-450.
- Six DA, Dennis EA 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488: 1– 19.
- Soderhall K, Cerenius L 1998. Role of the prophenoloxidase- activating system in invertebrates. *Curr Opin Immunol* 10: 23–28.
- Sousa OE, Johnson CM 1971. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 20: 405-10.

- Stanley-Samuels DW, Jensen E, Nickerson KW, Tiebel K, Ogg CL, Howard RW 1991. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1064–1068.
- Stanley-Samuels DW, Ogg CL 1994. Prostaglandin biosynthesis by fat body from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 24: 481–491.
- Stanley DW 2000. *Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems*, Princeton Univ Press, Princeton, 277 pp.
- Stanley DW 2004. Eicosanoids. In LI Gilbert, K Iatrou, SS Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Amsterdam, p. 540.
- Stanley D 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu Rev Entomol* 51: 25-44.
- Stefano GB, Ottaviani E 2002. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res* 924: 82–89.
- Steindel M, Pinto JCC, Toma HK, Mangia RHR, Rodrigues RR, Romanha J 1991. *Trypanosoma* i (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this tripanosome in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 73-9.
- Steindel M, Neto ED, Pinto CJC, Grisard EC, Menezes CLP, Murta SMF, Simpson AJG, Romanha AJ 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol* 41: 261-267.
- Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-268.
- Stoven S, Ando I, Kadalayil L, Engstrom Y, Hultmark D 2000. Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor relies on rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep* 1: 347-352.
- Strand MR 2008,a. The insect cellular immune response. *Insect Sci* 15: 1–14.
- Strand MR 2008,b. Insect hemocytes and their role in immunity. In N Beckage (ed.), *Insect Immunology*, Academic Press, San Diego, p. 25–48.
- Sugumaran M, Steven JS, Ramesh N 1985. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenolase in insect hemolymph. *Biochem Biophys Res Commun* 132: 1124–1129.

- Sugumaran M, Nellaiappan K, Amaratunga C, Cardinale S, Scott T 2000. Insect melanogenesis. III. Metabolon formation in the melanogenic pathway-regulation of phenoxidase activity by endogenous dopachrome isomerase (decarboxylating) from *Manduca sexta*. *Arch BiochemBiophys* 378: 393–403.
- Sun CS, Ltndstrom I, Lee JY, Faye I 1991. Structure and expression of attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 196: 247-254.
- Tejera E 1920. Un nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou Crithidia) *rangeli*. *Bull Soc Path Exot* 13: 527-530.
- Terra WR 1990. Evolution of digestive system of insects – review. *Annu Rev Entomol* 35: 181–200.
- Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol Life Sci* 59: 363–372.
- Theopold U, Schmidt O, Soderhall K, Dushay MS 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol* 25: 289–294.
- Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S 1999. The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J tissue viability* 9: 127-132.
- Tobie EJ 1961. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 11: 1-9.
- Tobie EJ 1964. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J Parasitol* 50: 593-598.
- Tobie EJ 1970. Observation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 16: 118-125.
- Torreilles J, Guerin MC 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 9: 509-518.
- Tsukamura M 1974. A further numerical taxonomic study of the *Rhodochrous* group. *Jpn J Microbiol* 18: 37–44.
- Tunaz H, Jurenka RA, Stanley DW 2001. Prostaglandin biosynthesis by fat body from true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 435–444.
- Tunaz H, Putnam SM, Stanley DW 2002. Prostaglandin biosynthesis by fat body from larvae of the beetle *Zophobas atratus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 49: 80– 93.

- Urrea DA, Carranza JC, Cuba Cuba CA, Gurgel- Gonçalves R, Guhl F, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA 2005. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallenscens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol* 5: 123–129.
- Ursic-Bedoya RJ, Nazzari H, Cooper D, Triana O, Wolff M, Lowenberger C 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J insect physiol* 54: 593-603.
- Ursic-Bedoya R, Buchhop J, Joy JB, Durvasula R, Lowenberger C 2011. Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Insect Mol Biol* 20: 775–786.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, de Sanchez N 1986. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. *Rev Biol Trop* 34: 75-81.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, Gualtero D, Castañeda N, Silva JC, Steindel M 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop* 81: 77–82.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC 2003. *et al.* Parity between kinetoplast DNA and miniexon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallenscens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* 3: 39–45.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC 2004. Interaction between *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* spp: A model for molecular epidemiology in American trypanosomiasis. In: S Mas-Coma (eds.). *Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases., IXth European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), Valencia 2004.* Monduzzi, Bologna, Italy, p. 121–127.
- Vallejo GF, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, Marín DH, Villa LM, Suárez J, Sánchez IP, Pulido X, Rodríguez IB, Lozano LE, Urrea DA, Rivera FA, Cuba-Cuba C, Clavijo JA 2007. Interaccion tripanosoma vector-vertebrado y su relacion con la sistematica y la epidemiologia de la tripanosomiasis americana. *Biomedica* 27: 110–118.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA 2009. Triatominae – *Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli*: Vector – parasite interactions. *Acta Trop* 110: 137–147.

- Vieira CS, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, Garcia ES, Azambuja P 2014. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides. *Parasites e Vectors* 7: 232-244.
- Vilmos P, Kurucz E 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett* 62: 59-66.
- Von Euler US 1936. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandinand vesiglandin). *J Physiol* 88: 213– 234.
- Wang YP, Lai R 2010. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Dongwuxue Yanjiu* 31: 27-34.
- Waniek PJ, Castro HC, Sathler PC, Miceli L, Jansen AM, Araújo CAC 2009. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): gene expression and peptide-structure modeling. *J insect physiol* 55: 840-848.
- Waniek PJ, Jansen AM, Araújo CA 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 845–847.
- Waniek PJ, Pacheco Costa JE, Jansen AM, Costa J, Araújo CA 2012. *et al.* Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization, expression pattern and zymography. *J insect physiol* 58: 178-187.
- Watkins R 1969. *Host–parasite interaction between Trypanosoma species and Rhodnius prolixus Stal (Hemiptera, Reduviidae)*, PhD thesis, University of California, Berkeley.
- Watkins R 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol* 17: 59–66.
- Weiske J, Wiesner A 1999,a. Detection of NO synthase-like NADPH diaphorase activity in an immunocompetent insect cell line. In: A Wiesner, GB Dunphy, VJ Marmaras, I Morishima, M Sugumaran, M Yamakawa (eds.), *Techniques in Insect Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, p. 235–241.
- Weiske J, Wiesner A 1999,b. Stimulation of NO synthase activity in the immunocompetent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. *Nitric Oxide* 3: 123-131.

- Weiss B, Aksoy S 2011. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol* 27: 514–522.
- Whitten MM, Mello CB, Gomes SA, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp Parasitol* 98: 44–57.
- Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N 2007. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 440–452.
- Wicker C, Reichhart JM, Hoffmann D, Hultmark D, Samakovlis C, Hoffmann JA 1990. Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterecin family of immune peptides. *J Biol Chem* 265: 22493–22498.
- Wigglesworth VB 1936. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Triatomidae). *Parasitology* 28: 284–289.
- Wigglesworth VB 1972. *The principles of insect physiology*, 7th ed., John Wiley, New York.
- Wood W, Faria C, Jacinto A 2006. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 173: 405–416.
- Yajima M, Takada M, Takahashi N, Kikuchi H, Natori S, Oshima Y 2003. A newly established in vitro culture using transgenic *Drosophila* reveals functional coupling between the phospholipase A2-generated fatty acid cascade and lipopolysaccharide-dependent activation of the immune deficiency (imd) pathway in insect immunity. *Biochem J* 371: 205–210.
- Yamada K, Natori S 1994. Characterization of the antimicrobial peptide derived from sapecin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem J* 298: 623 – 628.
- Yamano Y, Matsumoto M, Sasahara K, Sakamoto E, Morishima I 1998. Structure of genes for cecropin A and an inducible nuclear protein that binds to the promoter region of the genes from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 237 – 241.

- Yang J, Furukawa S, Sagisaka A, Ishibashi J, Taniai K, Shono T, Yamakawa M 1999. cDNA cloning and gene expression of cecropin D, an antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 122: 409–414.
- Yeaman MR, Yount NY 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27 – 55.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Modarski M, Goodfellow M 1988. DNA based composition and homology values in the classification of some *Rhodococcus* species. *J Gen Microbiol* 134: 2807–2813.
- Zasloff M 2002. Antimicrobial peptides of multicellular Organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, Kokoza V, Raikhel AS 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity* 32: 41–53.

8 ANEXO 1- ARTIGO

RESEARCH

Open Access

Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut

Cecilia Stahl Vieira¹, Peter J Waniek¹, Débora P Mattos¹, Daniele P Castro¹, Cícero B Mello², Norman A Ratcliffe^{2,3*}, Eloi S Garcia^{1,4} and Patrícia Azambuja^{1,4*}

Abstract

Background: The triatomine, *Rhodnius prolixus*, is a major vector of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease in Latin America. It has a strictly blood-sucking habit in all life stages, ingesting large amounts of blood from vertebrate hosts from which it can acquire pathogenic microorganisms. In this context, the production of antimicrobial peptides (AMPs) in the midgut of the insect is vital to control possible infection, and to maintain the microbiota already present in the digestive tract.

Methods: In the present work, we studied the antimicrobial activity of the *Rhodnius prolixus* midgut *in vitro* against the Gram-negative and Gram-positive bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. We also analysed the abundance of mRNAs encoding for defensins, prolixicin and lysozymes in the midgut of insects orally infected by these bacteria at 1 and 7 days after feeding.

Results: Our results showed that the anterior midgut contents contain a higher inducible antibacterial activity than those of the posterior midgut. We observed that the main AMP encoding mRNAs in the anterior midgut, 7 days after a blood meal, were for lysozyme A, B, defensin C and prolixicin while in the posterior midgut lysozyme B and prolixicin transcripts predominated.

Conclusion: Our findings suggest that *R. prolixus* modulates AMP gene expression upon ingestion of bacteria with patterns that are distinct and dependent upon the species of bacteria responsible for infection.

Keywords: *Rhodnius prolixus*, Antimicrobial peptides, Bacteria, mRNA modulation

Background

Although insect immunity has been studied since the first half of the 20th century [1-3], the mechanisms involved have yet to be fully elucidated. The immune system in insects, unlike vertebrates, lacks the classical response to pathogens mediated by memory cells and immunoglobulin, but relies solely on an extremely efficient innate immune response [4]. This efficiency is

probably one reason insects are the most abundant animal group, well adapted to many ecotopes [5]. Insect immunity includes the synchronized activation of cellular and humoral factors, such as the formation of microaggregates, phagocytosis and encapsulation by haemocytes, as well as the formation of reactive intermediates of oxygen and nitrogen, the prophenoloxidase system and antimicrobial peptides (AMPs) [6,7].

One of the major components of insect immunity is the synthesis of AMPs. Insect AMPs are usually cationic, amphipathic, often composed of 12–50 amino acid residues and have a broad activity spectrum [8]. The gene expression of AMPs occurs principally in the fat body, haemocytes and digestive tract epithelia, and the peptides

* Correspondence: N.A.Ratcliffe@swansea.ac.uk; azambuja.p@gmail.com

²Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF) Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

¹Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

are secreted into the haemolymph or midgut lumen [9,10]. AMP production is triggered by activation of different immune signalling pathways including Toll, Imd and Jak/STAT after recognition of non-self molecules known as the pathogen associated molecular patterns (PAMPs) [5,11].

Relatively few studies focus on the importance of the immune system in the midgut of insects, which is one of the most vulnerable tissues since it is always in contact with a variety of microorganisms [12]. Haematophagous insects, such as *Rhodnius prolixus*, ingest large amounts of blood from vertebrate hosts, often containing pathogenic microorganisms. The production of AMPs in the insect gut is therefore vital to protect against infection and to maintain homeostasis of the intestinal microbiota. The mutualistic microbiota of insects not only supplies essential nutrients but also aids digestion and the control of pathogenic microorganisms by modulating the immune responses [13,14]. Moreover, several studies have shown the importance of the microbiota in regulating insect genes involved in maintaining homeostasis of the gut [15-21].

R. prolixus is an important triatomine vector of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease in Latin America [22-24]. In the insect vector, *T. cruzi* remains exclusively inside the *R. prolixus* gut where, in order to survive, the parasite counteracts various host defence factors, including the AMPs [12]. Evidence indicates that in some insect vectors AMPs may be able to control parasite development [25-30]. Therefore, the study of AMPs present in the digestive tract of insects may have potential to provide new targets for control strategies.

Antimicrobial peptides are encountered in numerous organisms and are diverse even among closely related species [8]. In *R. prolixus*, six different AMPs have been identified, namely, defensin A, B and C, prolixicin and lysozymes A and B [31]. Each AMP has potential activity against a range of microorganisms. Lysozymes possess high activity against Gram-positive bacteria, by hydrolysing the 1,4- β -linkage between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine of the cell wall peptidoglycans [32,33]. Defensins are cysteine-rich peptides and are also known for their action against Gram-positive bacteria [27,34-36]. In contrast, prolixicin has high activity against Gram-negative *Escherichia coli* [37].

Despite the presence of these different AMPs in *R. prolixus*, the relative dynamics of their induction upon exposure to different species of bacteria is poorly understood. Thus, in the present study, using fifth instar nymphs of *R. prolixus*, the antimicrobial activities of the midgut *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and *E. coli* have been investigated. We also analysed the relative abundance of mRNAs encoding AMPs in the midgut of

insects fed with either *S. aureus* or *E. coli* at different days after an infected blood meal to test the hypothesis that each type of bacterium triggers a distinct immune response.

Methods

Ethics statement

For all experiments, *R. prolixus* were maintained in controlled environmental conditions and fed with defibrinated rabbit blood provided by the Laboratory Animals Creation Centre (Cecal). For feeding insects, an artificial apparatus was used, similar to that described previously [38] according to the Ethical Principles in Animal Experimentation approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/FIOCRUZ, under the protocol number L-0061/08). The protocol was developed by CONCEA/MCT (<http://www.cobea.org.br/>), which is associated with the American Association for Animal Science (AAAS), the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), the International Council for Animal Science (ICLAS) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC).

Bacteria

S. aureus 9518 and *E. coli* K12 4401 were purchased from the National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), Aberdeen, UK. Bacteria were maintained frozen at -70°C in tryptone agar and 10% glycerol. For all experimental procedures, bacteria were grown with shaking (90 revolutions per minute) in 20 ml of tryptone soy broth (TSB) for 17 h at 30°C , and then 10 ml of fresh TSB were inoculated with 100 μl of the respective bacterial culture and incubated for a further 4 h under the same conditions. The bacteria were then washed in phosphate buffered saline - PBS (0.01 M phosphate buffer, 2.7 mM potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4) and diluted in TSB to a final concentration of 1×10^4 cells/ml.

Insect treatment

Fifth-instar *R. prolixus* nymphs were obtained from a colony reared and maintained in Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos IOC/FIOCRUZ at a relative humidity of 50–60% and at 27°C . The insects were randomly chosen and then fed with defibrinated rabbit blood through a membrane feeding apparatus [38]. Three groups of insects were fed as follows: blood only (control), blood containing *E. coli* or blood containing *S. aureus*. The final concentration of bacteria in the blood was 10^4 /ml.

To compare the effects of whole normal plasma on the insect's antibacterial activity, insects were fed with blood after heat-inactivation of the plasma. The blood

was centrifuged at $1.890 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatant (plasma) was collected and incubated for 30 min at 55°C . After inactivation, the plasma was added back to the erythrocytes and fed to the insects. In the same experiment, a group of insects was fed with normal plasma in the blood (control).

Midgut sample preparations and antibacterial assays

For midgut sample preparations, starved or full engorged fifth-instar nymphs of *R. prolixus* were used at different days after feeding (DAF). The cuticle of the insects was cut laterally, to remove and separate the enlarged anterior midgut (stomach) from the narrow posterior midgut (intestine). The anterior midgut was separated into contents and wall for the antibacterial assays. Additionally, the antibacterial activity of the intestine was tested. All midgut preparations were collected in 1.5 ml reaction tubes always using pools of 3 insect midgut compartments diluted in 200 μl Milli-Q water, homogenized, centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C and finally sterilized by Millipore PVDF membrane filtration. Afterwards, the pools of 3 anterior midgut contents were diluted ten times in sterile water and stored at -20°C until use.

Antibacterial activity was assessed by turbidometric assays (TB) previously adapted by Castro *et al.*, 2012 [39,40]. For midgut TB assays, *S. aureus* or *E. coli*, grown as described above, were washed in PBS and diluted in TSB to a final concentration of 10^4 cells/ml. Subsequently, 10 μl of *E. coli* or *S. aureus* bacterial suspensions were incubated in each well of a sterile flat bottom 96-well microtiter plate (Nunc, Fisher Scientific, Leicestershire, UK) with 45 μl of sample (anterior midgut content, anterior midgut wall or posterior midgut) plus 5 μl of peptone 10%, to a final concentration of 1% peptone, at 37°C for 19 h. The optical densities were measured at 550 nm (OD_{550}) at hourly intervals using a Spectra Max 190 Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Control wells, run without midgut samples, contained 10 μl of bacteria in 1% peptone in Milli-Q water. The antibiotic ampicillin (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was included in each experiment as a positive control.

All data points were subsequently blanked against time zero to account for the opacity of the midgut samples. The midgut samples were also incubated in the plate without bacteria to observe the change in sample colour after 19 h and the readings obtained were subtracted from the samples incubated with bacteria to ensure that the difference in readings were related to antibacterial activity. Then, the readings for the bacteria, *E. coli* or *S. aureus*, were subtracted from all sample readings to obtain the antibacterial activity value. All experiments were carried out in triplicate (9 pools of 3 insects, $n = 27$ insects). In addition, to find out how the sample

dilutions affect antibacterial activity, different concentrations of the anterior midgut contents were tested against both bacteria. The anterior midgut contents of control insects at 7 DAF without dilution gave absorbance readings above the range of the standard curve and therefore in all TB assays samples were diluted 10 times which corresponded to 14.7 μg protein/ μl of protein. The posterior midgut samples of control insects at 7 DAF used for TB assays contained 0.8 μg protein/ μl of sample. All protein testing of midgut samples used a protein assay kit (BCA* Protein Assay Reagent, Pierce, USA) with bovine serum albumin (BSA) standards. Additionally, the differences in protein concentrations of each midgut preparation analysed in these assays were considered and are discussed below.

Concurrent with the TB assays, the anterior and posterior midgut samples (45 μl) were also incubated with 10 μl of *E. coli* or *S. aureus* (1×10^4 cells/ml) and 5 μl of peptone 10% at 37°C . At different times during incubation, samples were plated onto BHI-agar to compare the bacterial growth, by counting colony forming units (CFU), with the readings in the TB assays. Ampicillin (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated with both bacteria and plated on BHI-agar as a positive control of bacterial growth inhibition. The culture medium (TSB) used in the sample dilutions was also plated out as a control.

The thermal stability of the anterior midgut contents was analysed by heating the samples at 100°C for 60 min. The susceptibility of the anterior midgut contents to protease digestion was tested by pre-incubation with bovine pancreas trypsin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 2500 Uml^{-1} for 24 h at 37°C [40]. Samples were then centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min and the supernatants assayed for antibacterial activity. Tests showed that trypsin had no adverse effects on bacterial growth and for this reason was not inhibited in the sample prior to TB assay.

Analysis of AMPs mRNA abundance by reverse transcription (RT) PCR

Steady state levels of mRNA encoding peptides involved in the innate immunity of *R. prolixus* were tested by reverse transcription (RT) PCR. Before dissection, insects were immersed in water at 55°C for 15 sec to release haemocytes from tissues [41]. From fifth instar nymphs ($n = 10$), unfed (15 days after ecdysis), 1 and 7 DAF (infective and non-infective), the anterior and posterior midgut walls were dissected and stored at -70°C . Total RNA was extracted using a NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions and subsequently measured by a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Synthesis of cDNA was carried out with a First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare,

Buckinghamshire, UK) following the manufacturer's protocol using either 1.25 or 2.5 µg of total RNA. *R. prolixus* primers were designed from previously published defensin A, B and C, lysozyme A and B, prolixicin and β-actin (internal control, GenBank accession number ACPB02032143) encoding cDNA sequences as listed in Table 1 [31,37,42-44]. All defensins and the prolixicin encoding genes possess an intron and could therefore also be used as an internal control for contamination with genomic DNA.

PCRs were performed using Illustra Taq DNA Polymerase (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min; cycling step at 94°C for 25 sec, 54°C for 25 sec, 72°C for 30 sec and a final elongation step at 72°C of 7 min. The amplification of prolixicin was conducted at an annealing temperature of 48°C. The number of cycles (25 and 30) was experimentally optimized with the gene encoding actin to eliminate signal saturation [45]. For verification of primer specificity, amplicons of all genes were excised from agarose gels, purified and sequenced in both directions by Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. PCRs were carried out three times under the same conditions using technical replicates. As negative controls, PCR reactions were carried out without a template. All nucleic acid experiments were performed on a Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Amplification products (5 µl) were separated on an ethidium bromide stained 2% agarose gel and documented with a Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Band intensity was measured with the ImageJ program (version 1.47q). Means and standard deviations of the different samples were calculated.

Statistical analyses

The results were analysed with GraphPad Prism 5 using two way ANOVA or one way ANOVA or unpaired T tests, depending on the data distribution and number of treatments. Data are reported as mean ± standard deviation (SD). Differences among groups were considered not statistically significant when $p > 0.05$. Probability levels are specified in the text and Figure legends.

Results

Midgut antimicrobial activity

In the present study, the antimicrobial activity of *R. prolixus* midgut was assessed against two bacterial species, *E. coli* and *S. aureus*. To determine in which midgut compartment the antibacterial activity are present, we tested separately the anterior midgut wall and contents as well as total posterior midgut using the TB assay (Figure 1). Results showed that the anterior midgut contents had a significantly higher activity than the anterior midgut wall and posterior midgut against both bacterial species (Figure 1; $p < 0.001$). A comparison between the anterior midgut contents and posterior midgut was also made using BHI agar plates incubating the samples with *E. coli* and *S. aureus*. In the anterior midgut contents, no bacteria grew after 19 h incubation in contrast to the rapid growth of the bacteria alone controls (Additional file 1; $p < 0.001$). In contrast, incubation with the posterior midgut samples resulted in numerous bacteria colony forming units (CFU) after 19 h (Additional file 1; $p < 0.001$). These results confirm those from the TB assay above.

Analysis was also undertaken to determine if any antibacterial activity recorded was related to the complement system of the rabbit blood. Comparison of the antibacterial activity of anterior and posterior midgut samples from insects fed on blood containing whole

Table 1 List of primers used in the present study

Gene/name	Sequence 5'-3'	Tm (°C)	Amplicon length
RPDEFAP	GAATACTCCACTCAACCGCAAC	62.7	
RPDEFAR	TAGTTCCTTTACATCGGCCA	58.4	295 bp
RPDEFBF	CAGTACCTAGGATATCCACTCAAC	62.9	
RPDEFBR	TAGTTCCTTTACAATGGCCG	58.4	304 bp
RPDEFCE	CAGTACAGTCCTAATACCTAGCC	62.8	
RPDEFCE	CAGTTCCTACGCAACGGCCT	64.5	300 bp
RPLYS1F	TTCTTACTGGCTATTTTCGCC	58.7	
RPLYS1R	CGACCTCTGCAATGGTACTG	62.4	377 bp
RPLYS2F	CTAGTTTTAACACTATTGCTGCTG	59.4	
RPLYS2R	GCCCTTACATTTCTTGATCC	58.4	378 bp
RPPROLF	CTATAACGAGTGAAGTATAAGACAA	50.0	
RPPROLR	GTGTTTAATGGCGGTAACAAATTAC	53.2	406 bp
RPACTF	CACGAGGCTGTATACAATTCCA	60.8	
RPACTR	GTAGCTGTTTAGAAGCATTTCGCG	61.0	314 bp

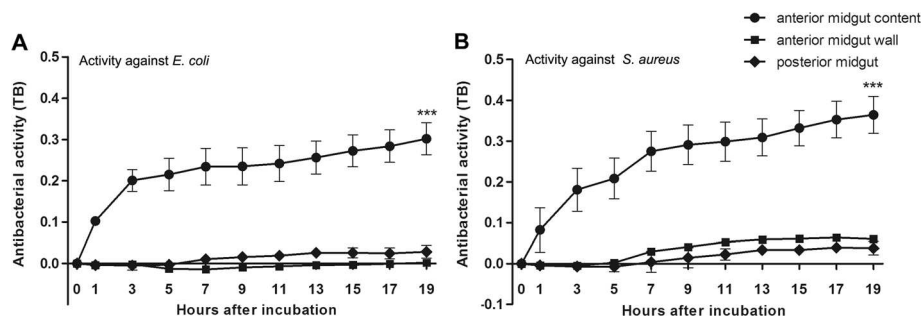


Figure 1 Antibacterial activity of the anterior and posterior midgut of *Rhodnius prolixus* 7 days after feeding. **A** – Activity of anterior (contents and wall) and posterior midgut samples against *E. coli*. **B** – Activity of anterior (contents and wall) and posterior midgut samples against *S. aureus*. Antibacterial activity measured by turbidometric assay (TB) (OD₅₅₀ nm) with readings from 0 to 19 hour in plate assay. Treatments: ● bacteria incubated with anterior midgut contents; ■ bacteria incubated with anterior midgut wall; ◆ bacteria incubated with posterior midgut. Values represent the means ± SD of 9 pools using 3 insects each (n = 27) in triplicate wells. Asterisks relates to significant differences (***p < 0.001) obtained by a two way ANOVA.

native plasma with those fed on heat-inactivated plasma revealed no differences in activity against *E. coli* or *S. aureus* (Additional file 2).

In order to analyse the dynamics of antibacterial activity in *R. prolixus*, the anterior midgut contents were tested against *E. coli* or *S. aureus* at different days after feeding (DAF). The results showed that at 7 DAF, the activity against *E. coli* was significantly higher than 5 DAF (p < 0.05), as well as 1, 9 and 12 DAF (p < 0.01) (Figure 2A). The activity of the anterior midgut contents against *S. aureus* was also highest at 7 DAF which was significantly higher (p < 0.05) than all the other DAF (Figure 2B).

The antibacterial activity of the anterior midgut contents was also tested for thermal stability and susceptibility to trypsin digestion. All antibacterial activities against *E. coli* and *S. aureus* were significantly reduced after trypsin and boiling treatments compared with the untreated controls (Additional file 3A; p < 0.01 and p < 0.05, respectively). The activities against *S. aureus* were also significantly reduced with these treatments (Additional file 3B; p < 0.001).

Transcription of AMPs in insects

In order to categorize antibacterial activity in the digestive tract of *R. prolixus*, the gene expression profiles of AMPs in the anterior midgut and posterior midgut walls of unfed insects and insects 1 or 7 DAF were studied. The relative abundance of transcripts for lysozyme A (*LysA*), lysozyme B (*LysB*), prolixicin (*Prol*), defensins A (*DefA*), B (*DefB*) and C (*DefC*) was quantified (Figure 3). In general, the AMP transcript abundance was highest at 7 DAF in both tissues, but the expression pattern over time and tissue was not the same for all AMPs analysed (Figure 3A and 3B). At 1 DAF, the abundance of transcripts of *LysB* increased approximately 15 fold in the anterior and posterior midguts, while *Prol* transcripts increased 5 fold in the posterior midgut, in comparison to unfed insects. Interesting, *DefC* abundance was significantly higher in anterior midgut samples of unfed insects (p < 0.001), and decreased at 1 and 7 DAF (Figure 3A). Comparing the transcripts between tissues 7 DAF, the anterior midgut showed a

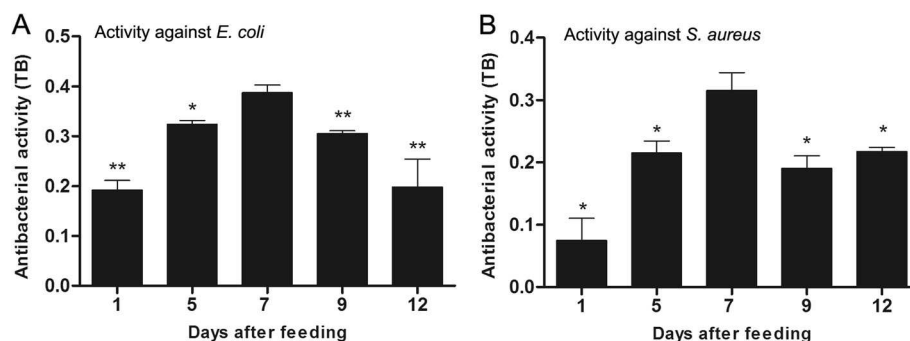


Figure 2 Antibacterial activity of the anterior midgut contents of *Rhodnius prolixus* on different days after feeding. **A**– Activity of anterior midgut contents against *E. coli*. **B**– Activity of anterior midgut contents against *S. aureus*. Antibacterial activity detected by turbidometric assay (TB) (OD₅₅₀ nm) after 19 h incubation of anterior midgut content samples with different bacteria. Values represent the means ± SD of 9 pools using 3 insects each (n = 27) in triplicate wells. Asterisks relate to significant differences (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) obtained after data were compared to day seven using one way ANOVA and Mann Whitney tests.

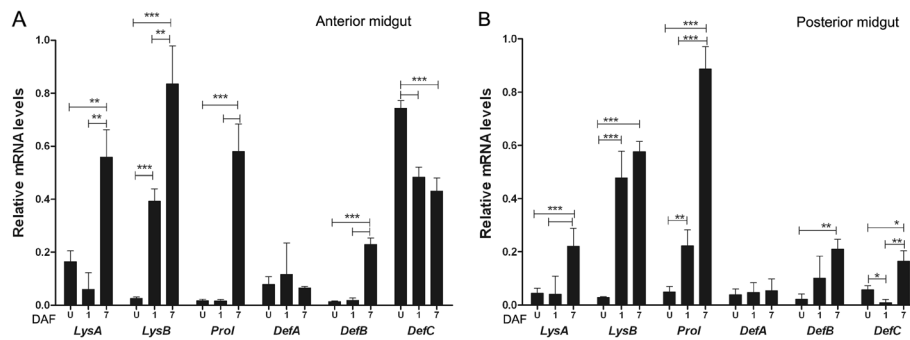


Figure 3 Relative transcript abundance of antimicrobial peptides and lysozymes encoding mRNA in *Rhodnius prolixus* midgut wall.

Anterior and posterior midgut samples collected before feeding (unfed), 1 and 7 days after a blood meal. **A**- Relative mRNA levels in anterior midgut. **B**- Relative mRNA levels in posterior midgut. DAF – days after feeding. U – unfed insects. Error bars represent SD of three independent experiments. Asterisks relates to significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) obtained after data analyses using one way ANOVA and unpaired t tests.

significantly higher abundance of *LysA*, *LysB* and *DefC* than the posterior midgut (Figure 3A). Additionally, only the abundance of *Prol* transcripts was significantly higher in posterior midgut than anterior midgut (Figure 3B).

Antibacterial activity and transcription of AMPs in bacteria fed insects

R. prolixus were infected separately with Gram-positive and Gram-negative bacteria to test whether different bacteria trigger a distinct immune response, altering the

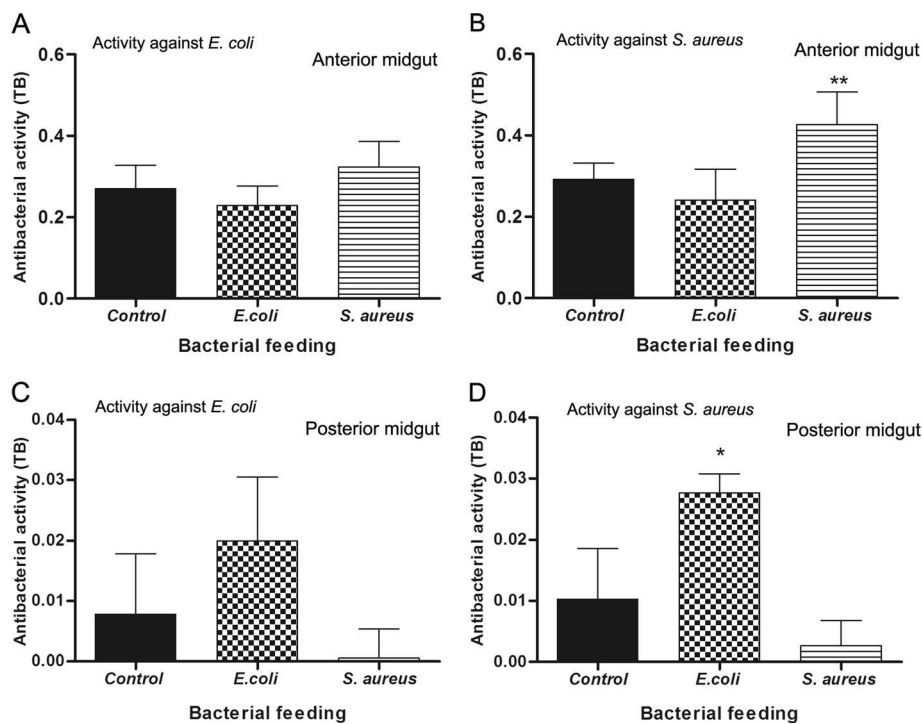


Figure 4 Antibacterial activity in *Rhodnius prolixus* midgut fed with blood containing *E. coli* or *S. aureus*. Anterior midgut contents and posterior midgut collected 7 days after feeding were tested against *E. coli* and *S. aureus*.

A- Antibacterial activity of anterior midgut contents after feeding with *E. coli*, *S. aureus* or blood alone against *E. coli*. **B**- Antibacterial activity of anterior midgut contents after feeding with *E. coli*, *S. aureus* or blood alone against *S. aureus*. **C**- Antibacterial activity of posterior midgut after feeding with *E. coli*, *S. aureus* or blood alone against *E. coli*. **D**- Antibacterial activity of posterior midgut after feeding with *E. coli*, *S. aureus* or blood alone against *S. aureus*. Black column - antibacterial activity of control insects fed on blood alone; grid column - antibacterial activity of insects fed with blood containing *E. coli*; striped column - antibacterial activity of insects fed with blood containing *S. aureus*. Antibacterial activity measured by turbidometric assay (TB) (OD_{550} nm) after 19 h incubation of midgut samples with different bacteria. Values represent the means \pm SE of three replicates. Asterisks relates to significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) in comparison to control obtained after data analyses using one way ANOVA and Mann Whitney tests.

antibacterial activity and the gene expression of AMPs. The antibacterial activities recorded were compared to control insects fed on blood without bacteria. Feeding the insects with blood containing *E. coli* failed to significantly alter the immune response of the anterior midgut contents tested against either *E. coli* or *S. aureus* (Figure 4A and 4B). In contrast insects fed with *S. aureus* recorded significantly increased antibacterial activity of the anterior midgut contents against *S. aureus* (Figure 4B; $p < 0.01$) but not *E. coli*. As with the anterior

midgut contents, the oral infection with either bacterium failed to significantly change the antibacterial activities of the posterior midgut samples against *E. coli* (Figure 4C), although an increase in posterior midgut antibacterial activity was only observed afterwards when the insects were infected with *E. coli* and then tested against *S. aureus* (Figure 4D; $p < 0.05$).

In the anterior midgut at 1 DAF, oral infection with either *E. coli* or *S. aureus* increased mRNA levels of some AMPs in comparison with the control insects fed

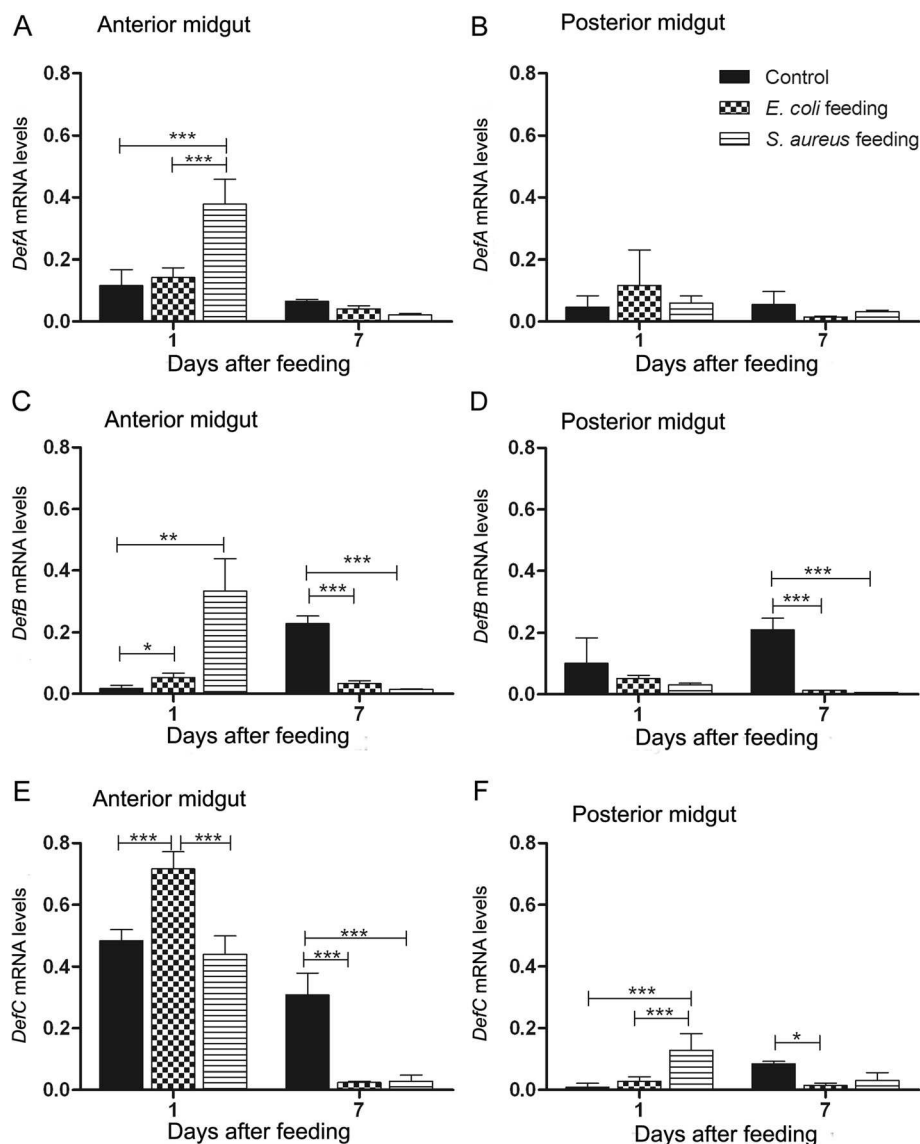


Figure 5 Relative transcript abundance of defensins encoding mRNA in *Rhodnius prolixus* after bacterial feeding. Anterior and posterior midgut samples collected 1 and 7 days after blood meal. **A, C, E:** anterior midgut relative mRNA levels. **B, D, F:** posterior midgut relative mRNA levels. **A-** *DefA* mRNA levels in anterior midgut. **B-** *DefA* mRNA levels in posterior midgut. **C-** *DefB* mRNA levels in anterior midgut. **D-** *DefB* mRNA levels in posterior midgut. **E-** *DefC* mRNA levels in anterior midgut. **F-** *DefC* mRNA levels in posterior midgut. Treatments: black column - insects fed with blood alone (control); grid column - insects fed with blood plus *E. coli*; striped column - insects fed with blood plus *S. aureus*. Error bars represent SD of three independent experiments. Asterisks relate to significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) obtained after data statistical analyses using one way ANOVA and unpaired t Test.

blood alone (Figure 5). In this tissue, *DefA* and *DefB* transcript abundance was upregulated by *S. aureus* infection (Figure 5A; $p < 0.001$ and 5C; $p < 0.01$) while *DefC* was upregulated by *E. coli* (Figure 5E; $p < 0.001$). In contrast, in the posterior midgut, at 1 or 7 DAF, bacterial feeding did not significantly increase the expression of *DefA* and *DefB* encoding genes (Figure 5B and 5D), although an increased expression of *DefC* 1 DAF occurred after *S. aureus* infection. (Figure 5F; $p < 0.001$). The transcript abundances of *DefA*, *DefB* and *DefC* were similar or even significantly lower in insects infected by either *E. coli* or *S. aureus*, in both the anterior and posterior midguts at 7 DAF when compared with control insects (Figure 5).

Concerning the *Prol* expression in both midgut tissues, only infection with *S. aureus* caused a significant increase in this AMP expression in the anterior midgut 1 DAF, when compared with control insects (Figure 6A; $p < 0.05$). In all other cases, *Prol* was significantly downregulated (Figure 6), especially at 7 DAF with bacteria (Figure 6A and 6B; $p < 0.001$).

Results with lysozyme at 1 DAF showed that *LysA* was significantly upregulated in the anterior midgut after *S. aureus* infection ($p < 0.01$) while *LysB* was significantly downregulated after *E. coli* infection (Figure 7A and 7C; $p < 0.01$). In contrast, in the posterior midgut 1 DAF with *E. coli* resulted in a significant increase in *LysA* transcript abundance compared to control (Figure 7B; $p < 0.05$). At 7 DAF, the abundance of *LysA* and *LysB* transcripts in insects infected with either bacterial species showed similar results to control insects in both tissues (Figure 7A and 7B) except for a significant decrease in *LysB*, abundance in anterior midgut tissues of *E. coli* and *S. aureus*-infected insects ($p < 0.01$) when compared with controls (Figure 7C).

Discussion

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important part of the immune response in insects, particularly in the

midgut lumen of vector species that transmit parasites during blood feeding. Furthermore, insect vectors possess gut microbiota composed of mutualistic and pathogenic bacteria [14] which are modulated by the AMPs to maintain the gut homeostasis [21]. In the present study, the results showed that oral infection with Gram-positive and Gram-negative bacteria differentially altered the antimicrobial activity and AMP expression patterns in the insect's midgut.

The AMPs detected in the gut of *R. prolixus* in the present study included transcripts for lysozyme A (*LysA*), lysozyme B (*LysB*), prolixicin (*Prol*), defensins A (*DefA*), B (*DefB*) and C (*DefC*), although probably more AMPs await discovery in *Rhodnius*. In a recent paper by Ribeiro et al. [46] eight defensin and five lysozyme encoding sequences were reported. From the eight reported defensin transcripts, four were identified as *DefC*, three as *DefA* and one as a truncated *def4* of *T. brasiliensis* and no *R. prolixus DefB* was identified. However, *T. brasiliensis Def4* and *R. prolixus DefA* are highly similar and are probably orthologs. Defensins are highly conserved and therefore incomplete sequences might match with the wrong sequences deposited in the GenBank. Our study analysed all full so far identified defensin genes including *DefB* which was not found by Ribeiro et al. [46]. In the case of lysozyme Ribeiro et al. [46] identified three of the five transcripts as lysozyme 1 (syn. of *R. prolixus* lysozyme A), which was included in our study. Our results also report the presence of prolixicin, another antibacterial peptide, which was not detected by Ribeiro et al. [46].

Both midgut compartments were analysed for antibacterial activity, since it has been shown that each midgut compartment has a highly specific environment and physiological function [47,48]. The anterior midgut of triatomines, which has a neutral-basic pH, is where the blood meal is stored and the majority of bacterial

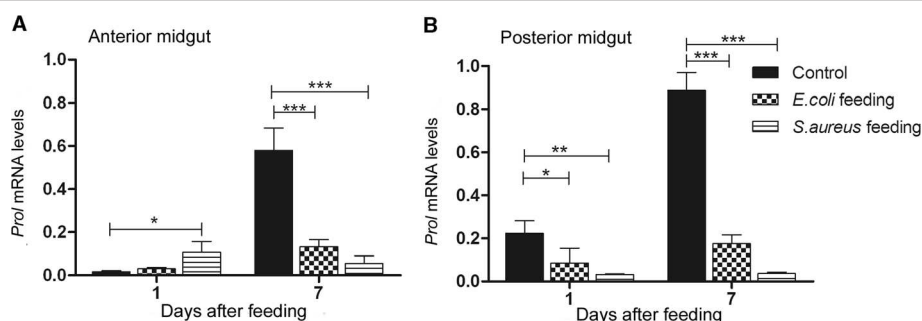


Figure 6 Relative transcript abundance of prolixicin encoding mRNA in *Rhodnius prolixus* midgut wall after bacterial feeding. Anterior and posterior midgut samples collected 1 and 7 days after feeding. **A:** anterior midgut relative mRNA levels. **B:** posterior midgut relative mRNA levels. Treatments: black column - insects fed with blood alone (control); grid column - insects fed with blood plus *E. coli*; striped column - insects fed with blood plus *S. aureus*. Error bars represent SD of three independent experiments. Asterisks relate to significant differences ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) obtained after data analyses using one way ANOVA and unpaired t tests.

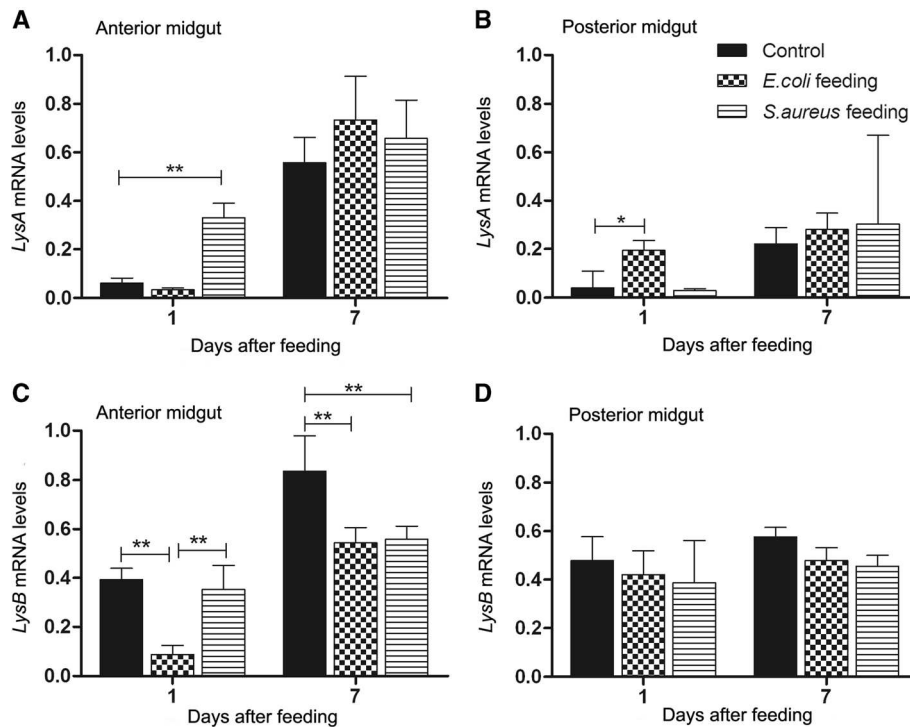


Figure 7 Relative transcript abundance of lysozymes encoding mRNA in *Rhodnius prolixus* midgut after bacterial feeding. Anterior and posterior midgut samples collected 1 and 7 days after blood meal. A, C: anterior midgut relative mRNA levels. B, D: posterior midgut relative mRNA levels. **A-** *LysA* mRNA levels in anterior midgut. **B-** *LysA* mRNA levels in posterior midgut. **C-** *LysB* mRNA levels in anterior midgut. **D-** *LysB* mRNA levels in posterior midgut. Treatments: black column - insects fed with blood; grid column - insects fed with blood plus *E. coli*; striped column - insects fed with blood plus *S. aureus*. Error bars represent SD of three independent experiments. Asterisks relate to significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) obtained after data statistical analyses using one way ANOVA and unpaired t Test.

symbionts reside. In contrast, the posterior midgut, with an acidic pH, is where protein digestion mainly occurs [45,49]. The ingested blood meal stored in the anterior midgut induces within days the transcription of AMPs and lysozymes. Concomitantly, we observed that the antibacterial activity *in vitro* was very high against both *E. coli* and *S. aureus*, reaching the highest level at 7 days after a blood meal, which may be explained by an increase of these peptides.

The results with *R. prolixus* fed with blood without microorganisms showed higher levels of mRNA encoding AMPs in the anterior than in the posterior midgut of *R. prolixus*. The anterior midgut contents also recorded a higher antibacterial activity than posterior midgut, in agreement with previous results [50]. However, results obtained by antibacterial assays on extracts from different gut regions, as in Figure 1, should be treated with caution since the anterior midgut contents are largely composed of the residual blood meal and therefore it is difficult to evaluate how much to dilute this sample to be “equivalent” to the anterior or posterior midgut walls. Thus, the protein concentration in the anterior midgut contents was 18 times higher than in the posterior midgut, and assuming that part of this protein can be related

to the amount of AMPs present, then this may explain the stronger antibacterial activity detected in the anterior midgut tissues. The results showing that the most abundant AMP encoding mRNAs were present in the anterior midgut, namely, *LysA*, *LysB*, *DefC*, seem to confirm the elevated antimicrobial activity recorded. In addition, the inhibition of antibacterial activity observed in the anterior midgut content treated with trypsin or incubated at 100°C indicate that AMPs and lysozymes are the molecules involved [40]. Nevertheless, it is unlikely that all the antimicrobial activity recorded derived solely from these peptides since reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) have been detected previously [21,41,50].

Regarding the results of insects fed with blood plus bacteria, this altered the pattern of antibacterial activity *in vitro* in the midgut. Feeding the insect with *S. aureus* increased the antibacterial activity against *S. aureus* in the anterior midgut and feeding the insect with *E. coli* enhanced the activity against *S. aureus* in the posterior midgut. These findings suggest that *R. prolixus* modulates antibacterial activity upon ingestion of bacteria with patterns that are distinct and dependent upon the species of bacteria present.

The results with mRNA expression showed that the *E. coli* infected insects 1 DAF expressed more *LysA* in the posterior midgut than naive insects, which may contribute to the increase in antibacterial activity against *S. aureus* observed in the posterior midgut at 7 DAF (compare Figure 4D with Figure 7B). In addition, *S. aureus* infection enhanced the anterior midgut activity against *S. aureus in vitro* and *S. aureus* infected insects showed a significantly higher *DefA*, *DefB* and *LysA* transcription abundance 1 DAF (compare Figure 4B with Figure 5A, C and Figure 7A). The significant increase in the abundance of these AMP mRNAs observed at 1 DAF may reflect an increase in antibacterial activity through to 7 DAF. This seems likely as the antibacterial activity recorded in the blood-fed controls continues to increase from 1, to 5 to 7 DAF. The enhanced *DefA*, *DefB* and *LysA* levels may explain the increase of antibacterial activity against *S. aureus* in the anterior midgut, since the respective peptides possess activity mainly against Gram-positive bacteria. Possibly other unknown *R. prolixus* antimicrobial peptides could also be responsible for the antibacterial activities observed.

In *R. prolixus*, lysozymes are involved in the digestion of polysaccharides of the symbiont *Rhodococcus rhodnii* [51]. These lysozymes may also play a role in the insect immune response [52,53]. *LysA* and *LysB* seem to have different roles in different compartments of the gut. *LysA* is expressed predominantly in the midgut and *LysB* in the fat body [31]. The rapid increase in *LysB* mRNA levels and, to a lesser extent *LysA*, in both tissues suggest a role in *R. prolixus* digestion, although a function in response to bacterial multiplication in the gut following a blood meal is also likely, as observed in other triatomines like *Triatoma infestans* and *Triatoma brasiliensis* [31,54,55]. Although phylogenetic analyses indicate that *R. prolixus LysA* groups with lysozymes that play a digestive role in other triatomine bugs [31,54,55], our results showed that *LysA* was strongly induced after *S. aureus* feeding and it was also possible to detect a slight increase of *LysA* after infection with *E. coli*, indicating also an immunological role for this lysozyme. Previous results with *Lutzomyia longipalpis* and *Galleria mellonella* have shown that there is a synergistic effect between lysozymes and other AMPs which enhances immune responses against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [56,57]. In *R. prolixus*, synergistic effects between AMPs and lysozymes might occur as well.

Insect defensins have major activities against Gram-positive bacteria [58], but also can act against Gram-negative forms [59]. A previous study – based on structural properties – showed a high similarity between *R. prolixus DefA* and *DefB* while *DefC* differed significantly, forming two distinct groups after a phylogenetic analysis [60]. These authors suggested that the various defensins have

different functions. In the present study, the analysis of transcript abundance also showed significant differences between the three *R. prolixus* defensins. In insects fed with *S. aureus* both *DefA* and *DefB* were significantly upregulated while *DefC* abundance increased only after *E. coli* infection. In unfed bugs and bugs fed solely on blood, *DefC* was the most abundant defensin transcript in the anterior midgut. The fact that in starved insects only *DefC* transcripts are abundant indicates a role of *DefC* in symbiont control whereas the upregulation of *DefA/B* after infections with unfamiliar microbes suggests a probable function of these gene products in the control of bacterial invasion. Regarding previous work, a common bacterial species found in *R. prolixus* gut was a Gram-negative bacterium, *S. marcescens* [61] and together with our findings about *DefC*, this reinforces the idea that this defensin may also play a role in the regulation of Gram-negative bacteria. As observed previously in *L. longipalpis*, high levels of defensin could be explained by microbiota control before adult emergence [62]. In *R. prolixus* fifth-instar nymphs moult to adults following a blood meal so that the high *DefC* levels could also be related to metamorphosis. Insect metamorphosis, however, is characterised not only by the need to control microbial expansion but also to mediate developmental processes and defensins have been shown to play dual roles both in immunity and development [63].

The blood meal also induces an increase of prolixicin encoding mRNA in the posterior midgut. Prolixicin, recently isolated from *R. prolixus* midgut and fat body, is a glycine-containing peptide, which is upregulated in fat body after bacterial or *Trypanosoma cruzi* haemocoel injection. The purified protein has a strong action against Gram-negative bacteria [37]. However, in the present work, prolixicin encoding gene was down-regulated in the midgut after feeding *R. prolixus* with blood containing *E. coli*. Further analyses will be necessary to clarify whether or not prolixicin is related to other microorganisms in the midgut, like e.g. different bacterial species, fungi or viruses.

In *R. prolixus*, the microbiota grows exponentially until eight days after blood feeding and thereafter decreases [50,64]. This might explain why a higher expression of peptides occurs on 7 DAF. Since AMPs may have a central role in the control of bacterial populations in the midgut. This would also explain the higher expression of the AMP encoding mRNAs and AMPs in the anterior midgut than in the posterior midgut since the anterior midgut, including the lumen, is the site of the bacterial bloom resulting from the blood meal. The anterior midgut may be a more suitable environment for lysozymes while prolixicin would control bacterial expansion in the posterior midgut.

The activation of immune responses in insects is regulated mainly by two intracellular pathways, the Toll and

the IMD pathways [65,66], that control the expression of most genes encoding the AMPs. Gram-positive bacterial infection activate the Toll pathway while Gram-negative bacteria infection induces the IMD pathway [67]. In the present work, different types of bacterial infection induced the expression of different types of AMPs in insect's midgut. Thus, AMP encoding genes induced by *S. aureus* (*DefA*, *DefB*, *Prol*) and *E. coli* (*DefC*) infections could be under different induction pathways.

Conclusion

Studies of the activation of immune responses in the gut become more relevant than those responses triggered by artificial inoculation in the body cavity of the insect, since these events occur less frequently in nature [67]. Insects and other animals live in a complex relationship with microorganisms [68] and the study of transcriptional control of AMPs can extend the understanding of how insects manage microbiota interactions and are still able to mount an efficient immune response against possible ingested pathogens.

Additional files

Additional file 1: Antibacterial activity of anterior midgut contents and posterior midgut of *Rhodnius prolixus* (7 DAF) tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The activity was measured as colony forming units (CFU/ml) after 19 hours of incubation. Values represent the means \pm SD of 9 pools using 3 insects (n = 27) in triplicate wells.

Additional file 2: Antibacterial activity from *R. prolixus* anterior midgut fed on normal blood and washed erythrocytes with inactivated plasma. Antibacterial activity was measured by turbidometric assay (TB) (OD₅₅₀ nm) with readings from hour 0 to hour 20 of incubation in plate assay. **A:** Activity against *E. coli*. **B** – Activity against *S. aureus*. Treatments: ■ bacteria incubated with content of anterior midgut from insects fed on blood; ● bacteria incubated with anterior midgut from insects fed on inactivated plasma (IP) blood; ◆ bacteria incubated with posterior midgut from insects fed on blood. ▲ bacteria incubated with posterior midgut from insects fed on erythrocytes with inactivated plasma (IP) blood. Values represent the means \pm SD of 9 pools using 3 insects each (n = 27) in triplicate wells. Statistical analysis was carried out using two way ANOVA.

Additional file 3: Antibacterial activity of anterior midgut of *Rhodnius prolixus* at 7 days after blood meal. Antibacterial activity detected by turbidometric assay (TB) (OD₅₅₀ nm) after 19 hours of incubation of anterior midgut samples with different bacteria. **A** – Antibacterial activity against *Escherichia coli*. **B** – Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Treatments: Black column - incubated with untreated anterior midgut; grid column - bacteria incubated with anterior midgut treated 24 hours with trypsin; striped column - bacteria incubated with anterior midgut heated at 100°C; Values represent the means \pm SD of three replicates. Asterisks relates to significant differences (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) obtained after data statistical analyses in comparison to control using one way ANOVA and Mann Whitney test.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CSV, PJW, DPC, PA, NAR, ESG and CBM designed the study protocols and drafted the manuscript; CSV, DPM and DPC carried out the antibacterial activity experiments; CSV, PJW, DPM and DPC performed the molecular

experiments. All authors analyzed the data, revised the article, approved the version to be published and are the guarantors of the paper.

Funding

The authors thank CNPq, FAPERJ, PROPPI-UFF, PDTIS/FIOCRUZ and PAPESV project to PA for financial support. PA and ESG are Senior Scientists from CNPq. PJW is a FIOCRUZ-CNPq research fellow (310012/2012-0). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

²Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF) Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. ³College of Science, Swansea University, Swansea, Wales, UK.

⁴Departamento de Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 6 January 2014 Accepted: 12 May 2014

Published: 20 May 2014

References

1. Wigglesworth VB: *The principles of insect physiology*. London: Methuen & Co.; 1939.
2. Whitcomb RF, Shapiro M, Granados RR: **Insect defense mechanisms against microorganisms and parasitoids**. In *The Physiology of Insecta, Volume 5*. 2nd edition. Edited by Rockstein M. New York: Academic Press; 1974:447–536.
3. Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R, Boman HG: **Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae**. *Eur J Biochem* 1982, **127**:207–217.
4. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA: **Phylogenetic perspectives in innate immunity**. *Science* 1999, **284**:1313–1318.
5. Bulet P, Stocklin R: **Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation**. *Protein Pept Lett* 2005, **12**:3–11.
6. Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA: **The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:862–874.
7. Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Genta FA, Azambuja P: ***Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus***. *Parasit Vectors* 2009, **2**:33.
8. Carter V, Hurd H: **Choosing anti-*Plasmodium* molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides**. *Trends Parasitol* 2010, **26**:582–590.
9. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C: **Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites**. *Trends Parasitol* 2006, **22**:262–268.
10. Ratcliffe NA, Whitten MMA: **Vector immunity in microbe-vector interactions**. In *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Edited by Gillespie SH, Smith GL, Osbourn A. Cambridge: Cambridge University Press; 2004:199–262.
11. Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L: **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences**. *Immunol Rev* 2004, **198**:249–266.
12. Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA: **Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi***. *Trends Parasitol* 2010, **26**:499–505.
13. Dillon RJ, Dillon VM: **The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions**. *Annu Rev Entomol* 2004, **49**:71–92.
14. Schaub GA: **Interactions of trypanosomatids and triatomines**. *Adv Insect Phys* 2009, **37**:177–242.
15. Koropatnick TA, Engle JT, Apicella MA, Stabb EV, Goldman WE, McFall-Ngai MJ: **Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism**. *Science* 2004, **306**:1186–1188.
16. Dale C, Moran NA: **Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts**. *Cell* 2006, **126**:453–465.
17. Feldhaar H, Gross R: **Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists**. *Microbes Infect* 2008, **10**:1082–1088.
18. Lee WJ: **Bacterial-modulated signaling pathways in gut homeostasis**. *Sci Signal* 2008, **1**:e24.

19. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G: **The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000098.
20. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G: **Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000423.
21. Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P: **Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae)—a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, **105**:605–610.
22. Dias JC, Prata A, Schofield CJ: **Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, **35**:669–678.
23. Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P: **Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions.** *J Insect Physiol* 2007, **53**:11–21.
24. Gonzalez MS, Hamed A, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NF, De Souza W, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES, Mello CB: **Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*.** *Exp Parasitol* 2006, **114**:297–304.
25. Lowenberger CA, Ferdig MT, Bulet P, Khalili S, Hoffmann JA, Christensen BM: ***Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*.** *Exp Parasitol* 1996, **83**:191–201.
26. Lowenberger C: **Innate immune response of *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**:219–229.
27. Vizioli J, Richman AM, Uttenweiler-Joseph S, Blass C, Bulet P: **The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes.** *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**:241–248.
28. Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, Hoffmann JA, Miller LH: ***Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin.** *Exp Parasitol* 1998, **89**:103–112.
29. Possani LD, Zurita M, Delepierre M, Hernandez FH, Rodriguez MH: **From noxiustoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*.** *Toxicon* 1998, **36**:1683–1692.
30. Rodriguez MC, Zamudio F, Torres JA, Gonzalez-Ceron L, Possani LD, Rodriguez MH: **Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*.** *Exp Parasitol* 1995, **80**:596–604.
31. Ursic-Bedoya RJ, Nazari H, Cooper D, Triana O, Wolff M, Lowenberger C: **Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease.** *J Insect Physiol* 2008, **54**:593–603.
32. Hultmark D: **Insect lysozymes.** In *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Edited by Jollès P. Basel: Birkhäuser Verlag; 1996:87–102.
33. Grunclova L, Fouquier H, Hypsa V, Kopacek P: **Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation.** *Dev Comp Immunol* 2003, **27**:651–660.
34. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D: **Antimicrobial peptides in insects; structure and function.** *Dev Comp Immunol* 1999, **23**:329–344.
35. Ganz T: **Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:710–720.
36. Zhou J, Liao M, Ueda M, Gong H, Xuan X, Fujisaki K: **Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*.** *Peptides* 2007, **28**:1304–1310.
37. Ursic-Bedoya R, Buchhop J, Joy JB, Durvasula R, Lowenberger C: **Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*.** *Insect Mol Biol* 2011, **20**:775–786.
38. Azambuja P, Garcia ES: **Care and maintenance of triatomine colonies.** In *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a Methods Manual*. Edited by Crampton JM, Beard CB, Louis C. London: Chapman and Hall; 1997:56–64.
39. Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S: **The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study.** *J Tissue Viability* 1999, **9**:127–132.
40. Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA: **Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *Microbes Infect* 2004, **6**:1297–1304.
41. Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N: **Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**:440–452.
42. Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C: **Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease.** *Insect Biochem Mol Biol* 2003, **33**:439–447.
43. Majerowicz D, Alves-Bezerra M, Logullo R, Fonseca-de-Souza AL, Meyer-Fernandes JR, Braz GR, Gondim KC: **Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae).** *Insect Mol Biol* 2011, **20**:713–722.
44. Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araujo RN: **Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:128.
45. Waniek PJ, Pacheco Costa JE, Jansen AM, Costa J, Araújo CAC: **Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization, expression pattern and zymography.** *J Insect Physiol* 2012, **58**:178–187.
46. Ribeiro JMC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO, Majerowicz D, Medeiros M, Koerich L, Terra WR, Ferreira C, Pimentel AC, Bisch PM, Leite DC, Diniz MMP, Vianez Junior JSG, Da Silva ML, Araujo RB, Gandara ACP, Brosson S, Salmon D, Bousbata S, González-Caballero N, Silber AM, Alves-Bezerra M, Gondim KC, Silva-Neto MAC, Atella GC, Araujo H, Dias FA, et al: **An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2014, **8**:e2594.
47. Lehane MJ: **Peritrophic matrix structure and function.** *Annu Rev Entomology* 1997, **42**:525–550.
48. Lehane MJ: ***The Biology of Blood-sucking in Insects*.** 2nd edition. Cambridge; New York: Cambridge University Press; 2005.
49. Terra WR: **Evolution of digestive system of insects – review.** *Annu Rev Entomol* 1990, **35**:181–200.
50. Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES: ***Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development.** *PLoS One* 2012, **7**:e36591.
51. Ribeiro JMC, Pereira MEA: **Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*.** *Insect Biochem* 1984, **14**:103–108.
52. Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA, Warthen JD: **Immune-Depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor azadirachtin.** *J Insect Physiol* 1991, **37**:771–777.
53. Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P: ***Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*.** *J Invertebr Pathol* 1995, **65**:261–268.
54. Kolliere AH, Fechner S, Waniek PJ, Schaub GA: **Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*.** *Arch Insect Biochem Physiol* 2003, **53**:134–145.
55. Araújo CAC, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM, Schaub GA: **Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2006, **36**:547–560.
56. Nimmo DD, Ham PJ, Ward RD, Maingon R: **The sandfly *Lutzomyia longipalpis* shows specific humoral responses to bacterial challenge.** *Med Vet Entomol* 1997, **11**:324–328.
57. Zdybicka-Barabas A, Staczek S, Mak P, Skrzypiec K, Mendyk E, Cytrynska M: **Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1828**:1449–1456.
58. Bulet P, Cociancich S, Reuland M, Sauber F, Bischoff R, Hegy G, Van Dorsselaer A, Hetru C, Hoffmann JA: **A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata).** *Eur J Biochem* 1992, **209**:977–984.
59. Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann JA, Bulet P: **Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity.** *J Biol Chem* 1999, **274**:9320–9326.
60. Waniek PJ, Castro HC, Sathler PC, Miceli L, Jansen AM, Araújo CAC: **Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): gene expression and peptide-structure modeling.** *J Insect Physiol* 2009, **55**:840–848.
61. Da Mota FF ML, Moreira CJ, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, Carels N, Azambuja P: **Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**:e1631.

62. Telleria EL, Sant'Anna MR, Alkurbi MO, Pitaluga AN, Dillon RJ, Traub-Cseko YM: **Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*.** *Parasit Vectors* 2013, **6**:12.
63. Natori S, Shiraiishi H, Hori S, Kobayashi A: **The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis.** *Dev Comp Immunol* 1999, **23**:317–328.
64. Azambuja P, Feder D, Garcia ES: **Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector.** *Exp Parasitol* 2004, **107**:89–96.
65. De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B: **The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*.** *EMBO J* 2002, **21**:2568–2579.
66. Lemaitre B, Hoffmann J: **The host defense of *Drosophila melanogaster*.** *Annu Rev immunol* 2007, **25**:697–743.
67. Charroux B, Royet J: ***Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract.** *Fly* 2010, **4**:40–47.
68. Hooper LV, Macpherson AJ: **Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:159–169.

doi:10.1186/1756-3305-7-232

Cite this article as: Vieira et al.: Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:232.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

