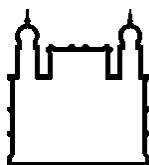


MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Parasitária

Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota.

KATE KATHERINE DA SILVA BATISTA GOMES

Rio de Janeiro -RJ
Março / 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária

Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos

Kate Katherine da Silva Batista Gomes

Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*:
função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota.

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária da Fundação Oswaldo Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária”

Orientadora: Prof. Dr. Daniele Pereira de Castro

Rio de Janeiro - RJ

Março / 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

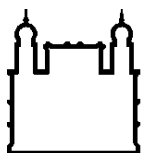
G633 Gomes, Kate Katherine da Silva Batista

Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota / Kate Katherine da Silva Batista Gomes. – Rio de Janeiro, 2016.
xiv, 69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.
Bibliografia: f. 57-69

1. *Rhodnius prolixus*. 2. Imunologia de insetos. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Microbiota. 5. Doença de Chagas. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota.

KATE KATHERINE DA SILVA BATISTA GOMES
ORIENTADORA: Dra. DANIELE PEREIRA DE CASTRO

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária”

Comissão examinadora:

Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez– UFF/RJ

Profa. Dra. Daniela de Pita Pereira – IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Prof. Dr. Felipe de Mello Vigoder – UFRJ/RJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 28 de março de 2016

À minha mãe, Deise, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Daniele Castro, pela preciosa orientação no mestrado, pela dedicação e confiança sobretudo por todos os ensinamentos valiosos para a vida inteira. Em você, me espelho.

Ao Dr. Peter Waniek, pela orientação, por toda paciência e completas explicações em bancada, igualmente à sua esposa Catarina Araújo pelo carinho e ajuda na reta final.

À Dra. Cecília, pela amizade, ensinamentos e pelo socorro prestado em muitas horas.

À Dra. Patrícia Azambuja, pelas valiosas sugestões e apoio.

Aos membros da banca doutores Marcelo Gonzalez, Otacílio Moreira e Rafaela Bruno pela importante contribuição com o trabalho, em especial à Dra. Rafaela Bruno, que também contribuiu com muito carinho com a revisão do trabalho. E também aos membros suplentes, Dra Daniela Pereira e Felipe Vigoder.

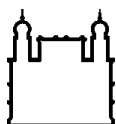
À toda equipe do Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária à CAPES, CNPq, FAPERJ, INCT, por tornar tudo isso possível.

À todos os meus companheiros de laboratório, estudantes, técnicos, às secretarias Lindaura e Fernanda, e aos pesquisadores do LABFISI, pessoas com quem aprendi e aprendo infinitamente, vocês são minha segunda família. E também, aos companheiros do laboratório vizinho (LABIMDOE), em especial à Paulinha Finamore, pessoa que contagia com a energia positiva todos os dias.

À toda minha turma de mestrado, pela união e incentivo mútuo. Lutamos e comemoramos juntos, desde os primeiros dias e que seja assim até a eternidade. A melhor turma dentre os 40 anos da Biologia Parasitária.

Agradecimento especial à minha família, em primeiro lugar à minha mãe, Deise, por ser meu exemplo, por ter me ensinado o mais importante, lutar pelos meus sonhos. Aos meus irmãos David e Walter por serem sempre meus melhores amigos. Ao meu marido Luís Fernando, por sempre estar do meu lado, torcendo por mim. Aos meus tios Queli e Lúcio pelo apoio no início dessa jornada e sempre.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me apoiaram em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

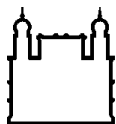
Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Kate Katherine da Silva Batista Gomes

O desenvolvimento completo de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado depende de muitos fatores, dentre os quais as respostas imunes, como a produção de espécies reativas de nitrogênio, e o crescimento de bactérias no trato intestinal dos insetos, são os principais. Assim, investigamos os efeitos de espécies reativas de nitrogênio no inseto vetor, *Rhodnius prolixus*, sobre a infecção por *T. cruzi*, a microbiota bacteriana intestinal e sinalização de outras respostas imunes no inseto. Para isto, tratamos ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* com L-arginina, o substrato para a produção de espécies reativas de nitrogênio, e L-NAME, o composto análogo que inibe a ação da óxido nítrico sintase. Ambos os compostos foram administrados oralmente por alimentação e por inoculação na hemocele dos insetos. Os efeitos dos tratamentos sobre as diferentes respostas imunológicas em diferentes tecidos de insetos infectados ou não com *T. cruzi* Dm28c e efeito sobre a quantidade de bactérias cultiváveis da microbiota intestinal foram analisados. L-arginina aumentou a produção de óxido nítrico, reduziu a quantidade de parasitas, aumentou a quantidade de bactérias e diminuiu a atividade antibacteriana contra *Serratia marcescens* no trato digestivo dos insetos tratados por via oral. A inoculação da droga na hemocele, diminuiu a expressão do gene da óxido nítrico sintase induzível um dia após a aplicação e aumentou a expressão do peptídeo antimicrobiano, defensina C no intestino um dia após a inoculação. No entanto, o tratamento oral com a L-NAME, resultou em menor produção de óxido nítrico na hemolinfa, um aumento do número de parasitas e redução de atividade fenoloxidase no trato digestivo dos insetos. Após a inoculação de L-NAME, observou-se uma menor expressão de sintase de óxido nítrico e aumento da expressão de defensina C na gordura corporal. Conclui-se que o óxido nítrico desempenha um papel fundamental na modulação da imunidade de insetos, que influencia a interação entre o parasita, a microbiota e fisiologia do inseto



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Immune response of *Rhodnius prolixus* to infection by *Trypanosoma cruzi*: role of reactive nitrogen species on interaction in the parasite, vector and microbiota

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Kate Katherine da Silva Batista Gomes

The whole development of *Trypanosoma cruzi* in the invertebrate host depends on many factors, from which the immune responses such as the production of reactive nitrogen species and the growth of bacteria found in the intestinal tract of the insects are the principal. Thus, we investigated the effects of reactive nitrogen species in the insect vector, *Rhodnius prolixus*, on the infection of *T. cruzi*, the intestinal bacterial microbiota and signaling of other insect immune responses. Therefore, we treated fifth stage nymphs of *R. prolixus* with L-arginine, the substrate for production of reactive nitrogen species and L-NAME, the analogue compound that inhibits the action of nitric oxide synthase. Both compounds were given orally by feeding and by inoculation in the hemocele of the insects. The effects of treatments on different immune responses in different tissues of insects infected or not with *T. cruzi* Dm28c and effect on the amount of cultivable bacteria of the intestinal microbiota were analyzed. L-arginine increased nitric oxide production, reduced the amount of parasites, increased the amount of bacteria and decreased the antibacterial activity against *Serratia marcescens* in the digestive tract of the insects orally treated. The inoculation of the drug in the hemocoel, decreased the gene expression of inducible nitric oxide synthase one day after application and increased the expression of the antimicrobial peptide, defensin C in the intestine one day after inoculation. However, the oral treatment with L-NAME, resulted in lower production of nitric oxide in the hemolymph, an increase of the parasite number and reduction of phenoloxidase activity in the digestive tract of the insects. After the inoculation of L-NAME, we observed a lower expression of the nitric oxide synthase and increased expression of defensin C in the fat body. We conclude that nitric oxide plays a fundamental role in insect immunity modulation, influencing the interaction between the parasite, the microbiota and the insect physiology.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Rhodnius prolixus	1
1.1.1. Microbiota intestinal	2
1.2. Trypanosoma cruzi.....	3
1.3. Sistema imune dos insetos	5
1.3.1. Imunidade celular	6
1.3.2. Imunidade humoral	7
1.3.2.1. Atividade de fenoloxidase	7
1.3.2.2. Peptídeos antimicrobianos.....	8
1.3.2.3. Espécies reativas de oxigênio.....	10
1.3.2.4. Espécies reativas de nitrogênio	11
II. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos gerais	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Manutenção da colônia de Rhodnius prolixus	16
3.2. Manutenção de culturas de Trypanosoma cruzi cepa DM28c.....	16
3.3. Alimentação, infecção e tratamentos de Rhodnius prolixus	16
3.3.1. Infecção	16
3.3.2. Tratamentos – via oral	17
3.3.3. Tratamentos – via inoculação	17
3.4. Mortalidade e ecdise em insetos tratados por inoculação.....	18
3.5. Quantificação de Trypanosoma cruzi nos insetos.....	18
3.6. Quantificação da população de bactérias da microbiota intestinal	18
3.7. Ensaio de respostas imunológicas.....	18
3.7.1. Quantificação de espécies reativas de nitrogênio	18
3.7.2. Atividade da enzima fenoloxidase	19
3.7.3. Atividade antibacteriana (Turbidimetria).....	20
3.7.4. Abundância relativa da expressão de AMPs e NOS	20

3.7.4.1. Análise da abundância de mRNA codificante para NOS por transcriptase reversa (RT)-PCR	21
3.7.4.2. Análise da abundância do mRNA codificante para <i>DefC</i> , <i>Prol</i> e <i>NOS</i> por PCR quantitativo (qPCR).....	22
IV. RESULTADOS.....	24
4.1. Quantidade de parasitas	24
4.2. Quantificação de Nitrito	27
4.3. Quantificação de óxido nítrico	33
4.4. Microbiota (C.F.U.).....	35
4.6. Atividade antibacteriana	38
4.7. Expressão da enzima óxido nítrico sintase por RT-PCR semi-quantitativo	40
4.8. Mortalidade em insetos tratados por inoculação	41
4.9. Avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos e óxido nítrico sintase por PCR quantitativo	45
4.9.1. No corpo gorduroso	45
4.9.2. No intestino médio anterior.....	47
V. DISCUSSÃO	49
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs - Peptídeos antimicrobianos
BHI - Meio de cultura de infusão de cérebro e coração
cdNA - DNA complementar
CFU - Unidade formadora de colônia
defA - Gene codificante do peptídeo defensina A
defB - Gene codificante do peptídeo defensina B
defC - Gene codificante do peptídeo defensina C
DOPA - Diidroxifenilalanina
DTU – Unidades discretas de tipagem (*Discrete typing units*)
kDa - Kilodaltons
kDNA - DNA do cinetoplasto
L-NAME - L-Nitro arginina metil éster
LPG - Lipofoglicano
LPS - Lipopolissacarídeos
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ON - Óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
NOS - Óxido nítrico sintase
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PAP - Protease ativadora da profenoxidase
PBS - Tampão salino-fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PGN - Peptidoglicano
PGRP - Proteína reconhecedora de peptidoglicanos
PO - Fenoxidase
PPO - Profenoxidase
Prol - Gene codificante do Peptídeo antimicrobiano prolixicina
PRP - Proteínas de reconhecimento padrão
qPCR - PCR quantitativo em tempo real
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
DOPA
rRNA - RNA ribossômico
RT - Transcrição reversa
SFB - Soro Fetal Bovino
TB - Turbidimetria
TSB - Meio de cultura caldo triptona de soja

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros (Azambuja & Garcia 2005)	5
Figura 2: Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO-Sintase (Feldman <i>et al.</i> , 1992)	12
Figura 3: Via de síntese de óxido nítrico. Arginases competem com a NOS pelo mesmo substrato. (Rivero, 2006)	12
Figura 4: Número de parasitas no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c e tratados com L-NAME e L-arginina.	25
Figura 5: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio anterior de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).....	28
Figura 6: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio posterior de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> após diferentes dias de alimentação (9 e 13 dias).....	29
Figura 7: Quantificação de nitrito em amostras de hemolinfa de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).	30
Figura 8: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio anterior, intestino médio posterior e hemolinfa de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).....	32
Figura 9: Quantificação de óxido nítrico em amostras de diferentes tecidos de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> 9 dias após a alimentação.	34
Figura 10: Quantificação das unidades formadoras de colônia de bactérias presentes no trato digestório de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> 8 dias após alimentação.	36
Figura 11: Atividade da enzima fenoloxidase em amostras de trato digestório de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> no 8º dia após a alimentação.	37
Figura 12: Atividade antibacteriana em amostras de trato digestivo de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> em diferentes dias após a alimentação.....	39
Figura 13: Abundância relativa do gene que codifica a óxido nítrico sintase em ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> em diferentes dias após a alimentação e em diferentes tecidos.	40

Figura 14: Porcentagem de sobrevivência de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> diferentes dias após inoculação com diferentes doses de L-NAME e L-arginina.....	42
Figura 15: Morfologia de insetos inoculado com 0,5µL de L-arginina a 0,36mg/µL..	44
Figura 16: Expressão relativa do mRNA codificante de <i>NOS</i> , <i>defC</i> e <i>prol</i> no corpo gorduroso de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculadas L-NAME ou L-arginina.....	46
Figura 17: Expressão relativa do mRNA codificante de <i>NOS</i> , <i>defC</i> e <i>prol</i> no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculadas L-NAME ou L-arginina.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Origem geográfica e biológica de diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas respectivas DTUs (Adaptado de Higuera <i>et al</i> , 2013)	4
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de qPCR	21
Tabela 3: Porcentagem de ninfas de 5° estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c e tratadas por via oral ou inoculação com os compostos L-NAME e L-arginina em diferentes concentrações.	26
Tabela 4: Mortalidade de insetos tratados com L-NAME e L-arginina via inoculação	41
Tabela 5: Taxa de alimentação em ninfas de 5° estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculados um dia antes ou no mesmo dia da alimentação sanguínea com solução salina, L-NAME ou L-arginina.	43
Tabela 6: Alterações de desenvolvimento em ninfas de 5° estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculadas com L-NAME e L-arginina em diferentes doses.	44

I. INTRODUÇÃO

1.1. *Rhodnius prolixus*

Rhodnius prolixus Stal, 1859, é um inseto pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, e subfamília Triatominae. Possui desenvolvimento hemimetábolo pois apresenta ciclo de vida indireto: passando por 5 estádios de ninfa que se assemelham ao adulto, porém, não apresentando asas, sendo a cada passagem de estágio ao outro, necessário a troca do exoesqueleto por um novo, em um processo conhecido como muda ou ecdise (Wigglesworth, 1972).

A hematofagia como hábito alimentar de triatomíneos, em todos os seus ciclos de vida além de fatores relacionados a co-evolução na interação parasita-vetor, os torna vetores do agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (Garcia *et al* 1991). Somente cerca de 20 espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são relevantes vetores de *T. cruzi* a seres humanos e dentre eles se destacam *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *R. prolixus*. (Gourbière *et al.*, 2012).

R. prolixus tem sido usado como importante modelo de estudo em fisiologia de triatomíneos pois além de apresentar importância na disseminação da doença de Chagas, também apresenta facilidade de manutenção em laboratório. Esta facilidade está associada à sua fácil adaptação à alimentação artificial, aceitando adição de drogas e culturas, sendo suas condições de melhor desenvolvimento temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade $65\% \pm 5$ (Azambuja *et al*, 1991a, Garcia *et al*, 1975).

Sua distribuição geográfica é abrangente, *R. prolixus* é o principal vetor na Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela, de onde acredita-se ter disseminado para países da América Central, com exceção do Panamá e Costa Rica (Guhl, 2007). No Brasil, o inseto apresenta distribuição amazônica principalmente (Monteiro *et al.*, 2003). Hoje, 7 milhões de pessoas se encontram infectadas, estando 90 milhões de pessoas possivelmente expostas ao parasita *T. cruzi*, e a principal forma de transmissão no Brasil hoje, é oral, sendo vetorial em muitos países (WHO, 2015).

1.1.1. Microbiota intestinal

Os insetos são a classe do reino animal mais diversa e abundante, em número de espécie, nos hábitos ecológicos, e em biomassa (Basset *et al.*, 2012). Apresentam uma diversificada comunidade composta por diferentes microrganismos, que constitui sua microbiota (Dillon *et al.*, 2010). Em insetos vetores de doenças, a microbiota pode influenciar a capacidade vetorial e o fitness do inseto (Ricci *et al.*, 2012).

A microbiota intestinal de triatomíneos é composta por tripanossomatídeos, bactérias, fungos e vírus. Até o presente momento, os únicos protozoários observados habitando a microbiota de *R. prolixus* eventualmente, são *T. cruzi* e *T. rangeli* (Flores-Villegas *et al.*, 2015). Um estudo da composição fúngica da microbiota do trato digestivo de quatro espécies de triatomíneos, *R. prolixus*, *R. neglectus*, *Diptelanogaster maximus* e *Panstrongylus megistus*, demonstra que os gêneros com o maior número de espécies encontradas foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium* e *Cladosporium*. Para *R. prolixus*, destaca-se *Aspergillus versicolor* (Moraes *et al.*, 2004). O único vírus conhecido por infectar triatomíneos é o *Triatoma virus* (TrV). A descoberta de TrV foi desencadeada pela morte de ninfas quinto de *T. infestans* após a alimentação (Muscio *et al.*, 1987).

O grupo majoritário na microbiota intestinal de triatomíneos é o de bactérias que se multiplicam rapidamente logo após a ingestão de sangue (Azambuja, *et al.* 2004). Estas, entram em contato com microrganismos por coprofagia e por contato direto com o meio ambiente (Sassera *et al.*, 2013). As bactérias apresentam diversas funções, por exemplo, participação no metabolismo de triatomíneos em uma relação mutualística, produzindo, por exemplo vitamina B, e fornecendo outros nutrientes por serem digeridas diretamente (Beard *et al.*, 2002; Sassera *et al.*, 2013).

A importância de bactérias no trato digestivo de *R. prolixus* foi descrita pela primeira vez por Duncan (1926) quando foi observada a colonização por um bacilo gram-positivo. Em 1936, Wigglesworth encontrou um bacilo differóide nos intestinos médios de *R. prolixus*, *Triatoma rubrofasciata*, *T. infestans* e *T. flavida*. Este bacilo foi chamado de *Actinomyces rhodnii* (Erikson, 1935), e mais tarde re-classificada no gênero *Nocardia* e, finalmente, para o gênero *Rhodococcus* (Tsukamura, 1974; Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 1988). Mais tarde, Figueiredo e colaboradores (1995) identificaram diferentes espécies de bactérias como *Enterobacter cloacae*, *Serratia*

marcescens, e *Enterococcus faecalis* em *T. infestans*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus* e *R. prolixus*. Recentemente, diferentes trabalhos têm mostrado grande diversidade de bactérias presentes na microbiota de triatomíneos que variam dependendo de fatores fisiológicos e filogenéticos dos insetos, além de influências geográficas (Eichler & Schaub, 2002; Azambuja *et al.*, 2004; Sorfová *et al.*, 2008; Da Mota *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015; Gumiel *et al.*, 2015). Estes adquirem sua microbiota da superfície dos ovos e por coprofagia, a manutenção desta população é crucial para o desenvolvimento destes insetos (Wigglesworth, 1974;. Vallejo *et al.*, 2009). A microbiota intestinal apresenta um papel fundamental na manutenção da resposta imune basal de insetos, favorecendo a homeostase intestinal (Garcia *et al.*, 2010;. Broderick *et al.*, 2014)

Por outro lado, a administração de antibióticos na alimentação do inseto auxilia o desenvolvimento de *T. cruzi* (Castro *et al.*, 2012). Há evidências de que a composição da microbiota bacteriana de insetos pode afetar sua competência vetorial e o desenvolvimento do parasita no inseto, isso foi visto para *Anopheles gambiae* e *Plasmodium falciparum* (Tchioffo *et al.*, 2013).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

Descrito pela primeira vez em 1909, em Minas Gerais, por Carlos Chagas, foi chamado de *Schizotrypanum cruzi*, depois por *Trypanosoma cruzi*. Chagas observou sintomas de um mal que assolava a região e associou aos insetos hematófagos que se escondiam nas casas dos pacientes observados. Em seguida observou o protozoário em lâminas e o identificou como agente causador da doença de Chagas (Chagas, 1909; Chagas-Filho, 1974). O protozoário identificado, hoje, é classificado taxonomicamente na ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Pertence à seção *stercoria* de seu gênero por ser eliminado nas fezes e na urina do vetor em parte do desenvolvimento de seu ciclo de vida no tubo digestivo do inseto (Dias, 1934). Atualmente a nomenclatura de *T. cruzi* é baseada populações agrupadas em seis Unidades discretas de tipagem (DTUs: *discrete typing units*), que é um agrupamento que associa as diferentes cepas (variabilidades genéticas) com base em características geográficas e eco-epidemiológicas (Tabela 1) (Zingales, 2009; Higuera *et al.*, 2013). As diferentes DTUs diferem em sucesso de invasão no trato digestivo, por exemplo *T. cruzi* cepa Y (TcII) não consegue colonizar o intestino de

R. prolixus, enquanto a cepa Dm28c (TcI) infecta com sucesso o trato digestivo de *R. prolixus* (Mello *et al.*, 1996; Azambuja *et al.*, 2004, Zingales *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2009).

Tabela 1: Origem geográfica e biológica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* e suas respectivas DTUs (Adaptado de Higuera *et al.*, 2013)

DTU	Cepa/clone	Origem geográfica	Origem Biológica
TcI	Cutia cl1*	Espiritu Santo, Brazil	<i>Dasyprocta aguti</i>
	DM28	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
	x101	Pará, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
TcII	MAScl1*	Minas Gerais, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
	ESM	Sao Felipe, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
TcIII	M6421	Belem, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
	M5631cl5*	Marajo, Brazil	<i>Dasypus novemcinctus</i>
TcIV	Stc10r	Georgia, USA	<i>Procyon lotor</i>
	CANIII	Belem, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
	TV	Boyacá, Colombia	<i>Triatoma venosa</i>
TcV	92.80	Santa Cruz, Bolivia	<i>Homo sapiens</i>
	BUG2148cl1*	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>
TcVI	LhVa	Chaco, Argentina	<i>Triatoma infestans</i>
	Rp540	Casanare, Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>
	CLBRENER	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>

Por desenvolver-se de modo cíclico entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), *T. cruzi* é classificado como heteroxênico. Devida a alta variabilidade nos ambientes durante o ciclo, o protozoário assume diferentes tipos morfológicos que variam em forma física, composição molecular de membrana e metabolismo (Hoare, 1972; Lent & Wygodzinsky, 1979; Garcia & Azambuja, 1991).

O ciclo de *T. cruzi* se inicia com a alimentação sanguínea do triatomíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Com a ingestão do sangue contendo as formas flageladas circulantes chamados de tripomastigotas sanguíneos, em poucos dias, essas formas não multiplicativas do parasita diferenciam-se em formas multiplicativas, chamadas de epimastigotas (Figura 1A), que se dividem diversas vezes por mitose no intestino médio, aumentando a população (Figura 1B). Em seguida, se aderem na membrana perimicrovilar das células intestinais (Gonzalez *et al.* 1999).

A metaciclogênese da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica, infectiva, ocorre no reto do triatomíneo (Figura 1C). Estas formas infectantes, juntamente com epimastigotas não transformados são eliminados nas fezes e urina do inseto, geralmente, logo após outro repasto sanguíneo (Dias 1934 Azambuja *et al.* 2005; Garcia *et al.* 2007).

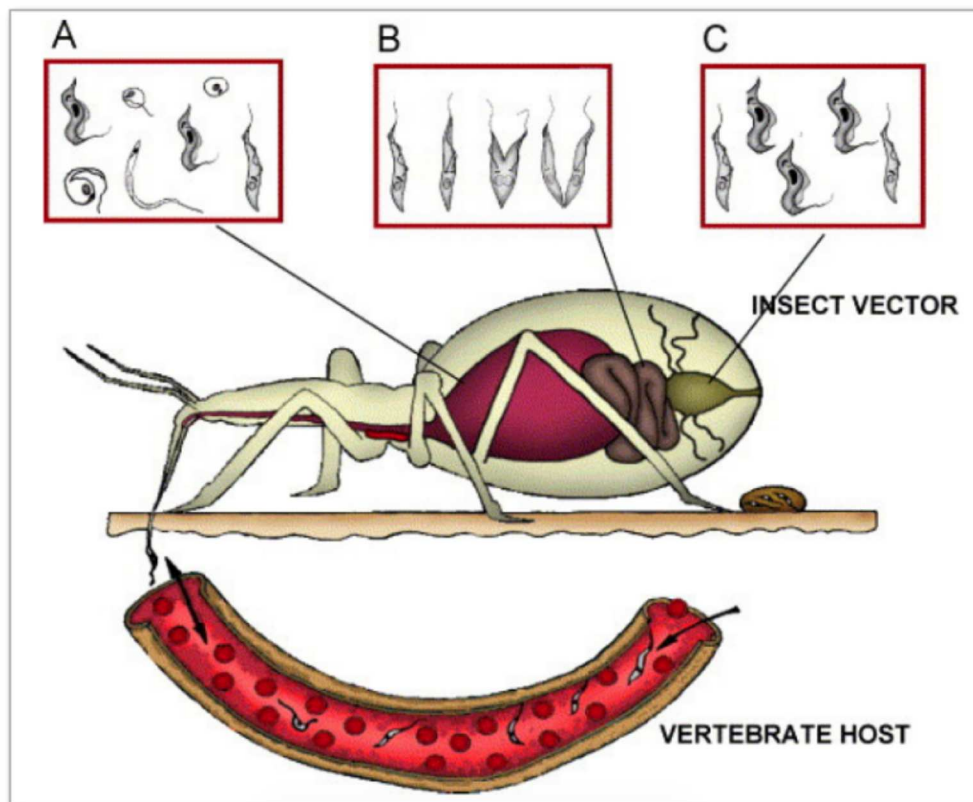


Figura 1 : Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros (Azambuja & Garcia 2005)

1.3. Sistema imune dos insetos

Os mecanismos de defesa dos insetos envolvem barreiras físicas que são sua primeira linha de defesa. Essas compreendem o rígido exoesqueleto ou cutícula externa, membrana que envolve o epitélio intestinal e as traquéias, propriedades físico-químicas da epiderme intestinal, como pH, condição redox e enzimas digestivas e de glândulas reprodutivas (Gillespie *et al.*, 1997)

Em seguida, uma infecção por microrganismos pode desencadear a ativação de diversas respostas imunológicas do sistema imune dos insetos. A ativação desse sistema se dá pelo reconhecimento através de proteínas de reconhecimento padrão

(PRPs), presentes na superfície de células e tecidos ou livre na hemolinfa, que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Gillespie *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstram que mecanismos de reconhecimento como estes, permite ao inseto responder contra patógenos mais eficientemente e em um segundo momento de modo análogo à memória imune de vertebrados (Dong *et al.*, 2006; Cisarovsky *et al.*, 2012; Nava-Sánchez *et al.*, 2015)

Uma vez que o reconhecimento tenha ocorrido, em seguida, as respostas imunes celulares e humorais são ativadas. Respostas celulares típicas são a fagocitose, a nodulação e encapsulamento, enquanto humoral incluem peptídeos antimicrobianos (AMPs), lisozimas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RNS e ROS) e atividade da fenoloxidase (PO) (Gillespie *et al.*, 1997).

1.3.1. Imunidade celular

A resposta imunológica celular de insetos, consiste em um conjunto de respostas mediadas por células presentes na hemolinfa, que são principalmente: fagocitose, nodulação (microagregação de hemócitos) e encapsulação celular, sendo que o último não foi observado em *R. prolixus* (Ratcliffe, 1985).

Hemócitos, são células circulantes presentes na hemolinfa de invertebrados originadas de órgãos hematopoiéticos (Ratcliffe, 1985, Hoffman, 1995). No geral, a classificação de hemócitos leva em consideração a funcionalidade e morfologia da célula, podendo variar em nomenclatura de acordo com a espécie estudada, mesmo exercendo funções similares, o que pode gerar controvérsia (Ribeiro e Brehelin, 2006). Os hemócitos descritos em *R. prolixus* são prohemócitos, plasmatócitos, células granulares, oenócitos, adipohemócitos e células gigantes (Azambuja *et al.*, 1991).

A fagocitose consiste na primeira resposta dos hemócitos à invasão do organismo por partículas estranhas, sendo o mecanismo de imunidade celular mais conservado dentre os seres vivos, no qual partículas estranhas são sequestradas e entram na célula fagocítica envolvendo diferentes passos como: adesão, reconhecimento, transdução de sinal, formação de pseudópodos, ingestão, fusão de lisossomos e eliminação da partícula fagocitada (Lavine & Strand, 2002; Figueiredo *et al.*, 2006). Os plasmatócitos e granulócitos estão envolvidos neste processo.

Nodulação é o processo de resposta imune celular que consiste na agregação de hemócitos, formando nódulos, constituídos por um ou mais tipos celulares que podem ser recrutados, no sentido de agregar e reter microrganismos ou materiais bióticos e abióticos estranhos (Ratcliffe & Gagen, 1977; Satyavathi *et al.*, 2014). Além de ser uma forma de contenção de patógeno muito eficiente, os nódulos podem fagocitar e depositar melanina no local da infecção pela ação da PO, o que auxilia o processo da eliminação do patógeno. (Brookman *et al.*, 1989).

1.3.2. Imunidade humoral

A imunidade humoral de insetos atua via moléculas, peptídeos ou enzimas de forma tóxica contra patógenos (Dunn, 1990; Klowden, 2007). Podemos destacar as respostas que compreendem a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais podem atuar causando danos diretos a microrganismos e seus produtos (Rivero, 2006; Whitten *et al.*, 2007); a ativação da cascata de profenoloxidase, que induz a produção de melanina, cujos produtos intermediários são tóxicos aos microrganismos (Soderhall & Cerenius, 1998; Cerenius *et al.*, 2008); e a produção de peptídeos antimicrobianos que atuam contra microrganismos de modo mais específico que os anteriores, o qual foi a primeira resposta humoral descrita para insetos, em 1982 por Hultmark, em estudos em pupas da mariposa *Hyalophora cecropia*, por isso o nome dado ao primeiro peptídeo antimicrobiano “cecropina”.

1.3.2.1. Atividade de fenoloxidase

A resposta imune por encapsulação humoral, ou sistema profenoloxidase, é um processo que leva a produção de melanina e outros compostos tóxicos ao patógeno invasor. Existem dois tipos descritos da enzima fenoloxidase (PO) em insetos, presentes na hemolinfa e produzidos por tipos específicos de hemócitos, (Söderhäll & Cerenius, 1998; González-Santoyo & Aguilar, 2012), como células cristalinas em *Drosophila* (Rizki *et al.*, 1985; Williams, 2007) e em oenócitos, em mariposas e mosquitos (Castillo *et al.*, 2006; Shrestha & Kim, 2008). O primeiro tipo trata-se de enzimas lacases, relacionado a esclerotização da cutícula após muda. O segundo, envolvido na resposta imune de insetos, possuindo atividade de

tirosinases, e de agente oxidante, capaz de oxidar difenóis em quinonas, que por sua vez sofrem reações espontâneas que as converte, em melanina (Dittmer *et al.*, 2004; Arakane *et al.*, 2005; Gorman *et al.*, 2007).

Como não se conhece uma sequência de peptídeo sinal que indique secreção da enzima fenoloxidase pelos hemócitos, acredita-se que sejam disponibilizadas após lise destas células, que pode ocorrer de forma espontânea ou após exposição a microrganismos (Ashida & Brey, 1997; Kanost & Gorman, 2008).

A ativação do sistema pode ser disparada por infecção ou injúrias teciduais, gerando mudança na conformação da enzima, tornando a capaz de catalisar reações de oxidação (Kanost & Gorman, 2008; González-Santoyo & Aguilar, 2012). Assim, a primeira protease ativadora da profenoloxidase (PAP), que se encontrava em formato de zimogênio (pro-PAP), é clivada por outras proteases, como parte da cascata proteolítica formada por serino proteases que são reguladas por serpinas.

Após a conversão da PPO em PO, tirosinas são hidroxiladas culminando na formação de diidroxifenilalanina (DOPA), que em seguida é oxidada em dopaquinona. Esta, se converte em dopacromo por uma reação não enzimática espontânea (Nappi & Vass, 1993; Nappi & Christensen, 2005). O dopacromo é descarboxilado, e seu produto 5-6 diidroxindol em seguida é oxidado formando indolquinonas, que, por sua vez, são polimerizadas em melanina (Napolitano *et al.*, 2000; Nappi & Christensen, 2005).

As reações que ocorrem ao longo da cascata 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, fungos e vírus (González-Santoyo & Aguilar, 2012)

Trabalhos recentes mostram atividade fenoxidásica no intestino de insetos, como *R. prolixus* (Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012). No entanto, a origem da PO neste tecido ainda é desconhecida.

1.3.2.2. Peptídeos antimicrobianos

A resposta imune humoral mais específica é a que envolve a síntese e a liberação de diferentes tipos de peptídeos antimicrobianos (AMP) (Bulet *et al.*, 1999). Dentre as respostas humorais de insetos, os AMPs são as moléculas efetoras mais

importantes e bem estudados, que atuam sobre distintos microrganismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários.

AMPs apresentam baixo peso molecular até 24 kDa, resistem mais à variações de temperatura que proteínas, e são tipicamente catiônicos, anfipáticos, sendo compostos, comumente por menos de 100 aminoácidos (Wang *et al.*, 2010). A característica anfipática dos AMPs permite que estes interajam com a bicamada lipídica, os tornando capazes de permear e atuar na membrana plasmática. A característica catiônica dos AMPs define sua capacidade de interagir mais seletivamente com células bacterianas e não com as células eucarióticas do hospedeiro (Graham *et al.*, 1997). As membranas de células procarióticas possuem grandes quantidades de fosfolípidios de carga negativa, como o fosfatidilglicerol e cardiolipina, enquanto as membranas de células eucarióticas são compostas por fosfolípidios zwitteriônicos, neutros, como a fosfatidilcolina e a esfingomiélna (Matsuzaki, 1999). Dessa forma, os AMPs catiônicos tendem a interagir muito mais fortemente com as membranas celulares procarióticas, de carga negativa, do que com as células eucarióticas de carga neutra.

O principal tecido responsável por produzir AMPs é o corpo gorduroso, mas, podem ser produzidos por muitos outros, como por exemplo, a glândula salivar, a traquéia e órgãos reprodutivos (Ferrandon *et al.*, 2007).

Existem grupos em que se classificam os AMPs, chamados de famílias, são elas: defensinas (Lambert *et al.*, 1989; Dimarcq *et al.*, 1990), cecropinas (Samkovlis, *et al.*, 1991), dipterocinas (Wicker *et al.*, 1990), atacinas (Sun, *et al.*, 1991) e lisozimas (Mohrig & Messner, 1968).

As defensinas se mostram eficazes contra bactérias Gram-positivas, e menos contra Gram-negativas, tendo sido caracterizada em várias ordens de insetos (McGwire *et al.*, 2003). Waniek *et al.*, 2011, demonstraram um aumento significativo da expressão de defensina em *Triatoma brasiliensis* infectados por *T. cruzi* sugerindo que este AMP pode ser expresso para o controle do parasita ou ter sido expresso por indução do parasita para controle da microbiota local, para facilitar sua infecção.

Cecropinas apresentam estrutura alfa-hélice e ação eficiente contra bactérias Gram-negativas (Yamano *et al.* 1998; Yang *et al.*, 1999). Apesar de serem isoladas em diversos lepidópteros e dípteros, não tem sido encontrada em outras ordens de insetos (Cociancich *et al.*, 1994).

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).

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.*, 2004). Diptericinas possuem ação contra uma gama limitada de bactérias Gram-negativas (Dimarcq *et al.*, 1988).

Recentemente, um novo AMP foi isolado de *R. prolixus*, a prolixicina, caracterizado por apresentar atividade contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas com nenhuma toxicidade para *T. cruzi* (Ursic-Bedoya *et al.*, 2011)

1.3.2.3. Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais livres, que apresentam grande potencial oxidativo por apresentarem um elétron não pareado na última camada (Ha *et al.*, 2005), podendo citar os ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidróxi (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Thannickal & Fanburg, 2000; Bonekamp *et al.*, 2009).

São produzidos constantemente através de vários processos naturais como a alimentação e a respiração celular (Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). Além disso, também estão relacionados à imunidade humoral inata do inseto, e esta função começou a ser estudada em hemócitos de *Drosophila melanogaster*, utilizando bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para indução (Nappi e cols. 1995, Nappi e Vass 1998). Recentemente, foi demonstrado que a regulação de ROS influencia a interação entre o parasita *Leishmania* e a microbiota intestinal no inseto hospedeiro, flebotômíneo, e que mudanças nos níveis de ROS com ácido úrico, causa aumento na microbiota (Diaz-Albiter *et al.*, 2012).

Apesar do efeito benéfico dos reativos de oxigênio na imunidade, se produzidos em excesso, esses radicais podem ser prejudiciais ao organismo, sendo necessário desenvolver mecanismos de desintoxicação como por exemplo a remoção catalítica pela catalase e a conversão destes para espécies menos reativas pelas vitaminas C e E (Halliwell e Gutteridge 1999).

1.3.2.4. Espécies reativas de nitrogênio

O óxido nítrico ON, também chamado por monóxido de nitrogênio, é um radical livre, por possuir um elétron desemparelhado, apresentando, desta maneira, alta reatividade e capacidade de formar reativos, como por exemplo nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), ambos com importância bioquímica pela capacidade de causar alterações pós traducionais de proteínas, (Queiroz, 1999; Nappi e Otavianni, 2000).

A Biossíntese de óxido nítrico acontece quando a enzima óxido nítrico sintase (NOS) com a participação de forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), como doador de elétrons, catalisa a oxidação da L-arginina (Granik *et al*, 1997) em L-citrulina.

A NOS, responsável pela síntese de NO in vivo, tem sido alvo de pesquisas e algumas isoformas da mesma são conhecidas, sendo distribuídas em duas classes: NOS constitutiva (cNOS), normalmente presente em células, expressas sem necessidade de estímulos e NOS induzida (iNOS) pelo estímulo imunológico (Queiroz e Batista, 1999).

Na figura 2, podemos observar um esquema geral da reação da NOS, onde a L-arginina é convertida em L-citrulina, catalisada por NOS, que requer NADPH em todas as etapas. Inicialmente ocorre uma hidroxilação que forma N^G -hidroxi-L-arginina como um produto intermediário ligado à enzima e uma oxidação de dois elétrons. Em seguida, ocorre a oxidação de três elétrons seguida por remoção de elétron, inserção de oxigênio e quebra da ligação carbono-nitrogênio para formar L-citrulina e NO (Feldman et al., 1992).

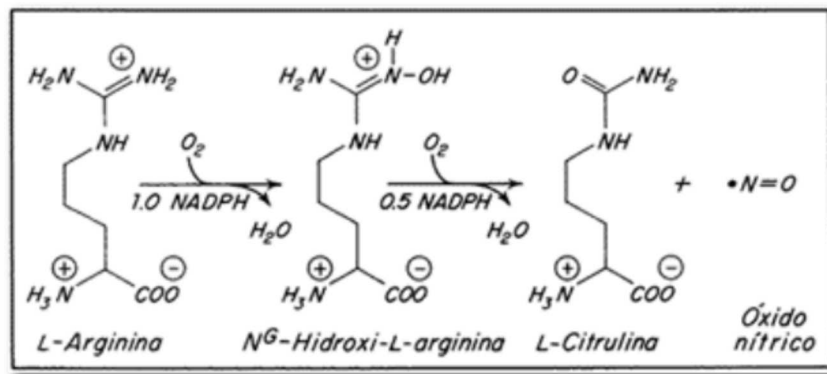


Figura 2: Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO-Sintase (Feldman et al., 1992)

O substrato da enzima óxido nítrico sintase, L-arginina, também é um aminoácido precursor de poliaminas em muitos tripanosomatídeos como *Leishmania* sp., e para isto, a L-arginina precisa ser hidrolisada pela enzima arginase em L-citrulina e uréia (figura 3) (Balaña-Fouce, 2012).

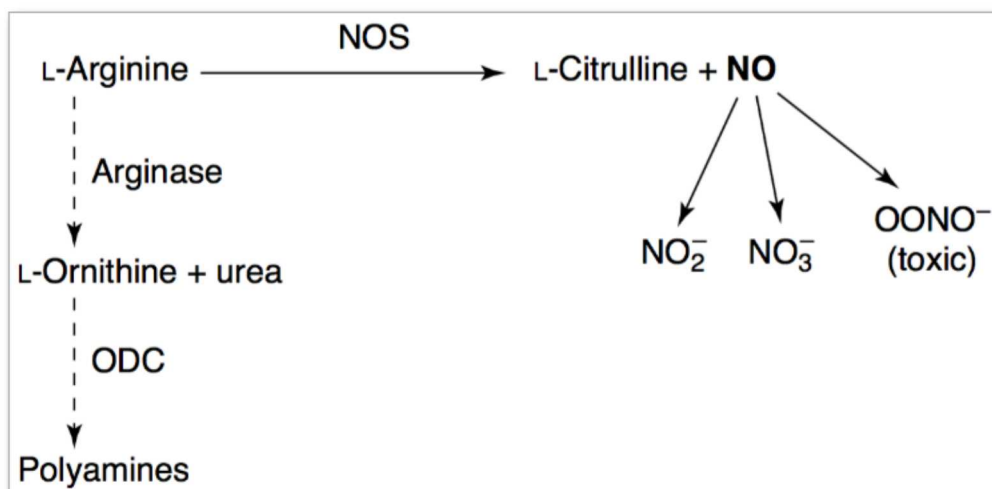


Figura 3: Via de síntese de óxido nítrico. Arginases competem com a NOS pelo mesmo substrato. (Rivero, 2006)

Arginase é a principal fonte de L-ornitina em Tripanosomatídeos. O gene que codifica a arginase foi identificado no cromossoma 35 dos genomas de *L. major* e *L. infantum* e no cromossoma 34 de *L. braziliensis*. Do mesmo modo, verificou-se no cromossoma 8 de *T. brucei* e no cromossoma 22 de *T. cruzi* (Roberts et al., 2004; Reguera et al., 2009).

A presença de uma sequência de peptídeo-sinal de destino para glicosomos em pró-arginases de todas as espécies de *Leishmania* as diferencia e destaca de *T. brucei* e *T. cruzi* em que esta sequência se encontra ausente, sugerindo que sua arginase seja citosólica. Mas a razão desta compartimentalização em *Leishmania* e não compartimentalização em *T. cruzi* e *T. brucei*, visto que estes possuem glicosomos, também não é conhecida (Reguera *et al.*, 2009; Opperdoes, 1987).

Sua função como molécula sinalizadora rendeu prêmio nobel para Furchgott, Ignarro e Murad em 1998. Por ser uma molécula gasosa, se difunde facilmente entre membranas e tecidos e é capaz de sinalizar rapidamente. Além desta, a molécula apresenta muitas funções, como defesa em vertebrados contra vírus, bactérias e fungos, mas sua função na imunidade de invertebrados passou a ser descrita mais recentemente, podendo ser sintetizada indutivamente em resposta a infecção por parasita em insetos (Rivero, 2006).

No início da década de 90, ON e NOS eram estudados principalmente no cérebro de insetos, estudos relacionados à informação visual e memória (Müller, 1997). E então, mais recentemente, a função da molécula na imunidade humoral de insetos começou a ser estudada em *Drosophila*, por Nappi e colaboradores (2000) que observaram que a encapsulação mediada por hemócitos gera aumento na produção de óxido nítrico local, auxiliando a resposta imune celular. Adicionalmente, observaram que quando a produção de ON é induzida na hemocele, é ativada a expressão de dipterina no local.

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria patogênica a insetos, que produz toxinas como Cry, essas toxinas matam insetos por poros nas células do intestino médio. Chavez e colaboradores (2015) demonstraram que a intoxicação de larvas de *Manduca sexta* com Cry1Ab induzem a expressão de NOS, com consequente aumento de ON e o mesmo efeito não é observado quando é utilizado um mutante não tóxico Cry1Ab- E129K. No mesmo trabalho, a produção de ON é inibida por L-NAME, e a diminuição de RNS diminui a toxicidade de Cry1Ab resultando na diminuição da mortalidade das larvas.

A relação entre a ação do óxido nítrico e seus radicais na imunidade de *R. prolixus* começou a ser investigada por Whitten e colaboradores em 2001. Antes disso, os estudos voltados para a molécula neste modelo se relacionavam com seus efeitos vasodilatadores, presente na saliva, facilitando assim o repasto sanguíneo. Uma única cópia do gene da NOS foi isolada da glândula salivar do inseto e

sequenciada (Yuda *et al.*, 1996), mas nenhum estudo foi feito acerca da imunidade humoral.

Desde então, tem sido demonstrado que a imunidade mediada por NOS de *R. prolixus* responde a diferentes estímulos, que sua expressão varia por tecido e tempo de infecção. Em infecção por *T. rangeli* de longo tempo, foi observado aumento significativo da expressão de NOS no reto do inseto o que talvez possa ser uma das razões pelas quais o parasita escape pelo intestino médio e complete seu ciclo na hemocele, onde a concentração de nitrito parece diminuir (Whitten *et al.*, 2007).

A produção de óxido nítrico pode ser aumentada através da administração de L-arginina, aumentando assim a quantidade de substrato para a enzima (Alderton *et al.*, 2001). E pode ser inibido por compostos análogos à L-arginina que irão competir com a L-arginina local pela enzima NOS, como por exemplo, o N_G-nitro-L-arginina-metiléster (L-NAME), N_G-nitro-L-arginina (L-NNA) e o N_G-monometil-L-arginina (LNMMA).

O estudo da resposta imune do triatomíneo, *R. prolixus*, nos permite compreender o processo de desenvolvimento do ciclo do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. A produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) pelo triatomíneo parece ser fundamental para o sucesso da infecção do parasita no vetor e precisa de maiores investigações sobre sua ação tanto sobre o parasita, como na microbiota e em relação à outras respostas imunes do inseto.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estudo da função de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota de *Rhodnius prolixus*.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificação da produção de espécies reativas de nitrogênio em diferentes dias e em diferentes órgãos de *Rhodnius prolixus* infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*;
- Tratamento de *R. prolixus* com diferentes drogas indutoras ou inibidoras da produção de espécies reativas de nitrogênio e efeito sobre a infecção de *T. cruzi* e microbiota.
- Interferência da ativação ou inibição de produção de reativos de nitrogênio em outras respostas imunológicas do inseto e em órgãos e tecidos não tratados.
- Quantificação da enzima óxido nítrico sintase em diferentes tecidos e em diferentes dias após infecção com *T. cruzi*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção da colônia de *Rhodnius prolixus*

Foram utilizadas ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* com mais de 30 dias de jejum disponibilizados pela colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC/FIOCRUZ, mantidos em temperatura de 28°C de acordo com Garcia *et al.*, 1984. A colônia é mantida com alimentações regulares em sistema artificial com sangue desfibrinado de coelho, proveniente do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), o protocolo de alimentação foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) com número de protocolo LW-03/12.

3.2. Manutenção de culturas de *Trypanosoma cruzi* cepa DM28c

Culturas de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c, cedidas pelo Dr. M. A. Sousa (Coleção de tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, CT-IOC, Fiocruz, Brasil) foram mantidas a 28°C em meio de cultura de infusão de cérebro e coração (BHI – *brain heart infusion*). O repique da cultura de parasitas foi feito uma vez por semana ao longo da pesquisa, utilizando 20% da cultura anterior em BHI modificado (Azambuja 7 Garcia, 1997).

3.3. Alimentação, infecção e tratamentos de *Rhodnius prolixus*

A alimentação artificial dos insetos nos permite administrar diferentes compostos e realizar infecções controladas por adição ao sangue.

3.3.1. Infecção

Para infecção dos insetos o sangue de coelho desfibrinado fornecido pelo CECAL foi descomplementarizado através da separação do plasma por centrifugação à 1890 g por 15 minutos a 4°C e inativação do plasma pelo calor à 60°C por 1 hora em banho-maria, segundo Azambuja e Garcia (1997). Os eritrócitos foram então ressuspensos com o plasma inativado e adicionado de formas

epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28 c. Os parasitas obtidos em fase exponencial de crescimento passaram por centrifugação a 1890g por 10 minutos a 4°C para eliminação do meio de cultura e o precipitado foi suspenso pelo sangue reconstituído de plasma inativado. A concentração final de epimastigotas foi de 1×10^7 parasitas/mL e os insetos selecionados para realização dos nossos ensaios foram apenas os que tiveram alimentação saturante com alta distensão abdominal.

3.3.2. Tratamentos – via oral

- Inibição da produção de RNS

Para reduzir a produção de RNS foi administrado junto ao sangue diferentes doses do composto hidrocloreto de N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, Sigma), inibidor da enzima NOS. Testamos duas diferentes concentrações dos compostos (8mg/mL de sangue, e em seguida 10mg/mL). A dose foi aumentada a fim de observar efeitos na produção de nitrito, que não fora observada com a primeira dose.

- Indução da produção de RNS

A fim de induzir a produção de espécies reativas de nitrogênio, administramos via alimentação oral o substrato da enzima óxido nítrico sintase, L-arginina. Duas diferentes concentrações de L-arginina (Sigma) foram administradas via alimentação oral (4 e 5 mg/mL de sangue).

3.3.3. Tratamentos – via inoculação

Foi utilizado um nanoinjetor (NanoInject II Drumond Sci) para aplicação de volumes inferiores a 1µL na hemocele e com agulha bem fina evitando grandes danos à cutícula do inseto diminuindo a mortalidade. A inoculação foi feita um dia antes da alimentação dos mesmos e no mesmo dia da alimentação. Diferentes concentrações de L-NAME e L-arginina diluídos em ringer (0,36, 0,1 e 0,7mg/µL) foram testadas a fim de escolher a dose ideal que não alterasse o desenvolvimento do inseto como sua viabilidade e ecdise. As melhores doses escolhidas foram L-NAME 0,1mg/µL e L-arginina 0,36 mg/µL (inoculação de 0,5µL da solução estoque por inseto) para utilização nos ensaios de respostas imunológicas posteriores. Os

insetos controle foram inoculados com solução salina *Rhodnius* (18 g/L D-glucose, 12.2 g/L KCl, 0.36 g/L NaHCO₃, 380mOsm, pH 7.8; Whitten *et al.*, 2001) nos volumes de 0,5µL e 0,7 µL/inseto na hemocele.

3.4. Mortalidade e ecdise em insetos tratados por inoculação

Para observação da mortalidade e percentagem de ecdise, foi feito um acompanhamento dos insetos que foram inoculados com L-NAME e L-Arginina. Estes insetos foram acompanhados a cada 3 dias até a muda para a fase adulta.

3.5. Quantificação de *Trypanosoma cruzi* nos insetos

O trato digestório foi dissecado a partir do décimo dia de infecção e homogeneizado em 1 mL de PBS [1x] estéril. Os parasitas nas amostras foram quantificados utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico com contraste de fases.

3.6. Quantificação da população de bactérias da microbiota intestinal

A microbiota do trato digestivo de *R. prolixus* foi analisada através de contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) que cresceram em meio ágar BHI. Todo o trato digestivo foi dissecado em condições estéreis após oito dias da alimentação e homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril. As amostras foram mantidas em gelo e diluídas em até 10⁻⁹ em PBS. Alíquotas de 20µl das diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁹ foram plaqueadas por espalhamento em placas de BHI ágar e incubadas de um dia para o outro a 30°C. Em seguida as colônias foram contadas. Uma alíquota de PBS utilizado nas diluições também foi plaqueada como teste de esterilidade.

3.7. Ensaios de respostas imunológicas

3.7.1. Quantificação de espécies reativas de nitrogênio

A fim de conhecer a quantidade de espécies reativas de nitrogênio (RNS) presentes na amostra, foi utilizado o Kit colorimétrico de quantificação de nitrito (Griess Reagent System, Promega) e o Kit fluorimétrico de quantificação da óxido nítrico sintase (Nitric Oxide Synthase Detection System, Sigma), seguindo orientação do fabricante.

O nitrito é um dos produtos de degradação primária, estáveis e não voláteis de óxido nítrico (ON), além do nitrato. O primeiro kit mencionado baseia-se numa reação de diazotação, que foi originalmente descrito por Griess em 1879.

A reação utiliza sulfanilamida e N-1-naphthylethylenediamina dicloridrato (NED) em condições ácidas (ácido fosfórico), onde é produzido um Azo composto que apresenta cor detectável por espectrofotômetro.

O segundo kit que foi mencionado mede a produção intracelular de ON por um método não-radiométrico. O sistema utiliza um derivado diacetato permeável em células derivado de um 4,5-diamino-fluoresceína (DAF-2 DA). DAF-2 DA penetra rapidamente nas células, onde é hidrolisado pela esterase intracelular para DAF-2 que, por sua vez, reage com o ON produzido pela NOS para formar uma fluoresceína-triazol fluorescente que pode ser medida em fluorímetro .

Para isto, foram utilizados tecidos de *R. prolixus* infectados e não infectados por *T. cruzi*, sob indução e inibição da produção de RNS por tratamento oral, descritos anteriormente.

Os tecidos utilizados para este ensaio foram hemolinfa, intestino médio anterior diluído em 200µL de água ultrapura, e intestino médio posterior em 100 µL de água ultrapura.

3.7.2. Atividade da enzima fenoloxidase

A atividade fenoloxidásica foi analisada nas amostras do trato digestório em insetos tratados com L-arginina e L-NAME seguindo metodologia descrita por Genta *et al* (2010). As amostras de hemolinfa (10µL) foram diluídas em água ultrapura e as de conteúdo estomacal em 200 µL de triton X-100 (0.1%), sendo o conteúdo estomacal diluído 10 vezes para o ensaio PO. As amostras (25µL) foram colocadas em placas de 96 poços contendo 10µL de tampão cacodilato (10mM de cacodilato de sódio, pH 7,4, contendo 10 mM CaCl₂). Em seguida adiciona-se o substrato da PO, 25µL de solução saturada de DOPA (4 mg/mL, Sigma Chemical, USA). As

amostras de trato digestório foram incubadas a 37° C por 2 horas. Após a incubação a absorbância foi medida a 490 nm no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices, California, USA).

3.7.3. Atividade antibacteriana (Turbidimetria)

A atividade antibacteriana foi testada nas amostras do trato digestório em insetos tratados ou não com L-arginina e L-NAME, em 5, 9 e 13 dias após a alimentação. As amostras foram incubadas a 37°C por 12 horas em placas de 96 poços, com *Serratia marcescens* e a densidade óptica foi medida a 550 nm (OD₅₅₀) de hora em hora, utilizando como controle meio de cultivo, e amostras não tratadas com os compostos mencionados. O ensaio TB foi feito em microplacas de 96 poços de fundo chato, utilizando-se um leitor de ELISA Spectra Max 190 (Molecular Devices). A atividade antimicrobiana é medida pela diferença entre a densidade óptica do crescimento da bactéria em meio peptona e a densidade óptica do crescimento da bactéria nas amostras analisadas em peptona.

3.7.4. Abundância relativa da expressão de AMPs e NOS

A estimativa de níveis de RNA de que codifica a expressão da enzima NOS foi realizada primeiramente por PCR convencional com insetos controle, em diferentes dias após a alimentação para avaliar em quais dias seriam ideais para analisar insetos tratados e não tratados com L-Arginina e L-NAME. E a análise da abundância de RNA que codifica os AMPs Defensina C e Prolixicina foram realizados somente por PCR tempo real.

Antes da dissecação, os insetos foram imersos em água a 55°C durante 15 segundos para liberar hemócitos dos tecidos, cada amostra representou um pool de 5 insetos. Ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* tratadas com L-arginina e L-NAME foram dissecadas, separando corpo gorduroso e a parede do intestino médio anterior e armazenados a -80°C. O RNA total foi extraído usando um kit *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante e subsequentemente medida por um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA). A síntese de cDNA foi feita com *Randon primers*, utilizando o cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)

seguindo o protocolo indicado pelo fabricante, utilizando 2,5 µg de RNA total, e o protocolo indicado pelo kit. *Primers* para o gene codificante da defensina C e prolíxina de *R. prolixus* foram desenhados a partir de *primers* publicados anteriormente (Tabela 2). Diferentes *primers* para a enzima NOS foram desenhados baseando no gene correspondente do *R. prolixus* publicado anteriormente (Yuda *et al.*, 1996, no. de acesso U59389) e padronizados para obtenção do *primer* com maior eficiência e menor produção de dímeros. Os oligonucleotídeos com melhor desempenho (NOSF3 e NOSR3) foram usados para os experimentos.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de qPCR

Gene/nome	Sequencia 5' – 3'	Tamanho do amplicon	Referência
GAPDH-F	GATGGCGCCAGTACATAGT	111 pb	Paim et al, 2012
GAPDH-R	AGCTGACGGGGCTGTTATTA		
TUB-F	TTTCCTCGATCACTGCTTCC	129 pb	Paim et al, 2012
TUB-R	CGGAAATAACTGGGGCATAA		
RPDEFC-F (defensina C)	CAGTACAGTCCTAATACCTAGCC	136 pb	Vieira et al, 2015
RPDEFC-R (defensina C)	TGGGCATCATCTAATTGATGTTG AGAA		
F1 (prolíxina)	ACAATTTTGGTGGTGGTTGTC	194 pb	Ursic-Bedoya et al, 2011
qR (prolíxina)	GCTTGAGCTCTGGTCCTTCC		
NOSF1	ATTTGTGGAATCGGCAACTC		
NOSR1	AATAGCAACGTCGCTCTGGT	132 pb	Esse trabalho
NOSF2	TCAGGAAGACGCTTGGAAAGT		
NOSR2	GGAATGGAAAGCATGGCTAA	241 pb	Esse trabalho
NOSF3	AATGGGCACCAGAAGTGTTT		
NOSR3	GTTGCCGATTCCACAAATCT	136 pb	Esse trabalho

3.7.4.1. Análise da abundância de mRNA codificante para NOS por transcriptase reversa (RT)-PCR

A quantidade de cDNA representando o RNA codificante para óxido nítrico sintase em diferentes dias após a alimentação foi analisado por PCR convencional, a princípio. PCRs foram realizadas utilizando Illustra Taq DNA *Polymerase* (GE

Healthcare, Buckinghamshire, UK) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min; 94°C durante 25 seg, 54°C durante 25 seg, 72°C durante 30 seg e um passo final de alongamento a 72°C, por 7 min. As PCRs foram realizadas três vezes sob as mesmas condições. Como controles negativos, as reações de PCR foram realizadas sem amostra. A expressão relativa foi estimada comparada ao gene constitutivo tubulina. Todos ensaios de PCR foram realizadas num Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, USA). Os produtos de amplificação (5 ul) foram separados e analisados em gel de agarose 2% com brometo de etídeo e documentado no fotodocumentador E-Gel imagem (Life Technologies). A intensidade da banda foi medida com o programa ImageJ (versão 1.47q). As médias e desvios-padrão das diferentes amostras foram calculados.

3.7.4.2. Análise da abundância do mRNA codificante para *DefC*, *Prol* e *NOS* por PCR quantitativo (qPCR)

Foram analisados dois pools de 5 amostras individuais contidas em cada pool, sendo as amostras: intestino médio anterior e corpo gorduroso, 1 dia após a alimentação, dois dias após a inoculação dos compostos, como descrito anteriormente (Vieira *et al.*, 2014). O mesmo cDNA sintetizado como descrito anteriormente, foi quantificado por fluorescência usando o *Fluorímetro Qubit* (Life Technologies) utilizando o kit indicado pela fabricante, *ssDNA assay Kit*.

Os genes de NOS e dos peptídeos antimicrobianos *defC* e *prol* e *NOS* presentes nos referidos tecidos de *R. prolixus* foram quantificados utilizando o método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001) e normalizados com os genes de referência para *R. prolixus* α -*tubulina* e *GAPDH*.

O qPCR (*Real-time quantitative polymerase chain reaction*) foi conduzido utilizando o aparelho ABIPRISM 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) nas instalações da Plataforma de PCR em Tempo Real – RPT9A/Fiocruz.

Os *primers* usados para cada gene e os genes de referência foram escolhidos de acordo com os *primers* utilizados previamente (Tabela 2) (Ursic-Bedoya 2011; Paim *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2015), Cada reação foi analisada em duplicata, cada poço contendo 10 ng de cDNA e cada par de primer na concentração de (0,25 μ M) e o qPCR master mix DyNAmo *ColorFlash SYBR Green qPCR Kit* (Thermo Fisher

Scientific, EUA), com volume final de 20 μ L. O cDNA foi amplificado em 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os controles negativos foram analisados utilizando poços com água ao invés de cDNA para verificar dimerização de *primers* ou contaminação nas reações. A curva de *melting* foi analisada a fim de confirmar a presença de um produto único amplificado durante a reação.

IV. RESULTADOS

4.1. Quantidade de parasitas

A infecção do *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c em *Rhodnius prolixus* foi analisada após tratamento dos insetos com L-NAME, composto que inibe a ação da enzima NOS, responsável pela produção de RNS, e L-arginina, substrato da NOS. No tratamento oral, por adição dos compostos ao sangue, observamos uma tendência ao aumento na quantidade de parasitas nos insetos tratados com L-NAME tanto na concentração de 8mg/mL como na de 10mg/mL de sangue em comparação aos insetos do grupo controle (Figura 4A e 4B). Nos insetos tratados com L-NAME via inoculação na hemocele na concentração de 0,1mg/μL (volume inoculado 0,5μL) também observamos maior quantidade de parasitas no trato digestivo dos insetos (Figura 4C). Lembrando que o composto L-NAME induz diminuição de RNS. Em contrapartida, no tratamento via oral com a droga L-arginina tanto na concentração de 4mg/mL e 5mg/mL de sangue observamos diminuição na quantidade de parasitas no trato digestivo dos insetos (Figura 4A e 4B). Entretanto essas observações da quantidade de parasitas no trato digestivo não são estatisticamente diferentes entre si.

Adicionalmente, utilizando ensaio baseado na quantificação de parasitas por biologia molecular observamos resultado semelhante aos de contagem em microscopia óptica, com insetos inoculados com L-NAME 0,1mg/μL em comparação ao grupo controle. Nesse ensaio preliminar feito em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas utilizamos técnica molecular baseada na detecção diferenciada de DNA de parasito e de triatomíneo em tempo real, que ainda está em fase de padronização. Por essa técnica, observamos um aumento no número de parasitas de 15 vezes comparando insetos inoculados com L-NAME (53,72) e inoculados com solução salina (3,49), grupo controle.

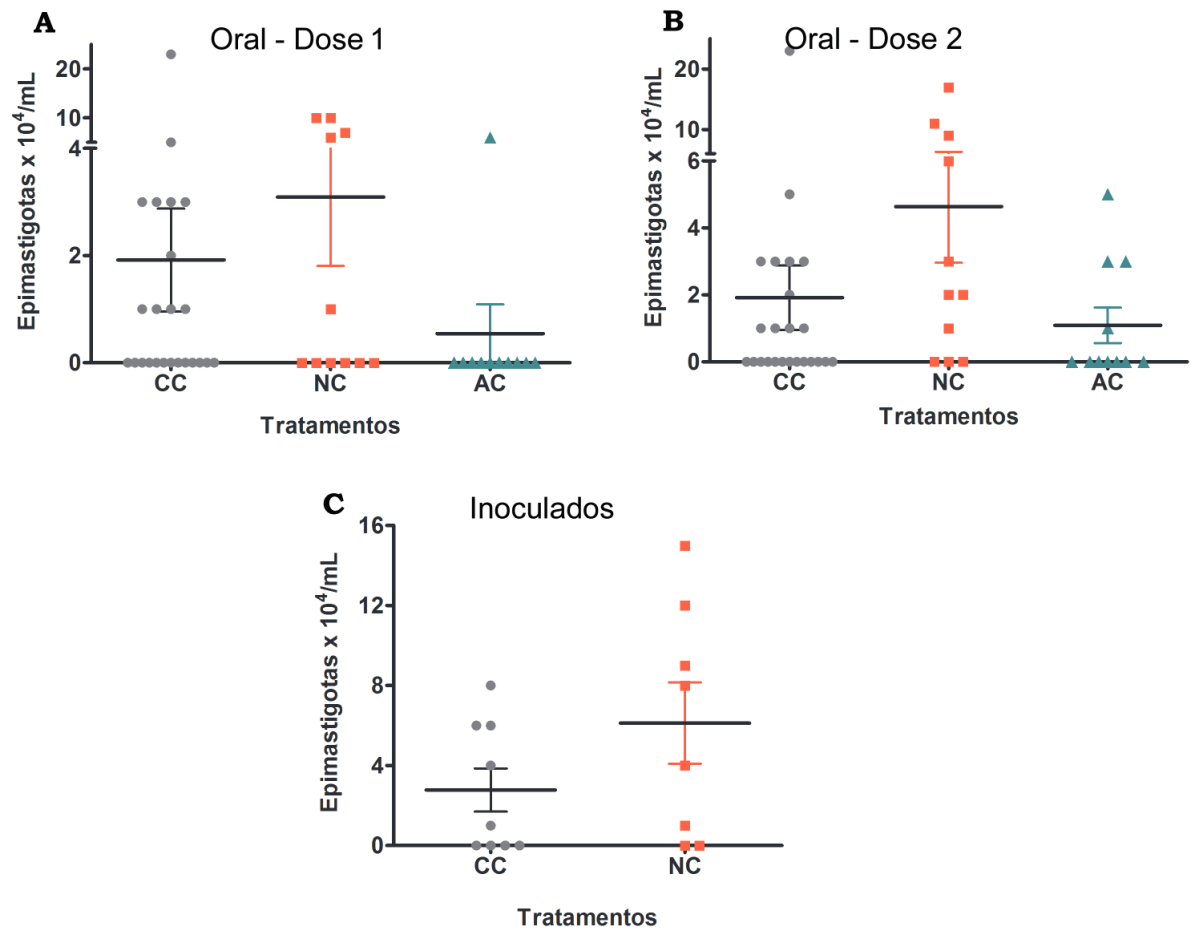


Figura 4: Número de parasitas no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c e tratadas com L-NAME e L-arginina.

A: Tratamentos por via oral com L-NAME 8mg/mL e L-arginina 4mg/mL. **B:** Tratamentos por via oral com L-NAME 10mg/mL e L-arginina 5mg/mL. **C:** Tratamento via inoculação com L-NAME 0,1mg/μL. Tratamentos: controle infectado (**CC**); tratado com L-NAME e infectado (**NC**); tratado com L-arginina e infectado (**AC**). Cada ponto representa contagem de um inseto, sendo as linhas as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados 2 experimentos independentes com contagem de mais de 5 insetos em cada, com exceção do ensaio de inoculação. Os tratamentos foram comparados utilizando *One-Way* ANOVA; com teste Kruskal Wallis e pós-teste Dunns comparando todos os grupos entre si e não houve diferença estatística ($p > 0.05$).

Em relação à porcentagem de insetos infectados observamos que o tratamento com L-NAME aumentou a taxa de insetos infectados pelo tratamento via oral na dose de 10mg/mL e por inoculação a 0,1mg/μL. O tratamento com L-arginina diminuiu a porcentagem de insetos infectados pelo tratamento oral a 4mg/mL de sangue (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem de ninfas de 5° estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas por *Trypanosoma cruzi* Dm28c e tratadas por via oral ou inoculação com os compostos L-NAME e L-arginina em diferentes concentrações.

Aplicação	Tratamentos	Dose	Insetos infectados (%)*
Oral	Controle	-	45,8
	L-NAME	8 mg/mL	45,4
	L-arginina	4 mg/mL	9,0
	Controle	-	45,8
	L-NAME	10 mg/mL	72,7
	L-arginina	5 mg/mL	36,4
Inoculado	Controle	-	55,6
	L-NAME	0,1mg/ μ L	75,0

* Na presença de ao menos 1×10^4 parasitas/mL da amostra do órgão, o inseto foi considerado positivo.

Com base nesses resultados de quantificação de parasitas determinamos as doses para utilização em ensaios posteriores sendo L-NAME a dose de 10mg/mL de sangue e para L-arginina de 5mg/mL.

4.2. Quantificação de Nitrito

No intestino médio anterior, a concentração de nitrito diminuiu com o passar dos dias após a alimentação, no qual em insetos controle e controle infectados é possível observar diminuição de quase duas vezes do 5° para o 9° dia ($p < 0,001$) e do 5° para o 13° dia após a alimentação ($p < 0,001$) (Figura 5A).

Apesar dos tratamentos com os compostos serem relacionados com a produção de RNS, não observamos diferença significativa entre os tratamentos em todos os dias analisados, tanto não infectados como os infectados com *T. cruzi* (Figura 5B, 5C e 5D).

A quantificação de nitrito no intestino médio posterior de ninfas de 5° estágio de *R. prolixus* resultou diferença significativa em insetos controle não infectados e os infectados com *T. cruzi* com relação aos dias ($p < 0,001$) (Figura 6A). Do 9° para o 13° dia após a alimentação, insetos controle não infectados e os infectados apresentaram aumento significativo na concentração de nitrito no intestino médio posterior (Figura 6A). Não foi observada diferença significativa entre os insetos tratados com L-NAME e L-arginina utilizando a metodologia colorimétrica (Figura 6B, 6C e 6D).

Na hemolinfa foi observada diferença significativa na quantificação de nitrito em insetos controle e controle infectados, expresso por um aumento na concentração de nitrito de quase 10 vezes do 5° para o 9° dia após a alimentação ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 7A). Em seguida, a quantidade de nitrito diminuiu 13° dia em insetos controle não infectados e controle infectados ($p < 0,05$) (Figura 7A). Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos com L-arginina e L-NAME para análise de quantificação de nitrito (Figura 7B, 7C e 7D).

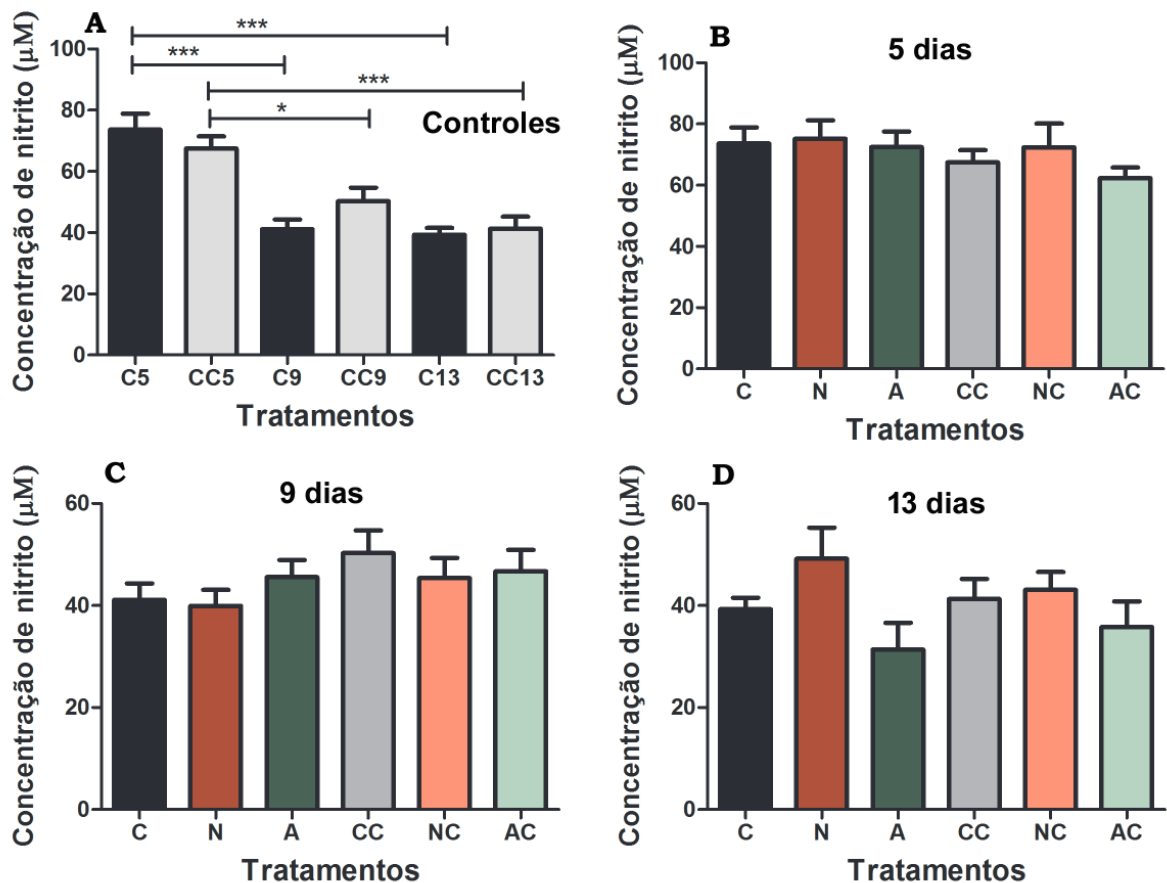


Figura 5: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio anterior de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).

A: concentração de nitrito de insetos controle e controle infectados ao longo de diferentes dias. **B:** concentração de nitrito 5 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. **C:** concentração de nitrito 9 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. **D:** concentração de nitrito 13 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue (**N**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue (**A**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (**CC**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue e infectados com parasita (**NC**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue e infectados com parasita (**AC**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados 3 experimentos independentes com 10 insetos em cada, totalizando 30 insetos por tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA e teste Tukey comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

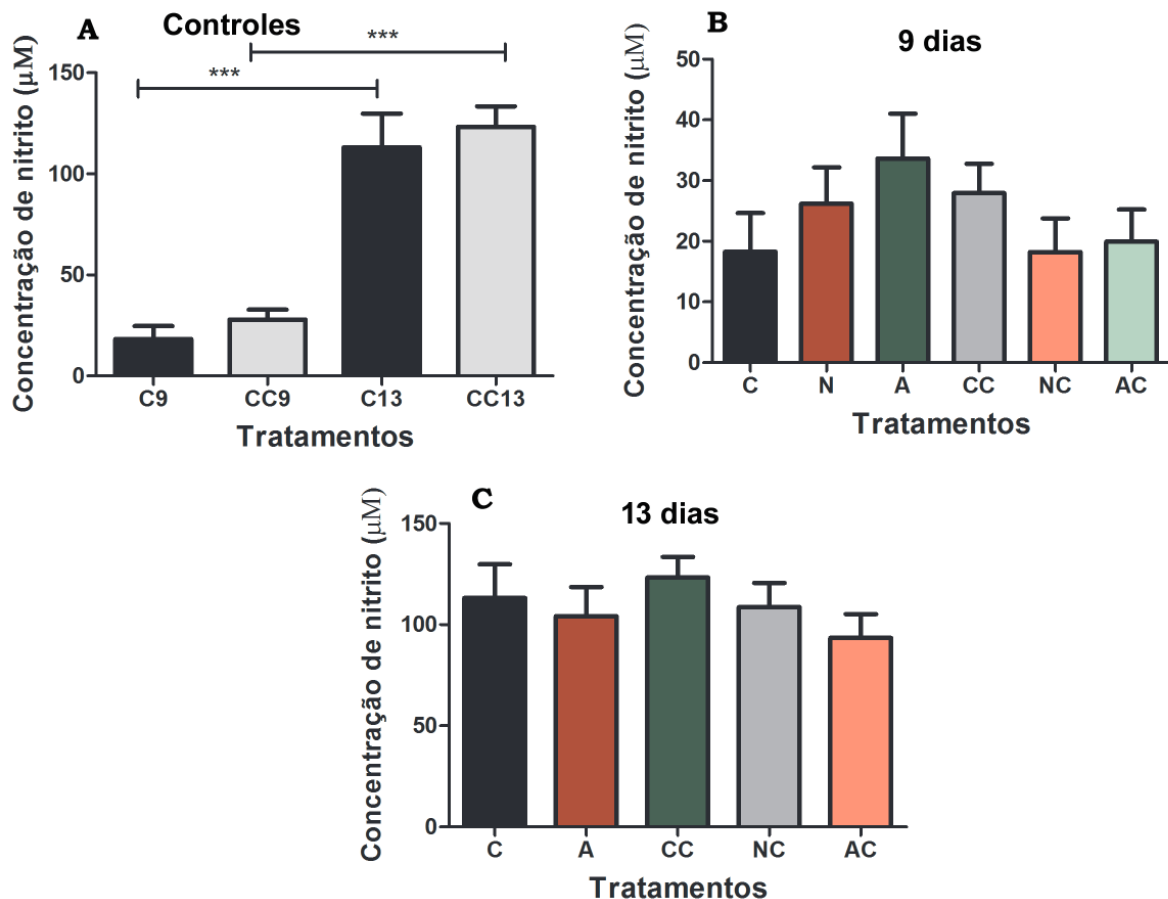


Figura 6: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio posterior de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* após diferentes dias de alimentação (9 e 13 dias).

A: concentração de nitrito de insetos controle e controle infectados ao longo de diferentes dias. **B:** concentração de nitrito 9 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. **C:** concentração de nitrito 13 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue (**N**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue (**A**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (**CC**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue e infectados com parasita (**NC**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue e infectados com parasita (**AC**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados 3 experimentos independentes com 10 insetos em cada, totalizando 30 insetos por tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA e teste Tukey comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

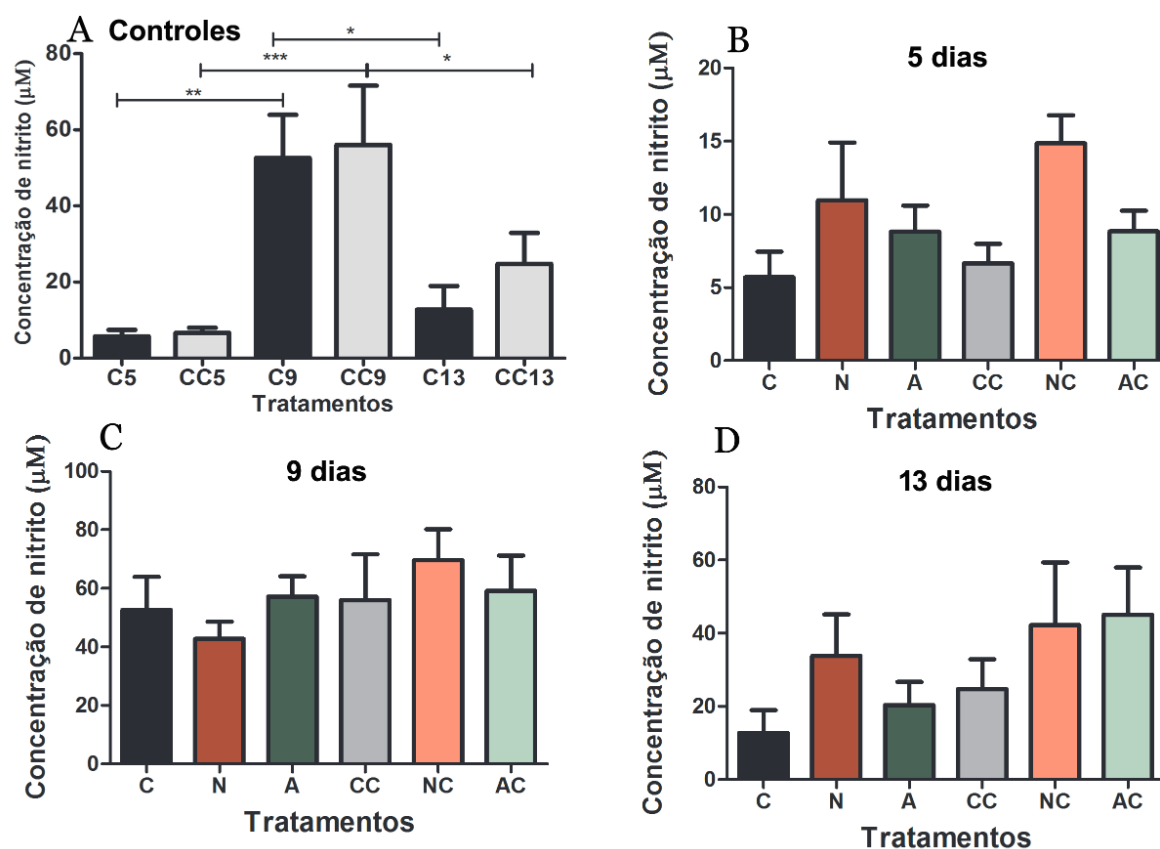


Figura 7: Quantificação de nitrito em amostras de hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).

A: concentração de nitrito de insetos controle e controle infectados ao longo de diferentes dias. **B:** concentração de nitrito 5 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. **C:** concentração de nitrito 9 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. **C:** concentração de nitrito 13 dias após a alimentação, tratamentos com as drogas e infecção. Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue (**N**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue (**A**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (**CC**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME a 10mg/mL de sangue e infectados com parasita (**NC**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina a 5mg/mL de sangue e infectados com parasita (**AC**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados 3 experimentos independentes com 10 insetos em cada, totalizando 30 insetos por tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA e teste Tukey comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

No 5° dia após alimentação e infecção com *T. cruzi* o intestino médio anterior de insetos controle não infectados e controle infectados apresentaram significativamente maior concentração de nitrito (70-80µM) que no corpo gorduroso (5-10 µM) ($p < 0,001$, Figura 8A). Já no nono dia após alimentação a quantidade de nitrito produzida no intestino médio anterior diminui e da hemolinfa aumenta ficando em torno de 40-60 µM em ambos tecidos de insetos controle e controle infectados (Figura 8B). Diferença significativa foi observada entre intestino médio anterior e posterior 9 dias após alimentação (Figura 8B). A quantidade de nitrito produzida pelo intestino médio posterior é significativamente menor que do intestino médio anterior ambos de insetos controle infectados ($p < 0,001$, Figura 8A). Após 13 dias de alimentação observamos um grande aumento da concentração de nitrito (120 µM) no intestino médio posterior em comparação ao anterior e a hemolinfa (Figura 8C). Diferenças significativas entre esses tecidos são observadas tanto nas amostras de insetos controle como controle infectados ($p < 0,001$, Figura 8C).

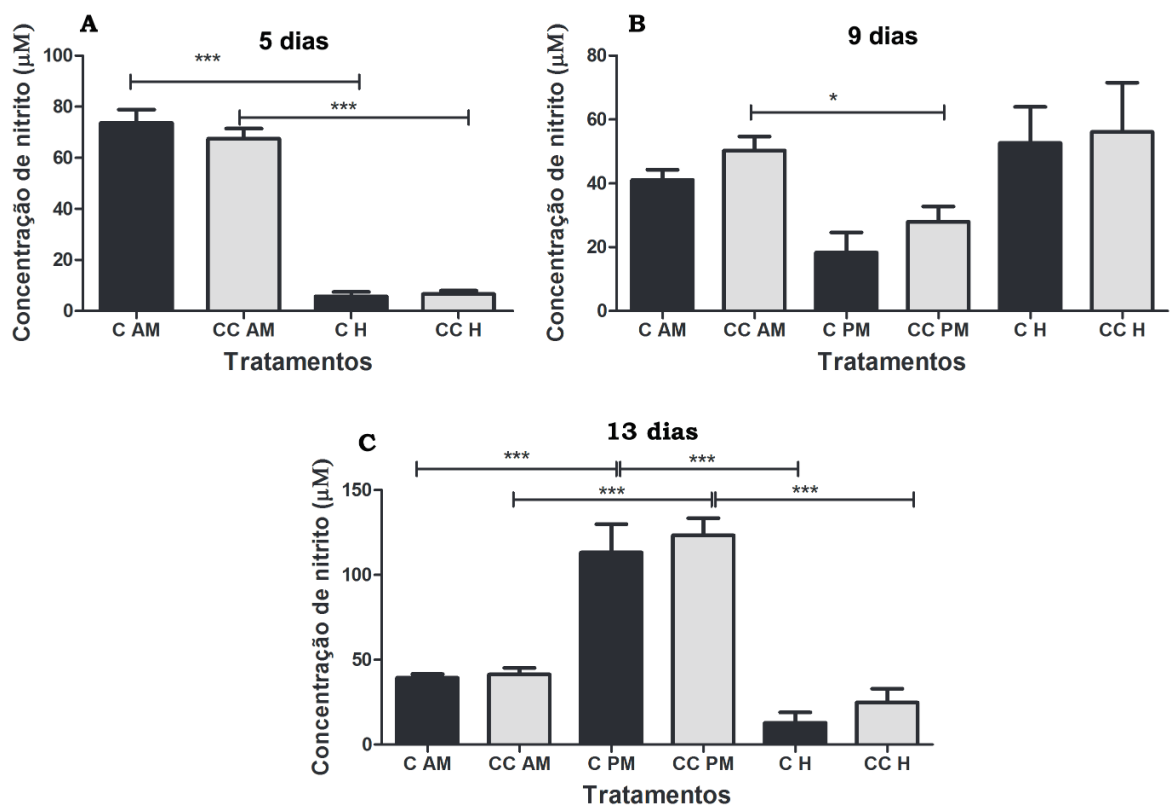


Figura 8: Quantificação de nitrito em amostras de intestino médio anterior, intestino médio posterior e hemolinfa de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* após diferentes dias de alimentação (5, 9 e 13 dias).

A – Concentração de nitrito em amostras 5 dias após tratamento; **B** - Concentração de nitrito em amostras 9 dias após tratamento; **C** - Concentração de nitrito em amostras 13 dias após tratamento. Tratamentos e tecidos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (1×10^7 epimastigotas/ mL de sangue) (**CC**); amostras de intestino médio anterior (**AM**); amostras de intestino médio posterior (**PM**); amostras de corpo gorduroso (**H**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados 3 experimentos independentes com 10 insetos em cada, totalizando 30 insetos por tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA e teste Tukey comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.3. Quantificação de óxido nítrico

Utilizando método fluorimétrico observamos diferenças significativas na quantidade de óxido nítrico em amostras de insetos tratados com os compostos L-NAME e L-arginina (Figura 9). No intestino médio anterior, insetos tratados com L-arginina infectados e não infectados apresentaram aumento significativo em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$; Figura 9A). Resultado semelhante foi demonstrado no intestino médio posterior de insetos tratados com L-arginina infectados e não infectados, nos quais o grupo tratado maior quantidade de óxido nítrico em comparação ao grupo controle e controle infectado ($p < 0,05$) (Figura 9B).

Grupos tratados com L-NAME não infectados demonstram uma diminuição significativa na taxa de óxido nítrico em relação aos tratados com L-arginina na hemolinfa ($p < 0,01$) (Figura 9C). Porém nos insetos também tratados com L-NAME mas infectados a quantidade de óxido nítrico nas amostras de hemolinfa é maior do que nos apenas tratados com L-NAME ($p < 0,01$) (Figura 9B).

Quando comparamos a quantidade de óxido nítrico em diferentes tecidos dos insetos controle e controle infectados observamos diferenças significativas entre elas (Figura 9D). Na qual a concentração de óxido nítrico é maior nas amostras de hemolinfa em comparação ao intestino médio posterior e anterior tanto nos insetos controle como nos controle infectados ($p < 0,001$; Figura 9D). Em relação ao intestino médio, a quantidade de óxido nítrico no intestino médio posterior é maior no que no anterior tanto nas amostras de controle como controle infectados após 9 dias de alimentação ($p < 0,01$) (Figura 9D).

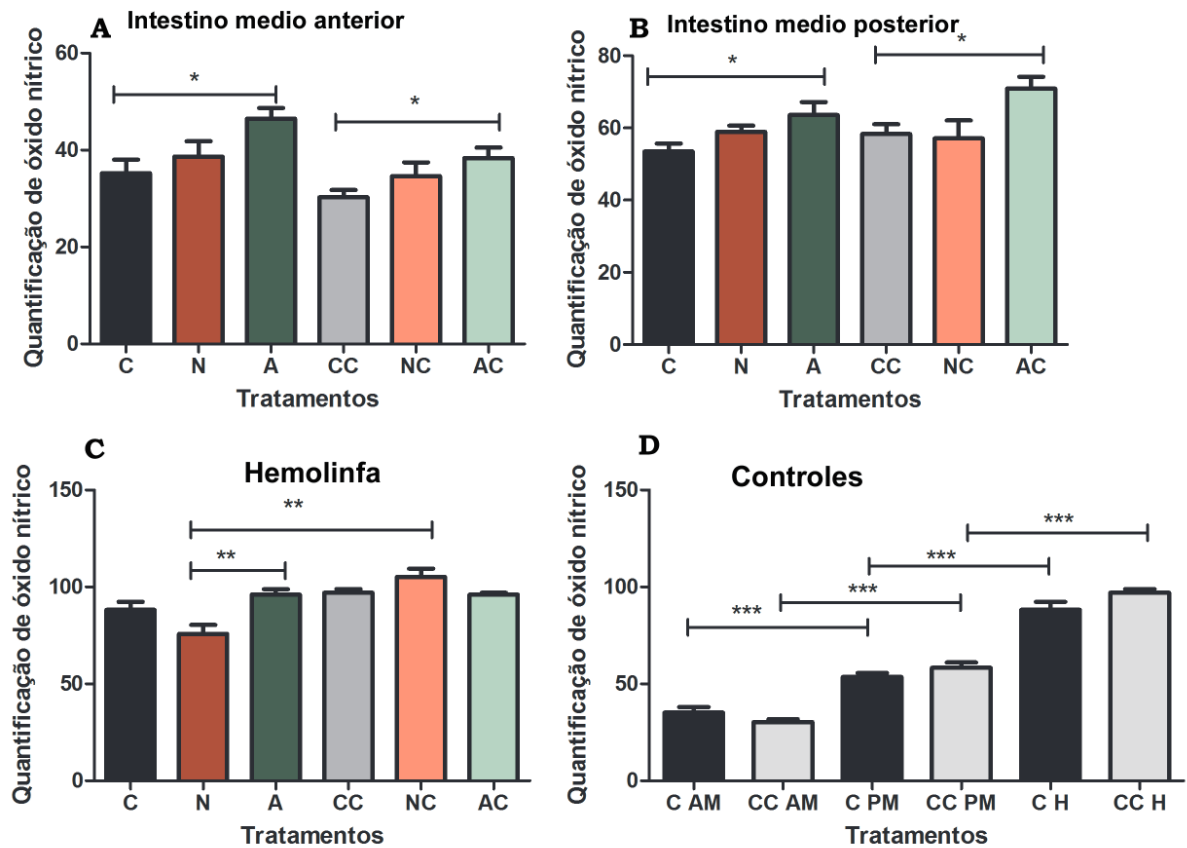


Figura 9: Quantificação de óxido nítrico em amostras de diferentes tecidos de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* 9 dias após a alimentação.

A: Intestino médio anterior; **B:** Intestino médio posterior; **C:** Hemolinfa; **D:** Quantificação de óxido nítrico em diferentes tecidos de insetos controle e controle infectados. Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) (**N**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) (**A**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (1×10^7 epimastigotas/mL de sangue) (**CC**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) e infectados com parasita (**NC**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) e infectados com parasita (**AC**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados experimentos com 10 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA e teste Tukey comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.4. Microbiota (C.F.U.)

A quantidade de bactérias cultiváveis da microbiota do trato digestivo de ninfas de 5° estágio infectadas com *T. cruzi* (CC) é significativamente menor que no grupo de insetos controle (C) ($p < 0,01$; Figura 10). Os grupos de insetos não infectados e tratados com L-NAME (N) e L-arginina (A) não demonstram diferença significativa quando comparados ao controle (C), apesar de observarmos um ligeiro decréscimo (Figura 10). Em contrapartida nos insetos infectados e tratados com L-NAME (NC) observou-se uma tendência de maior população de bactérias em comparação aos grupos de insetos controle infectados (CC) e um aumento significativo no grupo de insetos infectados e tratados com L-arginina (AC) ($p < 0,001$; Figura 10). Diferença estatística também foi observada nesse grupo de insetos infectados e tratados com L-arginina (AC) em relação ao grupo tratado com L-NAME (NC) ($p < 0,01$) (Figura 10).

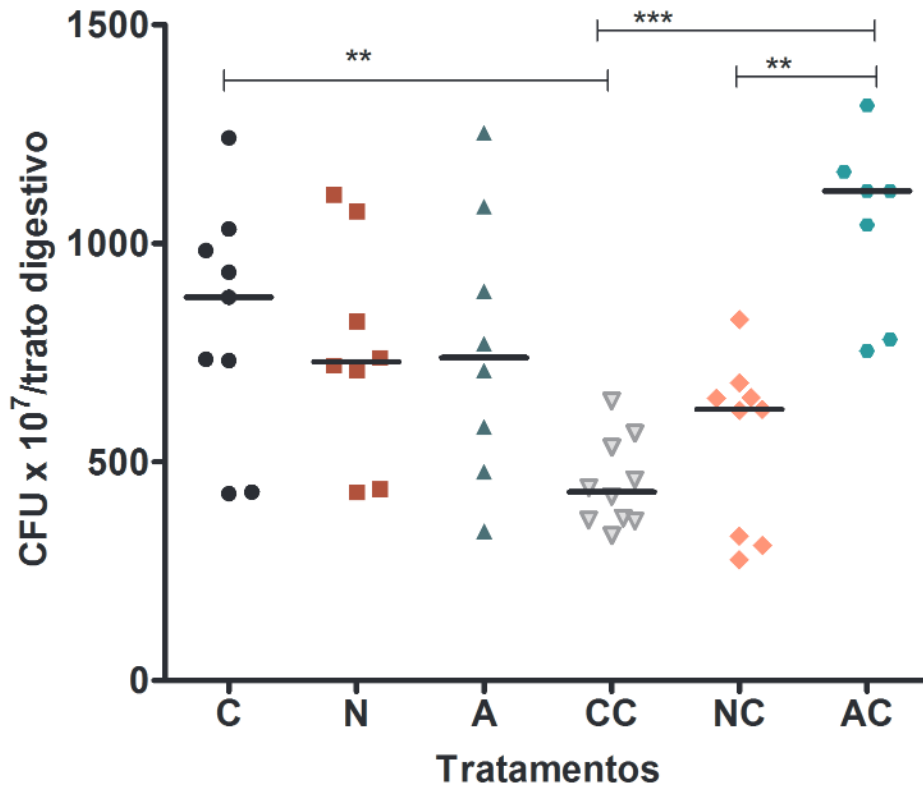


Figura 10: Quantificação das unidades formadoras de colônia de bactérias presentes no trato digestório de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* 8 dias após alimentação.

Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (C); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) (N); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) (A); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (1x 10⁷ epimastigotas/mL de sangue) (CC); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) e infectados com parasita (NC); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) e infectados com parasita (AC). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados experimentos com 10 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns, comparando todos os grupos entre si e t Test com Mann Whitney; *** p<0.001 e **p<0,01. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.5. Atividade da enzima Fenoloxidase

A atividade da PO foi analisada em amostras do trato digestivo de insetos e diferenças significativas foram observadas em insetos tratados com L-NAME (Figura 11). O tratamento com L-NAME sem e com infecção de *T. cruzi* causou uma diminuição significativa na atividade da enzima PO quando comparada aos insetos controle ($p < 0,01$; Figura 11).

Em insetos não tratados, observa-se que a presença do parasita gera uma diminuição significativa da atividade da PO em relação à insetos controle não infectados ($p < 0,05$; Figura 11).

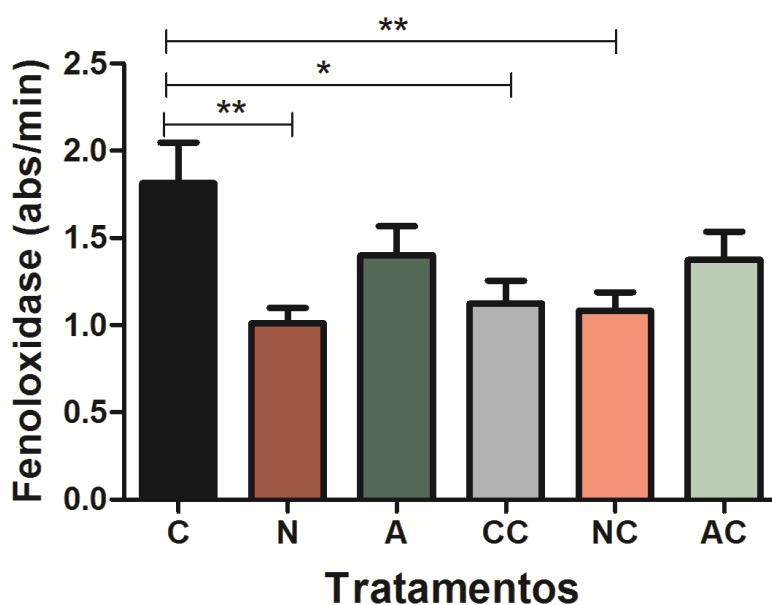


Figura 11: Atividade da enzima fenoloxidase em amostras de trato digestório de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* no 8º dia após a alimentação.

Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (C); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) (N); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) (A); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (1×10^7 epimastigotas/mL de sangue) (CC); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) e infectados com parasita (NC); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) e infectados com parasita (AC). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados experimentos com 10 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Tukey, comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.6. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana contra *Serratia marcescens*, espécie de enterobactéria encontrada na microbiota intestinal de *R. prolixus*, das amostras tratadas com L-NAME e L-arginina infectadas ou não com *T. cruzi* foram testadas (Figura 12).

A atividade de amostras de insetos controle infectados é significativamente maior do que nos insetos controle não infectados tanto com 5 e 9 dias após alimentação ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente) (Figura 12A). Nos insetos controle a atividade permanece a mesma de 5 para 9 dias e depois aumenta significativamente 13 dias após alimentação ($p < 0,001$; Figura 12A). Já nas amostras de insetos controle infectados, a atividade antibacteriana com 5 dias é alta e diminui significativamente após 9 dias e depois aumenta novamente com 13 dias após alimentação ($p < 0,001$; Figura 12A).

Em relação aos tratamentos com os compostos, as amostras de insetos tratados com L-arginina não infectados possuem significativamente menores atividades antibacterianas cinco dias após a alimentação, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 12B). O resultado é mais evidente quando os insetos tratados com L-arginina estão infectados com *T. cruzi*, onde a diminuição da atividade antibacteriana é bem maior quando comparada ao grupo controle infectado ($p < 0,001$; Figura 12B). A atividade do grupo L-arginina infectada é também significativamente menor que a do grupo de insetos tratados com L-NAME infectados ($p < 0,001$; Figura 12B). Nos dias 9 e 13 após alimentação não observamos diferença de atividade contra *S. marcescens* em nenhum tratamento (Figura 12C e 12D).

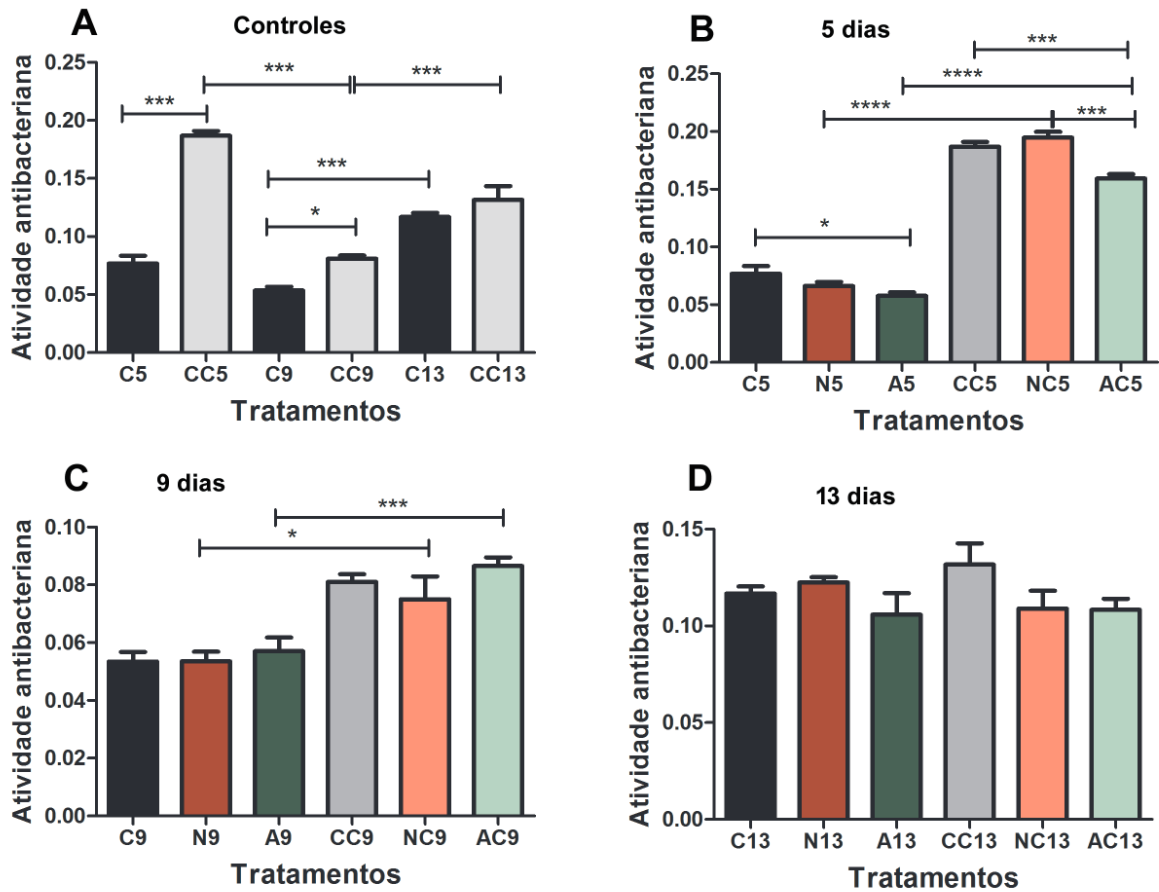


Figura 12: Atividade antibacteriana em amostras de trato digestivo de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* em diferentes dias após a alimentação.

A: atividade antibacteriana em diferentes dias após alimentação. **B:** 5 dias após a alimentação. **C:** 9 dias após a alimentação. **D:** 13 dias após a alimentação. Tratamentos: insetos alimentados apenas com sangue (**C**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) (**N**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) (**A**); insetos infectados com *Trypanosoma cruzi* Dm28c (1×10^7 epimastigotas/mL de sangue) (**CC**); insetos alimentados com sangue contendo L-NAME (10mg/mL de sangue) e infectados com parasita (**NC**); insetos alimentados com sangue contendo L-arginina (5mg/mL de sangue) e infectados com parasita (**AC**). As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Foram realizados experimentos com 10 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Tukey, comparando todos os grupos entre si; **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, e * $p < 0.05$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.7. Expressão da enzima óxido nítrico sintase por RT-PCR semi-quantitativo

A expressão relativa do gene codificante da NOS foi analisada ao longo de diferentes dias após alimentação e em diferentes tecidos de *R. prolixus*. Amostras do corpo gorduroso possuem maior expressão da NOS nos primeiros dias (1 e 4 dias após alimentação) em comparação ao intestino médio anterior e posterior ($p < 0,01$; Figura 13). A expressão da enzima no primeiro dia é cerca de duas vezes maior no corpo gorduroso do que no intestino médio posterior (Figura 13).

Existe uma tendência a queda na expressão da enzima óxido nítrico sintase no corpo gorduroso dos insetos do grupo controle, do primeiro ao oitavo dia após a alimentação, na qual no 8° dia após a alimentação, esta expressão se mostra significativamente mais baixa que a expressão no 4° e 1° dia ($p < 0,01$ e $p < 0,001$; Figura 13).

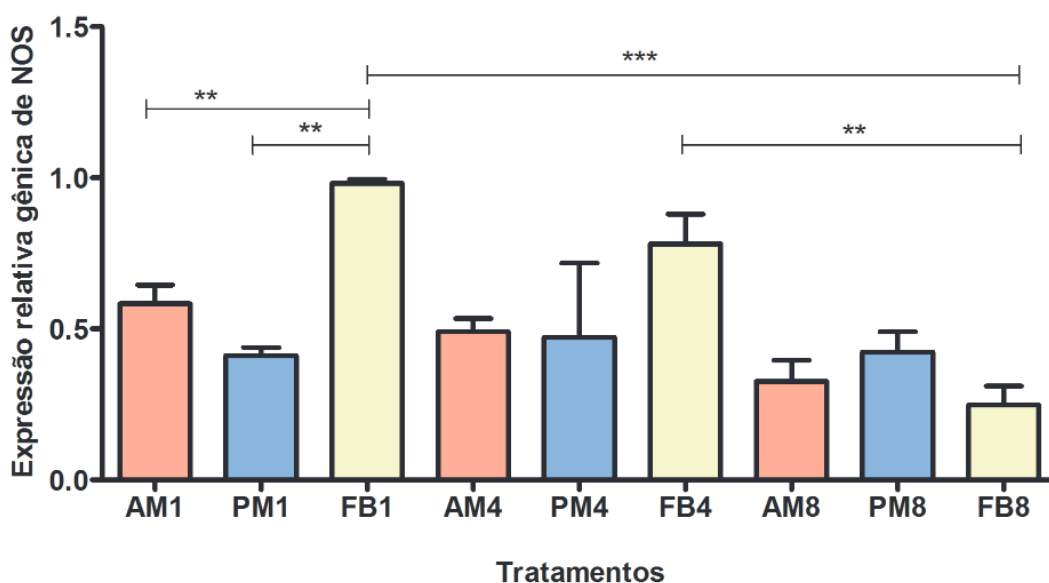


Figura 13: Abundância relativa do gene que codifica a óxido nítrico sintase em ninfas de 5° estágio de *Rhodnius prolixus* em diferentes dias após a alimentação e em diferentes tecidos.

Tratamentos: **AM1**, **AM4** e **AM8** – intestino médio anterior 1, 4 e 8 dias após alimentação; **PM1**, **PM4** e **PM8** – intestino médio posterior 1, 4 e 8 dias após alimentação; **FB1**, **FB4** e **FB8** – corpo gorduroso 1, 4 e 8 dias após alimentação. As barras representam as médias e erro padrão de cada tratamento. Cada tratamento tem 3 repetições com pool de 5 insetos em cada, totalizando 15 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Newman-Keuls, comparando todos os grupos entre si; *** $p < 0.001$ e ** $p < 0,01$. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.8. Mortalidade em insetos tratados por inoculação

A Mortalidade causada no inseto após a inoculação está representada na tabela 4, na qual se ressalta a toxicidade de L-arginina na inoculação comparada ao L-NAME. A mortalidade de insetos controle inoculados com solução salina independente do volume (0,5 ou 0,7 μL /inseto) fica em torno de 8 a 17%. Já na inoculação com L-arginina as mortalidades da menor dose para a maior (0,36, 0,1 e 0,7mg/ μL) são de 9%, 80% e 82% (Tabela 4). No caso do tratamento com L-NAME observamos mortalidades mais baixas, próximas aos valores do controle, variando de 11,1% a 28,6% nas doses de 0,36 a 0,7mg/ μL (Tabela 4).

Em relação aos insetos inoculados e um dia depois infectados oralmente com *T. cruzi*, apenas testamos o composto L-NAME. Nesse caso, enquanto o controle infectado apresenta mortalidade de 32%, os insetos tratados com L-NAME e inoculados possuem mortalidade de 47 e 79% nas doses de 0,36 e 0,7mg/inseto (Tabela 4).

Tabela 4: Mortalidade de insetos tratados com L-NAME e L-arginina via inoculação

Tratamentos	Infecção	Dose (volume) /inseto	Concentração da solução estoque injetada	Mortalidade (%)	
Sol. salina	-	0,5 μL	1x	17	
	-	0,7 μL		7,7	
	<i>T. cruzi</i>	0,7 μL	1x	32,5	
L-NAME	-	0,18 mg (0,5 μL)	0,36mg/ μL	15,4	
	-	0,30mg (0,5 μL)	0,10mg/ μL	11,1	
	-	0,49mg (0,7 μL)	0,70mg/ μL	28,6	
	<i>T. cruzi</i>	-	0,18 mg(0,5 μL)	0,36mg/ μL	46,9
		-	0,49mg (0,7 μL)	0,70mg/ μL	79,0
L-arginina	-	0,18 mg(0,5 μL)	0,36mg/ μL	9,1	
	-	0,30mg (0,5 μL)	0,10mg/ μL	80,0	
	-	0,49mg (0,7 μL)	0,70mg/ μL	82,4	

No gráfico de sobrevivência ao longo do tempo observamos que a mortalidade devido ao tratamento ocorre até 5 dias após inoculação se estabilizando em seguida (Figura 14). Além disso, fica nítido o efeito na sobrevivência dos insetos

tratados com L-arginina na dose de 0,7mg/μL em que menos de 20% dos insetos sobrevivem nesses 5 dias (Figura 14).

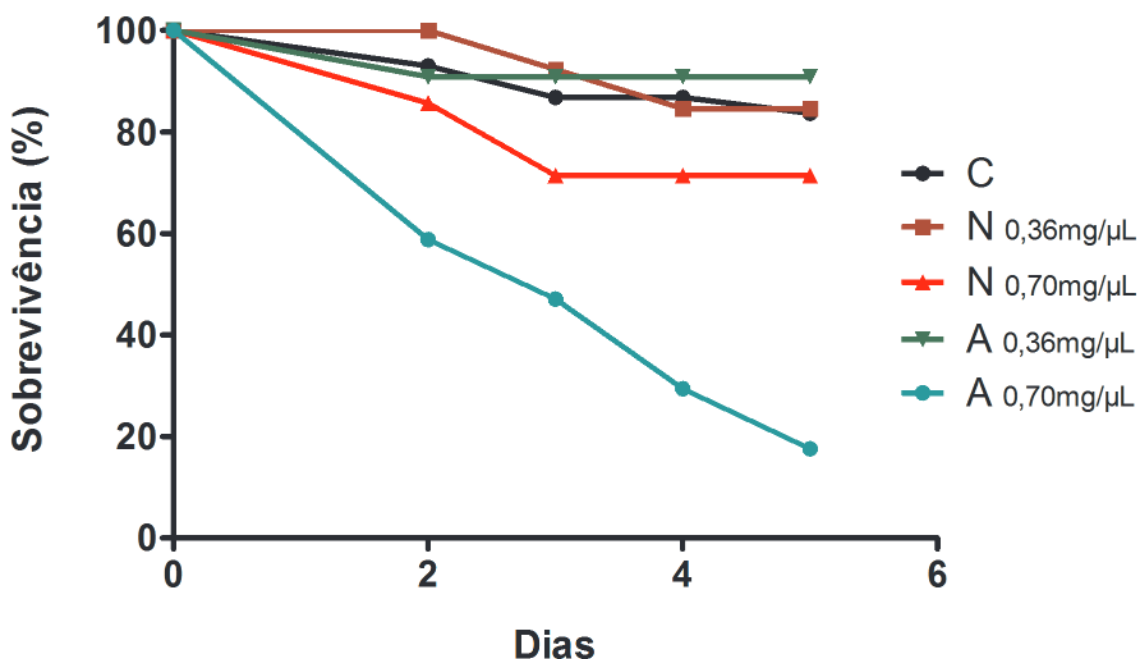


Figura 14: Porcentagem de sobrevivência de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* diferentes dias após inoculação com diferentes doses de L-NAME e L-arginina.

Tratamentos: insetos inoculados com solução salina *Rhodnius* (C); insetos inoculados com L-NAME 0,36mg/μL (N 0,36mg/μL); insetos inoculados com L-NAME 0,70mg/μL (N 0,70mg/μL); insetos inoculados com L-arginina 0,36mg/μL (A 0,36mg/μL); insetos inoculados com L-arginina 0,70mg/μL (A 0,70mg/μL).

Inoculações com os compostos nos insetos no mesmo dia da alimentação destes apenas afetou os insetos inoculados com L-arginina. Somente 40% dos insetos inoculados com L-arginina conseguiram se alimentar (Tabela 5) e o volume de sangue ingerido foi menor (235mg/inseto) em comparação com insetos controle, inoculados com salina, (310,5mg/inseto) e insetos inoculados com L-NAME (273,5mg/inseto).

A porcentagem de insetos que se alimentaram após inoculação com L-NAME um dia antes da alimentação foi de 78% na maior dose 0,7mg/μL (Tabela 5). Entretanto, com L-arginina a porcentagem de insetos que conseguiram se alimentar foi bem menor. Na dose de 0,1mg/μL de L-arginina, 40% dos insetos se alimentaram e na dose 0,7/μL somente 18% dos insetos conseguiram se alimentar (Tabela 5).

Tabela 5: Taxa de alimentação em ninfas de 5° estágio de *Rhodnius prolixus* inoculados um dia antes ou no mesmo dia da alimentação sanguínea com solução salina, L-NAME ou L-arginina.

Inoculação	Tratamentos	Doses injetada por inseto	Concentração da solução estoque injetada	Alimentados (%)
No mesmo dia da alimentação	Sol. salina	1x	1x	90,5
	L-NAME	0,3mg (0,5 µL)**	0,1mg/µL	100,0
	L-arginina	0,18 (0,5 µL)*	0,36mg/µL	40,0
Um dia antes da alimentação	Salina	0,5 µL	1x	86
		0,7 µL	1x	87
		0,18 (0,5 µL)*	0,36mg/µL	100
	L-NAME	0,3mg (0,5 µL)**	0,10mg/µL	82
		0,49mg (0,7 µL)***	0,70mg/µL	78
		0,18 (0,5 µL)*	0,36mg/µL	85
	L-arginina	0,3mg (0,5 µL)**	0,10mg/µL	40
		0,49mg (0,7 µL)***	0,70mg/µL	18

Além da baixa alimentação e alta mortalidade causadas pelo tratamento por inoculação com L-arginina, os insetos apresentaram paralisia, alguns não sofreram ecdise (Tabela 6). Em relação à inoculação com L-NAME (0,36mg/µL) um dia antes da alimentação 1 entre 10 indivíduos apresentaram alterações morfológicas, como abdômen cheio de ar, não tendo diminuído o tamanho do abdômen com o passar dos dias após a alimentação (Figura 15). Este fenômeno ocorreu apenas duas vezes, e o inseto apresentava movimentos das patas mesmo após 7 dias após a alimentação.

Além disso, L-NAME não demonstrou alteração na ecdise, porém L-arginina (0,49mg/inseto) não permitiu que de 1 de 3 insetos sobreviventes não completassem muda mesmo 45 dias após a alimentação.

Tabela 6: Alterações de desenvolvimento em ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas com L-NAME e L-arginina em diferentes doses.

Tratamentos	Dose (mg/inseto)	Observações
L-NAME	Todas	Nenhuma alteração
	0,18	1 inseto paralisado e 1 inflado
L-arginina	0,30	5 insetos demonstraram paralisia
	0,49	3 sobreviventes não fizeram muda mesmo após 45 dias após a alimentação



Figura 15: Morfologia de insetos inoculado com 0,5µL de L-arginina a 0,36mg/µL.

Dessas observações de mortalidade, porcentagem de alimentação e desenvolvimento dos insetos, foram escolhidas as concentrações ideais menos tóxicas ao inseto para realização dos ensaios de respostas imunológicas. Dessa forma, definimos as concentrações de L-NAME 0,1mg/µL (inoculação de 0,5µL) e L-arginina 0,36mg/µL (0,5µL) com aplicações um dia antes da alimentação sanguínea.

4.9. Avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos e óxido nítrico sintase por PCR quantitativo

4.9.1. No corpo gorduroso

A expressão de NOS no corpo gorduroso foi inibida tanto pela inoculação de L-NAME (0,1mg/ μ L), com média quatro vezes menor que do grupo controle ($p < 0,01$), quanto pela inoculação de L-arginina (0,36mg/ μ L), quase cinco vezes menor ($p < 0,01$) (Figura 16A).

Em relação aos AMPs, L-NAME induz a expressão de *defC* em 2 vezes em comparação com os insetos controle ($p < 0,1$) (Figura 16B). Porém, a expressão gênica de *proI* não é alterada pela inoculação por L-NAME, demonstrando, no entanto, uma tendência a ser reduzida quando insetos são tratados com L-arginina (Figura 16C).

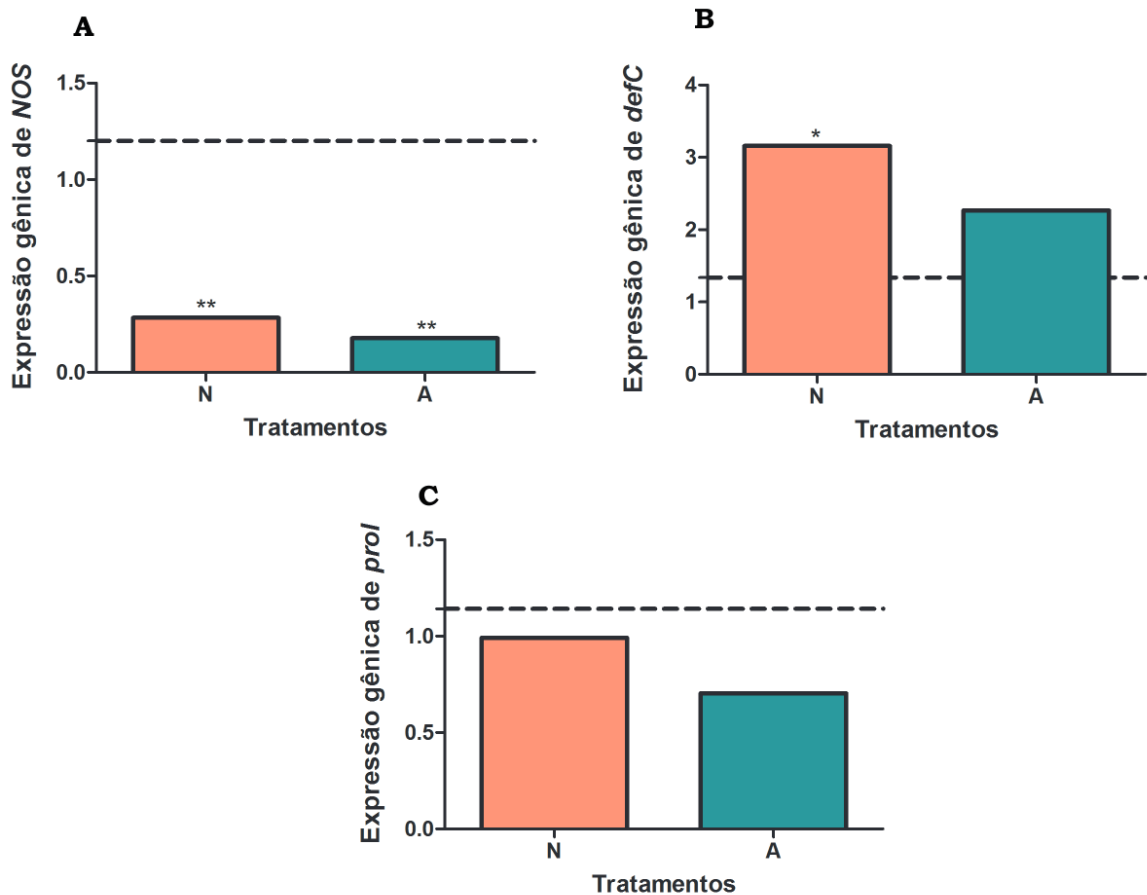


Figura 16: Expressão relativa do mRNA codificante de NOS, defC e prol no corpo gorduroso de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas L-NAME ou L-arginina.

A – expressão relativa de *NOS*. **B** - expressão relativa de *defC*. **C** - expressão relativa de *prol*. Tratamentos: insetos inoculados com solução salina (**Controle** - representado pela linha tracejada); insetos inoculados com L-NAME (0,1mg/μL) (**N**); insetos inoculados com L-arginina (0,36mg/μL) (**A**). As barras representam as médias dos valores de RQ (*relative quantification*) relativas ao grupo controles e as linhas o erro padrão. Cada tratamento tem 3 repetições com pool de 5 insetos em cada, totalizando 15 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Tukey, comparando todos os grupos com o grupo de insetos controle; **p<0,01 e * p<0,05. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

4.9.2. No intestino médio anterior

O composto L-arginina inoculado na hemolinfa dos insetos um dia antes da alimentação afetou a expressão de *defC* no intestino médio anterior um dia após a alimentação, onde se observa aumento de aproximadamente 3 vezes na expressão deste gene em comparação com a expressão do gene no grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 17C).

Não se observa diferença estatística significativa na expressão de *NOS* (Figura 17A) tanto para o tratamento com L-NAME como para o tratamento com L-arginina no intestino médio anterior dos insetos, embora haja uma tendência no aumento da expressão de *NOS* induzida por L-arginina. Entretanto, em relação a expressão de *proI*, o grupo de insetos tratados com L-NAME apresentou aumento significativo na expressão desse gene em comparação com o grupo de insetos controle ($p < 0,05$; Figura 17C) e os insetos tratados com L-arginina, apesar de não ter diferença estatística, demonstram diminuição na expressão de *proI* (Figura 17C).

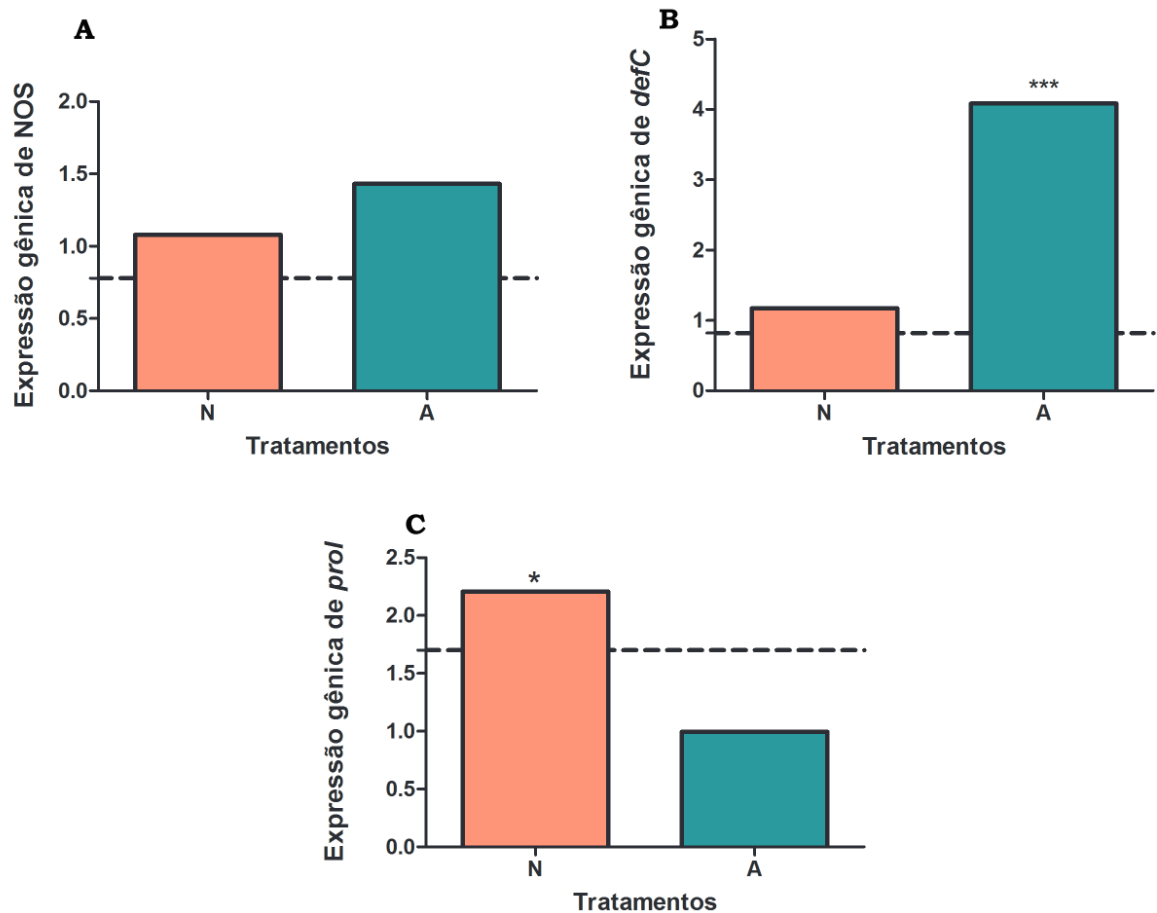


Figura 17: Expressão relativa do mRNA codificante de NOS, defC e prol no trato digestivo de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* inoculadas L-NAME ou L-arginina.

A – expressão relativa de NOS. **B** - expressão relativa de *defC*. **C** - expressão relativa de *prol*. Tratamentos: insetos inoculados com solução salina (**Controle** - representado pela linha tracejada); insetos inoculados com L-NAME (0,1mg/μL) (**N**); insetos inoculados com L-arginina (0,36mg/μL) (**A**). As barras representam as médias dos valores de RQ (*relative quantification*) relativas ao grupo controles e as linhas o erro padrão. Cada tratamento tem 3 repetições com pool de 5 insetos em cada, totalizando 15 insetos em cada tratamento. Os tratamentos foram comparados utilizando One-Way ANOVA com teste Tukey, comparando todos os grupos com o grupo de insetos controle; *** p<0.001 e * p<0,05. Apenas diferenças estatísticas significativas estão representadas nos gráficos.

V. DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigamos a importância das espécies reativas de nitrogênio de *Rhodnius prolixus* para o desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* Dm28c no hospedeiro invertebrado, sobre o crescimento de bactérias da microbiota intestinal, bem como seu papel como molécula sinalizadora de outras respostas imunológicas. O tratamento dos insetos com a droga que atua como substrato da reação de produção de RNS, L-arginina, aumenta a produção de óxido nítrico (Fig. 9.A), aumenta a população de bactérias da microbiota intestinal (Fig. 10), diminui a atividade antibacteriana do intestino médio contra *Serratia marcescens* (Fig. 12.B), diminui a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase no corpo gorduroso (Fig. 16.A) e aumenta a expressão do peptídeo antimicrobiano, defensina C (Fig. 17.B), no trato digestivo. Já o tratamento com a droga inibidora da enzima NOS, L-NAME, induz uma maior proliferação de *T. cruzi* no trato digestivo de *R. prolixus* (Fig. 4), diminui a atividade da fenoloxidase (Fig. 11) e diminui a expressão gênica de NOS no corpo gorduroso (Fig. 16.A).

Diversos trabalhos relatam a ação de RNS sobre o desenvolvimento de diferentes parasitas no hospedeiro invertebrado (Ascenzi e Gradoni, 2002; Rivero, 2006; Peterson *et al.*, 2007; Carton *et al.*, 2009; Vijay *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012). Resultados do presente trabalho também reforçam essa afirmativa. O tratamento oral com L-arginina, substrato da produção de RNS, tende a diminuir a quantidade de parasitas no trato digestivo e também na porcentagem de insetos infectados e o contrário é observado com tratamento com L-NAME, inibidor da NOS, tanto por via oral como por inoculação, no qual a quantidade de parasitas e a porcentagem de insetos infectados tendem a aumentar. Portanto, tanto a indução como a inibição de RNS nos insetos sugere alteração no desenvolvimento do *T. cruzi* no intestino médio de *R. prolixus*, sendo que a presença de maior quantidade de RNS diminui a infecção do parasita no inseto.

Em *Anopheles*, a administração de L-arginina diminui a porcentagem de insetos infectados por *Plasmodium* (Luckhart *et al.*, 1998; Murdock *et al.*, 2014). Administração oral de L-NAME em *Anopheles* apresenta um efeito contrário sobre oocistos, aumentando sua quantidade (Luckhart *et al.*, 1998; Vijay *et al.*, 2011; Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). Carton e colaboradores (2009) demonstraram que inoculações de LNMMA (N^G-monomethyl-L-arginine, monoacetate salt) e L-NAME na

hemocele de *Drosophila paramelanica* aumentou a sobrevivência do parasita *Leptopilina heterotoma*, sugerindo que o efeito da inibição da produção de RNS facilita o desenvolvimento de parasitas nestes insetos. Whitten e colaboradores (2001) demonstraram que a presença de *T. rangeli* no intestino de *R. prolixus* diminui a expressão de NOS na hemocele do inseto, facilitando que o parasita complete seu ciclo na hemocele.

Neste trabalho, observamos que enquanto a concentração de nitrito diminui no intestino médio anterior (Fig. 5.A), aumenta no intestino médio posterior com o passar do tempo após a alimentação (Fig. 6.A) e isto vai de acordo com os resultados de Whitten e colaboradores (2007). Esse perfil de concentração de nitrito no intestino médio parece estar correlacionado com a digestão sanguínea ao longo do trato digestivo em que a maior atividade hemolítica no intestino médio anterior ocorre nos primeiros cinco dias após alimentação (Azambuja, *et al.*, 1983). A formação de metabólitos derivados do ON parecem estar correlacionados com a hemoglobina e o estresse oxidativo e nitrosativo derivados da digestão, sendo que esses metabólitos afetam a infecção do parasita no inseto (Peterson *et al.*, 2007).

Comparando os diferentes tecidos de *R. prolixus*, detectamos uma maior concentração de óxido nítrico na hemolinfa, seguida do intestino médio anterior e depois pelo intestino médio posterior, no nono dia após alimentação em insetos controle (Fig. 7 e 8). De outra maneira, a quantificação de nitrito analisada nesse mesmo dia, mostrou que a hemolinfa e o intestino médio anterior apresentam a mesma concentração desse RNS, enquanto o intestino médio posterior possui uma menor quantidade. Contudo, avaliando a expressão relativa do gene codificante da enzima NOS, observamos que é maior no corpo gorduroso logo após a alimentação e diminui ao longo do tempo se assemelhando aos níveis de expressões do intestino médio anterior e posterior (Fig. 13). A maior expressão da NOS no corpo gorduroso corrobora com a quantificação de ON observada na hemolinfa na primeira semana após alimentação, assim como observado por Whitten *et al.*, (2007).

Os tratamentos de *R. prolixus* com L-NAME e L-arginina via alimentação não alteram a quantificação de nitrito utilizando a metodologia de ensaio colorimétrico com kit Griess, embora seja possível observar diferenças entre os grupos controle dos diferentes dias testados. Entretanto, quando utilizamos o método de detecção de óxido nítrico por ensaio fluorimétrico foi possível observar que L-arginina aumenta a produção de RNS como esperado (Fig. 9). A medição de óxido nítrico em sistemas

biológicos requer muitos cuidados, pois é rapidamente oxidado para nitrito e/ou nitrato pelo oxigênio. Assim, os Kits baseados na reação de Griess medem a concentração de nitrito (Griess, 1879). Porém, devido à complexidade molecular das amostras biológicas, a reação de Griess é propensa a sofrer interferências, como por exemplo, pela presença de NADPH (Verdon *et al.*, 1995), hemoglobina, ascorbato, tióis reduzidos, fosfatos, NG-nitro-L-arginina e heparina (Cortas *et al.*, 1990; Sastry *et al.*, 2002). Investigações sobre RNS em *Anopheles* sugerem que apenas a quantificação de nitrito não é representativa em relação ao total de metabólitos formados, enfatizando a importância da quantificação de outras espécies reativas, como o nitrato (Peterson *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008)

Como já demonstrado previamente, o substrato L-arginina aumenta a produção de ON (Luckhart *et al.*, 1998; Rivero, 2006; Peterson *et al.*, 2007) o que também foi observado no presente trabalho, tanto nos dois compartimentos do intestino médio (Fig. 9. A e B) como na hemolinfa (Fig. 9.B) de *R. prolixus* tratados via alimentação após nove dias. Provavelmente o composto L-arginina via alimentação oral gera aumento na quantidade de ON nesse órgão e por difusão vai para hemolinfa. Entretanto o tratamento dos insetos com L-arginina por inoculação gera menor expressão gênica de NOS no corpo gorduroso e tendência a maior expressão no trato digestivo, um dia após a alimentação (Fig. 16A e 17A). A inoculação de L-arginina, na hemocele, pode induzir alta produção de RNS local que pode ter desencadeado um processo de regulação negativa, com a inibição da expressão da NOS no corpo gorduroso. Sabe-se que a regulação de produção de RNS deve ser muito sensível, pois esses reativos também são tóxicos para o hospedeiro (Nappi *et al.*, 2000). Já o tratamento com L-NAME, inibidor da NOS, diminui a expressão da NOS (Fig. 16.A), apesar de não observarmos diferença significativa na quantidade de ON e nem de nitrito nas amostras tratadas com L-NAME.

O efeito sinalizador da molécula ON em invertebrados foi descrito em muitas funções, como na modulação da quimiorrecepção, e na memória a longo prazo, por exemplo (Nappi & Ottaviani, 2000; Rivero 2006). Porém, seus efeitos específicos na sinalização da resposta imunológica necessitam maiores investigações. Nossos resultados indicam que o tratamento dos insetos com inibidor de NOS e substrato da NOS via oral afetam outras respostas imunológicas como atividade da fenoloxidase e atividade antibacteriana mostrando possível ação de RNS como sinalizador de resposta imune. Além disso, a quantidade de ON produzida na hemolinfa é alterada

mesmo com o fornecimento dos compostos via alimentação, indicando uma ação sistêmica da molécula.

O tratamento com o substrato da produção de RNS, L-arginina, tende a diminuir a atividade da enzima fenoloxidase e diminuir a atividade antibacteriana contra *Serratia marcescens*. Essa menor atividade tanto da fenoloxidase como de atividade antibacteriana podem estar relacionadas ao aumento na quantidade de bactérias cultiváveis da microbiota intestinal. De acordo com Castro *et al.*, (2012) a atividade fenoxidásica no trato digestivo de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi* é maior e em insetos tratados com antibióticos que reduzem muito as bactérias do trato digestivo a atividade de PO é menor e sua ação parece estar correlacionado com o controle das bactérias da microbiota.

A relação da atividade antibacteriana *in vitro* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também está altamente correlacionada com o desenvolvimento *in vivo* da microbiota intestinal de *R. prolixus* (Castro *et al.*, 2012 e Vieira *et al.*, 2014). No presente trabalho, a atividade antibacteriana foi testada contra a bactéria *S. marcescens*, bactéria Gram-negativa, que é encontrada com maior prevalência na microbiota intestinal dos insetos de nossa colônia (Da Mota *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015; Gumiel *et al.* 2015). Alternativamente, seria interessante testar a atividade antibacteriana de amostras de tecidos de insetos tratados com drogas que induzem e inibem a produção de RNS contra a bactéria Gram-positiva *Rhodococcus rhodnii*, tida como simbiote de *R. prolixus* (Goodfellow and Alderson, 1979; Eichler & Schaub, 2002).

Podemos sugerir que o efeito de L-arginina na diminuição da atividade antibacteriana, permite que a microbiota se desenvolva e apresente um efeito tripanolítico ocasionando a redução do *T. cruzi* nos insetos tratados além do efeito direto da alta concentração de ON. Muitos estudos descrevem como a microbiota intestinal de insetos vetores afeta o ciclo de vida de parasitas, incluindo competição por nutrientes entre estes microrganismos (Weiss & Aksoy, 2011; Gendrin & Christophide, 2013). Em *R. prolixus*, em especial, já foi descrito que *S. marcescens*, presente em maioria em seu intestino, apresenta uma atividade tripanolítica direta sobre o parasita (Azambuja *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2007). Este efeito direto da microbiota sobre o parasita também é demonstrado em *Anopheles*, onde a microbiota do intestino médio afeta negativamente *Plasmodium* por contato direto e pela indução da resposta imune mediada por bactérias comensais (Dong *et al.*,

2009; Cirimotich *et al.*, 2011). Em *Rhodnius prolixus*, os autores Castro *et al.* (2012) e Vieira *et al.*, (2016), demonstraram que o *T. cruzi* cepa Dm28c modula respostas imunológicas do inseto vetor levando a uma diminuição do crescimento de bactérias da microbiota intestinal. Em nossos dados (Fig. 10) observamos o mesmo efeito de diminuição da microbiota em insetos infectados com *T. cruzi* como nos trabalhos citados acima. Interessante que nos insetos infectados com *T. cruzi* e tratados com L-arginina observamos o contrário (Fig. 10), um aumento significativo na quantidade de bactérias, quando comparada com os grupos de insetos controle infectados e tendenciosamente quando comparada aos demais grupos.

O tratamento dos insetos com L-NAME e L-arginina além de alterar a atividade antibacteriana do intestino médio dos insetos (Fig. 12) também afetam o nível de expressão gênica de *defC* (16.B e 17.B). Em *R. prolixus*, são descritas três defensinas: A, B e C, sendo a defensina A e B reguladas positivamente em resposta a administração oral de bactérias Gram-positivas no inseto (Vieira *et al.*, 2014) e a defensina C regulada frente a infecção por *T. rangeli* e *T. cruzi*, levando a diminuição do número de bactérias intestinais e promovendo o desenvolvimento do parasita (Vieira *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2016).

O tratamento de *R. prolixus* com o substrato L-arginina administrado via alimentação sanguínea, promove um aumento da atividade antibacteriana (Fig. 12) e diminui a população de bactérias cultiváveis da microbiota intestinal (Fig. 10), com intenso aumento da expressão de *defC* no intestino médio anterior pela aplicação de L-arginina por via inoculativa (Fig. 17.B). Esses resultados demonstram que a defensina C parece estar correlacionada com a atividade antibacteriana analisada nas amostras de trato digestivo e que possuem papel fundamental no controle da população de bactérias da microbiota intestinal como também observado por Vieira *et al.*, (2015; 2016). Já a prolixicina não parece ter como função o controle da microbiota como observado por esses autores e também em nossos resultados em que o tratamento com L-arginina demonstra uma tendência diminuição de *prol* no trato digestivo (Fig. 17C).

Em contrapartida, o tratamento com L-NAME que inibe a NOS e diminui RNS, gera tendência no aumento da quantidade de parasitas no trato digestivo e aumenta a expressão de *defC* no corpo gorduroso (Fig. 16.B). Vieira *et al* (2016) observaram que infecção de *R. prolixus* com *T. cruzi* Dm28c induz a expressão de defensina C no corpo gorduroso. Dessa forma, como o composto L-NAME induz aumento na

quantidade de *T. cruzi* no trato digestivo, esses parasitas podem estar induzindo o aumento da expressão de defensina C no corpo gorduroso. Já foi descrito anteriormente que a presença de bactérias ou parasitas no trato digestivo, mesmo sem que ocorra invasão à hemocele estimula a secreção sistêmica de AMPs na hemolinfa de diversos insetos, incluindo *Phlebotomus*, *Glossina* e *Drosophila* (Boulanger *et al.*, 2004; Boulanger *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2001; Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). Adicionalmente, também foi demonstrado que após a indução da expressão de AMPs no corpo gorduroso, esses são secretados diretamente na hemolinfa e podem difundir-se por todo o corpo do inseto (Bulet & Stocklin, 2005).

A indução de AMPs mediados por ON é relatada em diversos trabalhos (Foley e O'Farrell, 2003; Herrera-Ortiz *et al.*, 2011; Ishii *et al.*, 2013). Em *Drosophila*, os autores sugerem que a NOS regula a produção de AMP pois em insetos tratados com L-NAME e desafiados por infecção de bactérias ocorre supressão na produção de AMPs (Foley e O'Farrell, 2003). Em *Anopheles*, o tratamento dos insetos com ON exógeno induz a expressão dos AMPs, atacina, cecropina e gambicina (Herrera-Ortiz *et al.*, 2011).

Além disso, o ON pode regular a produção de AMPs de forma sistêmica no inseto (Hao *et al.*, 2001 e 2003; Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). Em moscas tsé-tsé, a indução de AMPs no corpo gorduroso após infecção por parasitas no trato digestivo provavelmente ocorre via sinalização de resposta imune por moléculas como ON e H₂O₂, prevenindo o inseto de uma possível infecção generalizada (Hao *et al.*, 2001 e 2003). Assim como, AMPs produzidos no trato digestivo de insetos antes mesmo dos parasitas entrarem em contato com a membrana do intestino médio indica a possibilidade do NO produzido na hemocele atuar como sinalizador dessa resposta imune (Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). Sugere-se, portanto, que o ON produzido na hemocele, após inoculação de L-arginina, alcança o intestino médio através da circulação, induzindo a expressão de defensina C nesse compartimento e não diretamente no corpo gorduroso. O ON é uma molécula gasosa que se difunde facilmente pelos tecidos e por essa razão é um sinalizador imediato de respostas imunológicas em outros tecidos (Nappi *et al.*, 2000).

Além de alterar o desenvolvimento de *T. cruzi* e de microbiota e alterar respostas imunológicas de *R. prolixus*, o substrato L-arginina, também causa alterações na fisiologia de insetos. Como o ON participa de diferentes funções fisiológicas dos insetos (Muller, 1997; Rivero, 2006), a indução da produção desse

reativo altera o desenvolvimento do inseto como observado no presente trabalho. O tratamento com L-arginina causa paralisia de movimentos, menor taxa de alimentação dos insetos, alterações morfológicas (hemocele repleta de gases) (Fig. 15) e alterações na ecdise dos insetos. Larvas de bicho de seda desafiados com diferentes microrganismos apresentaram paralisia suave mediada por um peptídeo paralítico que induz expressão de NOS, e outras respostas imunológicas (Ishii *et al.*, 2013). A ação de ON no sistema nervoso dos insetos é relatada em diversos trabalhos (Flora-Filho e Zilberstein, 2000; Bicker 2001; Settembrini *et al.*, 2007). Dessa forma seria interessante investigar em *R. prolixus* a ação de ON no sistema nervoso e atividade locomotora e correlação com respostas imunológicas.

Dessa forma, concluímos, que a indução e inibição da produção de reativos de nitrogênio possui papel fundamental na fisiologia de *R. prolixus*, alterando tanto a população de bactérias cultiváveis da microbiota intestinal como as respostas imunológicas. Além disso, pode-se sugerir que as espécies reativas de nitrogênio influenciam outras respostas imunológicas do inseto atuando como mensageiros entre diferentes órgãos e tecidos.

VI. CONCLUSÕES

- O tratamento de *Rhodnius prolixus* via oral com L-NAME, diminui a quantidade de óxido nítrico na hemolinfa, aumenta a quantidade de *Trypanosoma cruzi* e diminui a atividade da fenoloxidase no trato digestivo.
- A inoculação com L-NAME na hemocele de *Rhodnius prolixus* ocasiona menor expressão da enzima óxido nítrico sintase e maior expressão da defensina C no corpo gorduroso.
- O tratamento de *Rhodnius prolixus* com L-arginina administrada oralmente induz a produção de óxido nítrico, diminui a atividade antimicrobiana, aumenta a população de bactérias na microbiota e diminui o número de *Trypanosoma cruzi* no trato digestivo.
- A inoculação de L-arginina na hemocele de *Rhodnius prolixus* diminui a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase 24 horas após aplicação e aumenta a expressão do peptídeo antimicrobiano, defensina C, no intestino médio anterior 24 horas após a inoculação.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKANE Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ. 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11337-42.
- ASHIDA M, Brey P. 1997. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In Brey PT, Hultmark DE. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & hall, London, p. 135-171.
- AZAMBUJA P, Guimarães JA, Garcia ES. 1983. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. 29 (11), 833-837
- AZAMBUJA P, Garcia ES, 1997. Care and maintenance of triatomine colonies. *Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. London: Chapman and Hall: 56–64.
- AZAMBUJA P, Garcia ES, 1991a. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7:240-4.
- AZAMBUJA, P., E. S. Garcia e N. A. Ratcliffe 1991b Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86, 1-10.
- 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. *Experimental Parasitology* 107, 89–96.
- AZAMBUJA P, Ratcliffe NA, Garcia ES. 2005a. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*;77(3):397-404.
- AZAMBUJA P, Garcia ES, Ratcliffe NA. 2005b. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitology*;. 21(12):568-72.
- BALANÍA-FOUCE R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada C, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM. 2012. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Molecular & Biochemical Parasitology* 188. 85–93
- BASSET Y, Cizek L, Cuénoud P, Didham RK, Guilhaumo F, *et al.* 2012 *Arthropod Diversity in a Tropical Forest*. *Science*: 338, (6113), 1481-1484

- BEARD CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV, 2002. Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology* (47):123–141.
- BECKAGE NE 2011. *Insect Immunology*. San Diego, California, USA, Academic Press.
- BICKER G. 2001. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res*. Feb;303(2):137-46.
- BOULANGER N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L. 2004. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.*;72:7140-6.
- BONEKAMP NA, Völkl A, Fahimi HD, Schrader M 2009. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors* 35: 346-355.
- BRODERICK, N.A., Buchon, N., Lemaitre, B., 2014. Microbiota-induced changes in drosophila melanogaster host gene expression and gut morphology. *MBio*. 5, e01117-14.
- 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, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol.*: 329 – 344.
- CARTON Y, Frey ,F and Nappi AJ. 2009. Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila*. *J. Parasitol.*, 95(5), 2009, pp. 1134–1141
- CASTEELS P 1998. Immune responses in Hymenoptera *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. New York, USA, Chapman & Hall. . 92–110 in Brey, P.T. & Hultmark, D. Eds
- CASTILLO JC, Robertson AE, Strand MR 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 36(12):891-903.
- CASTRO DP, Seabra SH, Garcia ES, Souza W, Azambuja P 2007. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol* 117(2): 201–207.
- CASTRO DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. 2012. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota

- in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS One.;5:e36591.
- CERENIUS L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol 29(6):263-71.
- CHAGAS CRJ, 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morphologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159–218.
- CHAGAS FILHO C, 1974. Histórico sobre a doença de Chagas, In: CANÇADO, J R , ed Doença de Chagas Belo Horizonte: Imprensa Oficial: 5-21
- CHAVEZ C, Recio-Tótoro B, Flores-Escobar B, Lanz-Mendoza H, Sanchez J, Soberón M, Bravo A. 2015. Nitric oxide participates in the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to kill *Manduca sexta* larvae. Peptides. Jun;68:134-9
- CIRIMOTICH CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. Science. 2011;332:855-8.
- CISAROVSKY G, Schmid-Hempel P, Sadd, BM. 2012. Robustness of the outcome of adult bumblebee infection with a trypanosome parasite after varied parasite exposures during larval development. Journal of Evolutionary Biology (25):1053–1059.
- COCIANCICH S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA. 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitol Today.: 132 –139.
- CORTAS, N.; Wakid, N. W. 1990. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin. Chem., 36, 1440-1443.
- DA MOTA FF, Marinho LP, Moreira CJ, Lima MM, Mello CB, Garcia ES. 2012. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis.;6:e1631.
- DIAZ-ALBITER H, Sant'Anna M R, Genta FA, Dillon RJ. 2012. reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. The Journal of Biological Chemistry, 287, 23995-24003.
- DIAS E. 1934. Estudos sobre *Schizotrypanum cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz;28:1-110.

- 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.: 2507-2515.
- DIMARCQ JL, Keppi E, Dunbar B, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D. 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, diptricin A. Eur J Biochem.: 17– 22.
- DILLON RJ, Webster G, Weightman AJ, Charnley AK. 2010. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. Antonie van Leeuwenhoek 97: 69–77.
- DITTMER NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem Mol Biol 34(1):29-41.
- DONG Y, Taylor HE, Dimopoulos G. 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. PLoS Biology(4), e229.
- DONG Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathog5:e1000423.
- DUNCAN, J.T., 1926. On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids Parasitology 18, 238–252.
- DUNN PE 1990. Humoral Immunity in insects. 40 (10): 738-744.
- EICHLER S, SCHAUB GA. 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp Parasitol;100:17–27
- ERIKSON, D., 1935. The pathogenic aerobic organisms of the Actinomyces group Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser., 203, 5–61.
- FELDMAN, P. L.; Griffith, O. W.; Stuehr, D. J.; 1992. The surprising life of nitric oxide Chem. Eng. News, 71, 26.
- FERRANDON D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nature Reviews Immunology 7, 862-874

- FIGUEIREDO, A.R.Z.G., Nunes, A.A.L., Silva, C.M.G., Giordano-Dias, J.R., Coura, E Hofer. 1995. Isolation of microorganisms of triatomines maintained in artificial and sylvatic conditions. In: Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas, 1995, Caxambu. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 90, 228-228.
- FIGUEIREDO MB, Castro DP, S Nogueira NF, Garcia ES, Azambuja P 2006. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. J Insect Physiol 52(7):711-6.
- FLORES-VILLEGAS AL, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A, Gutiérrez-Cabrera AE, Rojas-Wastavino, GE, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M 2015. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. Bulletin of Entomological Research. 105:523-32.
- FOOK, J. L.1970. Haemocyte in the repair of wounds in an insect *Rhodnius prolixus*. J. Morphol., 130, 297-314. 45
- GARCIA ES, Macarini JD, Garcia ML, Ubatuba FB 1975. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. An Acad Bras Cienc 47:537-45.
- GARCIA, S, & Azambuja P. 1991. "Development and Interactions of *Trypanosoma Cruz* / Within the Insect Vector." Parasitology Today 7 (9): 240–244.
- GARCIA ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez M, Azambuja P.2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interactions. Journal of Insect Physiology. 53(1):11-21.
- GARCIA, E.S., Genta, F.A., de Azambuja. P., Schaub, G.A., 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 26, 499–505.
- GENDRIN M, Christophides G. 2013. The Anopheles mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors. Croatia: InTech;. p. 525-48.
- GENTA FA, Souza RS, Garcia ES, Azambuja P 2010. Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. J Insect Physiol 56(9):1253-9.
- GILLESPIE JP, Kanost MR, Trenczek T 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology 42, 611–643.

- GOODFELLOW M, Alderson G. 1977. The Actinomycete-genus *Rhodococcus*: A Home for the 'rhodochrous' Complex. *Journal of General Microbiology* 100, 99-122.
- GORMAN MJ, Wang Y, Jiang H, Kanost MR 2007. Manduca sexta hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase-activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade. *J Biol Chem* 282(16):11742-9.
- GONZÁLEZ-SANTOYO I, Aguilar AC, 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol Exp Appl.*: p. 1– 16.
- GOURBIÈRE S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil F, 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 108, 190–202.
- GRAHAM JM, Higgins JA. 1997. *Membrane Analysis* New York: Springer.
- GRANIK, V. G.; Ryabova, S. Y.; Grigoriev, N. B. 1997. Exogenous nitric oxide donors and inhibitors of its formation (the chemical aspects). *Russ. Chem. Rev.*, 66,717.
- GRIESS P. 1879. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber.* 12, 426–8.
- GUHL F 2007. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 29-37.
- GUMIEL M, da Mota FF, Rizzo Vde S, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM. 2015. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors.*;8:245.
- HA EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310: 847–850.
- HALLIWELL, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Em: Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª Edição, Oxford University Press, United Kingdom.
- 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 USA.*;98:12648-53.
- HARA S, Yamakawa M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem.* 1995: . 29923 – 29927.
- HERRERA-ORTIZ A, Martínez-Barnetche J, Smit N, Rodriguez MH, Lanz-Mendoza H. 2011. The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of

- the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Dev Comp Immunol* 35(1):44-50.
- HIGUERA SL, Guhl F, Ramírez JD. 2013. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*, 6:112
- HOFFMANN JA 1995. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7(1):4-10.
- HULTMARK D, Engström A, Bennich H, Kapur R, Boman HG 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur J Biochem* 127(1):207-17.
- KANOST MR, Gorman MJ, 2008. Phenoloxidases in insect immunity. In Beckage N. *Insect immunology*. Academic Press/Elsevier, San Diego,. 69-96.
- KLOWDEN M. 2007. *Physiological Systems in Insects*, 2nd Edition. Academic Press.
- LAMBERT J, Keppi E, DImarcq JL, Wicker C, Reichhart JM, Dunbar B, 1989. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. : p. 262-266.
- LAVINE MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*: p. 1295-1309.
- LIVAK KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.
- LUCKHART, S. Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R.1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5700–5705
- MATSUZAKI K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*.: p. 1-10
- MCGWIRE BS, Olson CL, Tack BF, Engman DM. 2003. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Dis* 188(1):146-52.
- MELLO C B, Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N. 1996. Differential *in Vitro* and *in Vivo* Behavior of Three Strains of *Trypanosoma cruzi* in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*, *Experimental Parasitology*, V. 82, I. 2, 112-121.

- MONTEIRO F, Barrett T, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology* V. 12 I: 4, 805–1108
- MOHRIG W, Messner B. 1968. Immunoreaktionen bei Insecten II, Lysozymals antimicrobielles Agens im Darmtrakt von Insectem. *Biol Zbl.:* p. 707-718.
- MORAES, A.M.L., Junqueira, A.C.V., Celano, V., Lara da Costa, G. & Rodrigues Coura, J. 2004. Fungal Flora of the digestive tract of *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, *Dipetalogaster maximus* and *Panstrongylus megistus* vectors of *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 288–291.
- MURDOCK CC, Blanford S, Luckhart S, 2014. Thomas MB. Ambient temperature and dietary supplementation interact to shape mosquito vector competence for malaria. *J Insect Physiol.* 67:37-44.
- MUSCIO, O.A., La Torre, J.L. & Scodeller, E.A. 1987. Small nonoccluded viruses from triatominae Bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 49, 218–220.
- MÜLLER, U. 1997. The nitric oxide system in insects. *Prog. Neurobiol.* 51, 363–381
- NAVA-SÁNCHEZ A, Munguía-Steyer R, González-Tokman D, Córdoba-Aguilar A 2015. Does mating activity impair phagocytosis-mediated priming immune response? A test using the house cricket, *Acheta domesticus*. *Acta Ethologica* (18):3.295-299
- 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* :47–54.
- NAPPI AJ, Vass E 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res* 6(3):117-26.
- NAPPI AJ, Vass E, Frey F, Carton Y 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* 68(4):450-6.
- NAPPI AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. 2000. Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* Vol. 4, No. 4, pp. 423–430

- NAPPI AJ, Christensen BM. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 35(5):443- 59.
- NAPPI AJ, Vass E. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol*. 1998 Dec;84(6):1150-7.
- OLIVEIRA GA, Lieberman J, Barillas-Mury C. 2012. Epithelial nitration by a peroxidase/NOX5 system mediates mosquito antiplasmodial immunity. *Science*. Feb 17;335(6070):856-9.
- OPPERDOES FR.1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*;41:127–51.
- PAIM RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araujo 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.
- QUEIROZ SL, Batista AA, 1999. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím. Nova*, São Paulo , 22, (4), 584-590.
- RATCLIFFE NA. 1985. Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. *Immunol Lett*, 10, 253-70.
- RATCLIFFE NA, Gagen SJ 1977. Studies on the in vivo cellular reactions of the insect: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell* 9(1): 73-85.
- RATCLIFFE NA 1982. Cellular defense reactions of insects. *Fortsch Zool* 27: 223-244.
- REGUERA RM, Balaña-Fouce R, Showalter M. 2009. *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol Biochem Parasitol*;165:48–56.
- RIBEIRO, J. M. e I. M. Francischetti 2001. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Exp Biol*, 204, 3887- 94.
- RIBEIRO C, Brehélin M 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J Insect Physiol* 52(5):417-29
- RICCI I, Valzano M, Ulissi U, Epis S, Cappelli A & Favia G. 2012. Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathog Glob Health* 106: 380–385.

- RIBEIRO JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science*. 260, (5107), 539-541
- RIVERO A 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol* 22(5):219-25.
- RIZKI TM, Rizki RM, Bellotti RA 1985. Genetics of a *Drosophila* phenoloxidase. *Mol Gen Genet* 201(1):7-13.
- ROBERTS SC, Tancer MJ, Polinsky MR, 2004. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem*;279:23668–78.
- SAMKOVILIS 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.*: 163-169.
- SASSERA, D., Epis, S., Pajoro, M. & Bandi, C. 2013. Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice and triatomine bugs. *Pathogens and Global Health* 6, 285–292.
- SASTRY, K. V.; Moudgal, R. P.; Mohan, J.; Tyagi, J. S.; Rao, G. S. 2002. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Anal. Biochem.*, 306, 79-82.
- SATYAVATHI VV, Minz A, Nagaraju J. 2014. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell Signal* 26(8):1753-63.
- SETTEMBRINI BP, Coronel MF, Nowicki S, Nighorn AJ, Villar MJ. 2007. Distribution and characterization of nitric oxide synthase in the nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta:Heteroptera). *Cell Tissue Res*. 328(2):421-30.
- SHRESTHA S & Kim Y, 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol Biol* 38(1):99-112.
- SÖDERHÄLL, K. (1982) Prophenoloxidase activating system and melanization – a recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev Comp Immunol*, 6, 601-11.
- SÖDERHÄLL K, Cerenius L 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Curr Opin Immunol* 10(1): 23–28.

- SORFOVÁ, P., Skeríková, A., Hypsa, V., 2008. An effect of 16S rRNA intercistronic variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. Syst. Appl. Microbiol. 31, 88–100.
- SUN CS, Lindstrom I, Lee YJ, Faye I. Structure and expression of attacin genes in *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem. 1991: 247-254.
- TCHIOFFO MT, Boissière A, Churcher TS, Abate L, Gimonneau G, Nsango SE 2013. Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. PLoS One (8):e81663.
- THANNICKAL VJ, Fanburg BL 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:1005–1028.
- TSUKAMURA, M., 1974. A further numerical taxonomic study of the *Rhodochrous* group. Jpn J Microbiol.18, 37-44.
- 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(6):775-86.
- VALLEJO, G.A., Guhl, F., Schaub, G.A., 2009 Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: vector-parasite interactions. Acta Trop. 110, 137–147.
- VERDON, C. P.; Burton, B. A.; Prior, R. L. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess Reaction is used to assay for nitrite. Anal. Biochem. 1995, (224), 502-508.
- 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 in the midgut. Parasit Vectors (7):232.
- VIEIRA, C.S., Mattos, D.P., Waniek, P.J., Santangelo, J.M., Figueiredo, M.B., Gumiel, M., da Mota F.F., Castro, D.P., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2015. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. Parasit. Vectors. 8, 135.
- VIEIRA CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, and Azambuja P, 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. Parasit Vectors. *in press*.

- VIJAY S, Rawat M, Adak T, Dixit R, Nanda N, Srivastava H, Sharma JK, Prasad GB, Sharma A. Parasite killing in malaria non-vector mosquito *Anopheles culicifacies* species B: implication of nitric oxide synthase upregulation. *PLoS One*. 2011 Apr 4;6(4):e18400.
- VILMOS P, Kurucz E 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett* 62(2):59-66.
- WANG YP, Lai R. 2010. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Dongwuxue Yanjiu*.: 27-34
- WANIEK PJ, Jansen AM, Araújo CA. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis*.:845–847.
- WHO, World Health Organization 2015, Chagas disease (American trypanosomiasis), <http://www.who.int/en/>, Fact sheet N°340, Updated March 2015.
- WEISS B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol*.:27:514-22
- WICKER C, Reichhart JM, Hoffmann D, Hultmark D, Samakovlis C, Hoffmann. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterecin family of immune peptides. *J BiolChem*. 1990: 22493 - 22498.
- WIGGLESWORTH V. 1972. The principles of insects physiology. London.: Chapman e Hall. Methuen And Company Limited..
- WILLIAMS MJ 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 178(8):4711-4716.
- WHITTEN M, Mello CB, Gomes SA, Nigam Y, Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N, 2001. Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* Interactions, *Experimental Parasitology*, 98, (1), 44-57
- WHITTEN M, Sun F, Tew I, Schaub GA, Soukou C, Nappi A 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.
- 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.*: 237 – 241.
- YANG J, Furukawa S, Sagisaka A, Ishibashi J, Taniai K, Shono T, 1999.. cDNA cloning and gene expression of cecropin D, an antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*: 409–414.
- YUDA, M., Hirai, M., Miura, K., Matsumura, H., Ando, K., Chinzei, Y., 1996. cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Eur. J. Biochem.* 242, 807–812.
- ZINGALES B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;104(7):1051-4.
- 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
-