



**BIOLOGIA DA INTERAÇÃO DE
INVERTEBRADOS E VERTEBRADOS
COM MICRORGANISMOS: UM ESTUDO
SOBRE ASPECTOS CELULARES E
IMUNOLÓGICOS**

Michelle Tanny Cunha do Nascimento

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Microbiologia), Instituto de Microbiologia
Prof. Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários a obtenção do título
de Doutor em Ciências (Microbiologia).**

Orientador (es): Elvira Maria Saraiva

Maria Cristina M. Motta

**Rio de Janeiro
Dezembro de 2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Michelle Tanny Cunha do Nascimento

**Biologia da interação de Invertebrados e Vertebrados com Microrganismos:
Um Estudo sobre Aspectos Celulares e Imunológicos.**

Rio de Janeiro 07 de Dezembro de 2010

Dra. Elvira Maria Saraiva

Departamento de Imunologia – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes -
UFRJ

Dr. Jose Roberto Meyer Fernandes

Departamento de Bioquímica Médica – Instituto de ciências biomédicas - UFRJ

Dra. Yara Traub Cseko

Departamento de Bioquímica e Biologia Celular - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto
Oswaldo Cruz.

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira

Departamento de Bioquímica Médica – Instituto de ciências biomédicas - UFRJ

Dra. Thais Souto-Padron

Departamento de Microbiologia Geral – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de
Góes - UFRJ

Nascimento, Michelle Tanny Cunha do
Biologia da Interação de Invertebrados e Vertebrados com
Microrganismos: Um Estudo sobre Aspectos Celulares e imunológicos /
Michelle Tanny Cunha do Nascimento – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG,
2010. X, 98f. il.; 31 cm.

Orientador: Elvira Maria Saraiva
Doutorado em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de
Janeiro/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2010.

Referências bibliográficas: f 86-98.

1. *Periplaneta americana* 2. *Escherichia coli* 3. Hemócitos. 4. *Leishmania*
5. neutrófilos 6. ETose 7. *Blastocrithidia culicis* 8. *Aedes aegypti*.

I. Nascimento, Michelle. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes,
Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Título da Tese

I. Saraiva, Elvira Maria. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Microbiologia Prof. Paulo de Góes. III. Título.

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Dr^a. Elvira Maria Saraiva, no Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, e da Dr^a. Maria Cristina Machado Motta, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

AGRADECIMENTOS

Os primeiros agradecimentos desta tese são dirigidos as minhas orientadoras, Dra. Elvira Saraiva e Dra. Cristina Motta, que sempre me apoiaram (e orientaram, é claro) e me auxiliaram a trilhar os caminhos mais tortuosos pelos quais tive que caminhar. Essas pessoas de bom coração tiveram um papel decisivo em muitos momentos da minha vida (e tenho certeza que continuarão tendo) não só me orientando cientificamente, mas também me incentivando sempre que precisei e de uma forma muito especial e carinhosa, e eu as agradeço muito por isso!

Em segundo lugar, agradeço (muito) ao apoio dado aos meus companheiros de trabalho no laboratório (Carol, Deivid, Eliete, Anderson, Natália, Lucia, Christian, por toda a ajuda e carinho que sempre me deram e que são fundamentais para mim. Em especial, gostaria de agradecer ao “Dr. Deivoca”, que eu tenho o prazer imenso de acompanhar há 6 anos, desde que entrei no laboratório, e é um cara espetacular por sua força de vontade, dedicação, companheirismo e excelente humor! Também dedico um agradecimento especial para a Carol, que trabalha comigo há muitos anos e representou uma peça fundamental para o desenvolvimento dos meus trabalhos e também no decorrer de minha pessoal. Sacode, Carola! Agradeço também à Karen, que não está mais trabalhando conosco, mas colaborou muito para o desenvolvimento de parte da minha tese.

É claro que minha família também merece um agradecimento especialíssimo por todo o apoio, carinho e dedicação que sempre me deram. Sem vocês nada teria sido possível! Agradeço em especial também ao marido, Júlio César, que me “atura” em casa com muita paciência, dedicação e amor, sempre me incentivando quando mais preciso!

A minha amiga Eliane, que também merece um agradecimento especial por sempre (sempre mesmo) me apoiar (e me aturar!). Há muitos anos.... longos, divertidos e bem vividos!

Aos professores e alunos do Laboratório de Ultraestrutura Hertha Meyer que sempre me ajudam muito. Em especial à Carol (muitas “Carois” em minha vida)

Catta-Preta que desenvolve alguns trabalhos comigo e é uma pessoa “do bem” e que merece (muito) ir rumo ao Nobel, como diz a Cris!

Aos professores que colaboraram, de várias formas, para esta tese: Dra. Susete Bressan, Dr. Edinildo Alcântara e Dr. Marcelo Medeiros (IBCCF, UFRJ), Dr. Marcos Sorgine (IBqM, UFRJ), Dr. Flávio Lara (FIOCRUZ-RJ), Dra. Lucia Helena (UFRRJ) e Dra. Ângela Hampshire (IMPPG, UFRJ). Agradeço também aos membros da Plataforma PDTIS (FIOCRUZ-RJ), em especial ao Bernardo Pascarelli, que sempre me recebe muito bem e me ajuda muito na aquisição das imagens no microscópio confocal.

À Alessandra Granato, que sempre foi solícita e muito me ajudou nos experimentos de citometria de fluxo e à Ana Beatriz Barleta que me ajudou muito nos experimentos de biologia molecular.

À professora Thais Souto-Padron, que prontamente aceitou ser revisora desta tese e também contribuiu imensamente para meus trabalhos sempre liberando o uso do microscópio em seu Laboratório em meus horários “alternativos” de uso.

A todos os membros da banca examinadora, Dr. Pedro Oliveira, Dra. Yara Traub, Dr. José Roberto, Dr. Mario Neto e Dra. Rosângela Soares, que prontamente aceitaram nosso convite para apreciação de minha tese.

À professora Denise Valle e a todos do LAFICAVE que nos atendem sempre com muito boa vontade e disponibiliza, há muitos anos, sua colônia de Aedes para nosso uso.

Aos alunos do grupo do prof. Pedro Oliveira, José Henrique, Ana Beatriz Nuno e Ana Carolina que me auxiliaram com o uso do sistema ApoTome e também ao fornecimento de mosquito (cepa Red eyes) para os experimentos de biologia molecular. Agradeço também ao Dr. Felipe Almeida, que me ajudava bastante quando era ainda aluno da profa. Ângela Hampshire e continua me ajudando agora, em sua estadia no laboratório do Dr. Pedro.

À Teresa e a Renata (Dra. Renata, né) pelas risadas, histórias de congressos... enfim pela amizade! É um prazer conviver com vocês!

A todos aqueles que neste momento tão tão tão, não consigo me recordar.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPERJ.

RESUMO

Biologia da interação de Invertebrados e Vertebrados com Microrganismos: Um Estudo Sobre Aspectos Celulares e Imunológicos

Michelle Tanny Cunha do Nascimento

Orientadora: Elvira Maria Saraiva
Maria Cristina M Motta

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ.

No presente estudo o mecanismo da ETose foi avaliado durante a interação de células do sistema imune de vertebrados e invertebrados com microrganismos, utilizando como modelos experimentais neutrófilos humanos e hemócitos de *Periplaneta americana*. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as células foram capazes de liberar redes extracelulares, compostas por DNA e histonas, que aprisionam e matam *Leishmania* e *Escherichia coli*. A liberação das redes também foi observada na presença de componentes de superfície desses microrganismos, como lipofosfiglicano (LPG) e lipopolisacarídeo (LPS). As redes formadas por hemócitos de *P. americana* também possuem lipídeos neutros em sua composição e estão associadas com o processo de nodulação dos hemócitos *in vitro* e *in vivo*. Esse conjunto de resultados demonstram que, além de células do sistema imune inato de humanos, hemócitos de um inseto ancestral dentro da escala evolutiva, como *P. americana*, também realizam ETose, sugerindo que este mecanismo da resposta inata seja conservado entre os seres vivos.

Neste estudo avaliamos também a biologia da interação de *Blastocrithidia culicis* com *Aedes aegypti*, com o objetivo de descrever a colonização de um protozoário monoxênico em um inseto vetor. Neste sentido, os resultados demonstram que *B. culicis* se distribui por todo o corpo de *Ae. aegypti* ao longo de 48 dias de colonização, promovendo uma resposta imunológica no mosquito, detectada através da modulação da expressão de fatores de transcrição, como Rel1, Rel2 e STAT, e da expressão de efetores imunes, defensina A e TEP-1. Avaliando a interação *in vitro* de *B. culicis* com as glândulas salivares do mosquito, demonstrou-se que o protozoário adere à superfície deste órgão e que este processo é mediado por carboidratos. No decorrer da interação, *B. culicis* foi encontrada no interior das células do epitélio glandular bem como na região onde a saliva é estocada. Ensaio de interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas das glândulas e do intestino médio de *Ae. aegypti* demonstraram que o protozoário reconhece e se liga especificamente a porção glicídica e/ou proteica das mesmas, sugerindo que sua interação com esses órgãos possa ser mediada por receptores. Este conjunto de resultados corroboram a hipótese de que tripanosomatídeos monoxênicos colonizam insetos vetores e representam uma primeira abordagem para o entendimento do ciclo de vida desses protozoários em seus hospedeiros invertebrados.

Palavras Chaves: *Periplaneta americana*, *Escherichia coli*, Hemócitos, ETose, *Leishmania*, neutrófilos, *Blastocrithidia culicis*, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Biology of invertebrate and vertebrate-microorganisms interaction: a study about cellular and immunological aspects

Michelle Tanny Cunha do Nascimento

Orientadora: Elvira Maria Saraiva
Maria Cristina M Motta

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ.

In the present study, the ETose mechanism was evaluated during the interaction of vertebrate and invertebrate cells with microorganisms, using human neutrophils and haemocytes from *Periplaneta americana* as experimental models. Our results demonstrated that both cells were able to release extracellular traps (ETs), composed of DNA and histones, which trap and kill *Leishmania* and *Escherichia coli*. The release of these structures was also observed when components of microorganisms' surface, such as lipophosphoglycan (LPG) and lipopolysaccharide (LPS) were used as activator of ETose. Traps formed by haemocytes from *P. americana* contain neutral lipids and these structures are also associated to the nodulation process *in vitro* and *in vivo*. Altogether these results demonstrate that, besides human cells, haemocytes from an ancestral insect in the evolutionary scale, such as *P. americana*, also undergo ETose, suggesting that this mechanism is conserved between living beings.

In this study we also evaluated the biology of *Blastocrithidia culicis*-*Aedes aegypti* interaction, in order to describe the colonization of a vector insect by this monoxenous protozoan. Our results demonstrated that *B. culicis* spreads throughout the body of *Ae. aegypti* along 48 days of colonization, promoting an immune response detected through the modulation of transcription factors expression, such as Rel1, Rel2 and STAT, and of expression of immune effectors, such as defensin A and TEP-1. Assessing the *in vitro* interaction of *B. culicis* with mosquito salivary glands, it was demonstrated that the protozoa adhere to this organ in a process mediated by carbohydrates. During the interaction, *B. culicis* was found inside the salivary gland epithelial cells as well in the region where saliva is kept. Assays using biotinylated *B. culicis* binding to *Ae. aegypti* salivary gland and midgut proteins showed that carbohydrates and/or proteins recognize this protozoan, suggesting that its interaction with these mosquito organs may be receptor-mediated. These results corroborate the hypothesis that monoxenous trypanosomatids colonize insect vectors and represent the first approach for a better comprehension of the life cycle of this protozoan inside their invertebrate hosts.

Keywords: *Periplaneta americana*, *Escherichia coli*, Haemocytes, Innate immune system, *Leishmania*, neutrophils, *Blastocrithidia culicis*, *Aedes aegypti*.

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO	1
1.1- A Interface entre os Insetos e os Microrganismos	1
1.1.1- Sistema digestório de mosquitos	2
1.1.1.1- As Glândulas Salivares	5
1.2- Trypanosomatídeos e Insetos Vetores	7
1.2.1- O modelo <i>B. culicis</i> – <i>A. aegypti</i>	11
1.3- Sistema imune inato de Insetos	14
1.3.1- Imunidade Celular	16
1.3.2- Imunidade Humoral	17
1.4- Redes Extracelulares de DNA e o mecanismo da ETose na Resposta Imune Inata de vertebrados	21
1.4.1- ETose em outras classes de seres vivos	23
1.4.2- <i>P. americana</i> como modelo para o estudo da ETose em insetos	23
2- OBJETIVOS	24
ANEXO I	26
3- MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES AO ANEXO	27
3.1- Obtenção e manutenção dos insetos	27
3.2- Coleção de hemolinfa e hemócitos de <i>P. americana</i>	27
3.3- Cultivo e obtenção de <i>E. coli</i>	27
3.4- Quantificação do DNA liberado no sobrenadante de hemolinfa ou hemócitos estimulados	27
3.5- Microscopia de Fluorescência	28
3.6- Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	28
3.7- Efeito bactericida de sobrenadantes ricos em DNA	28
3.8- Ensaio de atividade do sistema pro-PO/PO	30
3.9- Inoculação de <i>E.coli</i> -GFP e DNase I em <i>P. americana</i>	30
3.10- Avaliação da formação de nódulos e da fagocitose nos insetos inoculados com <i>E.coli</i> -GFP e DNase I	31
4- RESULTADOS COMPLEMENTARES AO ANEXO I.	32
4.1- Hemócitos de <i>P. americana</i> liberam redes de DNA quando estimulados	32
4.2- Hemócitos de <i>P. americana</i> liberam redes extracelulares formadas por DNA, histonas, proteínas e lipídios neutros	34
4.3- As redes extracelulares de DNA participam dos nódulos de hemócitos em <i>P. americana</i>	39
4.4- As redes extracelulares de <i>P. americana</i> aprisionam e têm efeito microbicida sobre <i>E. coli</i>	39
4.5- O tratamento in vivo com DNase I altera a quantidade e a distribuição dos nódulos de hemócitos em <i>P. americana</i> inoculadas com <i>E. coli</i>	44
4.6- Avaliação de hemócitos circulantes após inoculação de <i>E.coli</i> e/ou DNase	43

ANEXO II	50
5- MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES AO ANEXO II	44
5.1- Cultivo e obtenção de <i>B. culicis</i>	51
5.2- Cultivo e obtenção de <i>Ae. aegypti</i>	51
5.3- Infecção de <i>Ae. aegypti</i> com <i>B. culicis</i>	51
5.4 - Obtenção dos órgãos de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	52
5.5- Avaliação da distribuição de <i>B. culicis</i> nos diferentes tecidos de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com o protozoário	52
5.6- Extração de proteínas totais da glândula salivar de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	53
5.7- Extração de proteínas totais do intestino médio de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	53
5.8- SDS-PAGE e Western blot	54
5.9- Marcação com lectinas e deglicosilação de proteínas totais da glândula salivar e do Intestino médio de <i>Ae. aegypti</i>	54
5.10– Biotinilação de proteínas de superfície de <i>B. culicis</i>	55
5.11- Interação de <i>B. culicis</i> biotinizada com proteínas totais da glândula salivar ou do intestino médio de <i>Ae. aegypti</i>	56
5.12- Avaliação da expressão de fatores de transcrição e de efetores da resposta imune de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> infectadas com <i>B.culicis</i>	56
6- RESULTADOS COMPLEMENTARES AO ANEXO II	58
6.1- Colonização de <i>B. culicis</i> em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	58
6.2- <i>B. culicis</i> biotinizada reconhece glicoproteínas do extrato total das glândulas salivares e do intestino médio de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	59
6.3- Participação de carboidratos no reconhecimento de <i>B. culicis</i> às proteínas da glândula salivar e do intestino médio de <i>Ae. aegypti</i>	63
6.4- A colonização por <i>B. culicis</i> modula a expressão de fatores de transcrição e de efetores imunes em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	65
7- DISCUSSÃO	69
8- CONCLUSÕES	83
9- OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	85
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Lista de abreviações:

AMP – peptídeo antimicrobiano

BCIP/NBT – 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/azul de nitrotetrazolium

BSA – albumina de soro bovino

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CFU – unidade formadora de colônia

d-LPS – lipopolisacérídeo detoxificado

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA - ácido etileno-diamino tetracético

FITC – isotiocianato de fluoresceína

g - gravidade

GFP – green fluorescent protein

Hank's – solução salina de Hanks

HM - hemolinfa

IMD - imunodeficiência

JAK – Janus quinase

KCl – cloreto de potássio

KDa – kilodalton

k-DNA – DNA do cinetoplasto

L-DOPA – 3,4-Dihidroxi-L-fenil-alanina

LB - Luria-Bertani's

LPS - lipopolisacárido

mA – miliampere

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NaCl – cloreto de sódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NET – neutrophil extracellular traps

NF-KB – fator nuclear da família Kappa Beta

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PCR – reação de polimerase em cadeia

pH – potencial de hidrogênio

PGRP – proteínas reconhecedoras de peptidoglicanos

PI – iodeto de propídio

PMSF – fluoreto de fenil-metil-sulfonil

PNGase – peptidil N-glicosidase

PO - fenoloxidase

Pro-PO - profenoloxidase

PRR – receptores reconhecedores de padrões

STAT – “signal transducer and activator of transcription”

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SFB – soro fetal bovino

PMA – acetato de forbol miristato

Sulfo-NHS-Lc-biotina – sulfosuccinimidil-6-(biotinamida) hexanoato

TBS – tampão tris-salina

TBSt – tampão tris-salina contendo 0.05% de Tween 20

TEP – proteína com motivo tio-éster

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

U - unidade

1. INTRODUÇÃO

Insetos são seres vivos agrupados no filo Artropoda, que possuem o corpo formado por um rígido e quitinoso exoesqueleto, segmentado em placas separadas por regiões membranosas e subdividido em cabeça, tórax e abdômen. O grupo dos insetos apresenta grande diversidade de espécies e número de indivíduos que são, por sua vez, amplamente distribuídos e bem adaptados aos diversos ambientes do planeta. Características importantes, como o tamanho, o curto tempo de geração e a co-evolução com animais e plantas contribuíram para a ampla distribuição e adaptação dos insetos e também para a ampliação de suas fontes alimentícias. A possibilidade de alimentar-se de sangue proporcionou aos insetos uma excelente fonte nutricional capaz de suprir não só a demanda necessária à maturação dos ovos nas fêmeas, mas também a realização de outros eventos fisiológicos importantes, como o seu próprio crescimento corporal do inseto. Em alguns casos, como em *Aedes aegypti*, somente as fêmeas se alimentam de sangue na época da maturação de seus ovos, enquanto seus machos se alimentam de soluções naturais açucaradas, como o néctar de flores. Em outros casos, machos e fêmeas desempenham hematofagia por toda a vida (Black & Kondratieff, 2005).

1.1- A Interface entre os Insetos e os Microrganismos

A hematofagia constitui a principal ponte de ligação entre insetos e animais vertebrados. Ao longo do processo evolutivo, diversos microrganismos co-evoluíram nessa interface, adquirindo perfeita sincronia fisiológica, morfológica e bioquímica com determinados insetos. Todo esse processo co-evolutivo permitiu a alguns microrganismos a chegada aos vertebrados no momento da hematofagia, aumentando assim, sua capacidade de dispersão entre os insetos, e em consequência dessa ocupação, os vertebrados foram acometidos por doenças causadas por esses microrganismos tornando o sucesso da co-evolução inseto-microrganismo um problema de saúde pública.

A relação entre microrganismos e insetos é íntima e, como dito anteriormente, depende da harmonia entre o ciclo de vida do microrganismo e processos fisiológicos do inseto, como por exemplo, a busca por sangue. A partir do momento que um microrganismo é adquirido pelo seu inseto hospedeiro durante uma alimentação sanguínea, ele terá que completar seu ciclo biológico no inseto a tempo de adquirir as características necessárias para colonizar um novo vertebrado quando

esse inseto se alimentar de sangue novamente. Além disso, é comum a necessidade de migração para tecidos específicos do inseto que lhe permita ser transmitido com sucesso no próximo repasto sanguíneo (Black & Kondratieff, 2005). Os insetos que hospedam microrganismos que desenvolvem parte do seu ciclo de vida em seus tecidos e são capazes de transmiti-los a outros animais ou plantas, são classificados como vetores biológicos. Os animais (ou plantas) que os recebem são classificados como hospedeiros. Aqueles insetos que carregam consigo microrganismos em partes externas do seu corpo, como nas patas, podendo carregá-los de um ambiente para outro, são classificados como vetores mecânicos, como é o caso de *Periplaneta americana* (Rey, 2001).

O ciclo de vida de alguns vírus, como os arbovírus, protozoários como *Plasmodium spp.*, e vermes nematódeos, como os filarídeos, exemplificam esse relacionamento harmônico entre patógenos e insetos. De maneira geral, em todos os casos citados, a fase evolutiva do patógeno, que é infectiva para o inseto, está presente no sangue ou em células sanguíneas do vertebrado, sendo adquiridas pelo inseto durante a alimentação sanguínea. Uma vez no sistema digestório do inseto, esses patógenos atravessam o epitélio intestinal em direção à hemocele para se distribuírem para outros tecidos como as glândulas salivares, no caso de *Plasmodium* e arbovírus, e peças bucais, no caso dos filarídeos, e serem transmitidos novamente a outro hospedeiro vertebrado num próximo repasto sanguíneo. Os arbovírus podem, ainda, colonizar os ovários dos insetos sendo repassados verticalmente para a prole desses indivíduos (Higgs & Beaty, 2005).

1.1.1- O Sistema Digestório de Mosquitos

O sistema digestório dos insetos pode assumir morfologia diversificada e receber nomenclaturas diferentes em função da família de inseto em questão. Considerando os objetivos desta tese, será apresentado a seguir uma descrição do sistema digestório e das glândulas salivares de *Ae. aegypti*, mosquito pertencente à ordem Diptera (família Culicidae) que também abriga diversos outros insetos com importância médica como, anofelinos, culicídeos, flebotomíneos, glossinídeos e simulídeos. Muitas características descritas aqui são compartilhadas por anofelinos e culicídeos (*Anopheles* e *Culex*) que serão coletivamente referidos como mosquitos.

O canal alimentar de mosquitos é constituído por um tubo único que se estende da abertura oral, localizada na região anterior do corpo, até o orifício anal, na região posterior do corpo. Cada região desse tubo digestório possui uma origem embrionária e desempenha uma função particular. De uma maneira geral, esse canal alimentar é denominado intestino e apresenta-se dividido em três partes: o intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio ou mesêntero e o intestino posterior ou proctodeu. Cada uma dessas regiões apresenta órgãos anexos que participam do processo alimentar (Fig. 1). Os detalhes anatômicos de cada uma dessas regiões do trato digestório, bem como dos órgãos anexos a elas, como as peças bucais, o esôfago, os túbulos de Malpighi e as glândulas salivares, estão intimamente associados aos hábitos específicos de cada inseto. Logo, o trato digestório de mosquitos hematófagos apresenta uma anatomia associada diretamente ao seu hábito alimentar (Romoser, 1996).

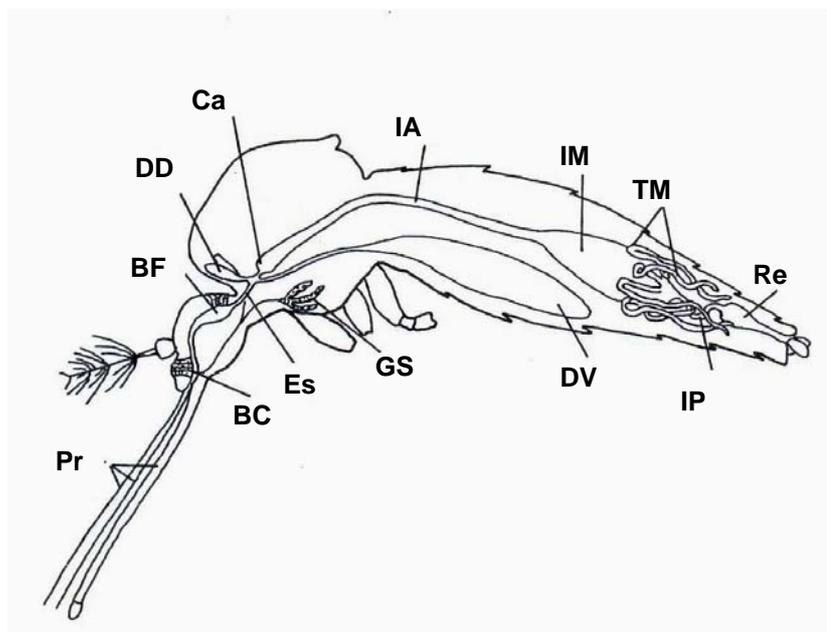


Figura 1 – Esquema do canal alimentar de um mosquito. Pr = proboscida; BC = bomba cibarial; BF = bomba faringeal; Es = esôfago; DD = divertículo dorsal; Ca = cárdia; GS = glândula salivar; IA = intestino anterior; DV = divertículo ventral; IM = Intestino médio; TM = Túbulos de Malpighi; IP = Intestino posterior; Re = reto. (Adaptado de Snodgrass, 1959).

O intestino anterior de insetos dipteros tem origem ectodérmica e é revestido por uma cutícula, estando envolvido com a ingestão, condução e estocagem de alimento. O processo de ingestão do alimento é iniciado pela inserção da proboscide do mosquito no vaso condutor de sangue de um vertebrado ou de seiva de uma planta. Cada espécie pertencente à ordem Diptera apresenta uma anatomia

particular tanto para a formação da proboscida, quanto para os demais órgãos anexos à porção anterior do intestino que auxiliam na alimentação do inseto. Em *Ae. aegypti*, a proboscida funciona como a agulha de uma seringa que punge o alimento, sendo a sucção do mesmo auxiliada pelas bombas cibarial e faringeal. Esta porção inicial do intestino pode apresentar também dilatações que formam divertículos ou papos que se abrem dentro do esôfago e podem estender-se livremente para a parte ventral ou dorsal do abdômen do inseto. O divertículo é um órgão impermeável que serve para estocagem do alimento rico em carboidrato, como o néctar, e até mesmo água e sangue, dependendo da família em questão. Outro órgão anexo à porção anterior do intestino de *Ae. aegypti* é a glândula salivar, que será descrita mais adiante. A ligação do intestino anterior com o intestino médio se dá pela cárdia, uma válvula cuja função é regular a passagem de alimento da porção anterior para a porção média do intestino, impedindo seu refluxo (Billingsley & Lehane, 1996).

O intestino médio tem origem mesodérmica e é o local onde ocorre a digestão propriamente dita, assim como a absorção do alimento ingerido, sendo conhecido também como estômago. Em todos os insetos dípteros o epitélio intestinal é composto por uma camada simples de células dotadas de microvilosidades na porção apical e apoiadas por uma membrana na porção basal (Billingsley, 1990). Uma peculiaridade observada no intestino médio dos insetos dípteros hematófagos é a secreção de uma estrutura quitinosa e acelular denominada matriz peritrófica, que pode ser secretada por células especializadas da cárdia ou pelo próprio epitélio que forma o intestino médio, como ocorre em *Ae. aegypti*. Em ambos os casos, a secreção da matriz peritrófica se inicia tão logo o inseto ingere sangue, mas esse intervalo de tempo varia de acordo com a espécie. A matriz peritrófica forma uma camada que envolve o sangue ingerido separando-o fisicamente do epitélio intestinal, o que confere a esta estrutura um papel importante no estabelecimento de microrganismos presentes no sangue ingerido (revisto por Devenport & Jacobs-Lorena, 2005).

O intestino posterior de mosquitos possui origem ectodérmica e é quitinizado. Esta porção é tipicamente separada do intestino médio pela válvula pilórica. É a porção intestinal envolvida com a excreção de materiais provenientes do intestino médio e dos túbulos de Malpighi, além de atuar na regulação da composição da hemolinfa, reabsorvendo água e sais das excretas. Da região da válvula pilórica saem os túbulos de Malpighi e a região imediatamente posterior a esta é chamada

de reto. Apesar de ser revestido por uma camada de quitina, o intestino posterior é permeável à água e vários solutos, uma vez que a região da ampola retal está envolvida com a reabsorção de água, íons e pequenas moléculas (Romoser, 1996; Billingsley & Lehane, 1996).

1.1.1.1- As Glândulas Salivares

Insetos utilizam estratégias e hospedeiros variados para se alimentarem de sangue e por isso precisam enfrentar problemas mecânicos e físicos associados aos seus hábitos alimentares, como características intrínsecas desses fluidos. Parte desses problemas é resolvida pela secreção produzida por suas glândulas salivares, órgãos exócrinos fundamentais para o sucesso da alimentação (Ribeiro, 1995b).

As glândulas salivares de mosquitos adultos são órgãos pares localizados no tórax, banhadas pela hemolinfa que fazem parte da porção anterior do trato digestório (Fig. 1). Por causa do hábito hematófago ser restrito às fêmeas, a glândula salivar é um órgão sexualmente dimórfico que apresenta diferenças estruturais e funcionais associadas ao hábito exclusivo das fêmeas ou à alimentação rica em carboidratos, comum tanto aos machos quanto às fêmeas (Orr *et al.*, 1961; James, 1994; Stark & James, 1996). Individualmente, cada glândula salivar é formada por três lóbulos, sendo dois laterais e um mediano, que se apresentam com aspecto tubular e são conectados entre si através de um ducto salivar comum onde a saliva é liberada (Fig. 2). O ducto salivar é um tubo fino delineado por uma cutícula e se invagina para dentro de cada lóbulo que forma a glândula. Saindo das glândulas salivares, o canal salivar atravessa o pescoço do mosquito para conectar-se à proboscida na região da cabeça. Em geral, os três lóbulos que formam a glândula salivar de machos adultos apresentam semelhanças morfológicas e histoquímica entre si, apresentando a mesma capacidade secretória. Já nas fêmeas, os lóbulos laterais que formam a glândula salivar são morfológicamente idênticos, mas diferem do lóbulo mediano. Cada lóbulo lateral possui três regiões: a porção proximal, a porção intermediária e a porção distal em relação ao ducto salivar comum (revisto por James, 2003) (Fig. 2).

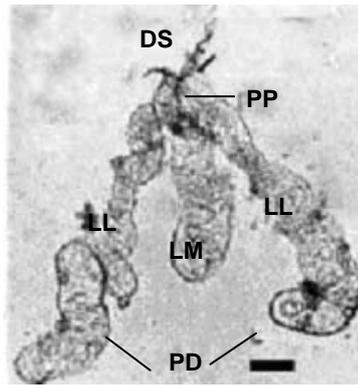


Figura 2 – Glândula salivar de fêmea *Ae. aegypti*. DS = ducto salivar; LL = lóbulo lateral; LM = lóbulo médio; PP = porção proximal dos lóbulos laterais; PD = porção distal dos lóbulos laterais. Barra = 100 μ M. (James, 2003).

O epitélio glandular que forma cada lóbulo da glândula salivar de mosquitos tem origem ectodermal e é formado por uma camada simples de células que estão organizadas ao redor do ducto salivar. As células que formam este epitélio apresentam uma superfície apical voltada para o lúmen do ducto salivar, e outra basal, voltada para a hemolinfa do inseto (Orr *et al.*, 1961; Beckett, 1990).

Em relação às diferenças funcionais, as células que formam a porção proximal dos lóbulos laterais produzem e secretam componentes da saliva relacionados à ingestão de uma refeição baseada em carboidratos, como amilases e α -1-4 glucosidases. Em contrapartida, as células que formam a porção distal dos lóbulos laterais juntamente com as células que formam todo o lóbulo mediano estão envolvidas com a produção de componentes da saliva relacionados exclusivamente à alimentação sanguínea (revisto por James, 2003).

A saliva de insetos hematófagos não é um fluido inerte, mas sim um potente coquetel farmacologicamente ativo. Para obter o sangue do hospedeiro, esses insetos desenvolveram estratégias espetaculares para manipular o sistema hemostático do hospedeiro vertebrado. Essas estratégias relacionam-se à produção de componentes que atuam na inibição da agregação plaquetária, da vasoconstrição, e da cascata de coagulação sanguínea, além de afetar a capacidade inflamatória e imune do hospedeiro vertebrado (Ribeiro, 1995a). Patógenos, como protozoários e vírus, foram capazes de co-evoluir com seus vetores e desenvolveram também mecanismos para tirar vantagens da manipulação da homeostase do hospedeiro vertebrado pelo vetor, para deste modo se estabelecerem após a transmissão (Titus & Ribeiro, 1988, Jones *et al.*, 1992, Belkaid *et al.*, 1998). Os mecanismos bioquímicos relacionados à hematofagia que se

destinam à prevenção da coagulação do sangue, por exemplo, não são exclusividade dos insetos, sendo compartilhados por diferentes artrópodes hematófagos. Diversas classes de proteínas anticoagulantes, incluindo grupos polifiléticos de enzimas, por exemplo, são comuns a diversos artrópodes hematófagos (Stark & James, 1996; Ribeiro, 1995a). Técnicas de proteômica têm sido amplamente utilizadas para fornecer informações sobre a composição proteica da glândula salivar de artrópodes hematófagos. Esse conjunto de proteínas identificadas é denominado “sialoma” e já foi estabelecido para vários insetos vetores, incluindo *Ae. aegypti*, *An. gambiae*, *An. stephensi*, *Rhodnius prolixus* e *Ixodes scapularis* (Valenzuela et al., 2002a, 2002b, 2003, 2004; Francischetti et al., 2002; Ribeiro et al., 2004a, 2004b, 2006; 2007).

As diferentes porções do canal alimentar, bem como as glândulas salivares dos insetos, são constituem tecidos que são utilizados por diferentes patógenos para estabelecimento e/ou como rota de disseminação pelo corpo do inseto, assim como via de transmissão para os hospedeiros vertebrados.

A seguir, serão descritos os principais aspectos da interação de protozoários tripanosomatídeos com os tecidos de seus insetos vetores, bem como suas rotas de disseminação e vias de transmissão para hospedeiros vertebrados.

1.2. - Os Tripanosomatídeos e os Insetos Vetores

Os protozoários chamados de tripanosomatídeos pertencem à família Trypanosomatidae que por sua vez está inserida na ordem Kinetoplastida. A família Trypanosomatidae compreende atualmente 13 gêneros (Tabela 1) que agrupam espécies de acordo com aspectos morfológicos e especificidade pelo hospedeiro. Cinco gêneros da família Trypanosomatidae são constituídos por protozoários que necessitam de dois hospedeiros, um intermediário e outro definitivo, para completarem seus ciclos biológicos, sendo por isso denominados heteroxênicos. Estão inseridos nesse grupo os gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Sauroleishmania* e *Endotrypanum*. Os dois primeiros abrigam importantes agentes etiológicos de doenças humanas como a leishmaniose, a tripanosomíase americana e a africana. O gênero *Phytomonas* inclui aqueles tripanosomatídeos que utilizam como segundo hospedeiro plantas como cafeeiros e palmeiras (Rey, 2001; Camargo, 1999).

Tabela 1- Gêneros da família Trypanosomatidae transmitidos por insetos e seus respectivos hospedeiros.

Grupos	Gêneros	Hospedeiros
Monoxênicos	<i>Angomonas</i> (Sousa & Corte-Real, 1991)	Invertebrados (Insetos das Ordens Diptera, Hemiptera)
	<i>Strigomonas</i> (Lwoff & Lwoff, 1931; Brandão <i>et al.</i> , , 2000)	
	<i>Wallaceina</i> (Podlipaev & Rokitskaya, 1999)	
	<i>Blastocrithidia</i> (Laird, 1959, apud Wallace, 1966)	
	<i>Crithidia</i> (Léger, 1902, apud Wallace, 1966)	
	<i>Herpetomonas</i> (Kent, 1880, apud Wallace, 1966)	
	<i>Leptomonas</i> (Kent, 1880, apud Wallace, 1966)	
	<i>Rhynchoidomonas</i> (Patton, 1910, apud Wallace, 1966)	
Heteroxênicos	<i>Endotrypanum</i> (Mesnil & Brimont, 1908, apud Wallace, 1966)	Invertebrados (Insetos das Ordens Diptera, Hemiptera) e Vertebrados
	<i>Leishmania</i> (Laveran & Mesnil, 1903, apud Wallace, 1966)	
	<i>Sauroleishmania</i> (Ranque, 1973)	
	<i>Trypanosoma</i> (Grubby, 1843, apud Wallace, 1966)	
	<i>Phytomonas</i> (Donovan, 1909)	Invertebrados (Insetos da Ordem Hemíptera) e Plantas

Dentre as muitas ordens que compõem a classe Insecta, duas se destacam quando o assunto é a interação com tripanosomatídeos: a ordem Hemiptera e a ordem Diptera. Ambas possuem importância médica por estarem relacionadas a transmissão de tripanosomatídeos patogênicos para o ser humano, como os insetos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (diptera) que transmitem diferentes espécies de *Leishmania*, os do gênero *Glossina* (diptera), que são vetores dos Trypanosomas africanos, como *Trypanosoma brucei*, e os insetos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (hemiptera) que transmitem os Trypanosomas americanos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* (Rey, 2001). O ciclo desenvolvido por esses tripanosomatídeos em seus insetos vetores inicia-se com a ingestão de sangue do vertebrado contendo suas formas infectivas e, dentro do inseto, o primeiro local ocupado é o intestino. Posteriormente, cada um deles se distribuirá por diferentes tecidos do inseto para completarem seus ciclos evolutivos e serem transmitidos novamente. Os protozoários dos gêneros *Leishmania*, por exemplo, são ingeridos pelo inseto na forma amastigota que por sua vez se transformam em

promastigotas capazes de aderir às vilosidades intestinais do flebotomíneo evitando, assim, sua eliminação junto com os excretas da digestão do sangue. Os promastigotas então, têm a chance de completarem sua metaciclogênese e se diferenciarem nas formas metacíclicas, que se desligam das vilosidades e migram em direção à porção inicial do trato digestório do flebotomíneo. No próximo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgitará os promastigotas metacíclicos no vertebrado (Bates, 2007). O ciclo dos tripanosomas americanos, *T. cruzi* e *T. rangeli*, difere de *Leishmania spp.* uma vez que as formas ingeridas pelos seus hospedeiros hemípteros são as formas tripomastigotas que se diferenciarão em epimastigotas capazes de aderir à cutícula do intestino posterior do inseto, no caso de *T. cruzi*, ou atravessar o epitélio intestinal em direção à hemocele no caso de *T. rangeli*. A metaciclogênese de *T. cruzi* se completa no intestino e as formas metacíclicas se acumulam na ampola retal do inseto para saírem junto com as fezes no próximo repasto sanguíneo. Por outro lado, *T. rangeli* completa sua diferenciação nas glândulas salivares do inseto hospedeiro, local de onde serão transmitidos para o hospedeiro vertebrado em sua próxima alimentação sanguínea (revisado por Vallejo et al., 2009). Com relação aos tripanosomas africanos, o ciclo no vetor inicia-se com a ingestão de formas metacíclicas curtas junto com o sangue do vertebrado. Uma vez no intestino do inseto, essas formas se diferenciam em procíclicos que proliferam e migram, por dentro do tubo digestório, em direção às glândulas salivares. Uma nova etapa de diferenciação ocorre e formas epimastigotas são originadas. Tardamente, os epimastigotas originam formas metacíclicas longas e não proliferativas que são transmitidas para outro vertebrado (Gull, 2001).

Embora a família Trypanosomatidae inclua protozoários de importância médica e econômica, a maioria dos gêneros pertencentes a esta família é formada por espécies que desenvolvem seus ciclos biológicos somente no inseto (hospedeiro invertebrado) (Wallace 1966; Wallace et al., 1983). Esses tripanosomatídeos são denominados monoxênicos e pertencem aos gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Leptomonas*, além dos recentemente criados: *Angomonas*, *Strigomonas* e *Wallaceina* (Wallace, 1966; Vickerman, 1994; Sousa & Corte-Real, 1991; Lwoff & Lwoff, 1931[apud Wallace, 1966]; Brandão et al., 2000; Podlipaev & Rokitskaya, 1999).

Curiosamente, tripanosomatídeos monoxênicos já foram isolados de insetos hematófagos pertencentes a ordem Diptera, *Culex pipiens*, *Aedes vexans*,

Anopheles maculipennis, *Mansonia richardii* ou de percevejos da ordem Hemiptera, como o *Triatoma infestans* (Wallace, 1966; Schaub, 1988). Embora se conheça em detalhe o ciclo de vida de tripanosomatídeos heteroxênicos e a fonte natural de infecção dos insetos, que é o sangue de animais infectados, até o presente momento o reservatório natural destes tripanosomatídeos monoxênicos ainda não está estabelecido. Um caso particular de colonização e de transmissão natural bem elucidado é o que envolve *Blastocrithidia triatomae* e *Triatoma infestans*, que coincidentemente é também o inseto hospedeiro de tripanosomatídeos heteroxênicos, como *T. cruzi* e *T. rangeli*. Neste caso foi demonstrado que o protozoário monoxênico coloniza o intestino de inseto juntamente com *T. cruzi* e *T. rangeli* e diferencia-se em cistos na ampola retal, sendo expelido juntamente com as fezes do triatomíneo (Schaub, 1988; Schaub *et al.*, 1988). Além disso, foi demonstrado que a transmissão natural de *B. triatoma* entre os insetos hospedeiros pode ocorrer pelos mesmos mecanismos observados em *T. cruzi* e *T. Rangeli*, ou seja: por coprofagia direta, que é a ingestão de fezes de outros insetos contaminadas com estes protozoários, por ingestão indireta (ingestão de alimentos contaminados com fezes contaminadas) (Gibbs, 1950, McGhee & Hanson, 1962, Schaub, *et al.*, 1989) e por canibalismo (Wallace, 1966, Schaub, *et al.*, 1989). Essa é a única descrição completa existente na literatura sobre o ciclo de tripanosomatídeos monoxênicos, permanecendo seu estudo negligenciado em detrimento dos tripanosomatídeos heteroxênicos de importância médica e econômica (revisado por Podlipaev, 2001).

Além do trato digestivo, monoxênicos também já foram encontrados em outros tecidos de insetos, como nos túbulos de Malpighi, no intestino posterior, na ampola retal, na hemolinfa e nas glândulas salivares (Wallace, 1966), mas todos esses estudos foram apenas descritivos e não elucidaram o ciclo desses protozoários. É importante ressaltar ainda, que se comparando as informações existentes sobre o ciclo de tripanosomatídeos heteroxênicos, pouco é sabido sobre os mecanismos de colonização e interação de tripanosomatídeos monoxênicos com insetos hospedeiros, apesar desses organismos representarem um maior número de gêneros dentro da ordem, do que os heteroxênicos.

1.2.1- O Modelo *Blastocrithidia culicis*-*Aedes aegypti*

B. culicis é um tripanosomatídeo monoxênico pertencente ao gênero *Blastocrithia* (Laird, 1959 apud Vickermam, 1994) e a família Trypanosomatidae. Primeiramente, *B. culicis* foi descrita e nomeada por Novey (1907 apud Vickermam, 1994) como *Crithidia*. Entretanto, Laird (1959; apud wallace, 1996) alterou esta classificação considerando que os tripanosomatídeos do gênero *Crithidia* possuem a forma coanomastigota piriforme, diferentemente daquela observada em *Blastocrithia*, que é epimastigota. Como um membro da família Trypanosomatidae, *B. culicis* apresenta as características comuns aos demais protozoários desta família, como a presença de mitocôndria única e ramificada, do cinetoplasto, que é a região alargada da mitocôndria que contém DNA (kDNA), de microtubulos sub-peliculares e de flagelo emergindo da bolsa flagelar (Fig 3). Entretanto, chama atenção a presença de uma bactéria simbiótica no citoplasma de *B. culicis* (Novey *et al.*, 1907, Wallace, 1966, Brueske, 1967), bem como no citoplasma de cinco outras espécies de monoxênicos: *Crithidia oncopelti* (Gill & Vogel, 1963), *C. deanei* (Mundim *et al.*, 1974), *Herpetomonas roitmani* (Fiorini *et al.*, 1989; Faria e Silva *et al.*, 1991) e *C. desouzai* (Fiorini *et al.*, 1989).

Estudos envolvendo o projeto genoma da bactéria simbiótica de tripanosomatídeos, mostram que os simbiontes das diferentes espécies são similares entre si e descendem de um ancestral comum, uma β -Proteobactéria do gênero Bordetella. Isto significa que a endossimbiose em tripanosomatídeos surgiu a partir de um evento monofilético, tal como ocorrido na origem da mitocôndria. (Motta *et al.*, 1991, Faria e Silva, 1991; Du *et al.* 1994; Hollar *et al.* 1998).

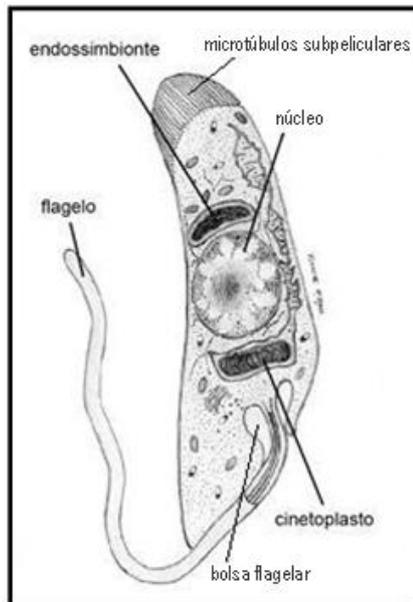


Figura 3- Representação de *Blastocrithidia culicis*, um tripanossomatídeo que contém endossimbionte. Adaptado de Márcia Shimada.

Uma ferramenta importante para o estudo entre a relação do endossimbionte com seu tripanossomatídeo hospedeiro foi a possibilidade de se obter cepas curadas desses protozoários, através da remoção do simbiote pelo tratamento com o antibiótico cloranfenicol (Chang, 1975; Mundim & Roitman, 1977). Atualmente, já estão disponíveis cepas curadas ou apossimbióticas de *B. culicis*, *C. deanei*, *C. oncopelti* e *H. roitmani* (Brueske, 1967; Chang & Trager, 1974; Mundim & Roitman, 1977; Chang, 1975; Faria e Silva *et al.* 1994). O cultivo de tais cepas apossimbióticas necessita da suplementação de fatores de crescimento essenciais, como hemina, purina, aminoácidos e vitaminas, pois já foi estabelecido que o endossimbionte complementa os ciclos metabólicos do seu protozoário hospedeiro (revisto por De Souza & Motta, 1999). Além da influência nutricional, relatos da literatura demonstram que a presença da bactéria simbiótica promove modificações ultraestruturais e físico-químicas no tripanossomatídeo hospedeiro, tais como: (i) alterações na composição de carboidratos da membrana plasmática (Dwyer e Chang, 1976; Esteves *et al.*, 1982), (ii) na carga de superfície (Oda *et al.* 1984), (iii) na diferenciação de *H. roitmani* (Faria & Silva *et al.*, 1994) e (iv) na capacidade de resistência desses tripanossomatídeos aos mecanismos microbicidas de macrófagos peritoneais de camundongo (Rozental *et al.* 1987). Recentemente, foi demonstrado também que a presença do endossimbionte altera a secreção de enzimas

proteolíticas do protozoário (d'Avila-Levy *et al.*, 2001) e aumenta sua adesão ao intestino de insetos vetores, promovendo o seu estabelecimento no inseto (Fampa *et al.*, 2003). É importante mencionar, que a simbiose em tripanosomatídeos apresenta carácter mutualístico, ou seja, se isolada do protozoário, a bactéria é incapaz de sobreviver e de se multiplicar (Azevedo-Martins *et al.* 2007), enquanto o tripanosomatídeo curado é incapaz de colonizar insetos (Fampa *et al.*, 2003).

Outro aspecto que reforça a importância de estudar a interação de tripanosomatídeos monoxênicos com insetos vetores, foi o surgimento de relatos indicando a possível infecção de humanos por esses protozoários. Infecções por tripanosomatídeos monoxênicos foram descritas em pacientes HIV-positivos (revisto por Chicarro & Alvar, 2003), embora a identificação do protozoário seja controversa, já que em alguns casos o protozoário isolado foi classificado como um membro divergente do gênero *Leishmania* (Noyes *et al.*, 2002). Entretanto, a identificação de *Leptomonas pulexsimulantis* como agente causal de uma síndrome semelhante à leishmaniose visceral em paciente HIV-positivo (Pacheco *et al.*, 1998) e o isolamento de um tripanosomatídeo de inseto, geneticamente relacionado a *Herpetomonas samuelpeessoai*, do sangue de um paciente também HIV-positivo (Morio *et al.*, 2008), inclui os tripanosomatídeos monoxênicos na lista de agentes oportunistas em indivíduos imunossuprimidos. Além desses relatos, um trabalho pioneiro de McGhee (1957) mostrou a infecção de embriões de galinha por *Crithidia sp.* com posterior isolamento dos protozoários do fígado do animal e transferência vertical para outros embriões. Da mesma forma Jansen e colaboradores (1988) demonstraram a multiplicação de diversos tripanosomatídeos monoxênicos na glândula de cheiro de gambás, mostrando a possibilidade de uma colonização em vertebrados. Além disso, ensaios *in vitro* mostraram que somente os tripanosomatídeos monoxênicos que contem bactéria simbiótica são capazes de infectar e de sobreviver por 48h em fibroblastos de camundongo obtidos da derme (Santos *et al.*, 2004). Recentemente, foi relatado que a cepa de *C. deanei* que contém simbionte apresenta maior taxa de associação com fibroblasto de mamífero do que a cepa curada no início do processo de interação (1-2h). Entretanto, a medida em que os ensaios prosseguem (24-96h) o índice de associação é similar em ambas cepas, indicando que a habilidade do tripanosomatídeo monoxênico de sobreviver e se replicar em hospedeiros vertebrados é independente da presença do simbionte (Matteoli *et al.*, 2009). Juntos esses relatos evidenciam a importância do estudo de tripanosomatídeos

monoxênicos como agentes oportunistas de infecções em vertebrados e cria controvérsias quanto a classificação dos tripanosomatídeos em monoxênicos ou heteroxênicos.

Nosso laboratório vem se dedicando ao estudo do processo de interação de tripanosomatídeos monoxênicos com insetos vetores. Foi primeiramente demonstrado que tripanosomatídeos monoxênicos com endosimbionte interagem mais com as linhagens celulares de insetos e com o intestino médio, explantados de diferentes espécies de dipteros, do que suas respectivas cepas aposimbióticas (Fampa *et al.*, 2003). Dentre os vários tripanosomatídeos monoxênicos utilizados neste estudo, *B. culicis* foi a espécie que mais interagiu com as linhagens de células e com os intestinos dos insetos analisados. Além disso, *B. culicis* com endosimbionte foi capaz de se estabelecer no intestino de fêmeas de *Ae. aegypti*, fato não observado com a cepa de *B. culicis* que não apresenta o endosimbionte. Esta última não foi encontrada no intestino do mosquito 24 horas após sua alimentação com os protozoários (Fampa *et al.*, 2003). Analisando a participação de glicoconjugados na interação de *B. culicis* com o intestino de fêmeas de *Ae. aegypti*, sugerimos o envolvimento de moléculas contendo manose e ácido siálico neste processo, uma vez que a adição destes compostos à interação protozoário-intestino *in vitro*, bem como o tratamento *in vitro* dos protozoários com sialidase diminuíram significativamente esta adesão (d'Avila-Levy *et al.*, 2005b).

Investigando mais detalhadamente a interação de *B. culicis* com *Ae. aegypti*, nosso grupo demonstrou que este protozoário é capaz de sobreviver e colonizar por longos períodos o intestino de fêmeas de *Ae. aegypti* que foram alimentadas com o protozoário. A análise ultraestrutural dessa interação revelou que o protozoário adere às células do epitélio intestinal do mosquito inserindo seu flagelo entre as microvilosidades que revestem este epitélio. Outro fato importante observado neste estudo foi a chegada de *B. culicis* à hemocele de *Ae. aegypti* nos estágios mais avançados da infecção (Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006). Esse achado abriu a possibilidade de *B. culicis* interagir com outros órgãos de *Ae. aegypti* que são banhados pela hemocele, como por exemplo as glândulas salivares do mosquito.

1.3 - Sistema imune inato de Insetos

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa utilizada por diversos seres vivos contra microrganismos invasores. As respostas da imunidade inata são

rápidas, eficazes, independentes de qualquer exposição prévia ao patógeno e as cascatas de transdução de sinais que as desencadeiam são conservadas ao longo da evolução desde insetos até vertebrados, incluindo humanos. Em comparação aos vertebrados, esta interseção inclui a produção de peptídeos antimicrobianos, de radicais reativos de oxigênio e nitrogênio, de moléculas reconhecedoras de padrões microbianos, como por exemplo lectinas do tipo C e receptores semelhantes a *Toll*, bem como fagócitos profissionais. Além disso, o reconhecimento de patógenos e a ativação desses sistemas em insetos levam também a mecanismos que não são compartilhados com vertebrados, como a nodulação dos fagócitos, a encapsulação dos microrganismos invasores e a ativação da enzima fenoloxidase responsável pelo mecanismo de melanização (Barillas-Mury *et al.*, 2005).

A primeira barreira do sistema inato de insetos é constituída por seu rígido exoesqueleto formado por quitina. O exoesqueleto corresponde funcionalmente a pele dos vertebrados e não só auxilia na homeostase do corpo evitando, por exemplo, a perda hídrica, como também compõe a primeira linha de defesa da imunidade inata desses organismos contra invasores, uma vez que essa estrutura funciona como barreira física, impedindo a entrada de microrganismos. Internamente ao exoesqueleto está a cavidade geral que forma o corpo do inseto, chamada hemocele, e que abriga todos os seus órgãos. A hemocele é a cavidade geral do corpo dos insetos por onde circula a hemolinfa, líquido corporal dos insetos cuja função assemelha-se ao sangue dos vertebrados. Voltado para a hemocele e localizado logo abaixo do exoesqueleto encontra-se o corpo gorduroso, órgão multifuncional dos insetos cujo papel no sistema imune é sintetizar e liberar peptídeos antimicrobianos (Gillespie *et al.*, 1997). Estruturalmente, o corpo gorduroso existe sob duas formas no abdômen do inseto: uma camada parietal adjacente ao tegumento e aos músculos inter-segmentares e uma camada perivisceral, localizada ao redor dos órgãos, principalmente ao trato digestório e ovários (Chapman, 1998).

Outros tecidos do inseto também podem participar efetivamente da resposta imune produzindo moléculas antimicrobianas, como ocorre nos hemócitos circulantes na hemolinfa (revisto por Lavine & Strand, 2002) e em epitélios, como o intestinal e o glandular (Dimopoulos *et al.*, 1998; Tzou, *et al.*, 2000).

Assim como ocorre em mamíferos, a resposta imune inata de insetos é mediada pelo trabalho colaborativo entre células e fatores humorais, sendo subdividida, didaticamente, nas etapas celular e humoral.

1.3.1- Imunidade Celular

Os efetores da resposta celular em insetos são células denominadas coletivamente de hemócitos. Essas células circulam pela hemolinfa e encarregam-se de (1) fagocitar o microrganismo invasor, (2) formar aglomerados ao redor do mesmo, num processo denominado nodulação, ou (3) formar uma cápsula com camadas celulares múltiplas e recoberta por melanina, caracterizando a encapsulação. Embora essas células sejam coletivamente chamadas de hemócitos, existem diferenças morfológicas e funcionais que dificultam o estabelecimento de uma nomenclatura homogênea para as diferentes subpopulações de hemócitos encontradas nas várias ordens de insetos existentes. Sendo assim, os tipos de hemócitos encontrados em insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera e Collembola são usualmente denominados pro-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitóides (revisto por Lavine & Strand 2002).

O primeiro passo para que ocorra uma resposta imune mediada por células é o reconhecimento de estruturas não-próprias presentes na superfície do microorganismo denominadas PAMPS ou padrões moleculares associados a patógenos. Tal reconhecimento é realizado por diferentes receptores, presentes nos hemócitos ou na hemolinfa, que são reconhecedores de padrões (PRRs). Ao contrário do que ocorre em vertebrados, os PRRs de insetos não são expandidos clonalmente, mas são tão eficientes quanto aqueles presentes nos vertebrados e disparam cascatas de respostas imunes capazes de controlar rápida e eficientemente uma infecção (revisto por Marmaras & Lampropoulou, 2009).

A fagocitose constitui um mecanismo primário da resposta inata e evolutivamente conservado. Além disso, a fagocitose também pode ocorrer como um processo que colabora para a homeostase do tecido, participando, por exemplo, da eliminação de células apoptóticas e debris durante a fase embrionária do inseto. Virtualmente, todos os tipos de hemócitos são capazes de fagocitar microrganismos, mas existem particularidades de acordo com a ordem de inseto em questão, com o tipo de microrganismo invasor e com a quantidade inoculada (Lackie, 1988).

Plasmatócitos e granulócitos são os fagócitos mais comuns, e em alguns insetos os oenocitóides também se destacam nesse processo. Em alguns casos, a fagocitose de microrganismos é otimizada pela opsonização destes com proteínas que também atuam como PRRs, como C-lectinas, proteínas contendo motivos tioester (TEPs) e proteínas reconhecedoras de peptidoglicanos (PGPRs) (revisito por Lavine & Strand 2002).

Quando a quantidade de microrganismos invasores é muito grande, o processo de nodulação é desencadeado e os hemócitos se aglomeram sobre a superfície do invasor formando nódulos. No caso de parasitóides e vermes nematódeos que parasitam insetos, invasores muito grandes para serem fagocitados, irá ocorrer a sobreposição de camadas múltiplas de hemócitos sobre a superfície estranha resultando na formação de uma cápsula através do processo denominado encapsulação. Ambos os processos, nodulação e encapsulação, são respostas imunológicas que contribuem para uma limpeza rápida e efetiva da hemolinfa já que ambas as estruturas, nódulo e cápsula, podem aderir aos tecidos do inseto, retirando rapidamente da circulação partículas invasoras ou evitando seu espalhamento pela hemolinfa por contê-las no local da inoculação (Lackie, 1988). Além disso, a deposição de melanina sobre a cápsula ou sobre o nódulo, quando ocorre, auxilia na morte do invasor através da produção local de radicais livres de oxigênio e nitrogênio e de quinonas tóxicas produzidas pela ativação da fenoloxidase, enzima que controla a cascata de melanização (Nappi & Christensen, 2005).

1.3.2- Imunidade Humoral

A resposta inata humoral é dada pela produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e de radicais reativos de oxigênio e de nitrogênio (ROS e RNS), pela ativação de cascatas enzimáticas complexas que controlam a melanização e a coagulação da hemolinfa e pela ativação de receptores reconhecedores de patógenos que, além de ativar hemócitos, podem atuar como opsoninas e fatores aglutinantes, no caso de C-lectinas (Barillas-Mury et al., 2005).

Insetos produzem uma variedade de AMPs em resposta a invasão de microrganismos. Lisozimas, defensinas, cecropinas e atacinas representam as famílias de AMPs que podem ser sintetizadas pelos hemócitos, corpo gorduroso e epitélios mediante a invasão de compartimentos do corpo do inseto. Em sua grande

maioria os AMPs correspondem a moléculas hidrofóbicas capazes de atacar diretamente a parede celular ou a membrana plasmática do microrganismo invasor causando lise e morte (Gillespie et al., 1997; Bulet et al., 1999). O primeiro fator antibacteriano identificado na hemolinfa de um inseto foi lisozima e atualmente defensinas de insetos constituem a classe de AMPs melhor caracterizada em diferentes classes.

As defensinas são peptídeos catiônicos, ricos em cisteínas, com aproximadamente 40 aminoácidos, e homólogas às defensinas de mamíferos (Lehrer et al., 1993; Dassanayake et al., 2007). Em mosquitos, as defensinas atuam contra uma ampla variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vermes (Lowenberger et al., 1995; Cho et al., 1996; Dimopoulos et al., 1997; Bartholomay et al., 2004; Kumar & Paily, 2008). Em *Ae. aegypti*, defensina representa um importante AMP, sendo produzidas três isoformas (A, B e C), das quais duas (A e B) são predominantes e expressas no corpo gorduroso, enquanto a terceira (isoforma C) é expressa em níveis bem menores no intestino do mosquito (revisto por Lowenberger, 2001). Com relação às cascatas imunológicas ativadas em resposta ao reconhecimento de um patógeno, Toll e IMD (do inglês “immunodeficiency”) são controladas por fatores de transcrição que regulam, em nível nuclear, a produção de defensina (e outros AMPs). O modelo melhor estudado é no inseto *Drosophila melanogaster*. Neste inseto, três fatores de transcrição nucleares da família kappa B (NF- κ B) controlam as importantes cascatas do sistema imune inato de *Drosophila*: Dorsal e Dif (do inglês “Dorsal-related immune factor”), membros da cascata Toll e que são ativados em resposta a fungos e bactérias Gram positivas, e Relish, membro da cascata IMD ativado em resposta a presença de bactérias Gram negativas (revisto por Lemaitre & Hoffmann, 2007). Tais cascatas imunes são conservadas em mosquitos (Hoffmann, 2003; Michel & Kafatos, 2005), sendo o fator Rel1 o homólogo de Dif e Rel2 o homólogo de Relish (Christophides et al., 2002, 2004; Shin et al., 2005). Em fêmeas de *Ae. aegypti* foi descrito que a cascata Toll é modulada por Rel1 (Bian et al., 2005; Shin et al., 2005), enquanto a cascata IMD é controlada por Rel2. A deficiência de Rel2 nesses mosquitos provoca com uma susceptibilidade a bactérias Gram negativas e um acentuado prejuízo na expressão de defensina e cecropina (Shin et al., 2003; Meister et al., 2005). A terceira cascata de sinalização da resposta imune é denominada JAK/STAT (do inglês “Janus kinase signal transducer and activator of transcription”) e tem sido

implicada com a resposta a vírus em *Ae. aegypti* (Souza-Neto et al., 2009) e *D. melanogaster* (Dostert et al., 2005).

A coagulação da hemolinfa é um mecanismo utilizado por insetos (e outros artrópodes) para selar uma injúria no integumento, evitando transtornos homeostáticos decorrentes da perda de hemolinfa, ou prender microrganismos invasores, contendo-os no local da injúria e evitando sua disseminação pela hemolinfa. A coagulação consiste na formação de uma matriz insolúvel que contém fatores humorais e hemócitos, sendo sua ativação semelhante à cascata de serino proteases que atuam na coagulação do plasma de mamíferos. O controle da coagulação é baseado na atividade de serino proteinases que desativam as proteases da cascata (revisto por Dushay, 2009). Recentemente foi descrito que uma transglutaminase, homóloga ao fator XIIIa de humanos, está presente na hemolinfa de *D. melanogaster* e é fundamental para a coagulação da hemolinfa e para o aprisionamento de bactérias no coágulo (Wang et al., 2010).

A melanização constitui um mecanismo particular da resposta humoral de organismos invertebrados, embora seja um mecanismo igualmente importante para a esclerotização da cutícula que forma o corpo dos insetos assim como o envoltório do ovo em algumas espécies. Para o sistema imune, a formação e deposição de melanina na superfície de patógenos ou de um grupo de hemócitos nodulados é importante para impedir a disseminação desses patógenos, para individualizar hemócitos nodulados e, em alguns casos, até mesmo para facilitar a fagocitose (revisto por Christensen et al., 2005). A ativação da cascata que resulta na melanização inicia-se mediante a ativação da enzima chave fenoloxidase (PO). PO existe nos insetos como uma pro-enzima, a pro-fenoloxidase (pro-PO), sendo sua ativação regulada pela clivagem proteolítica mediada por serino proteases. A conversão de pro-PO em PO inicia a hidroxilação de monofenóis, como tirosina, a o-difenóis, como dihidroxi-fenil-alanina (DOPA). Conseqüentemente, a oxidação de difenóis como DOPA gera quinonas precursoras da melanina, como a dopaquinona (Nappi & Christensen, 2005). Esse substrato pode ser utilizado pela própria PO ou pela enzima conversora de dopacromo (dopa descarboxilase - Ddc) para originar melanina. Em alguns insetos, ocorre a expressão de Ddc na superfície dos hemócitos interligando a resposta celular à humoral (Marvrouli et al., 2005; De Gregório et al., 2002; Liu et al., 1997).

A resposta imune desempenhada pelo mecanismo de melanização com participação do sistema pro-PO/PO possibilita a geração de radicais reativos de oxigênio e nitrogênio na hemolinfa durante o processo de melanização, promovendo citotoxicidade para o microrganismo que está sendo melanizado (revisto por Christensen et al., 2005). Em nível epitelial o equilíbrio Redox, em *D. melanogaster*, por exemplo, é feito por proteínas da família Duox (que contém um domínio NADPH e outro, N-terminal e extracelular, para peroxidase) que produzem ROS reguladamente no epitélio de e por catalases induzidas imunologicamente (“immune responsive catalase” ou IRC) (Ritsick et al., 2004).

Serino proteases de insetos são enzimas que atuam na amplificação da resposta imune aumentando o sistema de detecção dos patógenos. Elas funcionam de maneira homóloga a cascata do complemento de vertebrados e controlam, dentre outros fatores, a melanização. Como dito anteriormente, a ativação da cascata de melanização gera intermediários tóxicos. Sendo assim, a regulação da ativação de serino proteases deve ocorrer de maneira precisa e pontual, resultando na ativação local da cascata da melanização. Devido a essa exigência de um controle fino, uma família de enzimas inibidoras de serino proteases, as serpinas, existem para controlar a ativação inicial de todos os sistemas e prevenir a formação desses intermediários tóxicos no corpo do inseto (Kanost, 1999; Cerenius et al., 2008). Alguns patógenos são capazes de sintetizar inibidores de serino proteases homólogos às serpinas para evitar a ativação de pro-PO e conseqüentemente todo o sistema de melanização (Cerenius et al., 2008). Curiosamente, em alguns insetos dípteros, como *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, um evento de expansão gênica é observado em relação ao número de cópias de pro-PO, serino proteases e serpinas, sugerindo a presença de mecanismos múltiplos de ativação da melanização (Waterhouse et al., 2007).

O processo de opsonização em insetos é mediado por proteínas da hemolinfa que atuam na identificação de partículas estranhas e conseqüentemente na ativação de mecanismos do sistema imune inato, como a fagocitose, a produção de AMPs e a ativação do sistema de melanização. Embora insetos não tenham anticorpos para realizar tal função, a semelhança dos vertebrados, insetos possuem proteínas homólogas às do sistema complemento, às lectinas do tipo C (dependentes de cálcio) e à proteína-C reativa. Novamente o modelo mais estudado é *D. melanogaster*, onde mais de trinta C-lectinas com atividade imunomodulatória foram

descritas (revisado por Muller et al., 2008). Em *P. americana*, diversas lectinas atuam no reconhecimento de LPS, bactérias e protozoários (revisado por Muller et al., 2008; Ingram et al., 1984). Outra família de proteínas que atuam como opsoninas, e são homólogas aos fatores C3, C4 e C5 do sistema complemento de vertebrados, são as TEPs (proteínas contendo motivos tioéster). Em *Drosophila*, a produção de TEPs é controlada pela cascata de sinalização JAK/STAT (revisado por Lemaitre & Hoffman, 2007) e em *Anopheles* esta opsonina é importante na resposta imune à *Plasmodium* (Levashina et al., 2001; Blandin et al., 2004; Frolet et al., 2006).

1.4- Redes Extracelulares de DNA e o mecanismo da ETose na Resposta Imune Inata de vertebrados

As respostas imunológicas mediadas pelo sistema inato de humanos também são rápidas, eficazes, independentes de qualquer exposição prévia ao patógeno e dependentes do reconhecimento de moléculas presentes na superfície desses microrganismos. Tais respostas também são mediadas por um conjunto de células fagocíticas e de fatores humorais, sendo os neutrófilos as primeiras células recrutadas para sítios inflamatórios. Esse recrutamento, mediado por quimiocinas específicas, ocorre rapidamente, fazendo com que essas células constituam a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Uma vez no sítio infeccioso, os neutrófilos desempenham suas funções clássicas de fagocitar patógenos e liberar seus grânulos tóxicos, bem como mediadores quimiotáticos para diferentes tipos celulares que complementam a resposta imune de vertebrados. Neutrófilos também podem eliminar microrganismos de forma dependente ou independente de oxigênio. Os mecanismos independentes de oxigênio incluem a liberação de proteínas dos grânulos e o mecanismo dependente de oxigênio começa com a ativação da NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase que participa na produção de superóxidos.

Recentemente foi atribuída aos neutrófilos uma terceira função na resposta inata que corresponde a um mecanismo de morte extracelular de patógenos após exteriorização da cromatina neutrofilica associada as proteínas dos grânulos sob a forma de uma rede denominada *Neutrophil extracellular traps* - NETs. Este mecanismo pode ser ativado por bactérias Gram positivas e Gram-negativas, fungos (hifas e leveduras), protozoários (como *Leishmania*) e alguns produtos fisiológicos, como interleucina 8, e sintéticos, como acetato de forbol miristato (PMA) (Brinkmann

et al., 2004; Urban *et al.*, 2006; Guimarães-Costa *et al.*, 2009). As NETs emitidas pelos neutrófilos, além de conterem fisicamente a disseminação de microrganismos, concentram localmente moléculas antimicrobianas como histonas, elastase e mieloperoxidase, entre outras (revisto por von Kockritz-Blickwede & Nizet). A tabela 2 mostra as diversas moléculas associadas às redes extracelulares de neutrófilos identificadas por espectrometria de massa (Urban *et al.*, 2009).

Tabela 2. Moléculas associadas as Redes extracelulares de neutrófilos.

Localização celular	Proteína
Grânulos	Elastase
	Lactotransferrina
	Azurocidina
	Catepsina G
	Mieloperoxidase
	Proteinase 3
	Lisozima C
	Defensinas 1 e 3
	Histona H2A
Núcleo	Histona H2B: a) Histona H2B b) Histona H2B-like
	Histona H3
	Histona H4
Citoplasma	S100 Proteína ligadora de Cálcio A8
	S100 Proteína ligadora de Cálcio A9
	S100 Proteína ligadora de Cálcio A12
Citoesqueleto	Actina
	Miosina-9
	Alfa-actinina
	Plastina
	Citoqueratina-10
Peroxissoma	Catalase
Enzimas glicolíticas	Alfa-enolase
	Transquetolase

Adaptado de Urban et al., 2009

A emissão de NETs pelos neutrófilos foi caracterizada como um novo mecanismo de morte celular, cujas características diferem de apoptose e da morte por necrose, sendo denominado de NETose. Outras duas características importantes que auxiliam na diferenciação entre o mecanismo da NETose dos demais tipos de morte celular é a dependência da produção de radicais de oxigênio via ativação do complexo da NADPH oxidase (Fuchs *et al.*, 2007) e a ativação da enzima peptidil arginina deaminase 4 (PAD4), que catalisa a deaminação de resíduos de arginina em diferentes tipos de histonas (H2A, H3 e H4) gerando citrulinas; etapa

importante para o rearranjo do complexo DNA/histona que antecede a liberação do DNA nuclear para a formação das redes (Neeli et al., 2008; Wang et al., 2009).

Recentemente, Fuchs e colaboradores (2010) demonstraram que as redes extracelulares de neutrófilos também estão associadas com a trombose, evidenciando a aderência das plaquetas às NETs, bem como sua ativação pela formação de filopódios. Neste trabalho, também foi demonstrado que as NETs induzem a formação de trombos ricos em hemácias, que as redes também ligam proteínas encontradas no plasma sanguíneo importantes para a estabilidade dos trombos, como fibronectina, fator von Willebrand (vWF) e fibrinogênio e que o rompimento das NETs por DNase inibe a agregação de plaquetas.

Além dos neutrófilos, outras células do sistema imune humano realizam mecanismo semelhante quando ativadas por microrganismos, citocinas ou produtos microbianos: mastócitos (von Köckritz-Blickwede *et al.*, 2008), eosinófilos (Yousefi *et al.*, 2008), e monócitos (Webster et al., 2010), e por isso o mecanismo passou a se chamar ETose.

1.4.1- ETose em outras classes de seres vivos

Além dos neutrófilos, eosinófilos, monócitos e mastócitos humanos, o processo de formação das redes extracelulares foi demonstrado em células do sistema imune de outros mamíferos, como camundongo (Ermer et al., 2009), boi (Grinberg *et al.*, 2008), gato (Wardini *et al.*, 2010), peixes (Palic *et al.*, 2007), galinha (Chuammitri *et al.*, 2009). Em *Galleria mellonella*, embora não tenham sido observadas redes clássicas como as produzidas por neutrófilos humanos, foi evidenciado a participação de ácidos nucleicos derivados dos oenocitóides na coagulação da hemolinfa; mecanismo importante para a morte de bactérias (Altincicek *et al.*, 2008).

Também foi demonstrada a presença de DNA extracelular em plantas e sua relevância na defesa contra infecções fúngicas (Wen *et al.*, 2009).

1.4.2- *P. americana* como modelo para o estudo da ETose em insetos

P. americana é um inseto pertencente à ordem Blattodea, cujos registros fósseis datam do período Carbonífero (Vianna et al., 2001). Esses insetos possuem o desenvolvimento incompleto, do tipo hemimetábolo, onde a fase que emerge do ovo é morfologicamente semelhante ao adulto, só crescendo em tamanho até

alcançar a fase adulta. Possui distribuição cosmopolita, com mais de quatro mil espécies conhecidas no mundo, sendo apenas 1% associadas ao homem e atuando como vetores mecânicos de patógenos e como hospedeiro intermediário de helmintos e bactérias (Pai et al., 2003; Thyssen et al., 2004). São insetos com hábitos noturnos, alimentação onívora e, como *Ae. aegypti*, apresentam grande potencial reprodutivo mesmo em cativeiro, o que proporciona uma manutenção mais fácil das colônias em laboratório.

Além de possuir esse conjunto de características interessantes e atrativas para o estudo do sistema imune, o tamanho desse inseto e, conseqüentemente, a quantidade de hemócitos e hemolinfa que ele oferece, favorecem a sua utilização como modelo experimental para estudo de imunologia de insetos.

2- OBJETIVOS

Geral: Estudar aspectos celulares da interação de microrganismos com hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como os mecanismos da resposta imune ativados por essa interação.

Específicos relacionados aos estudos das redes extracelulares de DNA:

- 1- Avaliar formação, a composição e a toxicidade das redes extracelulares de neutrófilos humanos na interação com diferentes espécies e formas evolutivas do protozoário *Leishmania*;
- 2- Verificar se hemócitos de *P. americana* liberam DNA em resposta a produtos microbianos, como LPS e zimosan, na presença e na ausência da hemolinfa;
- 3- Avaliar a composição e a ultraestrutura das redes extracelulares de DNA liberadas por hemócitos de *P. americana* por microscopia de fluorescência e de eletrônica de varredura;
- 4- Analisar, *in vitro*, o envolvimento e a contribuição da ETose para a resposta imune de *P. americana*;
- 5- Avaliar o papel *in vivo* das redes de DNA em *P. americana* inoculada com *E. coli* e DNase I.

Específicos relacionados ao estudo da Interação *B. culicis*-*Ae. aegypti*:

- 1- Elucidar o ciclo de vida de *B. culicis* em fêmeas *Ae. aegypti* determinando quais órgãos do mosquito são alcançados pelo protozoário ao longo da colonização;
- 2- Determinar proteínas presentes no extrato total da glândula salivar e do intestino às quais *B. culicis* biotinilada reconhece e se liga;
- 3- Avaliar a natureza glicídica das proteínas no extrato total da glândula salivar e do intestino às quais *B. culicis* biotinilada reconhece e se liga através da marcação com lectinas;
- 4- Avaliar o efeito da deglicosilação de proteínas da glândula salivar e intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* na interação com *B. culicis* biotinilada pelo uso de glicosidases;
- 5- Analisar o efeito da infecção de *B. culicis* sobre os moduladores da transcrição de efetores da resposta imune inata de insetos (Rel1, Rel2 e STAT) e sobre as moléculas efetoras defensina A e TEP1 por PCR em tempo real.

ANEXO I

Este anexo é composto por um trabalho publicado, que encontra-se a seguir, e dados não publicados sobre o mesmo tema, cujos materiais e métodos e resultados obtidos serão descritos mais adiante.

3- MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES AO ANEXO I

3.1- Obtenção e manutenção dos insetos

A colônia de *P. americana* foi mantida no Laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. Previamente aos experimentos, ninfas no último estágio de crescimento eram retiradas da colônia e utilizadas imediatamente.

3.2- Coleção de hemolinfa e hemócitos de *P. americana*

Ninfas de *P. americana* no último instar de desenvolvimento ou machos adultos foram retirados da colônia, anestesiadas no gelo por 15 minutos e em seguida foram injetadas com 100µL de solução fisiológica para barata (128mM NaCl; 18mM CaCl₂; 1,3mM KCl; 2,3mM NaHCO₃; pH 7,0) diretamente na hemocele. A inoculação foi feita na região entre os esternitos abdominais com o auxílio de uma seringa Hamilton com agulha de 25 gauge. A hemolinfa diluída foi recuperada e usada imediatamente. Para separar os hemócitos da hemolifa, as ninfas foram inoculadas com solução anticoagulante (98mM NaOH; 145mM NaCl; 17mM EDTA; 41mM ácido cítrico; pH 4,5) na região abdominal e a hemolinfa recuperada foi centrifugada a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os hemócitos ressuspensos na solução de ringer e usados imediatamente.

3.3- Cultivo e obtenção de *E. coli*

E. coli, cepa DH5α (probe AT), expressando o gene da proteína verde – GFP – e o gene de resistência à ampicilina, foi cultivada em meio LB-broth (Luria-Bertani's rich nutrient médium; Sigma) suplementado com 200µg/mL de ampicilina à 37°C. A cada experimento, uma alíquota da cultura era retirada, lavada em solução de ringer para barata (descrita no item 3.2) e a concentração das bactérias era ajustada por comparação com escala McFarland (nº1, equivalente a 3×10^8 *E. coli* por mL). A partir daí, diluições foram realizadas até que se ajustasse a concentração das bactérias conforme o necessário para os diversos experimentos.

3.4- Quantificação do DNA liberado no sobrenadante de hemolinfa ou hemócitos estimulados

A hemolinfa recolhida de ninfas do último instar ou de machos adultos (obtidos conforme descrito no item 3.2) ou 5×10^5 hemócitos diluídos em solução de

ringer (200µL), foram estimulados com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo de *E. coli* (molécula inteira ou detoxificada [d-LPS], ou seja, sem a parte lipídica - cepa 0111: B4 - SIGMA) ou zimosan (Sigma) por 1h à temperatura ambiente. Após o estímulo, os microtubos foram centrifugados à 200g por 10 min para remoção das células (hemócitos e *E. coli* conforme a incubação realizada). A dosagem do DNA nestes sobrenadantes foi feita em placa de 96 poços utilizando-se Picogreen dsDNA kit (Invitrogen). A fluorescência foi detectada em fluorímetro no comprimento de onda 480/530nm e a concentração de DNA em cada amostra foi determinada através da correlação com curva padrão de DNA de peixe (Sigma). Todas as incubações e reagentes utilizados foram diluídos em solução de ringer.

3.5- Microscopia de Fluorescência

A hemolinfa proveniente de duas ninfas foi coletada e colocada sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina diluída em ringer (0,01%;Sigma). Em seguida, foi adicionado às lamínulas d-LPS (100ug/mL), *E. coli*-GFP (3×10^5) ou *B. culicis* (10^6) por 1h. Após o estímulo, as amostras foram fixadas com paraformaldeído (4%, diluído em ringer) por 1h, cuidadosamente lavadas com solução de ringer e incubadas com 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (10µg/ml;Sigma) ou homodímero de brometo de etídio (10µg/mL; Invitrogen) para revelar a presença de DNA. Algumas preparações foram tratadas com 2U de DNaseI (Fermentas) 30 min após a adição do estímulo, sendo a incubação mantida por mais 30 min, num total de 1 hora. Para evidenciar a presença de lipídeos, algumas preparações foram incubadas com Bodipy 493/503® (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) (100nM, Invitrogen) ou Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo- α -phenoxazine-5-one, 10µg/mL;Sigma), seguindo-se as instruções dos fabricantes. Simultaneamente, uma mistura de amins reativas conjugada à rodamina (100 µg/mL) (Rhodamine Green™ 505/535- carboxylic acid, succinimidyl ester, hydrochloride; Invitrogen), foi usada para detectar proteínas associadas às redes através da reação com amins livres.

A presença de histonas nas redes foi verificada através de ensaios de imunofluorescência com a adição de anticorpos anti-histona-3 fosforilada (100µg/mL) (clone MC463; Millipore) ou anti-complexo DNA/histona1 (10µg/mL; Chemicon) a preparações previamente estimuladas, fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em

ringer e bloqueadas com ringer-BSA (3%) por 30 min. A marcação com os anticorpos (diluídos em ringer) foi realizada por 1h e em seguida as lamínulas foram cuidadosamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado à FITC (Sigma) diluídos 1:200 em solução de ringer. Todas as preparações foram montadas em meio vectashield para preservar a fluorescência (Vector Lab) e analisadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss) modelo Axioplan ou Axiovert equipado com módulo ApoTome ou sistema confocal (LSM 510 META), respectivamente.

3.6- Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina diluída em ringer (0,01%;Sigma) contendo hemolinfa estimulada com d-LPS (100ug/mL) por 1h foram pré-fixadas por 30 minutos com paraformaldeído (4%), sendo em seguida fixadas por 12 horas à 4°C em solução de fixação (2.5% de glutaraldeído tipo II e 4% de formaldeído diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2, contendo 3,7% de sacarose e 5mM CaCl₂). A etapa de pós-fixação foi realizada em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio contendo 5mM de CaCl₂ e diluídos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH7,2, por 1 hora na ausência de luz, seguida de uma lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2, por 10 minutos. Após essas etapas, o material foi desidratado em séries crescentes de etanol (50, 70, 90 e 100% duas vezes) e pelo método do ponto crítico em aparelho Balzers CDP-20 (Balzers Union, Fürstentun Liechstenstein). As lamínulas foram recobertas com carbono e observadas em Microscópio Eletrônico Jeol JSM-5310.

3.7- Efeito bactericida de sobrenadantes ricos em DNA

A hemolinfa obtida de ninfas foi incubada com 100µg/mL de d-LPS por 1 hora para estimular a liberação das redes extracelulares ou mantida pelo mesmo tempo sem estímulo algum. Após estímulo, ambas as preparações foram centrifugadas à 200g para a retirada dos hemócitos, e em seguida, uma alíquota foi recolhida de cada sobrenadante para a quantificação de DNA liberado, conforme descrito no item 3.2. Os sobrenadantes estimulados com d-LPS, ricos em DNA, continham, em média, 2,2 ± 1,0 µg/mL de DNA e os sobrenadantes não estimulados, denominados HM, apresentaram, em média, 1,2 ± 0,6 µg/mL de DNA. *E.coli*-GFP (3x10⁵) foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente, com o (i) sobrenadante de hemolinfa

não estimulada (HM), (ii) com o sobrenadante enriquecido em DNA na ausência (d-LPS/DNA) ou (iii) na presença de DNase I (5U). A mesma quantidade de bactéria foi incubada pelo mesmo período de tempo somente na presença de DNase I (5U) ou sem tratamento algum. Após a realização dos tratamentos descritos, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi semeada em LB-agar contendo 200µg/mL de ampicilina e as placas foram mantidas em estufa à 34°C. A contagem visual das unidades formadoras de colônia (CFUs) foi realizada após 48 horas de crescimento bacteriano.

3.8- Ensaio de atividade do sistema pro-PO/PO

Alíquotas (10µL) dos sobrenadantes obtidos acima (hemolinfa estimulada ou não com d-LPS) foram adicionadas à 90 µL de tampão cacodilato (10mM sodium cacodylate, 10mM CaCl₂, pH 7.4) e mantidas no gelo. Em seguida, 10µL dessa preparação foi misturada a uma solução saturada de L-DOPA (3mg/mL;Sigma), diluída no mesmo tampão, e colocada, em triplicatas, em placa de 96 poços. A formação de dopacromo foi acompanhada através da leitura da absorbância à 490nm em intervalos de 0, 30 e 60 min após a adição do substrato L-DOPA. A diferença entre os valores das absorbâncias obtidas nos intervalos de 0 e 60 minutos foi assumida como a atividade de PO/60min. O mesmo procedimento foi realizado para verificar a atividade de PO nos sobrenadantes resultantes das 3 horas de tratamento de *E. coli-GFP*. Para testar a viabilidade do sistema pro-PO/PO, outra bateria de diluições dos mesmos sobrenadantes (após o estímulo com d-LPS e após o tratamento da bactéria) foi preparada, conforme descrito anteriormente, e acrescida de solução saturada de 15µL de tripsina bovina (1mg/mL, diluída no tampão cacodilato citado anteriormente) (Sigma) para ativar o sistema pro-PO/PO antes da adição do substrato L-DOPA e incubada por 10 min a 4°C. Após essa incubação, o substrato da PO foi adicionado e a atividade desta enzima foi verificada através da formação de dopacromo. Igualmente, a diferença entre os valores das absorbâncias obtidas nos intervalos de 0 e 60 minutos foi assumida como a atividade de PO/60min.

3.9- Inoculação de *E.coli-GFP* e DNase I em *P. americana*

Grupos de ninfas foram injetadas com 10µl de uma solução de ringer contendo 10⁵ ou 10⁶ *E. coli-GFP* na presença ou ausência de DNase I (5U;

Fermentas) diretamente na hemocele, através da região intermembranosa do integumento localizada na porção ventral do abdômem do inseto. Outros grupos foram injetados somente com DNase I ou com o tampão de diluição da enzima (50mM de Tris-acetate, 10mM de CaCl₂ e 50% glicerol) no mesmo volume e na mesma região anatômica. Todos os insetos inoculados foram mantidos sob as mesmas condições da colônia por 12 horas.

3.10- Avaliação da formação de nódulos e da fagocitose nos insetos inoculados com *E.coli-GFP* e DNase I

Doze horas após a inoculação descrita no item anterior, os insetos foram anestesiados em banho de gelo e a hemolinfa de cada indivíduo foi recolhida separadamente em solução anticoagulante. Após o recolhimento da hemolinfa, o corpo de cada inseto foi fixado individualmente em solução de 70% de metanol, sendo a cutícula removida posteriormente para a dissecação das crops e contagem visual dos nódulos presos a esse órgão. A contagem dos nódulos foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica, sendo a aquisição das imagens realizada através de um sistema fotográfico acoplado à lupa.

As hemolinfas recolhidas de cada inseto foram utilizadas para análise do número de hemócitos circulantes após os tratamentos realizados em cada indivíduo, bem como da eficiência da fagocitose de *E. coli-GFP* usada nestes tratamentos conforme descrito no item anterior. Para isso, cada amostra de hemolinfa (aproximadamente 100µL por inseto) foi centrifugada separadamente à 200g por 10 min e os hemócitos foram fixados em paraformaldeído (4%) diluído em solução anticoagulante. Posteriormente, todas as amostras foram marcadas com iodeto de propídio (10µg/mL) por 15 minutos, lavadas uma vez e ressuspensas em solução anticoagulante. A leitura de cada amostra de hemolinfa foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). A análise dos resultados obtidos foi feita com auxílio do programa summit v4.3.

4- RESULTADOS COMPLEMENTARES AO ANEXO I

4.1- Hemócitos de *P. americana* liberam redes de DNA quando estimulados

As redes extracelulares de DNA são liberadas por células do sistema imune inato mediante o contato com microrganismos, com seus produtos ou com moléculas sintéticas. Neutrófilos humanos, por exemplo, liberam redes extracelulares quando são estimulados por bactérias Gram-positivas ou negativas, fungos ou protozoários, bem como quando são tratados com lipopolissacarídeos, entre vários outros compostos (revisado por von Köckritz-Blickwede & Nizet, 2009). Para investigar a ETose em insetos e verificar seus hemócitos também são capazes de liberar redes extracelulares de DNA quando são estimulados, procedeu-se o estímulo *in vitro* desses hemócitos isolados ou na hemolinfa com concentrações crescentes de LPS (molécula completa), LPS detoxificado (sem a parte lipídica; d-LPS) ou zimosan. A liberação das redes foi avaliada pela dosagem de DNA no sobrenadante das culturas utilizando-se o Picogreen como agente de detecção do DNA. Como demonstrado na figura 4A, hemócitos provenientes de ninfas do último instar de *P. americana*, isolados ou na hemolinfa e estimulados por 1 hora com 100 ou 500µg/mL de d-LPS, liberaram significativamente mais DNA do que os controles não estimulados. A quantidade de DNA liberada pelos hemócitos estimulados com 100 e 500µg/mL de d-LPS na ausência da hemolinfa foi respectivamente 2,3 e 1,7 vezes maior do que na presença da mesma. A molécula completa de LPS estimulou a liberação de DNA na maior concentração testada (500µg/mL) quando os hemócitos foram estimulados na hemolinfa. Diferentes concentrações de zimosan, um polímero formado por unidades de β1-3 glucanas presente na parede celular de fungos, não foram capazes de estimular a liberação de DNA pelos hemócitos de ninfas de *P. americana* nem isolados nem em conjunto com a hemolinfa (fig. 4B). Hemócitos presentes na hemolinfa coletada de indivíduos machos e adultos de *P. americana* também foram capazes de liberar DNA quando estimulados com d-LPS nas concentrações de 100 e 500µg/mL (Fig. 4C).

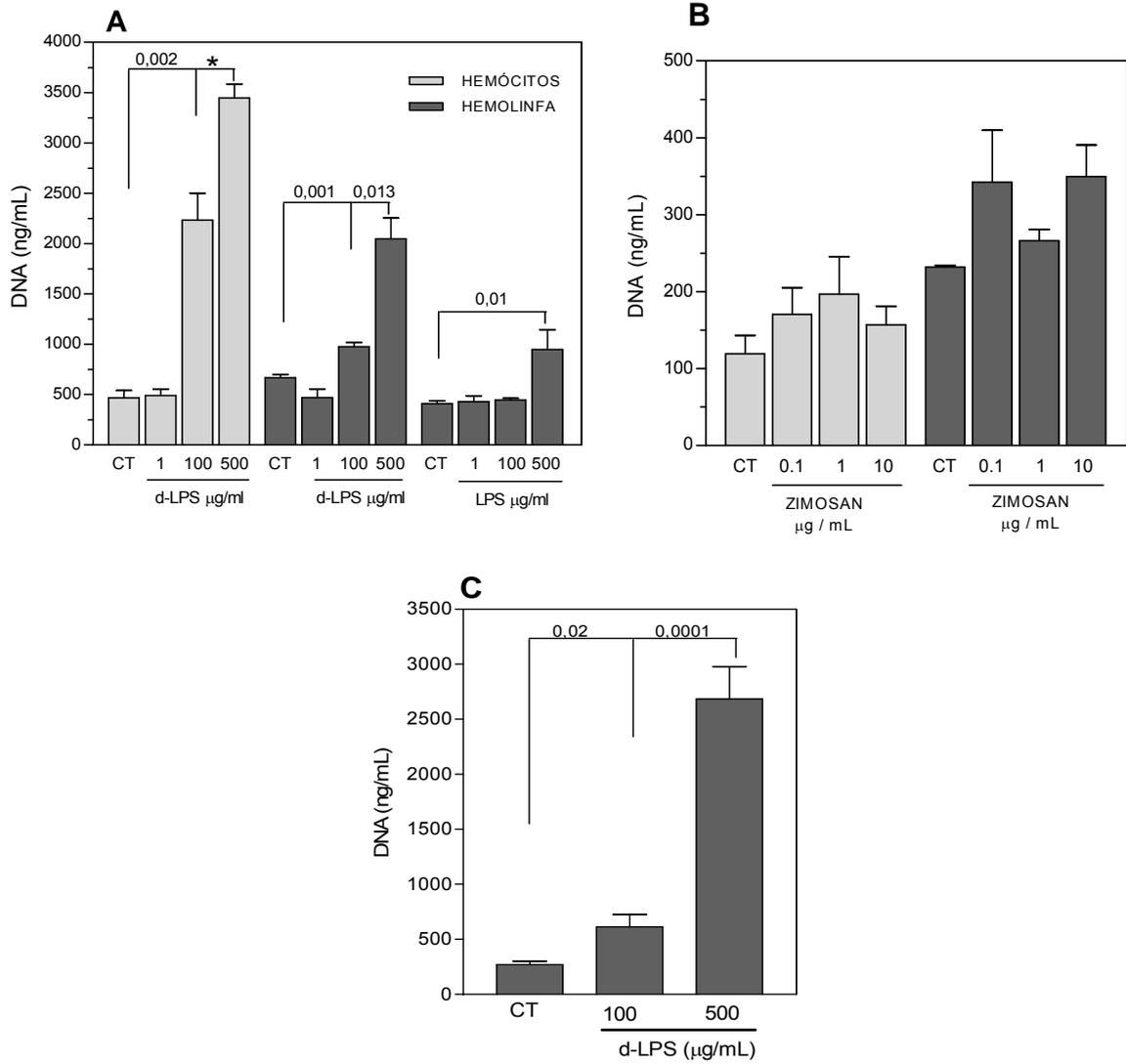


Figura 4- Dosagem de DNA no sobrenadante de hemócitos ou hemolinfa coletados de ninfas (A e B) ou adultos (C) de *P. americana* e estimulados por 1h com diferentes concentrações de LPS (molécula completa), d-LPS (LPS detoxificado, sem a porção do lipídeo A) ou zimosan. Os valores relativos a concentração do DNA dosado em cada tratamento representam a média de 4 experimentos independentes. * $p > 0,0001$.

4.2- Hemócitos de *P. americana* liberam redes extracelulares formadas por DNA, histonas, proteínas e lipídios neutros

Com o objetivo de demonstrar que os hemócitos de *P. americana* liberam redes extracelulares formadas por DNA, preparações de hemócitos isolados ou de hemolinfa foram estimuladas com d-LPS por 1h, fixadas e incubadas com diferentes moléculas intercalantes de DNA, como DAPI, brometo de etídio e Sytox green (Fig. 5). A análise das preparações em microscópio de epifluorescência mostra que DAPI marca uma estrutura fina e extensa formada na presença de d-LPS tanto na preparação contendo hemolinfa (Fig. 5A e 5B) quanto na preparação contendo apenas hemócitos (Fig. 5C e 5D) indicando que a estrutura formada em ambos os casos é composta por DNA. Da mesma forma, preparações de hemolinfa foram estimuladas sob as mesmas condições, incubadas com brometo de etídio e observadas através de microscopia confocal (Fig. 5E e 5F). Neste caso, observou-se o mesmo tipo de estrutura fina e extensa contendo DNA, evidenciado pela presença do marcador fluorescente. Estes resultados foram confirmados ainda pela marcação com Sytox green (Fig 6). A observação das culturas através de microscopia confocal nos permitiu verificar a presença de redes extracelulares contendo DNA em meio a um nódulo de hemócitos viáveis, uma vez que essas células não foram coradas pelo Sytox green adicionado antes da fixação do material (Fig 6).

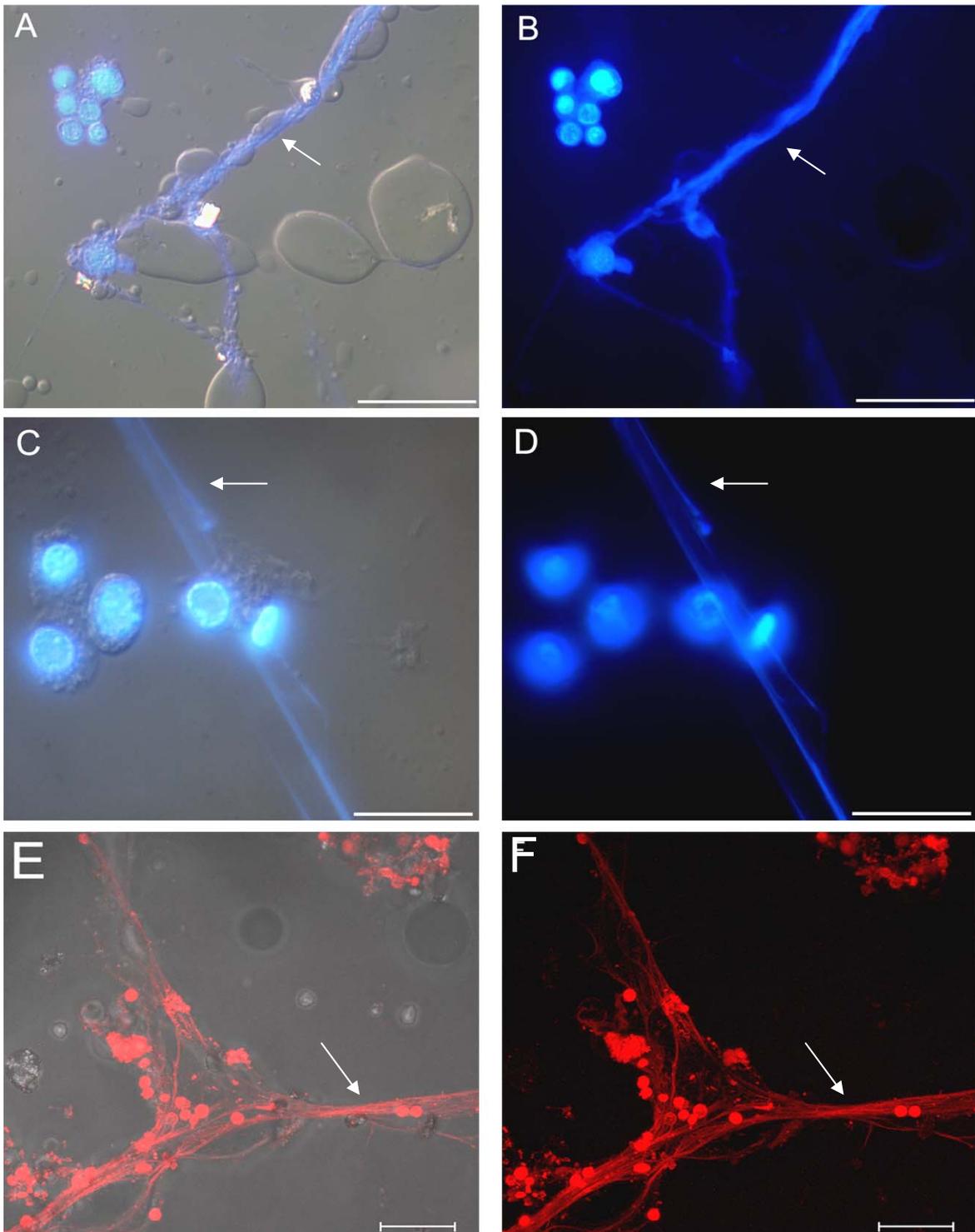


Figura 5 - DNA é um constituinte das redes extracelulares de *Periplaneta americana*. Micrografias de fluorescência de hemócitos na hemolinfa (A-B;E-F) ou isolados (C-D) coletados de ninfas de *P. americana*, estimulados por 1h com 100ug/mL de d-LPS e corados com DAPI (A-D) ou brometo de etídio (E-F). A formação das redes extracelulares contendo DNA são indicadas pelas setas. Barras: 20µm.

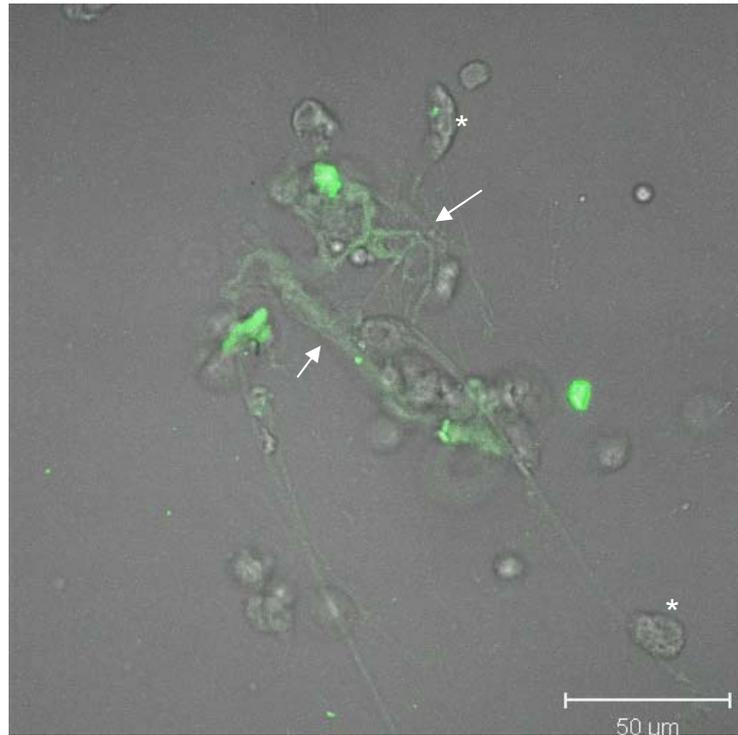


Figura 6 – Micrografia de fluorescência, obtida em microscópio confocal, revelando a presença de DNA extracelular em preparações de hemolinfa estimulada por d-LPS (100 µg/mL) na presença de Sytox Green (setas). Na mesma preparação é possível observar hemócitos viáveis que não foram marcados pelo intercalante de DNA impermeável às células viáveis (asteriscos).

Além do DNA, as redes extracelulares descritas em neutrófilos humanos contém proteínas nucleares, como as histonas, citoplasmáticas, como proteínas ligadoras de cálcio, granulares, como elastase e mieloperoxidase, e do citoesqueleto, como actina (Urban et al., 2009). Através da incubação das preparações de hemolinfa, previamente estimuladas por *E. coli* e com anticorpos que reconhecem Histona H3 fosforilada (Fig. 7A-C) ou o complexo DNA/histona H1 (Fig. 7D-F) e também com DAPI, foi possível observar, por microscopia de fluorescência, que DNA e histonas co-localizam nas redes extracelulares de *P. americana*. Utilizando a mesma metodologia na presença de marcadores inespecíficos de proteínas (Rhodamina green) e de lipídeos neutros (Bodipy) simultaneamente com DAPI, foi possível evidenciar a co-localização também de DNA, proteínas e lipídeos neutros nas redes extracelulares de *P. americana* (Fig. 8A-D). O marcador de lipídios insaturados e domínios hidrofóbicos de proteínas, Nile Red, identificou inclusões lipídicas nas preparações de hemolinfa, mas sua marcação não co-localiza com as redes extracelulares estimuladas com d-LPS e visualizadas com DAPI (Fig. 8E-G).

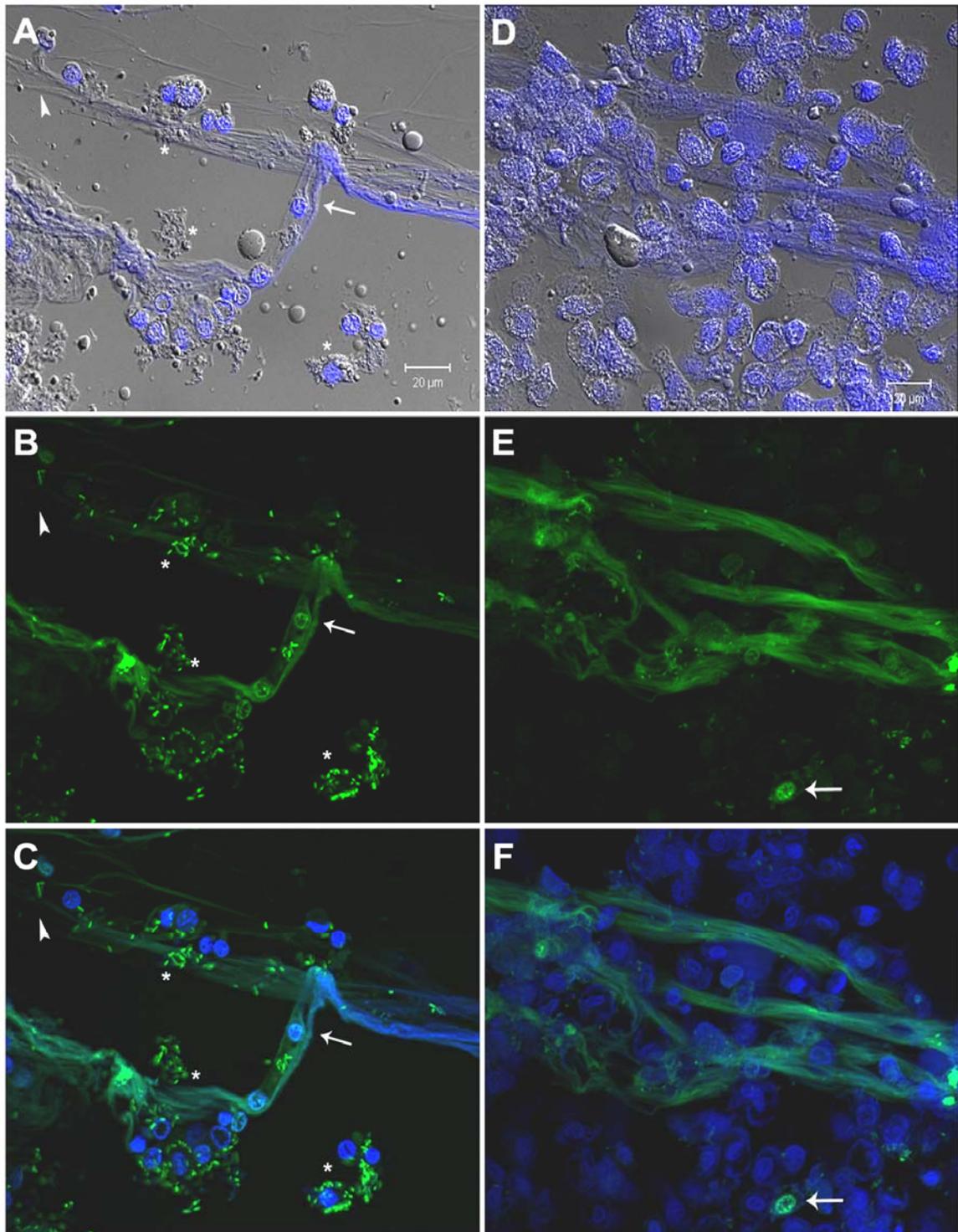


Figura 7- Co-localização de DNA e histonas em preparações de hemolinfa estimulas com *E. coli*-GFP e incubadas com anticorpo anti-histona H3 (A-C) ou anti-histona H1/DNA (D-F). As setas em A, B e C indicam a presença de DNA extracelular (marcado pelo DAPI) e histona H3 associados em determinadas regiões da rede e as cabeças-de-seta indicam regiões fibrosas que não contém DNA extracelular e nem Histona H3 (A-C). Os asteriscos indicam a formação de aglomerados de batérias presas ou não às redes bem como associadas à hemócitos.

Nas figuras D, E e F as setas indicam a marcação do núcleo de uma célula pelo anticorpo que detecta o complexo histona1/DNA em meio às redes extracelulares de DNA marcadas pelo DAPI. Barras = 20μm.

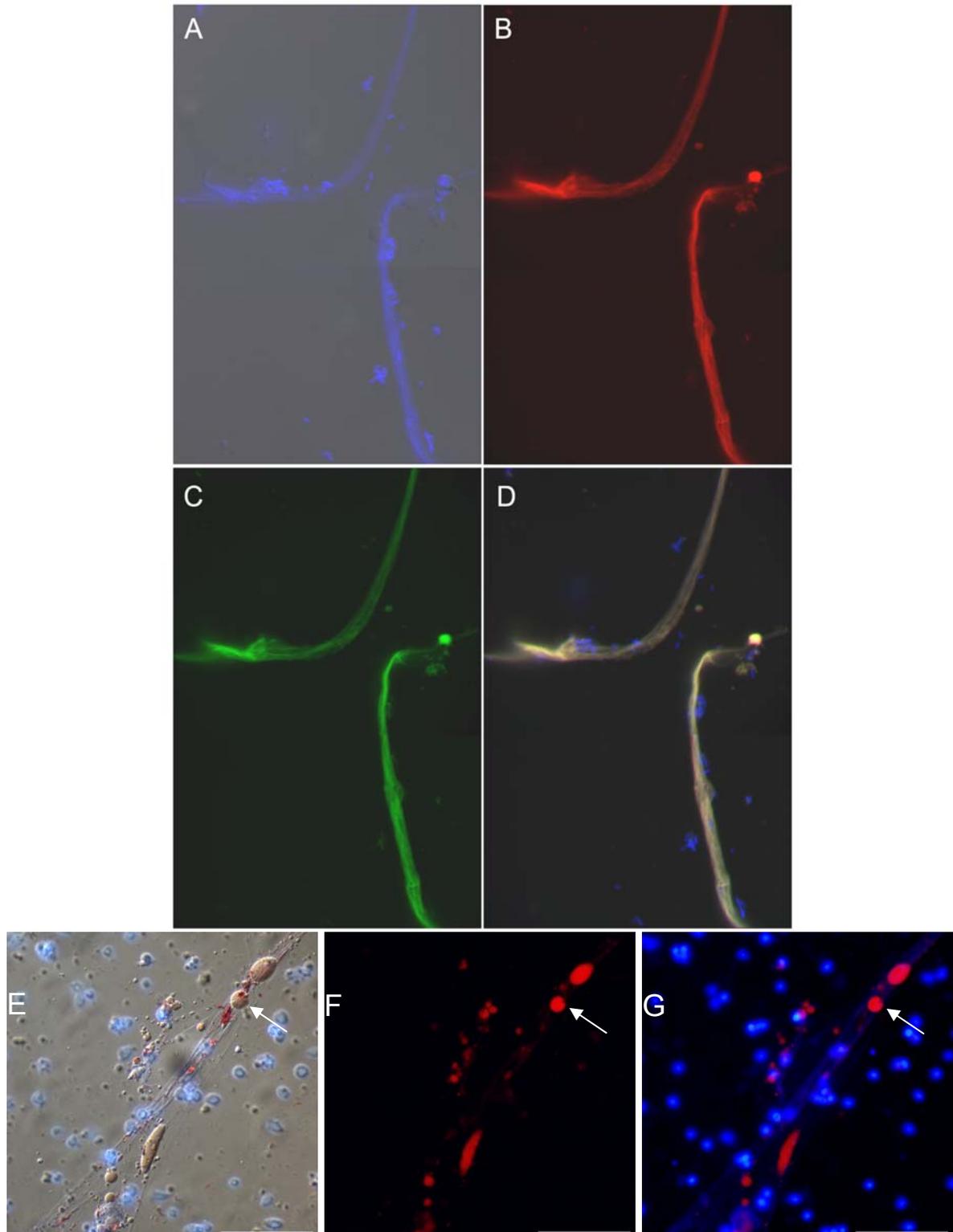


Figura 8 - Co-localização de proteínas e lipídios neutros com DNA nas redes extracelulares de *P. americana*. A hemolinfa foi estimulada com *E. coli* e as redes extracelulares foram marcadas simultaneamente por DAPI (A), Rhodamina Green® (C) e Bodipy 493/503® (B) revelando a presença de DNA, proteínas e lipídios neutros respectivamente (D).

Nile Red marca lipídios presentes nas preparações de hemolinfa estimuladas com d-LPS (seta em E-F) mas não co-localiza com o DNA presente nas mesmas preparações (seta em G). Barras = 100 μ m.

4.3- As redes extracelulares de DNA participam dos nódulos de hemócitos em *P. americana*

Para comprovar a presença de DNA nas redes tratamos as preparações de hemolinfa estimuladas com d-LPS com DNases I seguida por coloração com DAPI (Fig. 9). A marcação com DAPI revelou que a DNase foi capaz de digerir o DNA, diminuindo a agregação dos hemócitos promovida pelo estímulo com d-LPS (Fig. 9A e B, setas). Assim, para investigar melhor a presença das redes extracelulares de DNA em associação com nódulos de hemócitos, preparações de hemolinfa estimuladas com d-LPS foram processadas para microscopia eletrônica de varredura ou fixadas e marcadas com brometo de etídio para exame em microscópio confocal. A figura 9C mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e evidencia a íntima associação de finas e extensas estruturas (inserto) conectando dois nódulos. Por microscopia confocal foi possível observar uma estrutura formada por DNA delineando um nódulo (Fig. 9D e E; setas).

4.4- As redes extracelulares de *P. americana* aprisionam e têm efeito microbicida sobre *E. coli*

Uma das funções atribuída às redes de DNA é a capacidade de aprisionar fisicamente microrganismos para impedir sua disseminação e, ao mesmo tempo, concentrar moléculas microbicidas (Brinkman et al., 2004). Para determinar se as redes extracelulares eram capazes de aprisionar microrganismos *in vitro*, preparações de hemolinfa foram incubadas com *E. coli*-GFP ou com o protozoário *B. culicis* por 1 hora, quando foram fixadas e marcadas com DAPI. A figura 9 mostra imagens obtidas em microscópio de fluorescência revelando *E. coli*-GFP presas nas redes extracelulares coradas pelo DAPI (Fig. 10A-B), ao passo que *B. culicis* aparece associada aos hemócitos, porém sem evidências de associação com DNA extracelular (Fig. 10C-D).

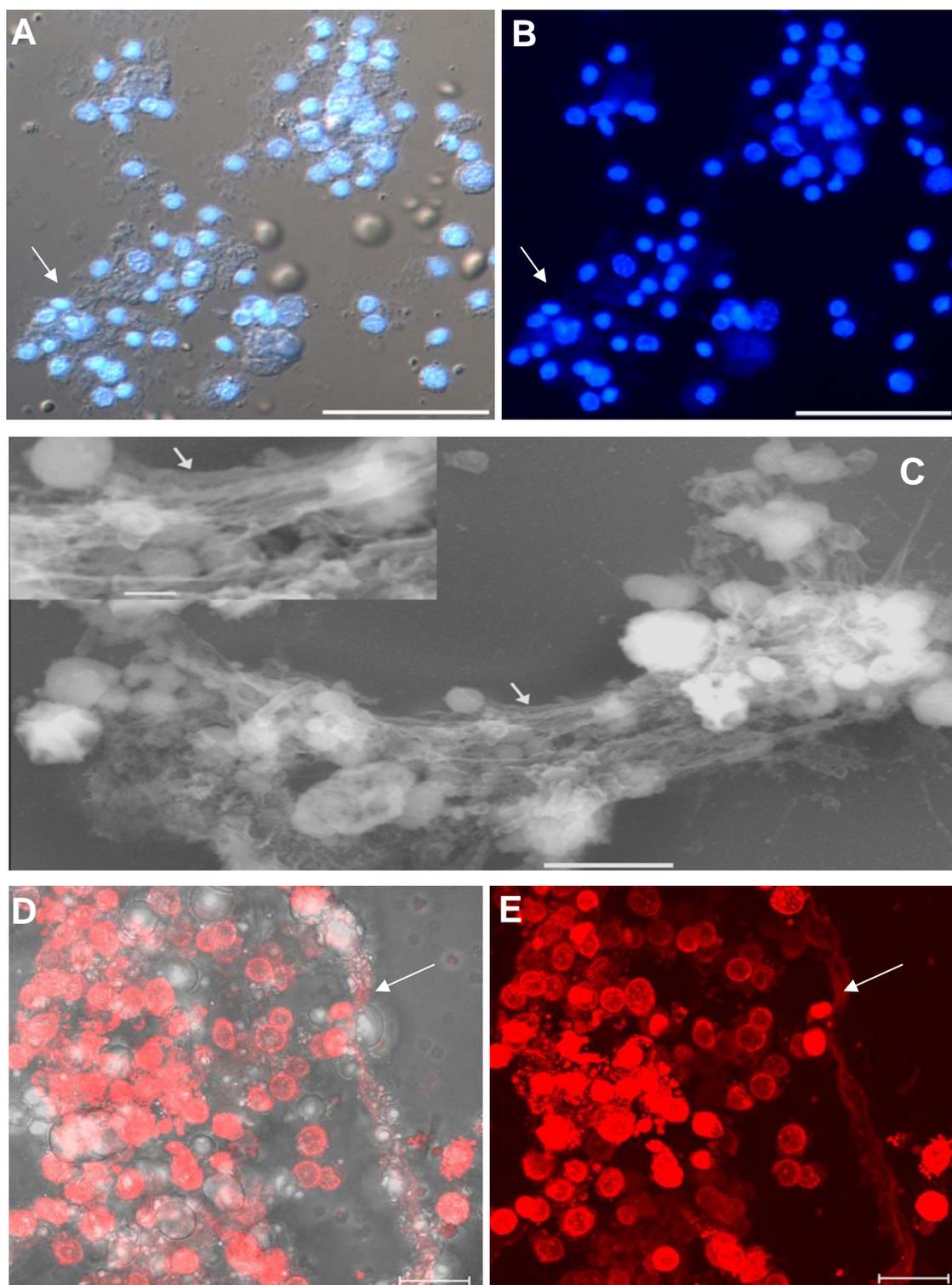


Figura 9 - Associação de redes extracelulares com nódulos de hemócitos formados na hemolinfa recolhida de ninfas de *P. americana* e estimulada com d-LPS.

A-B- preparações tratadas com Dnase I mostrando nódulos parcialmente desfeito e DNA entre os hemócitos (seta). Barra = 50 μ m.

C- Análise por microscopia de varredura mostrando estruturas finas e alongadas (detalhe) unindo dois nódulos (seta). Barra= 5 μ m (inset = 1 μ m).

D-E- micrografias obtidas por análise confocal revelando um filamento de DNA (seta), corado com homodimero de brometo de etídio, margeando um nódulo. Barra = 20 μ m.

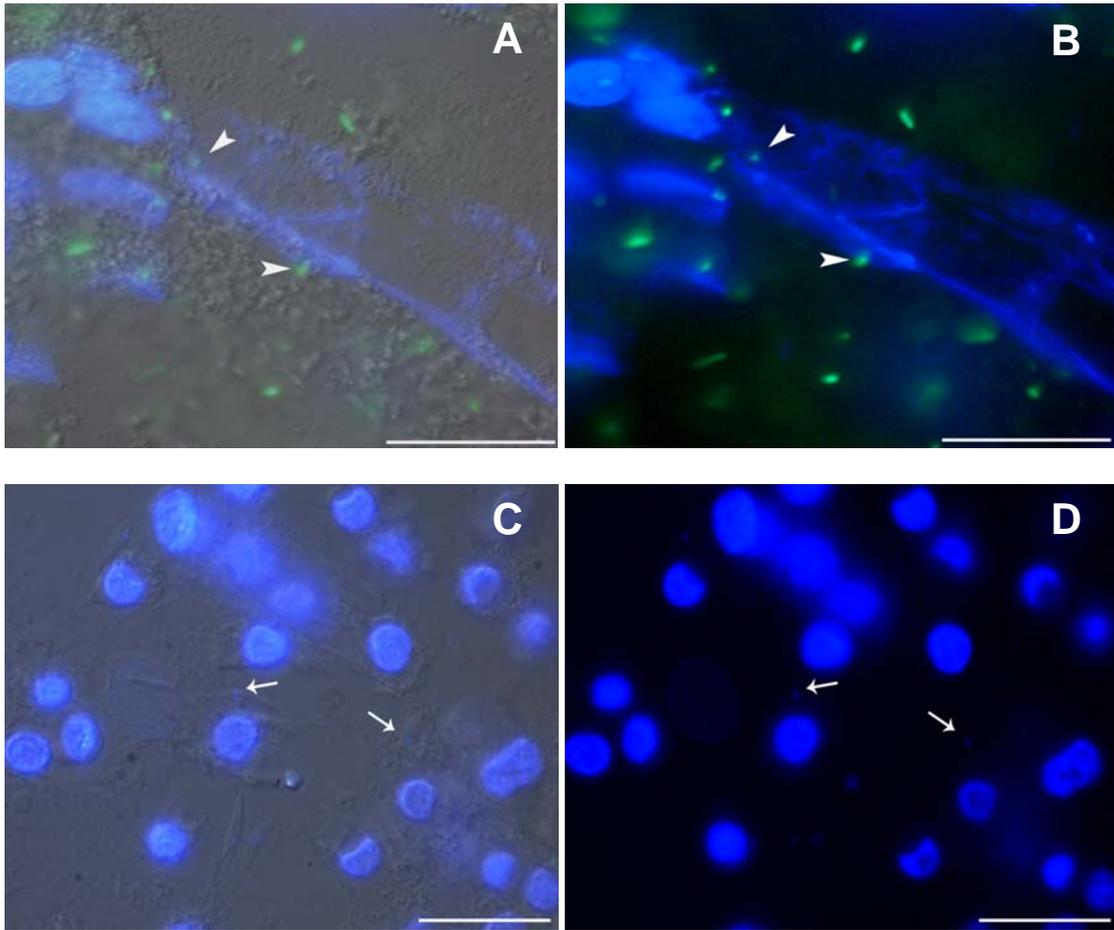


Figura 10 - Redes extracelulares de DNA aprisionam *E. coli*, mas não *B. culicis*.

A-B- A hemolinfa de ninfas de *P. americana* foi estimulada por 1 hora com *E. coli*-GFP e a presença das redes extracelulares de DNA prendendo as bactérias (cabeças-de-seta) é evidenciada pela marcação dessas estruturas com DAPI.

C-D- A hemolinfa estimulada com *B. culicis* (setas) não contém redes extracelulares de DNA. Barras = 20 μm .

O efeito microbicida das redes extracelulares de *P. americana* foi testado através do cultivo de *E. coli*-GFP tratadas por 3 horas com sobrenadante rico em DNA, na presença e na ausência de DNase, ou de hemolinfa não estimulada (Fig.11). A contagem das unidades formadoras de colônia após 48 horas de crescimento bacteriano revelou que o tratamento com o sobrenadante enriquecido em DNA foi capaz de inibir 96% do crescimento bacteriano (Fig. 11A; barra preta) quando comparado ao crescimento da bactéria que não recebeu tratamento algum (fig 11A; barra branca). Por outro lado, a adição de DNase I a este sistema aumentou em 3 vezes a sobrevivência das bactérias em relação as bactérias tratadas somente com o sobrenadante rico em DNA (Fig 11A; barra cinza-escuro). O tratamento das bactérias com a hemolinfa livre de hemócitos (HM) inibiu de maneira significativa o crescimento bacteriano (16 vezes; Fig. 11A - coluna hachurada) se comparado ao crescimento da bactéria não tratada. O tratamento apenas com DNase não afetou o crescimento das bactérias, quando comparado ao crescimento da bactéria sozinha (Fig. 11A; coluna cinza-claro).

A atividade de PO nos sobrenadantes testados acima para tratar *E. coli* foi monitorada pela formação de dopacromo antes e após as 3 horas de tratamento das bactérias. Nos ensaios para verificar a atividade de PO, uma amostra dos sobrenadantes antes e após o tratamento de *E. coli* foi misturada ao substrato L-DOPA, sendo a absorbância verificada à 470nm 5 e 60 minutos após a adição do substrato. A diferença entre a leitura final (60 min) e a inicial (5 min) após a adição de L-DOPA não mostrou a formação de dopacromo e conseqüentemente nenhuma atividade de PO (Fig. 11B). Quando tripsina foi adicionada as mesmas amostras dos sobrenadantes e alíquotas pós-tratamento de *E. coli* junto com o substrato L-DOPA, a formação de dopacromo foi verificada revelando que a enzima estava presente e funcionando embora não tenha participado da morte bacteriana (Fig. 11C).

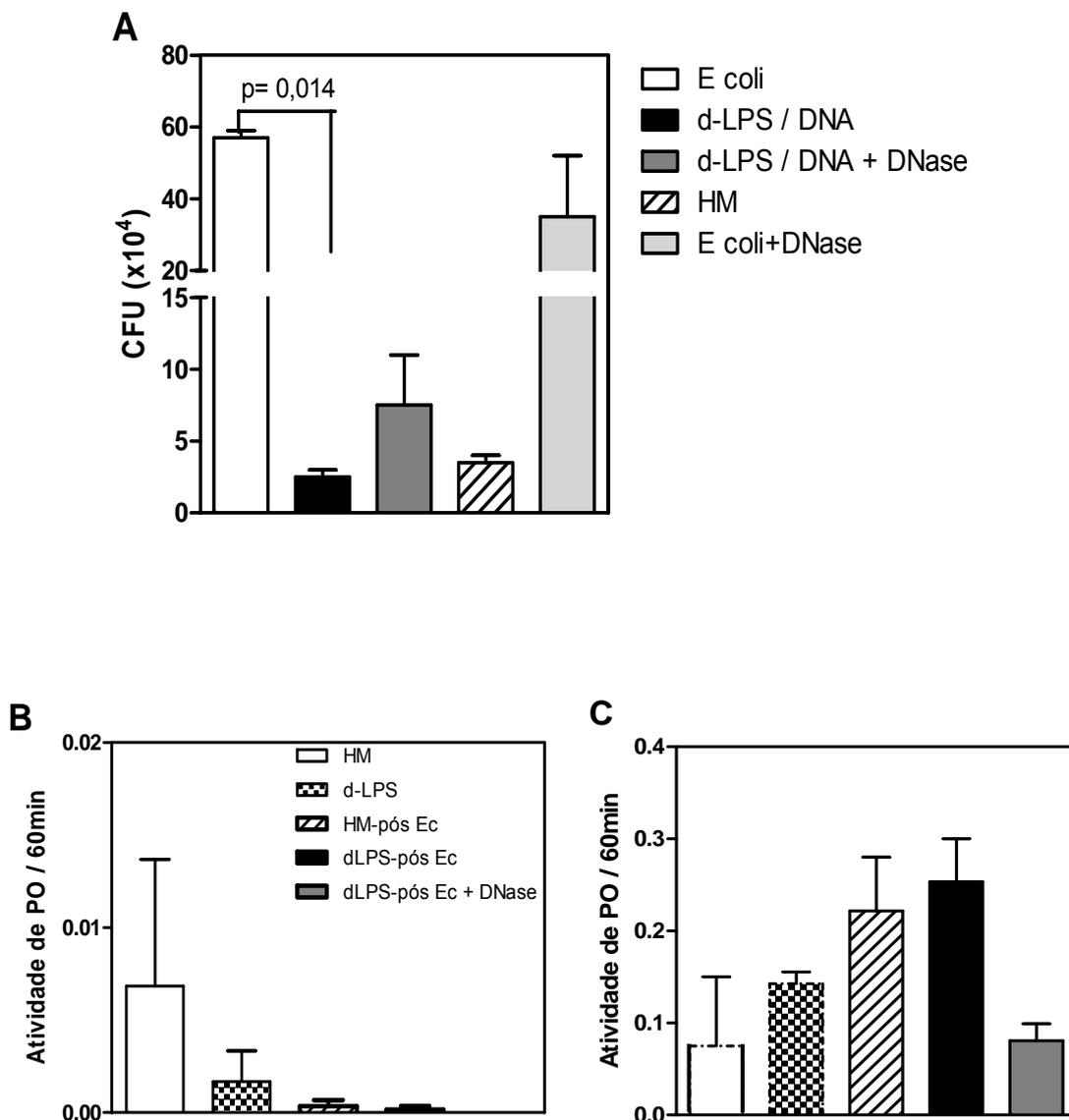


Figura 11 - Efeito do sobrenadante rico em DNA no crescimento de *E. coli*.

A- Hemolinfa sem estímulo (HM), contendo 1,2µg/mL de DNA, ou estimulada com 100 µg/mL de d-LPS por 1 hora (d-LPS/ DNA), contendo 2,2µg/mL de DNA, foram usados para tratar *E. coli* por 3 horas na presença ou ausência de DNase I (5U). Em paralelo, uma alíquota de bactéria foi tratada pelo mesmo tempo somente com DNase I e outra alíquota foi mantida sem tratamento algum. Após esse tratamento, todas as alíquotas foram semeadas em LB-ágar e mantidas à 34°C por 48 horas quando o n° de CFU foi determinado.

B- Atividade de PO verificada através da adição de L-DOPA e formação de dopacromo à 470nm (após 1 hora de reação) nos sobrenadantes ricos em DNA (obtidos após 1 hora de estímulo com d-LPS) e da hemolinfa não-estimulada (mantidos pelo mesmo tempo sem estímulo), e em todas as alíquotas de bactérias tratadas por 3h com os respectivos sobrenadantes na ausência ou presença de DNase.

C- Atividade de PO verificada após a ativação do sistema de melanização via tripsina e adição de L-DOPA. A formação de dopacromo foi monitorada à 470nm. Os gráficos representam os valores médios±SEM de 2 experimentos independentes (realizados em duplicata para o tratamento de *E. coli* e em triplicata para a atividade de PO).

4.5- O tratamento *in vivo* com DNase I altera a quantidade e a distribuição dos nódulos de hemócitos em *P. americana* inoculadas com *E. coli*

Para avaliar a contribuição *in vivo* das redes extracelulares de DNA na resposta imune inata de *P. americana*, grupos de ninfas foram injetados com diferentes doses de *E. coli* na presença ou ausência de 5U de DNase I (Fig. 12). Doze horas após as inoculações verificou-se um aumento significativo no número de nódulos formados somente nas ninfas de *P. americana* inoculadas com 10^6 *E. coli* na presença de DNase I, em relação ao número de nódulos formados nos insetos inoculados com a mesma dose de *E. coli* na ausência da DNase. Tal efeito não foi observado quando os insetos foram inoculados com dose menor de bactéria com ou sem DNase (Fig. 12A e B4 - 9).

A imagem do abdômen dos insetos inoculados com as bactérias (10^6) na presença de DNase mostra que pequenos nódulos estão espalhados por todo o abdômen dos insetos que receberam esse tratamento (Fig. 12B, setas B13-15), ao passo que, naqueles insetos inoculados somente com as bactérias na dose equivalente, a formação dos nódulos ficou restrita ao sítio da inoculação (Fig. 12B; setas em B10 - 12). A inoculação do tampão de diluição da DNase ou da enzima sozinha não provocou a formação de nódulos (Fig. 12B 1-3), bem como a inoculação de 10^5 bactérias associadas ou não a enzima (Fig. 12 B4-9).

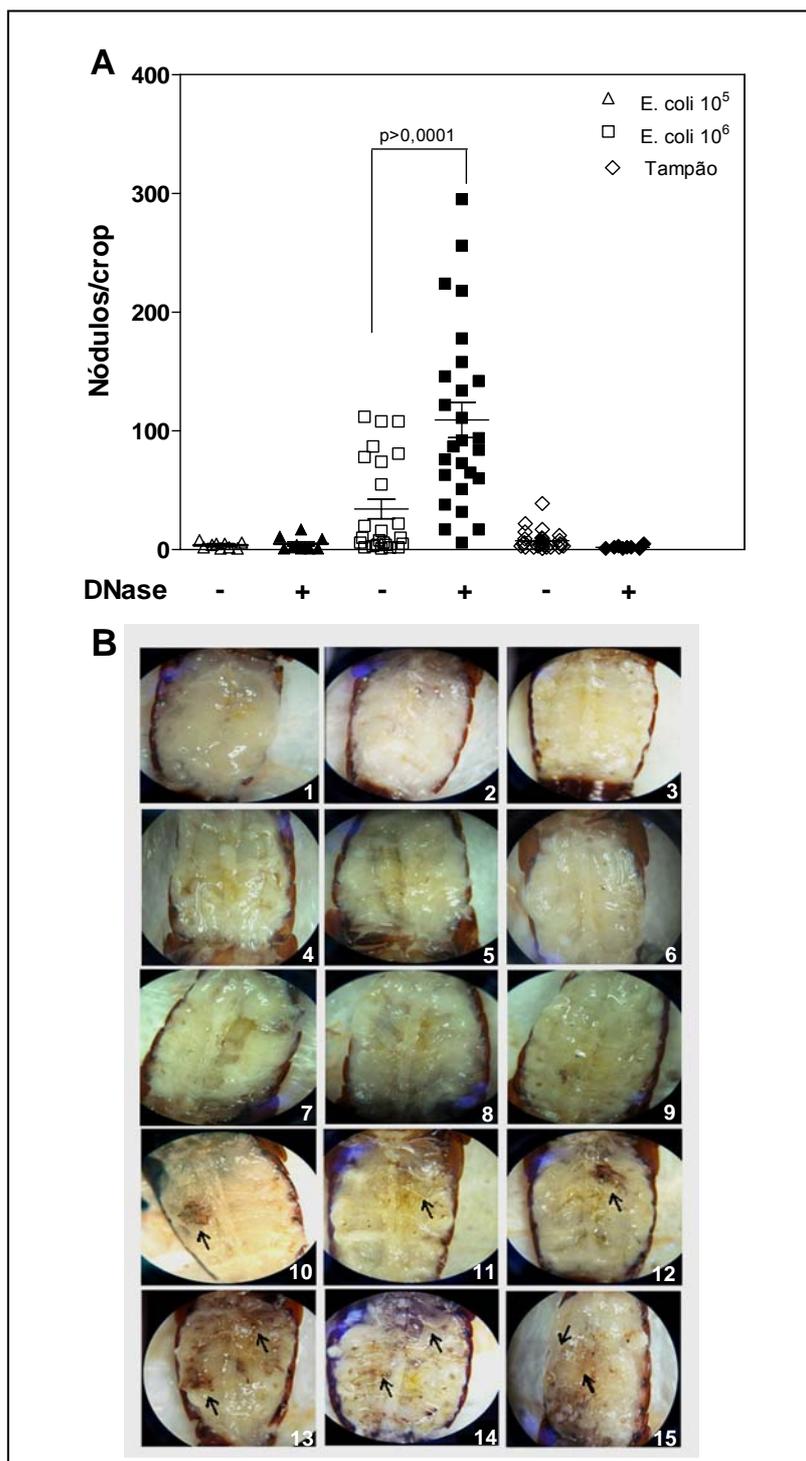


Figura 12 - Efeito do tratamento *in vivo* com DNase no número de nódulos formados em insetos inoculados com diferentes doses de *E. coli*.

A- contagem dos nódulos na crop de ninfas de *P. americana* 12 horas após a inoculação de 10⁵ ou 10⁶ *E. coli* na presença ou ausência de DNase I (5U). O gráfico representa o nº médio de nódulos \pm SEM.

B- Fotografias mostrando a visão panorâmica da distribuição dos nódulos nos abdomens dos insetos injetados somente com tampão (1 e 2), com 5U de DNase I (3), com 10⁵ *E. coli* na ausência (4-6) e na presença de DNase I (7-9) e com 10⁶ *E. coli* (10-12; as setas representam o local da injeção) e simultaneamente com 10⁶ *E. coli* e 5U de DNase I (13-15; as setas representam o local da injeção e o espalhamento dos nódulos).

4.6- Avaliação de hemócitos circulantes após inoculação de *E.coli* e/ou DNase.

Para analisar as sub-populações de hemócitos de *P. americana* por citometria de fluxo e delimitar as sub-populações analisadas nos experimentos seguintes, os hemócitos recolhidos de um inseto foram fixados e marcados com PI (FL2). Três sub-populações de hemócitos de *P. americana* foram reconhecidas pela análise de tamanho e granulosidade por citometria de fluxo, sendo denominadas R1, R2 e R3 (Fig. 13A). A população denominada R1 é formada por hemócitos pequenos e semi-granulares, ao passo que as populações R2 e R3 são formadas por hemócitos relativamente maiores, sendo a população R3 mais granulosa do que R2 (Fig. 13A). Para verificar o percentual de hemócitos autofluorescentes, as amostras foram analisadas também por citometria de fluxo nos comprimentos de onda de 515-545 nm (FL1) e de 562-588 nm (FL2). Neste caso, uma pequena percentagem de células duplo-marcadas (PI⁺ GFP⁺) aparecem nas três regiões (quadrante superior direito), sendo consideradas como resultado de autofluorescência, uma vez que, neste caso, os insetos não foram inoculados com as bactérias fluorescentes (Fig. 13A).

Inoculando diferentes doses de *E. coli*-GFP e analisando a percentagem média de hemócitos circulantes em R1, R2 e R3 doze horas após a inoculação, verificou-se um aumento significativo na população de hemócitos R1 e R3 (Fig. 13B e F) somente nos insetos inoculados com 10⁵ *E. coli*-GFP em comparação com os insetos inoculados apenas com o tampão (barra cinza). Em R1, o aumento foi de 2,5 vezes e em R3 foi de 5,5 vezes em relação ao tampão. Na dose de 10⁶ *E. coli*, aumento de 2 vezes na percentagem de hemócitos circulantes em R3 foi obtido.

Analisando o efeito da inoculação concomitante de 5U de DNase I sobre a percentagem média de hemócitos circulantes nas três populações de hemócitos nos insetos inoculados com 10⁵ *E. coli*-GFP, foi verificado que o inóculo da enzima diminui a percentagem média de hemócitos nas três populações, comparando-se à percentagem média de hemócitos obtidos dos insetos inoculados apenas com as bactérias (# nas Figs 13B, D, F). Quando a dose de *E. coli* inoculada foi 10 vezes maior, a presença da enzima inibiu a percentagem média de hemócitos somente na população R3 (Fig. 13F). Considerando o número de hemócitos obtidos nas três subpopulações doze horas após a inoculação de DNase como máximo, houve

diminuição significativa quando a enzima foi inoculada com 10^5 *E. coli* nas populações R1 e R2 (Fig. 13B, D).

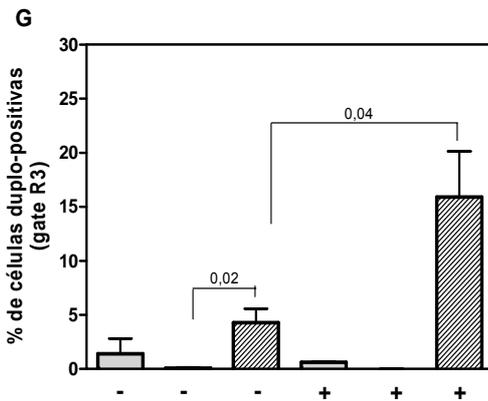
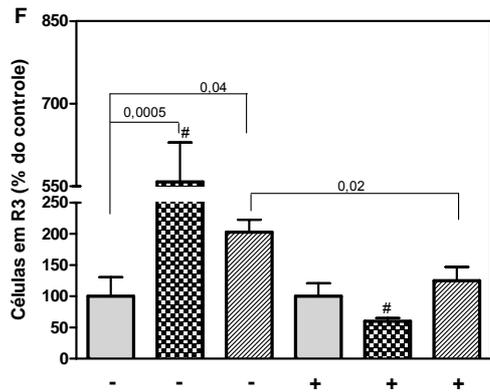
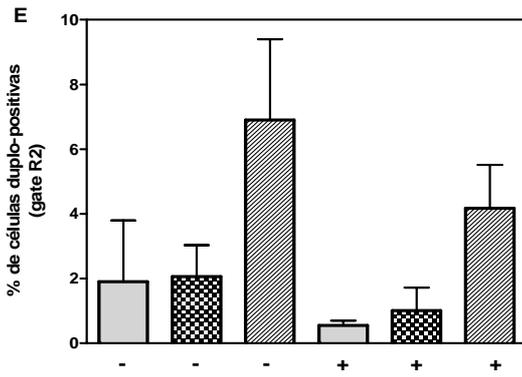
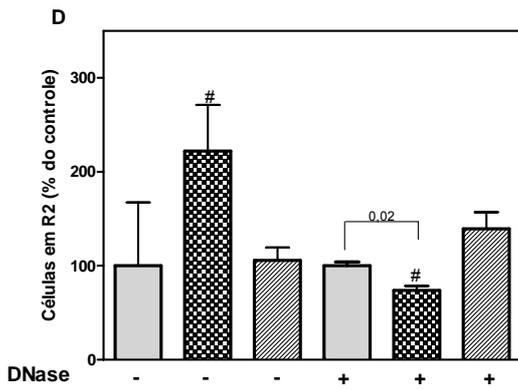
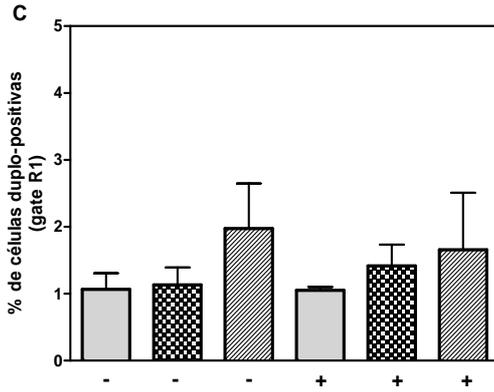
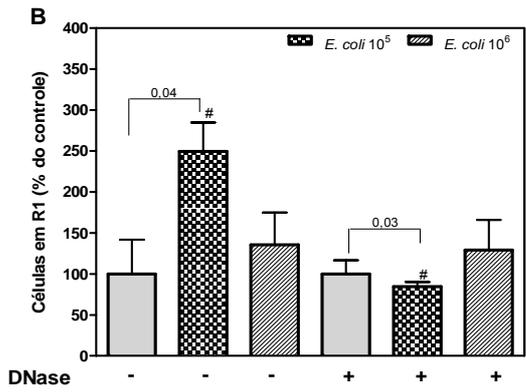
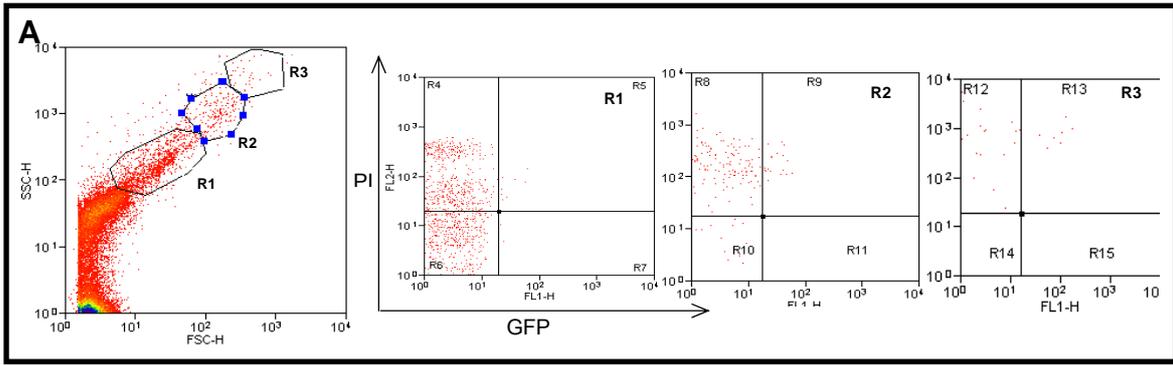
A análise da porcentagem de hemócitos contendo bactérias (PI⁺ GFP⁺) circulando na hemolinfa dos insetos doze horas após as inoculações foi realizada nas três subpopulações separadamente (Fig. 13C, E, G). Somente na subpopulação R3 recuperada de insetos inoculados com 10^6 *E.coli*, na presença e na ausência de DNase I, foi verificado um aumento na circulação de hemócitos contendo bactérias (Fig. 13G).

Figura 13 - Efeito do tratamento *in vivo* com DNase na porcentagem de hemócitos circulantes e na fagocitose de *E.coli*-GFP.

A- perfil dos hemócitos de *P. americana*, fixados e marcados com PI, e separados por citometria de fluxo em função do tamanho (SSC) e da granulosidade (FSC) relativos. Cada inseto tratado na figura 12 foi analisado separadamente de acordo essas regiões R1, R2 e R3. Os eventos PI⁺ (FL1) dentro de cada região foram considerados como o percentual máximo de hemócitos recuperados de cada inseto.

B, D e F- Nos insetos inoculados apenas com o tampão, o número médio de hemócitos recuperados foi considerado como 100% e a porcentagem de hemócitos recuperados nos insetos inoculados com as duas doses de *E. coli*-GFP foi calculada sobre essa porcentagem. O número de hemócitos recuperados dos insetos inoculados com DNase I foram considerados como 100% e comparados àqueles recuperados dos insetos inoculados com bactérias e DNase. Em B está representado a população R1 (#p=0,001); em D está representada a região R2 e (#p=0,02); em F está representada a população R3 (#p=0,0005). Os gráficos representam a porcentagem média ± SEM. Em cada experimento foram analisados entre 5-11 insetos.

C, E e G- Os eventos duplo-positivos (PI⁺GFP⁺; quadrante superior direito) representam a porcentagem de hemócitos que fagocitaram *E. coli* em relação ao total recuperado nas populações R1 (C), R2 (E) e R3 (G).



ANEXO II

Este anexo é composto por um trabalho publicado, que encontra-se a seguir, e dados não publicados sobre o mesmo tema, cujos materiais e métodos e resultados obtidos serão descritos mais adiante.

5 – MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES AO ANEXO II

5.1- Cultivo e obtenção de *B. culicis*

O cultivo do protozoário *B. culicis* (forma epimastigota) foi feito em nosso laboratório a partir de inóculo proveniente do banco de protozoários da Dr. Maria Auxiliadora de Sousa (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil – ATCC30268) isolado de *Ae. vexans*. Os protozoários foram crescidos em meio Warren (Warren, 1960) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado à 56°C em garrafas de vidro de 200mL (Pirex®) ou em tubos de vidro com tampa de rosca (Pirex®).

Para a realização dos experimentos, os protozoários foram coletados nos períodos de 24 a 48 hs de crescimento, contados em câmara citométrica (Neubauer Improved Chamber) e lavados 1-3 vezes com tampão fosfato 0,01M, contendo 0,9% NaCl (PBS), pH 7,2. Todas as lavagens foram realizadas em centrifuga refrigerada (IEC-Centra MP4R) a 4°C, 2.750 *g* por 10 minutos.

A mobilidade dos protozoários foi monitorada através da observação dos mesmos em microscópio óptico (Olympus BX40) antes, durante e após as incubações realizadas nos diferentes experimentos.

5.2- Cultivo e obtenção de *Ae. aegypti*

O cultivo e a manutenção permanente das colônias do mosquito *Ae. aegypti* foram feitos no Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores (LAFICAVE)– Fundação Oswaldo Cruz, RJ (cepa Rockefeller) ou no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ (cepa Red Eyes). Semanalmente, gaiolas contendo mosquitos adultos com 3-7 dias pós-eclosão foram gentilmente cedidas ao laboratório de Imunobiologia de Leishmaniose. Uma vez em nosso laboratório, as gaiolas foram imediatamente infectadas com *B. culicis*, conforme descrito a seguir, e mantidas na estufa à 26°C durante o período pós-infecção, sendo alimentadas com solução de 15% de sacarose *ad libitum*.

5.3- Infecção de *Ae. aegypti* com *B. culicis*

Mosquitos adultos com, no máximo, 7 dias pós-eclosão foram mantidos sem alimentação por 12 horas quando, então, lhes foi oferecido uma solução com 10⁷ *B. culicis* por ml diluídas em solução de Hank's (HBSS - Sigma) suplementada com 3% de albumina bovina (BSA; USB®) e 15% de sacarose (pH 7,5) por igual período. Passadas mais 12 horas, a solução de infecção foi trocada por uma solução de

sacarose à 15%. Aos mosquitos do grupo controle foi oferecida a mesma solução de HBSS suplementada com BSA e sacarose sem a presença de *B. culicis*.

5.4 - Obtenção dos órgãos de fêmeas de *Ae. aegypti*

Mosquitos foram coletados da gaiola e lavados em tubo plástico contendo água destilada e 1-3 gotas de detergente. Em seguida, os mosquitos foram rapidamente enxaguados em água destilada e colocados em placa de Petri contendo PBS, pH 7,2, mantida a 4°C durante todo processo de dissecação. Os machos foram sempre descartados. Todos os procedimentos de dissecação foram realizados com o auxílio de estiletos e pinças entomológicas.

Para os experimentos de extração de proteínas, as fêmeas tiveram suas glândulas salivares e intestinos médios recolhidos e armazenados conforme descrito nos itens 5.5 e 5.6, respectivamente.

Nos experimentos com mosquitos infectados com *B. culicis*, as glândulas salivares eram os primeiros órgãos dissecados, cuidadosamente, após a remoção da cabeça do mosquito para evitar a contaminação com protozoários de outros órgãos. Em seguida, o canal alimentar inteiro, juntamente com os ovários, foi retirado através da porção anterior do abdômem do mosquito, sendo cada órgão (divertículo, intestino médio, ovários, túbulos de Malpighi e intestino posterior) separado cuidadosamente e transferidos imediatamente para diferentes tubos de poliestireno. Os abdômens também foram recolhidos e os tórax foram descartados.

5.5- Avaliação da distribuição de *B. culicis* nos diferentes tecidos de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com o protozoário

Mosquitos fêmeas alimentados com *B. culicis* ou somente com meio, conforme descrito no item anterior, foram dissecados no 1º, 3º, 5º, 7º, 11º, 18º, 28º, 33º, 38º e 48º dia pós-infecção (DPI). Grupos de dez órgãos (intestinos médios, intestinos posteriores, divertículos, glândulas salivares, ovários, túbulos de Malpighi e abdômens sem os órgãos internos) foram recolhidos em 50 µL de PBS. Em seguida cada grupo de órgãos foi macerado individualmente e o DNA extraído com kit comercial (QIAamp Mini Kit; Quiagen) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O PCR em tempo-real foi feito utilizando-se o sistema SYBR green-PCR master mix (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *B. culicis* (forward: AGCAGGTCTGTGATGCTCCT; reverse:

GGACGTAATCGGCACAGTTT) foram desenhados a partir da sequência do gene ribossomal 18s do protozoário (GenBank U05679.1) e obtidos comercialmente (Integrated DNA Technologies®). A concentração final dos oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações foi de 10nM. MyD88 foi o gene de mosquito utilizado como controle endógeno da amplificação (sequência dos oligonucleotídeos iniciadores estão listados na tabela 2). Todas as reações foram realizadas utilizando-se o sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems).

5.6- Extração de proteínas totais da glândula salivar de fêmeas de *Ae. aegypti*

Para a extração de proteínas totais, grupos de 70 glândulas obtidas como descrito no item anterior foram dissecadas e imediatamente colocadas em microtubos contendo coquetel de inibidores de proteases (for mammalian tissues - Sigma), 10 mM de fluoreto de sódio (NaF), 1 mM de ortovanadato de sódio (NaVO₃), 100 µM de fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF), 0,02% de azida sódica (NaN₃), 10 µM de E64, 1 mM de EDTA e 1 mM de EGTA diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM), pH 8,0, num volume final de 105 µL para cada grupo de 70 glândulas. Em seguida os tubos foram armazenados em freezer -80°C até o uso. Antes do uso, as glândulas foram maceradas mecanicamente com o auxílio de macerador e a esta amostra foram adicionados 35 µL de tampão de amostra 4X concentrado (Tris-HCl 62 mM, pH 6.8, contendo 2% de dodecil-sulfato de sódio (SDS), 25% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol e 1mM de 2-β-mercaptoetanol). As amostras foram sonicadas por 15 minutos em banho de gelo em aparelho Thornton – INPEC ELETRÔNICA S.A. acoplado a gerador Chubby GA 240. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9300 g por 10 minutos a 4°C e alíquotas de 20 µL desse sobrenadante foram aplicadas no gel de acrilamida.

5.7- Extração de proteínas totais do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*

Grupos contendo 10 intestinos médios, obtidos conforme descrito no item 2.12 foram colocados em microtubos contendo 10µL de coquetel de inibidores de proteases (e os mesmos constituintes do tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0 descritos no item anterior, e mantidos em banho de gelo seco até a o final do processo de dissecação. Imediatamente após, a cada microtubo foi acrescido tampão de amostra

4X concentrado (Tris-HCl 62 mM, pH 6.8, contendo 2% de dodecil-sulfato de sódio (SDS), 25% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol e 1 mM de 2-β-mercaptoetanol), o conteúdo macerado com o auxílio de um macerador de teflon e logo em seguida fervido a 100°C por 5 minutos e centrifugado a 9300g por 10 min a 4°C. Imediatamente após a centrifugação o sobrenadante foi removido e guardado em alíquotas de 10 µL no freezer a -70°C até o uso.

5.8- SDS-PAGE e Western blot

Objetivando a separação das proteínas totais contidas no extrato das glândulas salivares e dos intestinos de fêmeas de *Ae aegypti* (item 2.12), alíquotas equivalentes a 10 órgãos foram aplicadas em SDS-PAGE contendo 10 ou 8% de Acrilamida (BioRad) e gel de empacotamento a 3%. A eletroforese foi feita em tampão Tris-glicina contendo 0.1% de SDS de acordo com o sistema descrito por Laemmli (1970), utilizando-se o sistema Mini Protean III (Bio Rad) sob 100 volts constantes durante a passagem pelo gel de empilhamento e 120 volts durante a separação no gel de corrida. Toda a eletroforese foi realizada a 4°C. As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas tomando-se como referência as posições de proteínas com massas moleculares padrões aplicadas no mesmo gel (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder – Fermentas Life Sciences).

Após a separação das proteínas totais contidas no extrato das glândulas salivares e do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* por SDS-PAGE, procedeu-se imediatamente a transferência dessas proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (S&S NC™ pure nitrocellulose – Schleicher & Schuell). Para isso utilizou-se o aparelho Trans-Blot® SD (Semi-Dry transfer cell apparatus - Bio Rad). A transferência foi feita em 25 mM de tampão Tris-base contendo 200 mM de ácido aminoacético (glicina).

5.9- Marcação com lectinas e deglicosilação de proteínas totais da glândula salivar e do Intestino médio de *Ae. aegypti*

As membranas contendo o extrato total das glândulas salivares ou do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* (obtidas como descrito no item anterior), foram bloqueadas por 12 horas, a 4°C em TBSt, pH 7.2, contendo 1% de BSA. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e procedeu-se à incubação dessas membranas, por uma hora sob agitação leve, com diferentes lectinas conjugadas à

fosfatase alcalina (tabela 3) diluídas em TBSt (10 µg / mL) por uma hora. Após o período de incubação com as lectinas, as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes com TBSt e incubadas com o substrato para fosfatase alcalina (BCIP/NBT – Sigma Fast™) para revelar a ligação das lectinas.

Tabela 3- Lectinas e suas especificidades.

LECTINAS	CARBOIDRATOS
Glycine max - SBA	N-acetil-D-galactosamina
Dolichos biflorus - DBA	N-acetil-D-galactosamina
Helix pomatia - HPA	N-acetil-D-galactosamina
Bauhinia purpurea - BPA	N-acetil-D-galactosamina; β-galactose
Wisteria floribunda- WFA	N-acetil-D-galactosamina
Griffonia simplicifolia I - GSI	N-acetil-D-galactosamina
Canavalia ensiformes - ConA	α-manose; α-glucose
Triticum vulgaris - WGA	N-acetil-D-glucosamina
Griffonia simplicifolia II - GSII	N-acetil-D-glucosamina
Ulex europaeus I - UEA I	α-L-fucose
Limulus polyphemus - LPA	ácido neuramínico
Arachis hypogaea - PNA	N-acetil-D-galactosamina

Para efetuar a remoção de resíduos de carboidratos presentes nas proteínas do extrato total de ambos os órgãos do mosquito, as membranas de nitrocelulose foram tratadas por 72 horas a 37°C sob leve agitação com α-manosidase (2U/mL;Sigma) ou PNGase F (Peptide-N-Glicosidase F) (10U/mL;Sigma) diluídas em tampão fosfato 50mM (pH 7,5) ou tampão acetato de sódio 50mM (pH5,5), respectivamente, ambos acrescidos de 0,5% de triton X-100. Membranas contendo o extrato de glândula e intestino, provenientes do mesmo Western blot, foram incubadas sob as mesmas condições na presença somente dos tampões das glicosidases. Após a obtenção das proteínas deglicosiladas, as membranas foram incubadas com *B. culicis* biotinizada, conforme descrito no item 2.18.

O controle da eficiência da deglicosilação foi feito através da incubação das membranas com Concanavalina A conjugada à fosfatase alcalina em tampão Tris (10 mM de Tris-base, 190 mM de NaCl; TBS), pH 7.2, e posterior revelação com diaminobenzidina (DAB; Sigma).

5.10– Biotinilação de proteínas de superfície de *B. culicis*

B. culicis em fase logarítmica de crescimento (10^8 protozoários/mL) foi incubada com 1mg/mL de hexanoato de sulfo-succinimidil-6-(biotinamida) (Sulfo-NHS-Lc-Biotin – Pierce) em PBS, pH 8.0, por 20 minutos a 4°C, de acordo com o

método descrito por Dias e colaboradores (2007). Após esta incubação, os protozoários foram lavados 3 vezes como descrito no item 2.1 e usados nos diferentes experimentos.

5.11- Interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas totais da glândula salivar ou do intestino médio de *Ae. aegypti*

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas totais presentes no extrato das glândulas salivares ou dos intestinos médios de fêmeas de *Ae. aegypti*, deglicosiladas ou não (obtidas como descrito no item 2.15 e 2.16), foram incubadas em TBS contendo 0,05% de Tween 20 (TBSt) com os protozoários previamente biotinilados (como descrito no item 2.16). Assim, adicionou-se às membranas 10^7 *B. culicis*-biotiniladas / mL em TBSt e procedeu-se à incubação por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação moderada em aparelho Shaker. Após este período, as membranas foram lavadas com TBSt 3 vezes, por 10 min cada lavagem, para remover os protozoários que não se ligaram às proteínas contidas nas membranas. Posteriormente, as membranas foram novamente incubadas em solução contendo 1 mg/mL de avidina conjugada à peroxidase (Sigma) diluída em TBSt (1:10.000) por 30 min sob leve agitação. Ao término desta incubação, procedeu-se mais 3 etapas de lavagens como descrito.

Para revelar a presença de protozoários aderidos às proteínas contidas nas membranas, procedeu-se, em câmara escura, à adição dos reagentes de detecção da peroxidase (ECLTM – Western Blotting Analysis System - Amersham Biosciences) às membranas de nitrocelulose e posterior exposição a um filme fotográfico (Amersham Biosciences). Após 1-5 minutos de exposição, o filme foi revelado em solução reveladora (Kodak) até o aparecimento de cor, seguindo a incubação do mesmo em solução fixadora (Kodak) .

5.12- Avaliação da expressão de fatores de transcrição e de efetores da resposta imune de fêmeas de *Ae. Aegypti* infectadas com *B.culicis*

Mosquitos fêmeas alimentados com *B. culicis* ou somente com meio, conforme descrito no item 5.3, foram dissecados no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º dia pós-infecção (DPI). Grupos de dez abdomens (sem os órgãos internos) foram recolhidos e misturados à 200 µL de Trizol® (Invitrogen). Em seguida cada grupo foi macerado

individualmente e o RNA foi extraído de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante do reagente de extração. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se kit comercial de alta performance para transcrição reversa (High Capacity – Reverse Transcription kit; Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. O PCR em tempo-real foi feito utilizando-se o sistema SYBR green-PCR master mix (Applied Biosystems) na presença de 10nM dos oligonucleotídeos iniciadores obtidos previamente (Integrated DNA Technologies®) e listados na tabela 4. O gene de *Ae. aegypti* utilizado como controle endógeno das reações foi o gene ribossomal RP49, cuja seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados também encontram-se na tabela 4. Todos os pares de primers, bem como as condições de reação utilizadas já foram padronizadas pelo grupo do Dr. Marcos Sorgine apresentando tipicamente eficiência de amplificação > 95%.

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados para quantificação relativa por PCR em tempo real dos genes listados.

Gene		Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores
aaREL1	F	GACTCGTCGGAGCTGAAATC
	R	CGGTTTGTTTCAGGTTGTTGA
aaREL2	F	TCTGTCGGCAGATGAAGTGA
	R	GCACTGGAATGGAGAATCAAA
Defensina	F	GATTCGGCGTTGGTGATAGT
	R	TTATTCAATTCCGGCAGACG
MyD88	F	CGATGCGTTCATTTTGTTTG
	R	CACCGCTCAGAAATCAGCTT
TEP	F	ATTTTTGACGGCTTTTGTGG
	R	TGGATTACTTGCCCCACTTC
STAT	F	CACACAAAAGGACGAAGCA
	R	TCCAGTTCCCCTAAAGCTCA
RP49	F	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
	R	TCATCAGCACCTCCAGCT

6- RESULTADOS COMPLEMENTARES AO ANEXO II

6.1- Colonização de *B. culicis* em fêmeas de *Ae. aegypti*

A distribuição de *B. culicis* nos tecidos de *Ae. aegypti* foi verificada ao longo de 48 dias após a alimentação através da técnica de PCR em tempo real. A presença de *B. culicis* nos diferentes tecidos foi monitorada através da expressão relativa de seu gene ribossomal 18s. Os resultados obtidos após essa abordagem indicam a presença do protozoário em todos tecidos analisados, com variações ocorridas no perfil da expressão em função do tecido e do dia analisados (Fig. 14).

O perfil de expressão relativa de 18s no intestino médio indicou uma diminuição brusca de protozoários na primeira semana pós-colonização, sendo a expressão mínima detectada no 7º dia. No 18º dia, onze após essa queda acentuada, os níveis de expressão relativa voltam a subir, alcançando o mesmo índice observado no primeiro dia depois da alimentação. Do 18º até o 48º dia foi observado uma constância no valor médio de expressão relativa de 18s (Fig. 14). O perfil encontrado no divertículo assemelha-se àquele observado no intestino, mas a diminuição de *B. culicis* é menos acentuada e ocorre nos dias 3 e 5 após a alimentação dos mosquitos com os protozoários. No 7º dia, os níveis de *B. culicis* se aproximam ao do primeiro dia pós-alimentação e se mantêm até o final da avaliação, no 48º dia (Fig. 14).

No abdômen (Fig. 14), a expressão relativa de 18s indica que *B. culicis* aumenta gradativamente do 3º ao 7º dia pós-alimentação, caindo bruscamente no 11º dia e retomando os níveis iniciais no 18º dia pós-alimentação. Outra queda foi observada no 28º dia pós-alimentação, mas os valores iniciais são recuperados ao longo da colonização e mantidos até o 48º dia. Nos túbulos de Malpighi, ao contrário do abdômen, a diminuição da expressão relativa ocorre No 11º dia pós-alimentação (Fig. 14).

Nas glândulas salivares somente os dias 7, 11, 28 e 48 pós-alimentação foram avaliados e o nível máximo de expressão relativa observado ocorreu no 28º dia pós-alimentação que perdurou, em níveis menores, no 48º dia pós-alimentação (Fig. 14). No intestino posterior a presença de *B. culicis* é menor do que no intestino médio, e semelhante a este, há uma queda no 3º dia pós alimentação. No 48º observamos uma queda no intestino posterior que não foi detectada no intestino médio (Fig. 14). Nos ovários, o perfil de expressão relativa aumenta gradativamente

até o dia 11, caindo no 18º dia e voltando a crescer a partir do 33º dia pós-alimentação (Fig. 14).

Comparando-se os níveis médios de *B. culicis* detectados no intestino médio e no divertículo ao longo da colonização com os demais órgãos investigados, percebe-se que os níveis de *B. culicis* são expressivamente maiores nesses órgãos do que aqueles observados no abdômen, nas glândulas salivares, no intestino posterior, nos túbulos de Malpighi e nos ovários do mosquito (Fig. 14).

6.2- *B. culicis* biotinilada reconhece glicoproteínas do extrato total das glândulas salivares e do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*

Utilizando a técnica de biotinilar protozoários vivos e em seguida interagi-los com membranas de nitrocelulose contendo o extrato total do intestino médio ou das glândulas salivares de fêmeas de *Ae. aegypti*, foi possível observar cinco proteínas da glândula (Fig.15C) e cinco do intestino (Fig.15F) que *B. culicis* reconhece e se liga. A marcação das membranas de nitrocelulose contendo as proteínas da glândula (Fig. 16A) e do intestino (Fig. 16B) com lectinas revelou que todas as proteínas as quais *B. culicis* se liga contém diferentes resíduos de carboidratos.

Em colaboração com o Dr. Eric Calvo, três proteínas da glândula salivar (com 70, 50 e 30KDa) foram seqüenciadas pela porção C-terminal de acordo com a técnica de degradação de Edman e identificadas como apyrase, D7 e aegyptina, respectivamente. Essas três proteínas identificadas são solúveis, sendo encontradas na saliva do mosquito.

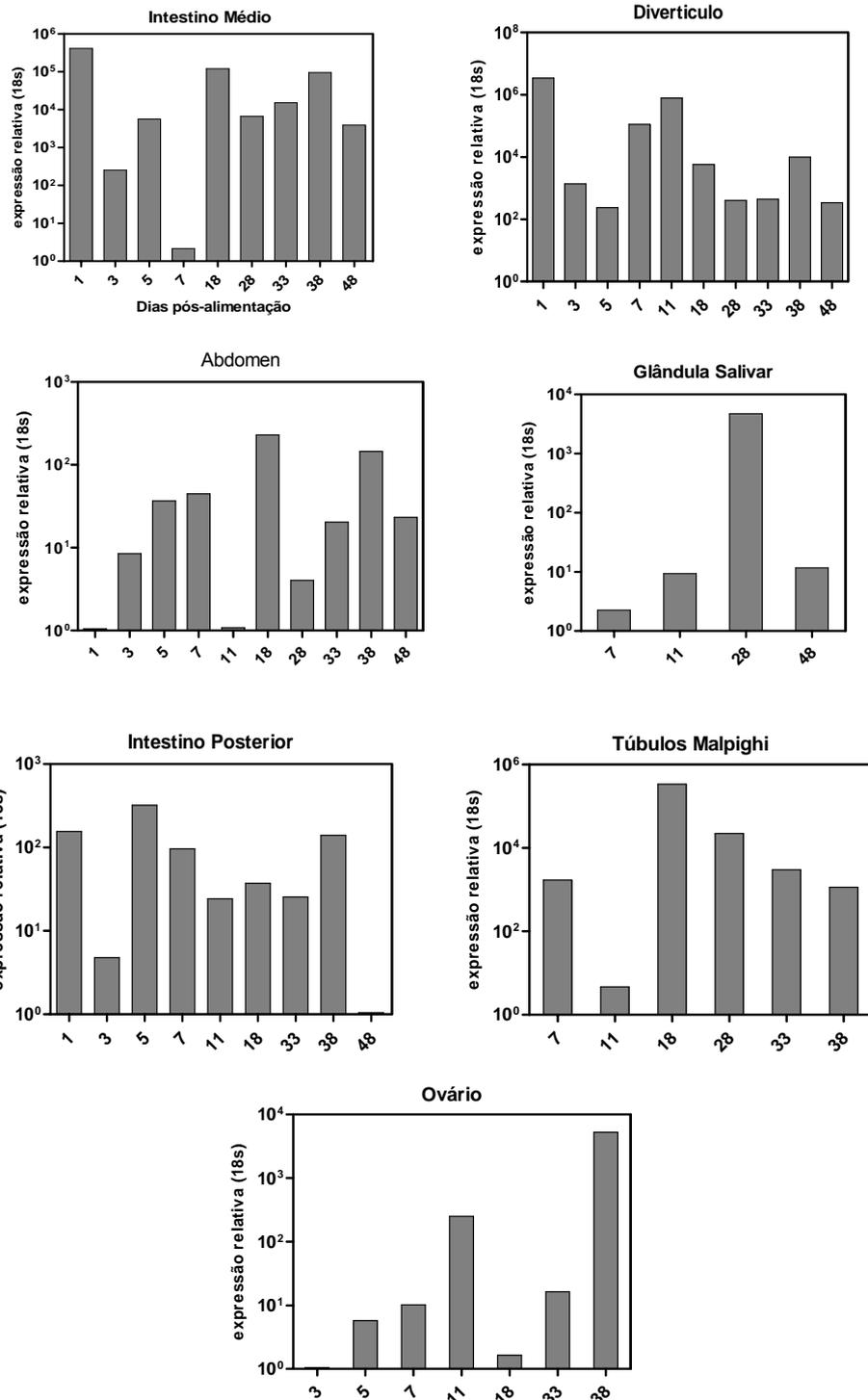


Figura 14- Determinação da presença de *B. culicis* em diferentes órgãos de fêmeas de *Ae. aegypti* ao longo de 48 dias de colonização. Os valores de expressão relativa foram obtidos por PCR em tempo real e referem-se a amplificação do gene ribossomal 18s de *B. culicis* no DNA total extraído de 10 órgãos do mosquito. O controle endógeno das reações foi MyD88 e os valores de expressão relativa de 18s foram normalizados em relação a menor expressão deste gene obtida em cada experimento. Os resultados mostrados são representativos de 1 experimento.

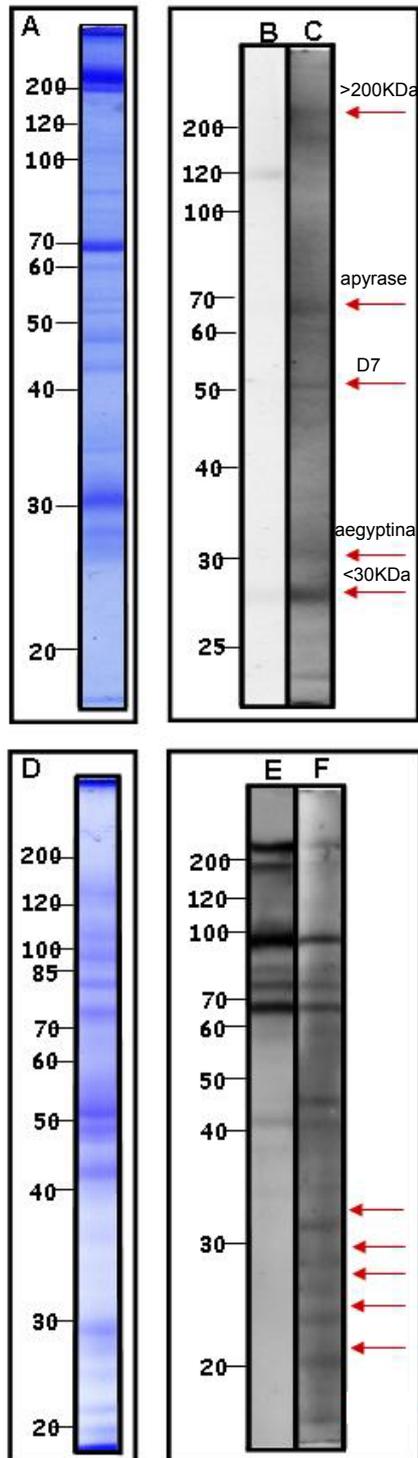


Figura 15 - Interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas do extrato total da glândula salivar ou do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*.

A- Perfil das proteínas totais da glândula salivar de fêmeas de *Ae. aegypti* resolvidas por SDS-PAGE e coradas com azul brilhante de Coomassie.

B- Não foi detectada a presença de proteínas naturalmente biotiniladas na glândula quando a membrana de nitrocelulose foi incubada somente com avidina-peroxidase.

C- Perfil das proteínas da glândula que reconhecem *B. culicis* biotinilada. As setas indicam a presença dos protozoários aderidos às proteínas da glândula. As proteínas de 70KDa (apyrase), 50KDa (D7) e 30.5KDa (aegyptina) foram identificadas através do sequenciamento da porção C-terminal de acordo com a técnica de Degradação de Edman. As proteínas <200 KDa e >30KDa ainda não foram identificadas.

D- Perfil das proteínas totais presentes no extrato total do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* resolvidas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie brilliant blue.

E- Perfil das proteínas naturalmente biotiniladas extrato total do intestino médio reveladas quando a membrana de nitrocelulose foi incubada somente com avidina-peroxidase.

F- Perfil das proteínas do intestino médio que reconhecem *B. culicis* biotinilada. As setas indicam a presença dos protozoários aderidos às proteínas do intestino ainda não identificadas.

Os números à esquerda indicam as massas moleculares das proteínas padrão expressas em KDa.

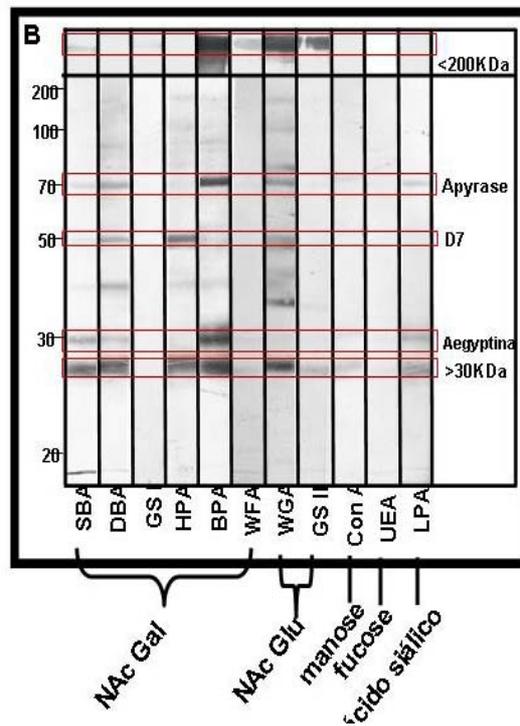
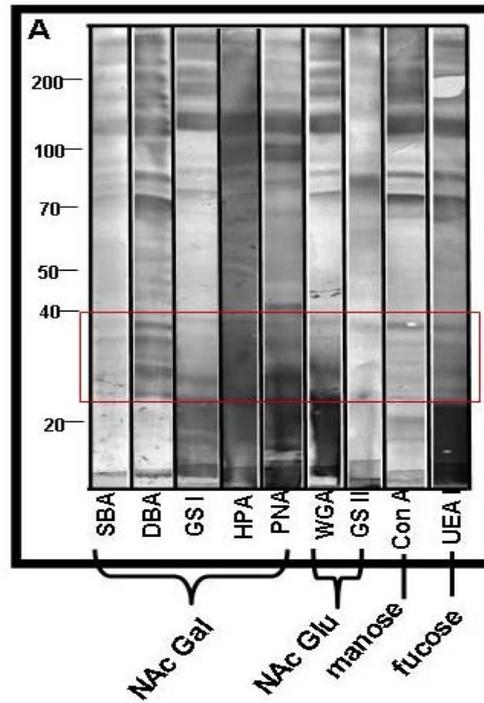


Figura 16 – Marcação de proteínas presentes extrato total do intestino médio (A) e da glândula salivar (B) de fêmeas de *Ae. aegypti* com lectinas. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas totais do intestino médio ou das glândulas salivares de fêmeas de *Ae. aegypti* foram marcadas com lectinas que reconhecem diferentes carboidratos. As proteínas às quais *B. culicis* se liga estão destacadas pelas caixas vermelhas.

6.3- Participação de carboidratos no reconhecimento de *B. culicis* às proteínas da glândula salivar e do intestino médio de *Ae. aegypti*

Para avaliar a participação de carboidratos na ligação de *B. culicis* às proteínas do mosquito, as membranas de nitrocelulose contendo o extrato proteico dos dois órgãos foram tratadas com PNGase F ou com α -manosidase antes da incubação com os protozoários biotinilados (Fig. 17). A primeira enzima é uma glicopeptidase que remove todo o braço glicídico de glicoproteínas que estão ligados ao aminoácido asparagina, ou seja, provenientes de glicosilações do tipo N. α -Manosidase é uma hidrolase ácida que remove resíduos de D-manose presentes em α -manosídeos. O tratamento prévio das membranas de nitrocelulose contendo o extrato do intestino com PNGase F aboliu a ligação de *B. culicis* às cinco proteínas do intestino de *Ae. aegypti* (Fig. 17A- canaleta 4; asteriscos vermelhos), ao passo que o tratamento com manosidase aboliu a ligação de *B. culicis* à três dessas cinco proteínas (Fig. 17A- canaleta 6; asteriscos vermelhos). Duas proteínas do intestino foram reconhecidas por *B. culicis* mesmo sem a presença de seus resíduos glicídicos (Fig. 17A- canaleta 6; asteriscos pretos). A eficiência do tratamento com as enzimas foi avaliada incubando-se membranas após o tratamento com concanavalina A, revelando que os resíduos glicídicos das proteínas do intestino foram completamente removidos por ambas glicosidases utilizadas (Fig. 17A- canaletas 5 e 7).

Com relação às proteínas da glândula salivar, o tratamento com PNGase F ou manosidase não aboliu a ligação do protozoário à proteína de alto peso molecular (<200 KDa) e nem à aegyptina (30KDa) (Fig. 17A- canaletas 4 e 6; asteriscos pretos). O tratamento com ambas glicosidases interferiu na ligação de *B. culicis* a proteínas D7 (50KDa) (Fig. 17A, canaletas 4 e 6; asteriscos vermelhos). Diferentemente da eficiência do tratamento com as enzimas observado nas proteínas do intestino, a marcação das membranas deglicosiladas com concanavalina A revelou que os resíduos glicídicos das proteínas da glândula foram parcialmente removidos por ambas glicosidases utilizadas (Fig. 17A- canaletas 5 e 7).

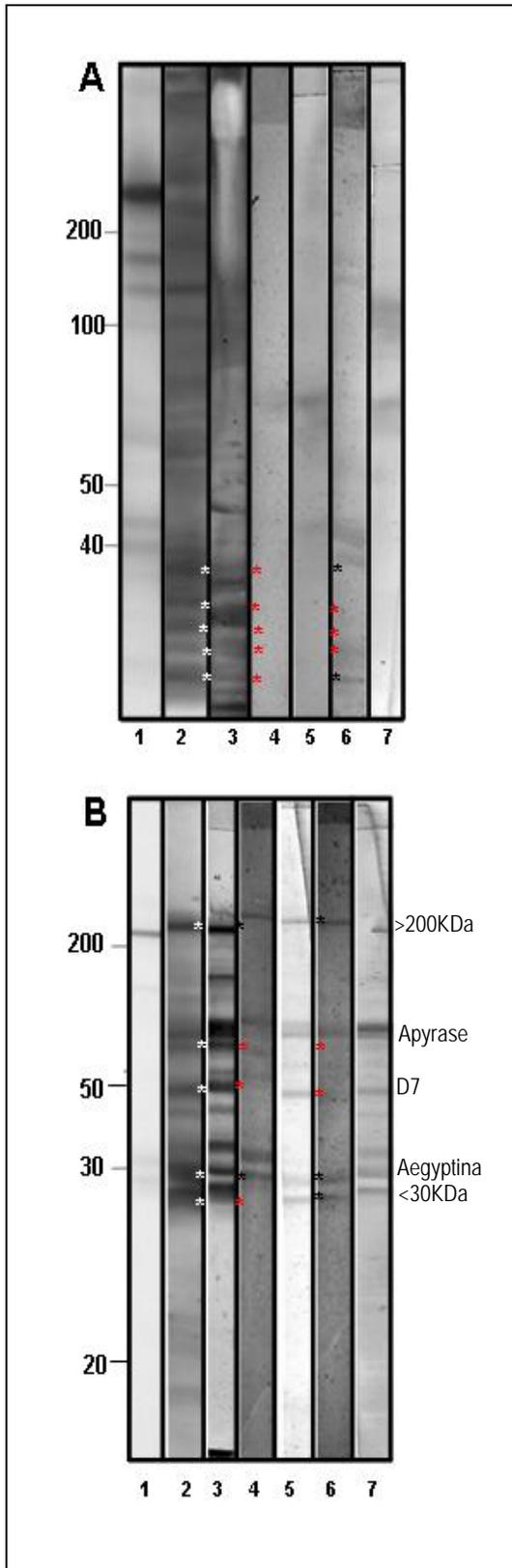


Figura 17 - Interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas deglicosiladas presentes extrato total do intestino médio (A) ou da glândula salivar (B) de fêmeas de *Ae. aegypti*.

1- Detecção de proteínas naturalmente biotiniladas no intestino médio ou nas glândulas quando a membrana de nitrocelulose foi incubada apenas com avidina-peroxidase. Os números à esquerda indicam as massas moleculares das proteínas padrão expressas em KDa.

2- Perfil das proteínas da glândula ou do intestino médio reconhecidas por *B. culicis* biotinilada. Os asteriscos brancos indicam a presença dos protozoários revelada com avidina-peroxidase.

3- Perfil das proteínas da glândula e do intestino médio marcadas por ConA.

4- Interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas da glândula ou do intestino previamente deglicosiladas por 72 horas com 10U de PNGase F. Os asteriscos vermelhos indicam as proteínas que *B. culicis* deixou de reconhecer após a deglicosição por PNGase A e os pretos indicam as proteínas que *B. culicis* continuou ligando após a deglicosição por esta glicosidase.

5- Eficiência da deglicosilação por PNGase F revelada pela incubação das membranas de nitrocelulose com ConA.

6- Interação de *B. culicis* biotinilada com proteínas da glândula ou do intestino previamente deglicosiladas por 72 horas com 2U de Manosidase. Os asteriscos vermelhos indicam as proteínas que *B. culicis* deixou de reconhecer após a deglicosição e os pretos indicam as proteínas que *B. culicis* continuou ligando após a deglicosição por manosidase.

7- Eficiência da deglicosilação por manosidase revelada pela incubação das membranas de nitrocelulose com ConA.

6.4- A colonização por *B. culicis* modula a expressão de fatores de transcrição e de efetores imunes em fêmeas de *Ae. aegypti*

Fatores de transcrição, como Rel 1, Rel 2 e STAT, regulam importantes vias de produção de efetores imunes, como os peptídeos antimicrobianos, que atuam no controle de infecções virais e bacterianas em mosquitos, sendo o corpo gorduroso o órgão apontado como um dos principais locais de produção desses efetores. Os resultados obtidos após a avaliação dos níveis de expressão de RNA para Rel 1 no abdômen de fêmeas de *Ae. aegypti* colonizadas por *B. culicis* mostram que a presença do protozoário provoca um aumento de duas vezes na presença desse fator de transcrição no 1º e no 3º dias comparando-se ao grupo de mosquitos alimentados somente com meio. No 5º pós alimentação, os níveis de Rel1 são semelhantes entre os mosquitos alimentados ou não com *B. culicis* ao passo que a presença do protozoário volta a aumentar os níveis de expressão no 7º e 9º dia pós alimentação. Em seguida, no 11º dia, a presença do protozoário não mais afeta a transcrição de Rel1 no abdômen do mosquito (Fig 18). Com relação à Rel 2, sua expressão decresce gradativamente do 1º ao 5º dia nos mosquitos não infectados, sendo aumentada pela presença de *B. culicis* no 5º dia pós-alimentação. Nesses mosquitos infectados, o nível de expressão de Rel2 é mantido no 11º dia, contrariamente ao observado nos mosquitos controle, onde a expressão de Rel2 é maior do que nos mosquitos alimentados com *B. culicis* (Fig. 18).

STAT 1 tem a sua expressão aumentada em três vezes no dia 1, somente pelo fato dos mosquitos se alimentarem com a solução de Hank's. Em contrapartida, esse aumento é quatro vezes menor, no mesmo dia, na presença de *B. culicis*, sendo mantido no 3º dia pós-alimentação. Nos mosquitos não alimentados com o protozoário, os níveis de expressão de STAT caem gradativamente ao longo dos dias, ao passo que nos mosquitos alimentados com *B. culicis* ocorre um aumento desses níveis no 5º e 7º dias, mas que, em seguida, no 9º dia, são novamente reduzidos nos mosquitos alimentados com o protozoário (Fig. 18).

A transcrição de defensina, um importante peptídeo antimicrobiano da resposta imune de mosquitos, foi inibida por *B. culicis* do 1º ao 9º dia pós-alimentação dos mosquitos em comparação aos níveis observados no mesmo período nos mosquitos controle. No 11º dia, entretanto, o cenário observado mostra

que a presença dos protozoários aumentou a transcrição de defensina em 98% em comparação a dos mosquitos controle (Fig. 18).

Proteínas com funções homólogas às opsoninas de vertebrados, como TEP-1, têm sido descritas como efetores da resposta imune de insetos liberados por hemócitos e que apresentam papel relevante no controle de microrganismos que alcançam a hemocele de mosquitos, como por exemplo *Plasmodium* (Blandin et al., 2004). Comparando-se a expressão de TEP-1 no abdômen de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com *B. culicis* às fêmeas alimentadas somente com a solução de Hank's, é possível observar níveis semelhantes de expressão de TEP-1 em ambos os grupos de mosquito, com exceção dos dias 5 e 11, nos quais ocorreu um aumento expressivo de 5 e 15 vezes, respectivamente, sobre a transcrição dessa proteína no grupo de abdomens coletados de mosquitos infectados (Fig 18).

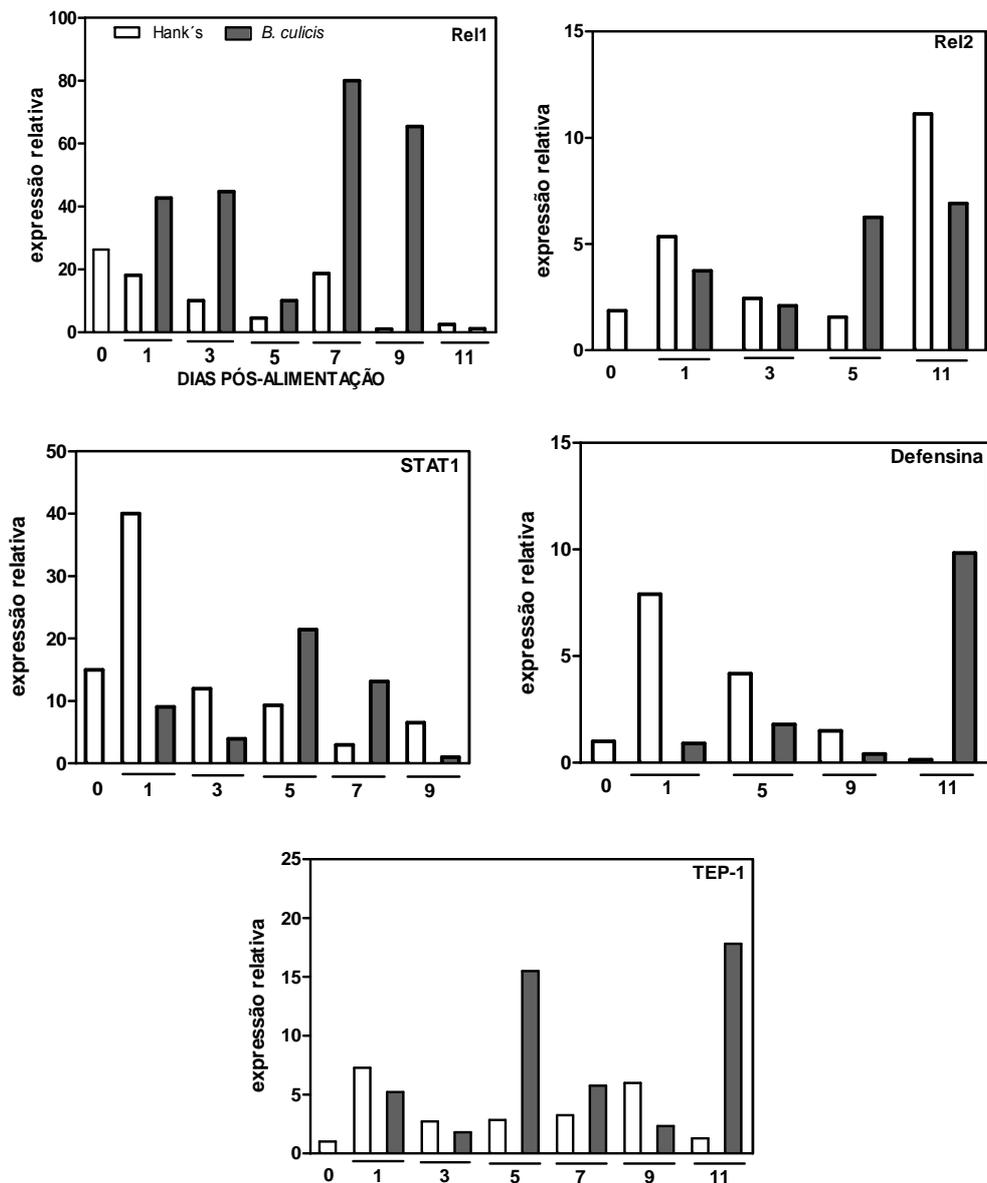


Figura 18- Modulação da resposta imune no abdômem de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas ou não com *B. culicis*.

Os níveis de RNA de fatores de transcrição (Rel1, Rel2 e STAT) e de efetores imunes (defensina e TEP-1) foram avaliados através da extração e RNA de 10 abdômens, recolhidos de mosquitos alimentados com *B. culicis* (barras cinzas) ou somente com solução de Hank's suplementada com BSA e sacarose (barras brancas), transcrição reversa e PCR em tempo real ao longo de 11 dias pós-alimentação. Os valores de expressão obtidos em cada PCR foram normalizados em relação ao menor valor de expressão obtido no mesmo experimento. Os resultados mostrados são preliminares e representam 1 experimento.

A resposta imune de *Ae. aegypti* à presença de *B. culicis* no intestino médio do mosquito, foi avaliada cinco dias após a alimentação com os protozoários. A avaliação da expressão dos fatores de transcrição Rel1, Rel2, e STAT mostrou um aumento marcante de vinte vezes na expressão de Rel 1 nos mosquitos que foram alimentados com *B. culicis* e uma diminuição de sete vezes na expressão de Rel2 nos mosquitos alimentados com *B. culicis* em comparação aos mosquitos controle e não revelou diferenças na expressão de STAT1. A expressão de defensina avaliada nos intestinos médios cinco dias após a alimentação, apresentou uma diminuição de 25% na expressão desse peptídeo antimicrobiano nos mosquitos controle em relação aos mosquitos alimentados com *B. culicis* (Fig. 19).

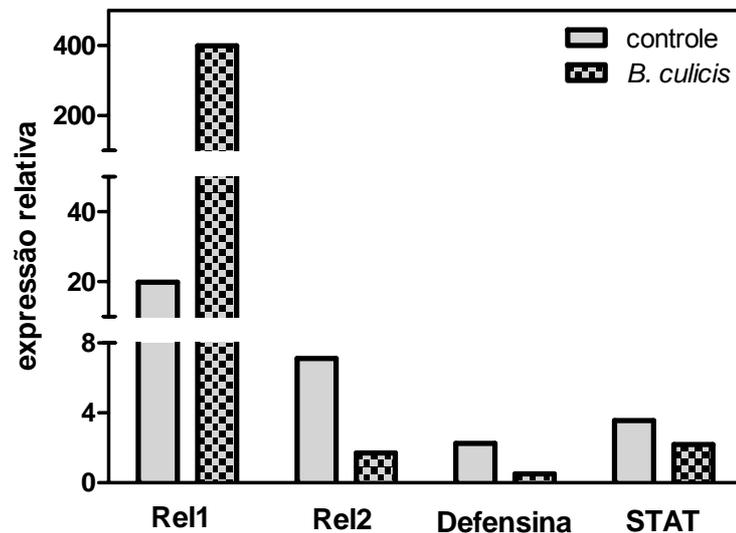


Figura 19- Modulação da resposta imune no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* no 5º dia pós-alimentação com *B. culicis*.

Os níveis de RNA de fatores de transcrição (Rel1, Rel2 e STAT) e do peptídeo antimicrobiano defensina foram avaliados através da extração de RNA de 10 intestinos médios, recolhidos de mosquitos no 5º dia pós-alimentação com *B. culicis* (barras cinzas) ou somente com solução de Hank's (barras hachuradas), e transcrição reversa seguida de PCR em tempo real. Os valores de expressão obtidos em cada PCR foram normalizados em relação ao menor valor de expressão obtido no mesmo experimento. Os resultados mostrados são preliminares e representam 1 experimento.

7- DISCUSSÃO

Os mecanismos da resposta inata de insetos (e outros artrópodes) assemelham-se àqueles utilizados por mamíferos e outros vertebrados no combate à microrganismos. Com exceção da geração de anticorpos, que implicam numa resposta adaptativa cuja existência em insetos ainda é discutida (revisito por Hoffman, 2003), esses dois grupos compartilham mecanismos inatos clássicos, como a fagocitose e a produção de peptídeos antimicrobianos. A existência de receptores reconhecedores de padrões comuns em ambos, insetos e vertebrados, bem como a conservação de cascatas de sinalização que levam à ativação de genes imunes, reforçam a idéia do uso de estratégias semelhantes no combate dos mesmos patógenos que, por outro lado, transitam em ambos os grupos e compartilham moléculas de superfície que são reconhecidas como PAMPs (Hoffmann et al., 1999; Imler & Hoffmann, 2001).

As redes extracelulares de DNA, cujo papel em vertebrados é conter fisicamente os microrganismos e concentrar moléculas tóxicas neste ambiente, aumentam o leque de mecanismos da resposta inata de vertebrados e gradativamente vêm sendo descritas em vários organismos. Em insetos, Bidla e colaboradores (2005) relataram a primeira tentativa de demonstrar a formação de redes extracelulares de DNA na hemolinfa de larvas no último estágio de desenvolvimento de *D. melanogaster* e *Galleria mellonella*. Entretanto, os autores estudavam na ocasião a associação de DNA extracelular com a coagulação da hemolinfa desses dois insetos e embora não tenham detectado tal associação, concluindo que as fibras formadas durante a coagulação são diferentes das NETs de neutrófilos, os autores descreveram que os hemócitos de *Galleria* denominados coagulócitos explodem durante a formação dos coágulos. Mais tarde, Altincicek e colaboradores (2008) relataram a segunda tentativa de demonstrar a formação de redes extracelulares de DNA utilizando novamente a hemolinfa de larvas de *G. mellonella* no último estágio de desenvolvimento. Neste trabalho, os autores relatam que não foram observadas redes clássicas como as de neutrófilos humanos, mas que os oenocitóides liberam rapidamente seu DNA diante do estímulo imune seguido pela degranulação dos granulócitos e formação de fibras que se coram com Sytox Green. Bactérias são aprisionadas nessas fibras e com o passar do tempo toda estrutura é melanizada.

No presente estudo, a liberação de DNA e a formação das redes extracelulares foram avaliados após a estimulação de hemócitos isolados ou na hemolinfa recolhida de *P. americana*, um inseto hemimetábolo diferentemente de *Galleria* e *Drosophila*, que são holometábolos. Moléculas presentes na superfície de microrganismos, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície de bactérias Gram negativas ou o polímero de glucanas presentes na parede celular de fungos (zimosan) foram usados como estímulos para a liberação de redes extracelulares. A abordagem metodológica de se estudar esse mecanismo da resposta inata nos hemócitos isolados, livres de outros fatores da hemolinfa permite discernir a formação das redes extracelulares do mecanismo de coagulação diferentemente de outros trabalhos citados anteriormente, pois em baratas a coagulação não ocorre quando hemócitos e hemolinfa são separados (Bohn, 1986 apud Lackie, 1988). Assim, os resultados aqui apresentados evidenciam a liberação de DNA por hemócitos isolados, bem como na presença de hemolinfa, provenientes de ninfas e adultos de *P. americana* quando eles foram estimulados *in vitro* com LPS completo ou detoxificado. Classicamente, LPS é reconhecido pelo sistema imune de vertebrados através de sua porção lipídica, denominada lipídio A. Em *P. americana* foi demonstrado a existência de lectinas na hemolinfa do inseto capazes de reconhecer e ligar a molécula de LPS através de sua porção glicídica (Kawasaki et al., 1993, Jomori et al., 1990). Algumas dessas lectinas fazem um reconhecimento espécie-específico, pois pequenas diferenças na porção glicídica do LPS de *Salmonella minnesota*, impedem sua ligação pela lectina que liga LPS (LBP). Funcionalmente, a LBP presente na hemolinfa de *P. americana* atua como uma opsonina, facilitando a fagocitose de bactérias e sendo importante na fase aguda da resposta imune do inseto (Jomori & Natori, 1992). Uma outra lectina caracterizada na hemolinfa de *P. americana* tem especificidade pelo 2-keto-3-deoxi octonato (KDO), e reconhece LPS quando esse resíduo é exposto como no LPS-delipidado (Kawasaki et al., 1993). É interessante notar que os resultados aqui apresentados mostram que a liberação de DNA mediante o estímulo com d-LPS ocorre de maneira dose-dependente, ao passo que a molécula completa de LPS só induziu a liberação de DNA na maior concentração utilizada (500µg /mL). Vale notar ainda que a menor quantificação de DNA pela hemolinfa em relação aos hemócitos isolados pode ser devida a competição pelo d-LPS entre as células e as lectinas presentes na hemolinfa. O efeito estimulatório de d-LPS também foi observado por Cardenas e

colaboradores (2004) sobre os hemócitos de *Procambarus zonangulus* ao passo que, LPS completo mostrou-se citotóxico para essas células.

Zimosan, como LPS, é um componente de microrganismos conhecido por elicitar respostas imunológicas em vertebrados e invertebrados (Kimbrell & Beutler, 2001; Lavine & Strand, 2002). Sendo um polímero de β 1-3 glucanas presente na parede celular de fungos, zimosan foi utilizado neste estudo para testar sua capacidade de estimular os hemócitos de *P. americana* a liberarem DNA. Nossos resultados demonstraram que nas concentrações testadas, zimosan foi incapaz de induzir a liberação de DNA nos hemócitos isolados ou na presença da hemolinfa. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Gabriel e colaboradores (2010), que descreveram recentemente que zimosan não foi capaz de induzir a liberação de redes extracelulares de neutrófilos humanos. Neste caso, os autores demonstraram que zimosan é preferencialmente fagocitados pelos neutrófilos.

A formação de estruturas semelhantes às NETs de neutrófilos foi demonstrada aqui por microscopia óptica e uso de diferentes fluoróforos intercalantes de DNA, como DAPI, Sytox Green e brometo de etídio. Preparações de hemócitos isolados ou de hemolinfa e, previamente estimuladas por 1 hora com d-LPS e incubadas com DAPI ou brometo de etídio após a fixação com paraformaldeído demonstraram a presença de estruturas finas e longas contendo DNA, semelhante às NETs de neutrófilos. Igualmente, quando as preparações foram incubadas simultaneamente com d-LPS e com o corante vital Sytox Green, procedendo-se a fixação do material somente após esta etapa, o intercalante acumulou-se sobre fibras extensas e finas associadas aos hemócitos ao passo que, não marcou o núcleo de hemócitos em meio às fibras, evidenciando, desta forma, a presença de DNA extracelular em tais estruturas.

Uma característica do DNA presente nas NETs de neutrófilos é sua associação com histonas nucleares, que, em alguns casos, foram apontadas como as moléculas associadas às redes que exercem atividade tóxica para microrganismos (bactérias e *Leishmania*) aprisionados pelas redes (Brinkmann et al, 2004; Guimarães-Costa et al., 2009). A presença de histonas (H3 e H1) foi confirmada nas redes de DNA extracelular de *P. americana* através da marcação simultânea dessas estruturas com DAPI e anticorpos que reconhecem essas moléculas (anti-H3) ou em associação com o DNA (anti-H1/DNA). Além do DNA e

das histonas, proteínas e lipídios neutros (reconhecidos por Bodipy, mas não por Nile Red) também foram evidenciados nas redes extracelulares formadas pelos hemócitos de *P. americana*. A presença desses constituintes pode explicar, pelo menos em parte, a ineficiência da DNase I em clivar as redes extracelulares por um princípio semelhante ao descrito por Hakkim e colaboradores (2010), que demonstraram que as redes formadas pelos neutrófilos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico não são clivadas por DNase I, pois são densamente recobertas por anticorpos que impedem fisicamente o acesso da enzima ao DNA. Da mesma forma, o estudo sobre as redes extracelulares de DNA formadas por mastócitos humanos reforça essa hipótese uma vez que, a digestão das redes só ocorre quando DNase e proteinases agem em conjunto (von Kockritz-Blickwede *et. al.*, 2008). Por outro lado, embora a adição de DNase I às preparações estimuladas com d-LPS não tenha resultado na clivagem total das redes extracelulares, o tratamento com esta enzima mostrou uma marcante desagregação dos nódulos de hemócitos formados nestas preparações *in vitro*. O envolvimento das redes extracelulares de DNA com os nódulos formados mediante o estímulo com d-LPS foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia óptica confocal, duas abordagens que possibilitaram visualizar o envolvimento de fibras finas e alongadas de DNA participando da estruturação física dos nódulos. Vale notar que, Sun & Steele (2001) mencionaram o uso de DNase (0,01%) para prevenir a agregação de células em preparações de corpo gorduroso de *P. americana* e, além disso, conforme mencionado anteriormente, oenocitóides de *Galleria* liberam rapidamente seu DNA que por sua vez é incorporado ao nódulo; dados que sustentam a hipótese de que as redes extracelulares formadas pelos hemócitos de *P. americana* estão envolvidas com o mecanismo de nodulação *in vitro*.

Diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, estimulam a formação das redes extracelulares de DNA nos modelos investigados até o presente momento (revisado por von Kockritz-Blickwede & Nizet, 2009). Nas preparações de hemolinfa estimuladas com *E. coli*-GFP, foi possível visualizar bactérias presas às redes extracelulares, aglutinadas e também associadas à superfície dos hemócitos. Por outro lado, quando as preparações de hemolinfa foram estimuladas com *B. culicis*, a estrutura formada correspondia a uma extensa matriz espessa e granulosa onde hemócitos e protozoários (livres e associados aos hemócitos) estavam imersos e o DAPI corou apenas os núcleos das células. Tal

estrutura assemelha-se a uma resposta mediada por aglutininas. Essa comparação possibilitou, então, diferenciar as estruturas formadas na hemolinfa de *P. americana* em resposta a presença de diferentes microrganismos. Estudos anteriores já tinham demonstrado uma forte atividade aglutinante na hemolinfa de *P. americana* na presença de protozoários como *T. rangeli*, *T. brucei* e *L. hertigi* (Takle, 1988; Ingram et. al., 1984).

O efeito microbicida das NETs de neutrófilos vem sendo demonstrado através do tratamento das redes com DNase, cujo rompimento desagrega os componentes tóxicos diluindo seus efeitos, ao mesmo tempo em que permite a liberação dos microrganismos das redes. A estratégia utilizada neste estudo para avaliar o papel microbicida das redes extracelulares liberadas pelos hemócitos de *P. americana* consistiu no tratamento de *E. coli*-GFP por três horas com sobrenadantes ricos ou não em DNA, ou seja, estimulados ou não com d-LPS, na presença e na ausência de DNase, e em seguida avaliar o crescimento das bactérias por 48 horas pós-tratamento. Os resultados obtidos mostram que o sobrenadante rico em DNA inibiu 95% do crescimento bacteriano. A co-injeção de bactérias com DNase I aumentou o crescimento bacteriano em 3 vezes em relação ao sobrenadante sozinho, evidenciando a participação das redes extracelulares na resposta de *P. americana* à *E. coli*. Por outro lado, hemolinfa não estimulada também inibiu o crescimento bacteriano (93%), o que pode ser explicado pela presença de DNA extracelular detectado neste caso. Além da presença de DNA, é possível especular também que neste caso outros mecanismos humorais possam ocorrer e resultar na morte das bactérias. Um deles é a ativação da principal enzima formadora de melanina em insetos, a fenoloxidase (PO), e o outro é a presença de AMPs. A ativação de PO nos sobrenadantes utilizados para tratar *E. coli*, bem como nos sobrenadantes provenientes do tratamento da bactéria, foi descartada nos ensaios aqui realizados pela simples incubação dos sobrenadantes em ambas as ocasiões com L-DOPA. Se a enzima estivesse ativa, a formação de dopacromo teria sido detectada, mas nenhuma atividade de PO foi detectada em nenhum dos sobrenadantes antes ou após o tratamento da bactéria durante 1 hora de incubação com o substrato. Por outro lado, a presença de PO nesses sobrenadantes foi confirmada pela adição de tripsina, uma serino protease capaz de converter pro-PO em PO ativa. De acordo com os trabalhos relatados na literatura, LPS (completo) não ativa a PO de duas espécies de barata ou de *Bombyx mori* e na presença de *E. coli* a ativação só ocorre

quando a hemolinfa está completa (Lackie, 1988). Esses achados reforçam a estratégia utilizada neste estudo, cujo objetivo foi avaliar a atividade microbicida de sobrenadantes ricos em DNA sem a ativação de PO. Além da ativação da PO, outra hipótese que poderia explicar a morte das bactéria nos sobrenadantes não estimulados seria a produção de AMPs, mas esse parâmetro não foi avaliado pois a literatura não dispõe de informações até o presente sobre a atividade de AMPs em *P. americana* como já foi amplamente descrito em diversos outros insetos.

O papel das redes extracelulares de DNA não tem sido investigado em modelos *in vivo* devido aos estudos sobre o mecanismo serem realizados com células humanas. No presente estudo, ninfas de *P. americana* foram inoculadas com diferentes doses de *E. coli* na presença e na ausência de DNase I para que o papel das redes extracelulares de DNA fosse avaliado fisiologicamente, considerando a resposta imune inata como um todo. Classicamente, a resposta imune de insetos é definida como robusta devido a rápida capacidade de controle dos microrganismos injetados experimentalmente na hemocele dos insetos. Sendo assim, a formação de nódulos, a ativação de PO e a coagulação são eventos que acontecem rapidamente e retém os microrganismos no local da inoculação (Haine et. al., 2007). Quando *E.coli*-GFP foi inoculada na hemocele de *P. americana*, doze horas após a inoculação o número de nódulos formados foi relativamente menor quando 10^5 bactérias foram injetadas ($3\pm 0,8$) em comparação com a dose dez vezes maior (34 ± 8) e, nitidamente a distribuição desses nódulos ocorreu ao redor do local da inoculação em ambos os casos. Na presença de DNase, o número de nódulos foi significativamente maior na dose de 10^6 bactérias (109 ± 15) em comparação a mesma dose de bactérias na ausência da enzima, não havendo diferença na menor dose de bactérias inoculadas na presença a enzima (5 ± 2). Com relação à distribuição dos nódulos, houve claramente um espalhamento aleatório de nódulos por todo o abdômen das baratas, sugerindo novamente uma interferência da DNase I no mecanismo de nodulação, mas desta vez *in vivo*. Visualizando as inclusões melanizadas formadas aleatoriamente nesses insetos, também foi possível inferir que a ativação de PO foi igualmente aleatória e não mais local como nos insetos inoculados somente com as bactérias. A ativação local é considerada como padrão, uma vez que a ativação do sistema pro-PO/PO é estritamente regulada, sendo limitada ao local da injúria ou ao redor do invasor (Cerenius, 2010). A inoculação de DNase I sozinha não induziu a formação de nódulos e nem foi visualizada a

melanização do abdômen dos insetos. Esses resultados corroboram as observações *in vitro* e sustentam a hipótese de que as redes extracelulares de DNA contribuem para a nodulação dos hemócitos de *P. americana*. Ainda nesta abordagem, também foi avaliado o efeito *in vivo* da DNase I sobre o número de hemócitos circulantes em três subpopulações separadas por citometria de fluxo e sobre a fagocitose das bactérias inoculadas. Com relação aos hemócitos, três subpopulações foram definidas de acordo com tamanho e granulosidade: R1, formada por hemócitos pequenos e semi-granulares, R2, composta por hemócitos grandes e granulosos e R3, formada por hemócitos com tamanho semelhante ao de R2, mas com grande granulosidade. Assumindo o número de hemócitos dos insetos inoculados somente com tampão como 100% de hemócitos circulantes, a percentagem de hemócitos foi significativamente aumentada nas três subpopulações quando 10^5 bactérias foram inoculadas nos insetos, sendo possível inferir que esse aumento percentagem de hemócitos circulantes poderia ser explicado por um aumento da fagocitose, mas a presença de hemócitos duplo-positivos dentro dessas sub-populações não foi observada. Assim, é possível hipotetizar que novos hemócitos foram acrescentados à hemolinfa e no período analisado (12 horas) foram capazes de eliminar as bactérias inoculadas. O fato do número de nódulos formados não ter sido alto nessa dose de bactérias corrobora essa hipótese. Por outro lado, a inoculação simultânea de 10^5 bactérias com DNase I impediu esse aumento de hemócitos nas três subpopulações avaliadas e se a comparação for feita entre o grupo de insetos inoculados somente com DNase, também foi possível observar uma redução na percentagem de hemócitos circulantes nessas subpopulações. Mais uma vez, a nodulação não pode explicar essa diminuição dos hemócitos mediante a inoculação de DNase já que o número de nódulos detectados nesse grupo de insetos também foi baixo. Da mesma maneira, a melanização pode ser descartada, pois a visualização dos abdomens dos insetos não demonstrou sinais de deposição de melanina. Assim, é possível hipotetizar que a DNase possa ter afetado, nas condições testadas, a ontogenia dos hemócitos de *P. americana* ou ser tóxica para os hemócitos. No grupo de insetos inoculados com a maior dose de *E. coli*-GFP (10^6), só foi observado um aumento significativo na percentagem de hemócitos circulantes na subpopulação R3, em comparação com o grupo de insetos inoculados somente com o tampão e, neste caso, é possível inferir que a presença de um número maior de bactérias tenha induzido um aumento no número de hemócitos nas

três subpopulações, mas no tempo avaliado os hemócitos das subpopulações R1 e R2 tenham nodulado (já que o número médio de nódulos contabilizados nesses insetos foi significativamente maior), ao passo que os hemócitos da subpopulação R3 tenham permanecido circulantes. Novamente, o tratamento com DNase I afetou a percentagem de hemócitos circulantes nesta mesma subpopulação R3, mas neste caso a explicação mais plausível é a nodulação dessas células, já que o número de nódulos nesse grupo de insetos foi maior ainda do que na ausência da DNase I (109 ± 15 nódulos). Observando a percentagem de hemócitos duplo-positivos circulantes na subpopulação R3, foi constatado um aumento significativo de 4 vezes nos hemócitos contendo bactérias circulando nos insetos inoculados com 10^6 *E. coli*-GFP e DNase I, permitindo inferir que o efeito da DNase I sobre a nodulação dos hemócitos ocorre nesta subpopulação, se considerarmos a idéia que hemócitos que fagocitaram um grande número de bactérias saem da circulação, pois nodulam e são encapsulados posteriormente sobre a superfície de tecidos da hemocele (Lackie 1988).

Tripanosomatídeos monoxênicos são encontrados numa ampla variedade de insetos pertencentes às ordens Diptera e Hemiptera (Vickerman, 1994; Podlipaev, 1990, 2000; Westenberger et al., 2004). O ciclo biológico de tripanosomatídeos monoxênicos não têm sido explorado na literatura, sendo o grande volume de informações disponíveis acerca de ciclos biológicos de tripanosomatídeos heteroxênicos em insetos vetores. Tal discrepância decorre do fato dos tripanosomatídeos heteroxênicos causarem patologias. Por outro lado, um grande número de espécies de tripanosomatídeos monoxênicos são encontrados em insetos vetores, sendo alguns descritos como capazes de colonizar hospedeiros vertebrados, dentre eles o ser humano (Morio et al., 2008; Pacheco *at al.*, 1998; Jansen *at al.*, 1988; McGhee, 1957; Santos et al., 2004; Mateolli et al., 2009). Sendo assim, parte do nosso estudo foi dedicada ao entendimento da interação de *B. culicis* com *Ae. aegypti*, objetivando esclarecer o processo de colonização do tripanosomatídeo no inseto e a resposta imune do inseto à presença do protozoário.

Numa abordagem anterior, demonstramos que a alimentação dos mosquitos com *B. culicis* resultava na colonização do intestino médio e na chegada do protozoário à hemocele do mosquito no período mais avançado da colonização (Corrêa-da-Silva et al., 2006). Para entender o processo de colonização de maneira

mais ampla, mosquitos foram alimentados com o protozoário e a distribuição do mesmo nos tecidos do inseto foi verificada por PCR quantitativo ao longo de 48 dias pós-alimentação. Os resultados aqui apresentados embora preliminares permitem concluir que *B. culicis* não possui uma preferência por compartimentos do corpo do inseto uma vez que o protozoário foi detectado em todo o corpo do inseto ao longo dos dias pós-alimentação. O intestino médio e o divertículo foram os órgãos que apresentaram maior taxa de expressão relativa do gene ribossomal 18s de *B. culicis* indicando que esses dois órgãos atuam como fonte de replicação dos protozoários. Visto que a colonização de *B. culicis* não mata as fêmeas de *Ae. aegypti*, é plausível supor que há um controle do número de protozoários em todos os órgãos ao longo da colonização e essa hipótese é suportada pelo fato da detecção do protozoário ter sido bimodal em todos os órgãos, como exceção das glândulas salivares porém, nesse órgão, poucos dias pós-alimentação foram analisados. A diminuição abrupta de *B. culicis* em alguns órgãos observada no 7º (intestino médio), 11º (túbulo de Malpighi e abdômen) e 18º (ovário) dias pós-alimentação aliada ao fato de nenhuma diminuição tão acentuada ter sido observada no divertículo, sugere que os protozoários possam multiplicar neste órgão e sair constantemente em direção a outros, como o próprio intestino médio, posterior ou túbulos de Malpighi. De qualquer forma, *B. culicis* chega à hemocele de *Ae. aegypti*, pois foi detectada a expressão de 18s no abdômen do inseto, confirmando os resultados obtidos anteriormente por Corrêia-da-Silva e colaboradores (2006) utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

A detecção de *B. culicis* nos ovários e nas glândulas salivares do mosquito permite supor que os protozoários são levados pela hemolinfa para todo o corpo do inseto. Hillyer e colaboradores (2007) publicaram um estudo esclarecedor sobre o destino dos esporozoítos de *Plasmodium sp.* liberados pelos oocistos na hemocele de *An. quadrimaculatus* (na altura do lado basal do intestino médio), mostrando que os protozoários são submetidos ao fluxo direcional da hemolinfa do mosquito, sendo levados para todo o corpo inclusive para apêndices distais como patas, antenas, halteres e asas. Em outro estudo, Salazar e colaboradores (2007) demonstraram que o vírus da dengue (tipo 2) também se dissemina por todo o corpo de *Ae. aegypti* ao longo de 21 dias pós alimentação. Neste caso, a detecção do vírus por imunofluorescência mostrou que o intestino médio, o abdômen, as glândulas

salivares, tecidos da cabeça e os túbulos de Malpighi são colonizados pelo vírus ao longo do período analisado.

O estudo realizado por Hillyer e colaboradores (2007) também demonstrou que após 14-20 dias do início da infecção, poucos mosquitos continham esporozoítos circulando na hemolinfa, sendo a grande maioria dos protozoários visualizados dentro das glândulas salivares ou aderidos a órgãos como os ovários. Similarmente, os resultados aqui apresentados mostram uma baixa expressão relativa de 18s no abdômen de *Ae. aegypti* durante todo o período pós-alimentação (em torno de 10^2), o que sugere uma baixa quantidade de protozoário circulando na hemolinfa. Em contrapartida, esse baixo valor não foi observado nos demais órgãos avaliados, nos quais a expressão relativa de 18s ultrapassou esse valor em diversos dias pós-alimentação. Considerando que *B. culicis* é capaz de sobreviver na hemolinfa de *Ae. aegypti* conforme demonstrado através da incubação *in vitro* do protozoário com a hemolinfa do mosquito (Nascimento et al., 2010; anexo II), é possível supor que o protozoário mantenha-se em pequeno número na hemolinfa porque interage com outros órgãos, como as glândulas salivares ou como os hemócitos circulantes na hemolinfa semelhantemente ao comportamento de *T. rangeli* na hemolinfa de seu inseto hospedeiro.

Embora a metodologia aqui utilizada não permita discernir se a presença de *B. culicis* nas glândulas salivares e nos ovários corresponda ao lado luminal ou basal desses órgãos, nosso grupo demonstrou recentemente que *B. culicis* radioativa inoculada diretamente na hemolinfa de fêmeas de *Ae. aegypti* adere à superfície das glândulas salivares e é capaz de invadir esse órgão, *in vitro*, alcançando a região interna da glândula onde a saliva é estocada (Nascimento et al., 2010; anexo II). Estes fatos, então, não permitem descartar a hipótese de que no 28º dia, por exemplo, a alta expressão relativa de 18s indique a presença de *B. culicis* multiplicando dentro das glândulas salivares.

Considerando que (i) *B. culicis* adere à superfície do epitélio intestinal, inserindo seu flagelo entre as células epiteliais (Corrêa-da-Silva et al., 2006), (ii) também adere ao epitélio glandular mediante um contato íntimo de seu flagelo com a lâmina basal do órgão e que culmina com sua chegada ao citoplasma da célula (Nascimento et al., 2010; anexo II), (iii) a adesão de outros protozoários, como *Leishmania* e *Plasmodium*, ao epitélio intestinal ou ao epitélio glandular de seus

respectivos insetos vetores é mediada por interações ligantes-receptores (Kamhawi et al., 2004; Gosh et al., 2009), investigamos no presente estudo a ligação de *B. culicis* à proteínas do extrato total das glândulas salivares e do intestino médio com o intuito de identificar possíveis receptores para os protozoários nestes tecidos e também para avaliar o envolvimento de carboidratos no reconhecimento por *B. culicis*. Assim, utilizando *B. culicis* viva e marcada com biotina, demonstramos que o protozoário se liga à cinco proteínas presentes no extrato total das glândulas salivares, das quais três foram identificadas como apyrase, D7 e aegyptina e duas permanecem sem identificação (<200KDa e a >30KDa). No extrato total de intestino médio, *B. culicis* reconhece e se liga à cinco proteínas com massa molecular abaixo de 50KDa.

Carboidratos presentes na superfícies de microrganismos têm sido implicados no processo de interação com células hospedeiras (Okolo, et al., 1990; Pimenta et al., 1992; Ruiz et al., 1998; Kamhawi et al, 2004; Myskova et al., 2007) e a presença de resíduos glicídicos nas proteínas da glândula salivar e do intestino médio que são reconhecidas por *B. culicis* foi avaliada neste estudo através da incubação das membranas de nitrocelulose com lectinas que reconhecem diferentes carboidratos e do uso de glicosidases para a remoção dos carboidratos presentes nessas proteínas. Tanto as proteínas do intestino médio quanto as proteínas da glândula salivar as quais *B. culicis* biotinilada se liga foram reconhecidas por lectinas evidenciando suas naturezas glicídicas. A participação de carboidratos no processo de interação *in vitro* de *B. culicis* com o intestino médio do mosquito já havia sido demonstrada por d'Àvila-Levi e colaboradores (2005), da mesma forma que demonstramos a participação de resíduos de N-acetil glucosamina, fucose e manose na interação de *B. culicis* com as glândulas salivares de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller). Neste estudo, caracterizamos os carboidratos presentes na superfície das glândulas salivares de *Ae. aegypti* e demonstramos a presença de manose na superfície de *B. culicis*. Além disso, demonstramos ainda que o pré-tratamento de *B. culicis* com manose, ou seja o recobrimento de possíveis lectinas da superfície do protozoário que participem do reconhecimento de resíduos de manose presentes na superfície das glândulas salivares, impede a adesão de *B. culicis* evidenciando, então, o envolvimento de manose na interação do protozoário com este órgão (Nascimento et al., 2010; vide anexo II). Com o objetivo de verificar se o reconhecimento de *B. culicis* às proteínas das glândulas e do intestino médio ocorria pela presença dos

resíduos glicosilados, as membranas de nitrocelulose contendo o extrato total de ambos os órgãos foram previamente deglicosiladas por N-glicosidases (PNGase F e manosidase) e em seguida submetidas aos ensaios de ligação com *B. culicis* biotinizada. O tratamento com as glicosidases aboliu a ligação de *B. culicis* à algumas proteínas do intestino médio e da glândula, mas não interferiu na ligação dos protozoários a outras, sobretudo à proteína de alto peso molecular (>200KDa) da glândula salivar, cuja marcação com ConA após a deglicosilação mostrou que os resíduos glicídicos não foram totalmente removidos. Considerando que PNGase F é uma N-glicosidase, ou seja, remove resíduos de carboidratos ligados à asparagina, é plausível hipotetizar que o resíduo glicídico presente nesta proteína de alto peso molecular da glândula salivar do mosquito é proveniente de uma O-glicosilação, por isso não foi removido diante do tratamento utilizado. Outra possível explicação é esta proteína conter fucose ligada na posição α 1-3, tipo de ligação que PNGase F é incapaz de remover. No extrato do intestino médio, duas proteínas tiveram seus resíduos glicídicos totalmente removidos pelo tratamento com α -manosidase, mas ainda assim *B. culicis* se ligou a essas proteínas, indicando que nestes casos o protozoário reconhece diretamente as proteínas.

Como foi relatado anteriormente, a colonização de *B. culicis* em fêmeas de *Ae. aegypti* não causa a morte do mosquito. Juntando esse fato aos resultados obtidos durante a investigação do perfil da distribuição de *B. culicis* nos diferentes órgãos do mosquito, parte deste estudo foi dedicado a avaliação da resposta imune de *Ae. aegypti* à presença de *B. culicis*. Assim, a expressão de fatores de transcrição como Rel1, Rel2 e STAT, e de efetores, como defensina A e TEP-1 foi avaliada no abdômem ao longo de onze dias após a alimentação dos mosquitos com os protozoários e no quinto dia no intestino médio. Embora os resultados aqui apresentados sejam preliminares, é possível perceber que a presença de *B. culicis* induz a expressão de Rel1 no abdômem dos mosquitos no 1º, 3º, 7º e 9º dias pós-alimentação, ao passo que a expressão desse efetor é silenciada no 5º dia, quando Rel2 foi o efetor induzido pela presença de *B. culicis*. Da mesma forma, essa alternância ocorreu no 11º dia pós-alimentação, quando os níveis de expressão de Rel1 diminuíram enquanto os de Rel2 aumentaram nos mosquitos alimentados com *B. culicis*. Classicamente, Rel1 integra a cascata Toll ao passo que Rel2 é um componente da cascata IMD e ambos podem levar à produção de AMPs, como por exemplo, defensina. Em *Ae. aegypti* Rel1 e Rel2 estão predominantemente

relacionados ao controle da transcrição dos AMPs cecropina e defensina e de moléculas anti-*Plasmodium*, como Tep-1 (Osta et al., 2004; Meister et al., 2005; Shin et al., 2005; Xi et al., 2008). Recentemente, Antonova e colaboradores (2009) demonstraram que a superexpressão de Rel2 induz constitutivamente a transcrição de defensina A no corpo gorduroso do mosquito, sugerindo que em *Ae. aegypti* a cascata IMD seja regulada por Rel2, culminando com a produção de defensina A. Os autores demonstraram ainda que essa superexpressão foi importante para o controle da infecção por bactérias (Gram positivas e negativas) e por *P. gallinaceum*. No caso de *B. culicis*, nem a expressão de Rel2 e nem de Rel1 foi acompanhada de um aumento na expressão de defensina A, com exceção do 11º dia pós-alimentação onde houve um aumento marcante na expressão desse AMP nos mosquitos infectados e que, por sua vez, coincide com a drástica diminuição dos protozoários no abdômen do mosquito determinada nos ensaios de colonização. Ainda assim, mosquitos não alimentados com *B. culicis* também apresentaram alta expressão de Rel2 no 11º dia que não foi corroborada pelo aumento da expressão de defensina no mesmo dia. Esses resultados, sugerem, então, que outro AMP, como cecropina, possa estar sendo produzido neste cenário. Tais resultados precisam ser melhor investigados com a realização de experimentos que elucidem a participação de outros AMPs, como cecropina, e de moduladores negativos das cascatas de sinalização Toll e IMD, como Cactus e Caspar, na resposta imune de mosquitos colonizados por *B. culicis*. Com relação à TEP-1, dois grandes aumentos da expressão desta opsonina foram observados no abdômen de mosquitos alimentados com *B. culicis*: um no 5º dia e outro no 11º dia, corroborando os aumentos observados em Rel2 nos mesmos dias. Correlacionando a presença de *B. culicis* no abdômen ao aumento de TEP-1, é possível inferir que o aumento deste efector na hemolinfa contribua para a acentuada diminuição dos protozoários observada no abdômen dos mosquitos no 11º dia. De acordo com a função de TEP-1 descrita na infecção por *Plasmodium*, a opsonina se deposita sobre a superfície dos protozoários presentes na hemolinfa de *Anopheles* (Levashina et al., 2001; Blandin et al., 2004; Frolet et al., 2006), induzindo sua fagocitose pelos hemócitos e isso poderia explicar a acentuada diminuição de *B. culicis* observada no abdomen neste momento da colonização.

STAT-1 é um fator de transcrição que transduz sinais da cascata de sinalização das quinases da família Janus (JAK). A cascata JAK/STAT foi

relacionada com a resposta imune de *Drosophila* e de *Ae. aegypti* à vírus (Dostert et al., 2005; Souza-Neto et al., 2009) e de *Anopheles* à bactéria (Barillas-Mury et al., 1999). Além disso, em larvas de *Drosophila* foi demonstrado que essa cascata participa da resposta celular através da regulação da diferenciação de pro-hemócitos (Krzemien et al., 2007) e proliferação dos hemócitos (Hanratty and Dearolf, 1993; Harrison et al., 1995). Nos mosquitos alimentados somente com Hank's a expressão de STAT-1 no abdômen foi muito alta em relação ao dia 0, ao passo que a alimentação com *B. culicis* inibiu drasticamente a expressão de STAT neste dia. Relacionando essa diferença na expressão de STAT com a presença de *B. culicis* no abdômen do mosquito, pode-se observar que os protozoários não chegam no abdômen no 1º dia pós-alimentação, mas de alguma maneira sua presença no sistema digestório modula a expressão de STAT. Contrariamente, no 5º e no 7º dia pós-alimentação, a presença do protozoário no abdômen foi detectada e aumentou a expressão deste efector em relação aos mosquitos controle. Gupta e colaboradores (2009) investigaram a participação de STAT na fase tardia da resposta inata de *Anopheles* contra *Plasmodium*, demonstrando que STAT regula a expressão de mediadores da resposta imune, como a oxido nítrico sintase, que reduzem a sobrevivência do protozoário. Embora os resultados aqui apresentados ainda sejam preliminares, os níveis de *B. culicis* detectados no intestino médio no 7º dia pós-alimentação são relativamente baixos se comparados ao 5º dia pós-alimentação e, considerando a possibilidade de STAT também regular a produção de óxido nítrico no epitélio intestinal durante a travessia de *B. culicis* em direção à hemocele, tal fato poderia explicar a queda de *B. culicis* no intestino e o concomitante aumento de STAT no abdômen observado no 5º e no 7º dias pós-alimentação. Em contrapartida, analisando a resposta imune no intestino médio no 5º dia pós-alimentação, a maior expressão detectada nos mosquitos alimentados com *B. culicis* foi a de Rel1. no caso dos outros moduladores avaliados, a presença de *B. culicis* diminuiu suas expressões.

Embora os resultados sobre a resposta imune de *Ae. aegypti* durante a colonização por *B. culicis* mostrados e discutidos neste trabalho necessitem ser confirmados futuramente, eles representam uma primeira abordagem imunológica no cenário da interação tripanosomatídeo/inseto hospedeiro e, somados aos resultados já publicados sobre esse modelo experimental, mostram que, apesar do protozoário ser reconhecido pelo sistema imune do mosquito, ambos, inseto e

protozoário, interagem e sobrevivem durante a colonização.

8- CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo principal investigar aspectos celulares e imunológicos na interação de insetos com microrganismos utilizando como modelo a interação de hemócitos de *Periplaneta americana* com microrganismos e seus produtos, bem como a interação de *Blastocrithidia culicis* com *Aedes aegypti*. Baseado nos resultados aqui apresentados, podemos concluir que:

1 – neutrófilos humanos são estimulados pela presença de diferentes espécies e formas evolutivas de *Leishmania* a liberarem redes extracelulares de DNA que contém histona e elastase;

2 - hemócitos de ninfas e machos adultos de *P. americana*, isolados ou na hemolinfa, liberam DNA quando estimulados por LPS completo ou detoxificado;

3 - o DNA liberado dos hemócitos forma estruturas semelhantes às NETs liberadas por neutrófilos humanos, sendo corado por intercalantes de DNA como DAPI, brometo de etídio e Sytox green;

4 - histonas (H3 e H1) são componentes das redes extracelulares formadas por *P. americana*;

5 - Bodipy® e Rhodamina Green® marcam as redes extracelulares evidenciando a presença de lipídeos neutros e proteínas juntamente com o DNA ao passo que Nile Red marca lipídeos que não participam das redes;

6 - DNA extracelular está associado aos nódulos de hemócitos estimulados com LPS *in vitro*, e as redes extracelulares aprisionam *E. coli*-GFP mas não *B. culicis*;

7 - o tratamento *in vivo* com DNase I aumenta o número de nódulos formados em insetos inoculados com *E. coli* e interfere com a distribuição dessas estruturas no abdômen dos insetos;

8 - o tratamento *in vivo* com DNase I embora diminua a população total de hemócitos circulantes na hemolinfa de insetos inoculados com diferentes doses de *E. coli*, aumenta a percentagem de hemócitos contendo bactérias circulando na subpopulação R3;

9 – No conjunto nossos resultados demonstram pela primeira vez que hemócitos de um inseto ancestral como a *Periplaneta americana* são capazes de morrer por ETose, e que as redes extracelulares são capazes de prender e matar bactérias. Descrevemos pela primeira vez que lipídeos também estão associados as redes de DNA extracelular de *P. americana*.

10 - *B. culicis* coloniza fêmeas de *Ae. aegypti* se distribuindo por todo o corpo do mosquito ao longo de 48 dias pós-alimentação;

11 - *B. culicis* reconhece e se liga a porção glicídica e protéica de proteínas presentes no extrato total das glândulas salivares e do intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*;

12 - a colonização de *B. culicis* modula a expressão de fatores de transcrição das cascatas Toll, IMD e JAK/STAT e de efetores, como defensina e TEP-1, na resposta imune de *Ae. aegypti*.

9- OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Nadaes NR, Danelli MG, Mazur C, Benjamim CF, Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH. *J Gen Virol*. 2010; 91:259-64.

Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. *PLoS One*. 2009; 29;4:e5733.

Development of a ligand blot assay using biotinylated live cells. De Almeida Dias F, Souza Dos Santos AL, Ferreira-Pereira A, Romeiro A, Teixeira Zimmermann L, Cunha do Nascimento MT, Correa Atella G, Saraiva EM, Linden R, Hampshire Lopes A. *J Biomol Screen*. 2007;12:1006-10.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altincicek, B, Stötzel, S, Wygrecka, M, Preissner, KT, Vilcinskas, A. 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection insects. *J Immunol.* 181:2705-2712.

Antonova Y, Alvarez KS, Kim YJ, Kokoza V, Raikhel AS. 2009. The role of NF-kappaB factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. *Insect Biochem Mol Biol.* 39:303-314.

Azevedo-Martins AC, Frossard ML, De Souza W, Einicker-Lamas M, Motta, MC.M. 2007. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. *FEMS Microbiol Lett.* 275: 229-236.

Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 37:1097-1106.

Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC. 1999. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18:959-967.

Barillas-Mury C, Paskewitz S, Kanost M. 2005. Immune Response of Vectors. Capítulo 27 In: *Biology of Disease Vectors.* 2th Edition. Edited by William Marquardt. Elsevier Academic Press

Bartholomay LC, Fuchs JF, Cheng LL, Beck ET, Vizioli J, Lowenberger C, Christensen BM. 2004. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 13:125-132.

Beckett, E.B. 1990. Development and ageing of the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes togoi* (Theobald) mosquitoes (Diptera:culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 19: 277-290.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J. & Sacks, D.L. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.* 188: 1941-1953.

Bian G, Shin SW, Cheon HM, Kokoza V, Raikhel AS. 2005. Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:13568-13573.

Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol.* 29:669-679.

Billingsley, PF. 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu. Rev. Ent.* 35: 219-248.

Billingsley, PF, Lehane, MJ. 1996. Structure and Ultrastructure of the insect midgut. In: *Biology of the Insect Midgut.* Billingsley, P.F. & Lehane, M.J. (ed). Published by Chapman & Hall, London. pp. 3-30.

Black, Kondratieff, 2005. Evolution of Arthropod Disease Vectors. Capitulo 2 In: Biology of Disease Vectors. 2th Edition. Edited by William Marquardt. Elsevier Academic Press

Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. 2004. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Cell. 116:661-670.

Brandão AA, Miranda A, Degraeve WM, Sousa, MA. 2000. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. Parasitol Res. 86:809-812.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303:1532-1535.

Brueske, WA. 1967. The diplosome of *Blastocrithidia culicis*. Ph.D. Dissertation, University of Minnesota, Minneapolis.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. Developmental and Comparative Immunology. 23: 329–344.

Camargo EP. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. Adv. Parasitol. 42:29-112.

Cárdenas W, Dankert JR, Jenkins JA. 2004. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. Fish Shellfish Immunol. 17:223-233.

Cerenius L, Söderhäll K. 2010. Coagulation in Invertebrates. J Innate Immun.

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol. 29:263-271.

Chang KP, Trager W. 1974. Nutritional significance of symbiotic bacterial in two species of flagellates. Science 183:531-532.

Chang KP. 1975. Reduced growth in *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* freed of intracellular symbionts by cloramphenicol. J. Protozool. 21:699-704.

Chapman RF. 1985. Structure of the Digestive System. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Kerkut G.A & Gilbert L.I. (ed), Vol. 4, Oxford and New York : Pergamon Press. pp. 165-211.

Chapman RF. 1998. The insect: Structure and Function. University Press, Cambridge.

Chicarro C, Alvar J. 2003. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97: 875-878.

Cho WL, Fu YC, Chen CC, Ho CM. 1996. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 26:395-402.

Christensen BM, Li J, Chen CC, Nappi AJ. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 21:192-199.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC. 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.* 298:159-165.

Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. 2004. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 198:127-148.

Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. 2009. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 129:126-131.

Corrêa-da-Silva MS, Fampa P, Lessa LP, Dos Reis Silva E, Dos Santos Mallet JR, Saraiva EM, Motta MC. 2006. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitol Res.* 99:384-391.

d'Avila-Levy CM, Melo AC, Vermelho AB, Branquinha MH. 2001. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. *FEMS Microbiol Lett.* 202:73-77.

d'Avila-Levy CM, Silva BA, Hayashi EA, Vermelho AB, Alviano CS, Saraiva EM, Branquinha MH, Santos AL. 2005. Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. *FEMS Microbiol Lett.* 252:279-286.

Dassanayake RS, Silva Gunawardene YI, Tobe SS. 2007. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized alpha/beta motifs. *Peptides.* 28:62-75.

De Souza W, Motta MCM. 1999. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 1-8.

De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT. 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell.* 3:581-592.

Devenport M, Jacobs-Lorena M. 2005. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. *Capitulo 22* In: *Biology of Disease Vectors.* 2th Edition. Edited by William Marquardt. Elsevier Academic Press.

Dias FA, Santos AL, Ferreira-Pereira A, Romeiro A, Zimmermann LT, Nascimento MTC, Atella GC, Saraiva EM, Linden R, Lopes AH. 2007. Development of a Ligand Blot Assay Using Biotinylated Live Cells. *J Biomol Screening*. 12:1006-1010.

Dimopoulos G, Richman A, Müller HM, Kafatos FC. 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:11508-11513.

Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J*. 17:6115-6123.

Donovan C. 1909. Kal-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Chonorrhinus*). *Lancet*. 177: 1195-1196.

Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, et al. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol* 6: 946–953.

Du Y, McLaughlin G, Chang KP. 1994. 16S ribosomal DNA sequence identifies of β -proteobacterial endosymbionts in the three *Crithidia* species. *J. Bacteriol*. 176: 3081-3084.

Dushay MS. 2009. Insect hemolymph clotting. *Cell Mol Life Sci*. 66:2643-2650.

Dwyer DM, Chang KP. 1976. Surface membrane carbohydrate alterations of a flagellated protozoan mediated by bacterial endosymbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:852-856.

Esteves MJG, Andrade AFB, Angluster J, De Souza W, Mundim MH, Roitman I, Pereira MEA. 1982. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. *Eur. J. Cell. Biol*. 26: 244-248.

Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. 2009. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun*. 1:181-193.

Fampa P, Corrêa-da-Silva MS, Lima DC, Oliveira SMP, Motta MCM, Saraiva EMB. 2003. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and respective insect cell lines. *Internt. J. Parasitol*. 33:1019-1026.

Faria-e-Silva PM, Sole-Cava AM, Soares MJ, Motta MC, Fiorini JE, de Souza W. 1991. *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989) n. comb.: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm. *J. Protozool* . 38: 489-494.

Faria-e-Silva PM, Fiorini JE, Soares MJ, Alviano CS, De Souza W, Angluster J. 1994. Membrane-associated polysaccharides composition, nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. *J. Euk. Microbiol*. 41:55-59.

- Fiorini JE, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, Brasil RP. 1989. Three new species of trypanosomatidae isolated in Alfenas, Minas Gerais, Brazil.. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 84: 69-74.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM. 2002. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. J Exp Biol. 205:2429-2451.
- Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Levashina EA. 2006. Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. Immunity. 25:677-685.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 176:231.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:15880-15885.
- Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. 2010. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. J Immunol. 185:4319-4327.
- Gibbs AJ. 1950. *Crithidia familiaris* n. sp. in *Cenaus carnifex* Fabr. (Hemiptera). Parasitology. 40:322-327.
- Gill JW, Vogel HJ. 1963. A bacterial endosymbiont in *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*: biochemical and morphological aspects. J. Protozool. 10:148-152.
- Gillespie JP, MR Kanost, T Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- Ghosh AK, Devenport M, Jethwaney D, Kalume DE, Pandey A, Anderson VE, Sultan AA, Kumar N, Jacobs-Lorena M. 2009. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the *Anopheles* saglin proteins. PLoS Pathog. 5:e1000265.
- Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 76:2802-2807.
- Gull K. 2001. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. Int J Parasitol. 31:443-452.
- Gupta L, Molina-Cruz A, Kumar S, Rodrigues J, Dixit R, Zamora RE, Barillas-Mury C. 2009. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. Cell Host Microbe. 5:498-507.

- Haine ER, Rolff J, Siva-Jothy MT. 2007. Functional consequences of blood clotting in insects. *Dev Comp Immunol.* 31(5):456-464.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:9813-9818.
- Hanratty WP, Dearolf CR. 1993. The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol. Gen. Genet.* 238:33-37.
- Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. 1995. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14:2857-2865.
- Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. 2007. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int J Parasitol.* 37:673-681.
- Higgs, Beaty. 2005. Natural Cycles of Vector-Borne Pathogens. Capitulo 14 In: *Biology of Disease Vectors.* 2th Edition. Edited by William Marquardt. Elsevier Academic Press.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284:1313-1318.
- Hoffmann JA. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 426:33-38.
- Hollar L, Lukes J, Maslov DA. 1998. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *J. Euk. Microbiol.* 45: 293-297.
- Imler JL, Hoffmann JA. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.,* 11, 304-311.
- Ingram GA, East J, Molyneux DH. 1984. Naturally occurring agglutinins against trypanosomatid flagellates in the haemolymph of insects. *Parasitology.* 89:435-451.
- James AA. 1994. Molecular and biochemical analysis of the salivary gland of vectors mosquitoes. *Bull. Inst. Pasteur.* 92:113-150.
- James AA. 2003. Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *J Exp Biol.* 206: 3817-3821.
- Jansen AM, Carreira JC, Deane MP. 1988. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83:271-272.
- Jomori T, Natori S. 1992. Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin. *FEBS Lett.* 296:283-286.

- Jomori T, Kubo T, Natori S. 1990. Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. *Eur J Biochem.*190:201-206
- Jones LD, Hodgson E, Williams T, Higgs S, Nuttall PA.1992. Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Med. Vet. Entomol.* 6:261-265.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell.* 119:329-341.
- Kanost MR. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol.* 23:291-301.
- Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* 2:256-267.
- Krzemien J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M. 2007 Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 46, 325–328.
- Kumar BA, Paily KP. 2008. Identification of immune-responsive genes in the mosquito *Culex quinquefasciatus* infected with the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. *Med Vet Entomol.* 22:394-398.
- Lackie AM.1988. Haemocytes Behaviour. *Advances in insect physiology.* 21:84-178.
- Lavine MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 32:1295-1309.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol.*11:105-128.
- Lemaitre B, Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.*25:697-743.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell.* 104:709-718.
- Liu CT, Hou RF, Ashida M, Chen CC. 1997. Effects of inhibitors of serine protease, phenoloxidase and dopa decarboxylase on the melanization of *Dirofilaria immitis* microfilariae with *Armigeres subalbatus* haemolymph in vitro. *Parasitology.* 115:57-68.
- Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, Hoffmann JA.1995. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 25:867-873.

- Lowenberger CA. 2001. Form, function and phylogenetic relationships of mosquito immune peptides. *Adv Exp Med Biol.*484:113-129.
- Lwoff M, Lwoff A. 1931. Recherches sur la morphologie de *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden et *Leptomonas fasciculata* Novy, Mac Neal et Torrey. *Arq. Zool. Exp. Gen.* 71: 21-37.
- Marmaras VJ, Lampropoulou M. 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.* 21:186-95.
- Matteoli FP, d'Avila-Levy CM, Santos LO, Barbosa GM, Holandino C, Branquinha MH, Santos AL. 2009. Roles of the endosymbiont and leishmanolysin-like molecules expressed by *Crithidia deanei* in the interaction with mammalian fibroblasts. *Exp Parasitol.* 121: 246-253.
- Mavrouli MD, Tsakas S, Theodorou GL, Lampropoulou M, Marmaras VJ. 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1744:145-156.
- McGhee RB. 1957. Infection of chick embryos by a *Crithidia* from a phytophagous hemipteron. *Science.* 125:157-158.
- McGhee RB, Hanson WL. 1962. Growth and reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J. Protozool.* 9:488-493.
- Meister S, Kanzok SM, Zheng XL, Luna C, Li TR, Hoa NT, Clayton JR, White KP, Kafatos FC, Christophides GK, Zheng L. 2005. Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.*102:11420-11425.
- Michel K, Kafatos FC. 2005 Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35:677-689.
- Morio F, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet JP, Ravel C. 2008. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J ClinMicrobiol.* 46:3845-3847.
- Motta MCM, Faria-e-Silva PM, Solé-Cava AM, Soares MJ, Fiorini JE, De Souza W. 1991. Morphological and Biochemical Characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas anglusteri*. *Can. J. Zool.* 69:571-577.
- Müller U, Vogel P, Alber G, Schaub GA. 2008. The innate immune system of mammals and insects. *Contrib Microbiol.* 15:21-44.
- Mundim MH, Roitman I, Hyermans MA, Kitajima EW. 1974. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *J. Protozool.* 21: 518-521.
- Mundim MH, Roitman I. 1977. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *J. Protozool.* 24: 329-331.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect.* 9:317-324.

Nappi AJ, Christensen BM. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 35:443-459.

Neeli I, Khan SN, Radic M. 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol.* 180:1895-1902

Novey FG, McNeal WJ, Toorey HN. 1907. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J. Infect. Dis.* 4: 223-276.

Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G, Dedet JP. 2002. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* sp. *Parasitology.* 124:17-24.

Oda LM, Alviano CS, Silva Filho FC, Angluster J, Roitman I, De Souza W. 1984. Surface anionic groups in symbiont-free strains of *Crithidia deanei*. *J. Protozool.* 31:131-134.

Okolo CJ, Jenni L, Molineaux DH, Wallbanks KR. 1990. Surface carbohydrate differences of *Glossina* salivary glands and infectivity of *Trypanosoma brucei* gambiense to *Glossina*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 70: 39-47.

Orr CWM, Hudson A, West AS. 1961. The salivary glands of *Aedes aegypti*. Histological-histochemical studies. *Can. J. Zool.* 39:265-272.

Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. 2004. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* 207:2551-2563.

Pacheco RS, Marzochi MCA, Pires MQ, Brito CMM, Madeira MF, Barbosa-Santos EGO. 1998. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatids of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93: 531-537.

Pai HH, Ko YC, Chen ER. 2003. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. *Acta Trop.* 87:355-359.

Palić D, Ostojić J, Andreasen CB, Roth JA. 2007. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology.* 31:805-16.

Pimenta PF, Turco SJ, Mc Conville MJ, Lawer PG, Perkins PV, Sacks DL. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sand fly midgut. *Science.* 256:1812-1815.

Podlipaev SA, Rokitskaya TA. 1999. Classification of isolate of insects trypanosomatids: isoenzymes analysis. *Parasitol (ST Petersburg).* 33:350-357.

Podlipaev SA. 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatids appears. *Int. J. Parasitol.* 31:648-652.

Ranque PH, Nourrit J, CNicoli RM. 1973. Recherches systematiques sur lês trypanosomatides. Lês stades évolutifs chez lês trypanosomatides. *Bull. Soc. Path. Éxot.* 67:377-387.

Rey L. 2001. Parasitologia. 3º edição. Guanabara Koogan.

Ribeiro JMC. 1995a. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4: 143-152.

Ribeiro JMC. 1995b. Insect Saliva: Function, Biochemistry and Physiology, In: *Regulatory Mechanisms in Insect feeding*. R.F. Chapman & Gerrit de Boer (ed). Chapman & Hall, New York. pp. 74-90.

Ribeiro JM, Charlab R, Pham VM, Garfield M, Valenzuela JG. 2004a. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:543-563.

Ribeiro JM, Andersen J, Silva-Neto MA, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG. 2004b. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:61-79.

Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK. 2006. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol.* 36:111-129.

Ribeiro JM, Arca B, Lombardo F, Calvo E, Phan VM, Chandra PK, Wikel SK. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 8:6-12.

Romoser WS. 1996. The Vector Alimentary System, In: *Biology of the Insect Midgut*. Parte III- Cap 18. Billingsley, P.F. & Lehane, M.J. (ed). Published by Chapman & Hall, London. pp. 298-317.

Ritsick DR, Edens WA, McCoy JW, Lambeth JD. 2004. The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. *Biochem Soc Symp.* 85-96.

Rozental S, de Carvalho TU, de Souza W. 1987 Influence of the endosymbiont on the interaction of *Crithidia deanei* with macrophages. *Microsc Electron Biol Celular.* 11:167-177.

Ruiz RC, Favoreto S, Dorta ML, Oshiro MEM, Ferreira AT, Manke PM, Yoshida N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoprotein with differential Ca²⁺ signaling activity. *Biochem. J.* 330:505-511.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 30:7:9.

- Santos DO, Bourguignon SC, Castro HC, Silva JS, Franco LS, Hespanhol R, Soares MJ, Corte-Real S. 2004. Infection of mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. *J Eukaryot Microbiol.* 51:570-574.
- Schaub GA. 1988. Parasite-host interrelationships of *Blastocrithidia triatomae* and triatomines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83:622-632.
- Schaub GA, Breger B. 1988. Pathological effects of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the reduviid bugs *Triatoma sordida*, *T. pallidipennis* and *Dipetalogaster maxima* after coprophagic infection. *Med. Vet. Entomol.* 2:309-318.
- Schaub GA, Schurr E, Reduth D. 1988. Isolation and separation of cysts and epimastigotes of *Blastocrithidia triatomae* (Cerisola et al., 1971, Trypanosomatidae). *J. Microbiol. Meth.* 7:277-284.
- Schaub GA, Boker CA, Jensen C, Reduth D. 1989. Cannibalism and coprophagy are models of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between triatomines. *J. Protozool.* 36:171-175.
- Schaub GA. 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol. Today* 10: 463-468.
- Shin SW, Kokoza V, Lobkov I, Raikhel AS. 2003. Relish-mediated immune deficiency in the transgenic mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2616-2621.
- Shin SW, Kokoza V, Bian G, Cheon HM, Kim YJ, Raikhel AS. 2005. REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.* 280:16499-16507.
- Snodgrass RE. 1959. The anatomical life of the mosquito. *Smithsonian Misc. Coll.*, Vol. 139, N° 8, Washington, D.C.
- Sousa MA, Corte-Real S. 1991. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 33:58.
- Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Nat Acad Sci USA* 106:17841–17846.
- Stark KR, James AA. 1996. The Salivary Gland of Disease Vectors, In: *Biology of the Insect Midgut.* Parte III- Cap 20. Billingsley, P.F. & Lehane, M.J. (ed). Published by Chapman & Hall, London. pp. 333-348.
- Sun D, Steele JE. 2001. Regulation of intracellular calcium in dispersed fat body trophocytes of the cockroach, *Periplaneta americana*, by hypertrehalosemic hormone. *J Insect Physiol.* 47:1399-1408.
- Takle GB. 1988. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol.* 51:64-72.

Thyssen PJ, Moretti Tde C, Ueta MT, Ribeiro OB. 2004. The role of insects (Blattodea, Diptera, and Hymenoptera) as possible mechanical vectors of helminths in the domiciliary and peridomiciliary environment. *Cad Saude Publica*. 20:1096-102.

Titus RG, Ribeiro JM. 1988. Salivary gland lysates from sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308.

Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*. 13:737-748.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 8:668-676.

Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 5(10):e1000639.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector-parasite interactions. 2009. *Acta Trop*. 110:137-47.

Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Francischetti, I.M.B. & Ribeiro, J.M.C. 2002a. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 32: 1101-1122.

Valenzuela, JG, Francischetti, IM, Pham, VM, Garfield, MK, Mather, TN & Ribeiro, JM. 2002b. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol*. 205:2843-64.

Valenzuela, J.G, Francischetti, I.M., Pham, V.M., Garfield, M.K. & Ribeiro, J.M. 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect. Biochem. Mol. Biol*. 33:717-32.

Valenzuela, J.G., Garfield, M., Rowton, E.D. & Pham, V.M. 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol*. 207:3717-29.

Vickerman, K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J. Parasitol*. 24: 1317-1331.

von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E. 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 111:3070-3080.

von Köckritz-Blickwede & Nizet V. 2009. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med*. 87:775-83.

- Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon HU. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 14: 949.
- Wallace, F.G. 1966. The trypanosomatids parasites of insects and arachnids. *Exp. Parasitol.* 18: 124-193.
- Wallace, F.G., Camargo, E.P., McGhee, R.B. & Roitman, I. 1983. Guide-lines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J. Protozool.* 30:308-13.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 184:205-13.
- Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsi P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, Loseva O, Mörgelin M, Iklé J, Cripps RM, Herwald H, Theopold U. 2010 Pathogen entrapment by transglutaminase--a conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathog.* 6:e1000763.
- Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Nadaes NR, Danelli MG, Mazur C, Benjamim CF, Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH. 2010. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol.* 91:259-264.
- Waterhouse RM et al. 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science.* 316:1738-1743.
- Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Walmsley SR, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH. 2010. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.* 185:2968-79.
- Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.* 151:820-829.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledón R, Campbell DA, Maslov DA. 2004. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology.* 129:537-47.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4(7):e1000098.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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