

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

Identificação da microbiota bacteriana e análise proteômica de trato digestivo de triatomíneos: aspectos da infecção por tripanosomatídeos

Marcia Ximena Gumiel Rocha

Tese apresentada à Coordenação do Curso de
Doutorado em Biologia Parasitária como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Patricia de Azambuja Penna

Rio de Janeiro

2016

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

G974 Gumiel Rocha, Marcia Ximena

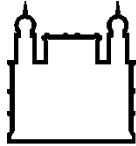
Identificação da microbiota bacteriana e análise proteômica de trato digestivo de triatomíneos: aspectos da infecção por tripanosomatídeos / Marcia Ximena Gumiel Rocha. – Rio de Janeiro, 2016.
vii, 183 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 111-130

1. Triatomíneos. 2. Microbiota. 3. Trato digestivo. 4. Tripanosomatídeos. 5. Eletroforese em gel de gradiente denaturante. 6. Pirosequenciamento. 7. Proteômica. I. Título.

CDD 595.754



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Parasitária

Marcia Ximena Gumiel Rocha

ORIENTADORA: Dra. Patricia de Azambuja Penna

Banca examinadora

Dra. Rafaela Vieira Bruno - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)

Dr. André Luis Rodrigues Roque (Instituto Oswaldo Cruz)

Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (Universidade Federal Fluminense)

Dr. Carlos Roberto Alves (Instituto Oswaldo Cruz)

Dr. Felipe de Mello Vigoder (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, Junho de 2016

*A Deus, meus tesouros Eugene e Fernando, meus amados Pais
Ramiro e Jenny!!*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos pesquisadores que conduziram este projeto de dissertação. A Dra. Patricia de Azambuja, minha orientadora, pesquisadora competente que conduziu de forma segura este projeto, muito obrigada pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABIFISI), pela paciência, confiança e tudo o apoio recebido. Ao Dr. Nicolas Carels, idealizador, pensador, entusiasta e por confiar em mim. Ao Dr. Fabio da Mota, por todo o conhecimento, dedicação e amizade. A Dra. Mariana Waghbi por ter me aberto as portas do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB) para o desenvolvimento deste trabalho, pelo seu profissionalismo, dedicação e pela sua inspiração contagiante. Cada um de seu modo aportou, intelectualmente para o enriquecimento deste trabalho. Muito obrigada por tudo!!

Um agradecimento especial ao Dr. Fernando Genta, Dra. Daniele Castro e Dr. Gustavo B. Rivas pelas suas contribuições e colaboração, assim como também a Dra. Patricia Cuervo, André Ferreira e Leticia Lery pelos conhecimentos e apoio recebido.

Aos colegas e pessoal administrativo da Pós-Graduação em Biologia Parasitária por toda a instrução, incentivo e ajuda que recebi nos últimos quatro anos.

Aos meus amados Fernando e meu doce Eugene por tanto amor, tanto apoio, tanta paciência, compreensão e por serem eles a motivação pela superação em todo instante. São o aire que me da vida. Amo muito!!

Aos meus pais, Ramiro (*in memorian*) e Jenny, meus anjos do céu e da terra, pelo exemplo, incentivo e refugio de sempre. A saudade é grande mas o amor é imenso. Sem o apoio deles nada disto seria uma realidade!

Aos meus amados irmãos, Ramiro e Jenny, pelos conselhos, por todo o apoio recebido, o amor não têm limites geográficos!

Um agradecimento especial ao pessoal dos laboratórios de Bioquímica, Imunologia e Fisiologia de Insetos: Fernando, Daniele, Peter, Catarina, Gerson, Tainá, Raquel, Bianca, Cecilia, Samara e o pessoal do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática.

À Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), plataforma de Espectrometria de Massas (RPT02A), Eletroforese 2D e Fraccionamiento (RPT02B), Eletroforese 2D (RPT02C – RJ), Sequenciamento de DNA (RPT01A) e a plataforma de Sequenciamento de DNA de Alta Geração do IOC.

Finalmente, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram para concretizar a finalização deste trabalho.

Muito obrigada!!

Marcia



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Identificação da microbiota bacteriana e análise proteômica de trato digestivo de triatomíneos: aspectos da infecção por tripanosomatídeos

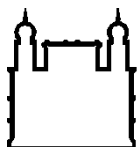
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marcia Ximena Gumiel Rocha

A doença de Chagas continua sendo um problema importante de saúde nos países em vias de desenvolvimento do Continente Americano. *Trypanosoma cruzi*, é o agente causal da doença podendo ser naturalmente transmitido aos humanos através das fezes de insetos da família Triatominae. Dentre as principais espécies destacam-se o *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*, sendo o primeiro também o vetor do *Trypanosoma rangeli*. O parasito ao ser ingerido pelo inseto sofre multiplicação e metaciclogênese, interagindo, portanto, com as diferentes bactérias da microbiota intestinal do inseto nos diferentes compartimentos do trato digestivo. Uma vez que esta interação pode ter um papel importante na epidemiologia da doença de Chagas através da competição com *T. cruzi*, é necessário caracterizar a microbiota bacteriana destes insetos. Neste contexto, a presente tese teve como objetivo caracterizar e comparar as comunidades bacterianas que compõem a microbiota do trato digestivo entre insetos coletados no peri-domicílio na localidade de Russas, Ceará, entre insetos procedentes de colônias de laboratório mantidos em diferentes tempos e entre *R. prolixus* infectados artificialmente com *T. rangeli*. Para isso, foram utilizadas técnicas independentes de cultivo baseadas na amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA. O DNA metagenômico permitiu acesar a informação do gene da Citocromo Oxidase I para caracterizar a taxonomia dos insetos procedentes do peri-domicílio e também para identificar a presença de *T. cruzi* (TcI e TcII) através do gene do mini-exon. Os resultados indicaram que a microbiota bacteriana destes insetos coletados no campo estava constituída principalmente de Proteobacteria e Actinobacteria e em menor proporção por Firmicutes e Bacteroidetes, independente da infecção por *T. cruzi*. O gênero *Serratia* (Filo Proteobacteria família Enterobacteriaceae) foi encontrado em todas as amostras analisadas. A composição da microbiota bacteriana em insetos mantidos em colônias de laboratório em diferentes tempos mostrou que bactérias do gênero *Serratia sp.* e actinobactérias diminuem nos insetos que permanecem por um tempo maior a 3 meses e bactérias do gênero *Arsenophonus* aumentam nos insetos que permanecem por um tempo de 3 a 5 anos. *R. prolixus* infectado com *T. rangeli* mostrou um aumento de membros da família Burkholderiaceae e diminuição das Enterococcaceae. Os resultados indicam que a microbiota bacteriana identificada nos triatomíneos de campo tem maior diversidade em relação aos insetos mantidos em Laboratório, onde predominam as bactérias intracelulares. A porcentagem de infecção encontrada nos triatomíneos coletados no peri-domicílio foi de 80% para *T. pseudomaculata* e 90 % para *T. brasiliensis*.

O trato digestivo dos insetos vetores nos quais *T. cruzi* interage, constitui um ambiente dinâmico que poderia afetar o desenvolvimento do parasito. Assim, outro objetivo da tese foi de identificar as proteínas que caracterizam o trato digestivo de ninfas de quinto estágio de *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus* e *Diptelogaster maxima* procedentes de colônias de laboratório. Para isso foi utilizada a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas MS/MS. A análise proteômica do trato digestivo dos triatomíneos revelou poucas proteínas em comum entre as quatro espécies, e muitas proteínas únicas para cada espécie, dentre as quais se encontravam proteínas de diversos componentes celulares e proteínas envolvidas nas diferentes atividades metabólicas, de digestão do sangue, estresse e detoxificação. Em conjunto os resultados desta tese contribuem com o conhecimento da microbiota bacteriana em triatomíneos e com informação proteômica de espécies de importância epidemiológica na doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Bacterial microbiota identification and proteomic analyses of triatomines digestive tract: aspects of infection by trypanosomatids

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marcia Ximena Gumiel Rocha

Chagas disease continues being an important health problem in developing countries of the American continent. *Trypanosoma cruzi*, is the causative agent of the disease and can be naturally transmitted to humans through the contact with insect infected fezes of the Triatomine family. Within main species *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans* stand out as main vectors of this disease, being the former an important vector of *Trypanosoma rangeli*. Once *T. cruzi* is ingested by the insect, parasites multiply and begin the metaciclogenesis interacting with bacterial communities of insect intestinal microbiota in the different compartments of digestive tract. Since these interactions may play a role in the epidemiology of Chagas disease by competing with *T. cruzi*, it is necessary to characterize the bacterial microbiota of these insects.

One of the main goals in this thesis was to characterize and compare the bacterial communities comprising gut microbiota between insects collected from peridomicile location in Russas, a city of the Ceará state, insects reared in laboratory conditions at different times and *R. prolixus* infected with *T. rangeli*. For this, independent culture methods based on the amplification of the 16S rRNA coding gene were applied. Metagenomic DNA allowed us to characterize peridomicile insects through Cytochrome oxidase I gene and to identify the presence of *T. cruzi* through miniexon gene (TcI and TcII).

DGGE results showed that bacterial microbiota in these insects was mainly comprised by Proteobacteria and Actinobacteria and in less proportion by Firmicutes and Bacterioidetes, independently from *T. cruzi* infection. *Serratia* (Proteobacteria: Enterococcaceae) was found in almost all samples analyzed. Bacterial microbiota in insects reared in laboratory conditions was composed mainly of *Serratia* sp., *Arsenophonus* and Actinobacteria varying in quantity along time of rearing. On the other hand, in *T. rangeli* artificially infected *R. prolixus* microbiota it was observed a high proportion of bacterial members belonging to the Burkholderiaceae family and less proportion of Enterococcaceae. These results show that bacterial microbiota identified in peridomicile triatomines have more diversity in relation to insects reared in laboratory, where intracellular bacteria predominates. The percentage of infection found in triatomines collected in peridomicile was 80% and 90 % for *T. pseudomaculata* and *T. brasiliensis* respectively.

The digestive tract of the insect vectors in which *T. cruzi* interacts constitutes a dynamic environment that could affect the development of the parasite. In this sense, another goal of the thesis was to identify what proteins characterize the digestive tract of fifth instar of *Diptelogaster maxima*, *P. megistus*, *T. infestans* and *R. prolixus* insects reared in laboratory conditions. For this purpose it was applied a Liquid Chromatography – Mass Spectrometry MS/MS-coupled proteomic approach that revealed few common proteins shared by the four species studied and many unique proteins for each one that comprised diverse cellular components and were involved in different metabolisms such as carbohydrates, lipids, energetic, blood digestion, stress and detoxification. Together the results of this thesis contribute to the knowledge of the bacterial microbiota and proteomic information in triatomine species of epidemiological importance of Chagas disease.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ l	microlitro
μ M	microMolar
16S rRNA	“16S Ribossomal Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucleico ribossômico)
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ATP	“Adenosine triphosphate” (Trifosfato de adenosina)
Barcoding	(Código de barras)
BHI	“Brain heart infussion” (Meio de cultura de cérebro e coração)
BLASTN	“Nucleotide basic local alignment search tool”
BLASTP	“Protein basic local alignment search tool”
Boostrap	(Técnica de reamostragem)
bp	“base pairs” (pares de bases)
BSA	“Bovine serum albumine” (Albumina de soro bovina)
CFU	“Colony forming units” (Unidades formadoras de colônia)
COI	“Cytochrome oxidase I” (Citocromo oxidasa)
DGGE	“Denaturing gradient gel electrophoresis” (Eletroforese em gel de gradiente denaturante)
DNA	“Desoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucleico)
DTU	“Discrete typing units” (Unidades discretas de tipagem)
EC	“Enzyme Comission for number enzymes”
EDTA	“Ethylendiamine tetraacetic acid ”
FDR	“False discovery rate”
GO	“Gene Ontology” (Ontologia gênica)
GST	“Glutathione S-transferase” (Glutathiona S-transferase)
GTR	“Generalised time reversible”
Hb	“Hemoglobine” (hemoglobina)
ID	Identificação
IEF	“Isoelectric focusing buffer” (Tampão de focalização isoelétrica)
JH	“Juvenile hormone” (Hormônio juvenil)

kDa	Kilodalton
kDNA	“Kinetoplastid DNA” (DNA do cinetoplasto)
KEGG	“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
LC	“Liquid chromatography” (Cromatografia líquida)
M	Molar
min	minutos
ml	mililitro
mM	miliMolar
MS/MS	“Mass spectrometry” (Espectrometria de massas)
MW/MM	“Molecular weight” (Massa molecular)
NAD	“Nicotinamide dinucleotide”
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
nm	nanometro
OTUs	“Operational taxonomic units” (Unidades taxonômicas operacionais)
ORF	“Open Reading frame”
PAGE	“Polyacrylamide gel electrophoresis” (Electroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	“Phosphate buffer solution” (Tampão salina fosfato)
PCR	“Polymerase Chain reaction” (Reação em Cadeia da Polimerasa)
PDBTM	“Protein Data Bank of Transmembrane Proteins”
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	“Potencial hidrogeniônico”
PI	“Isoelectric point” (Ponto isoelétrico)
PIKE	“Protein Information Knowledge Extractor”
PM	“Peritrophic membrane” (Membrana peritrófica)
PMM	“Perimicrovilar membrane” (Membrana perimicrovilar)
PSM	“Peptide Spectrum Matching”
RNA	“Ribonuclei acid”
ROS	“Reactive oxygen species” (Espécies reativas de oxigênio)
RPM	“Revolution per minute” (Revoluções por minuto)
s	segundos

SDS	“Sodium dodecyl phosphate” (Dodecil sulfato de sódio)
SDS	“Sodium dodecil phosphate”
STRAP	“Software Tool for Rapid annotation of Proteins”
TAE	“Tris acetate EDTA”
U	unidades
V1, V3, V6, V8	“Variable region” (Regiões variáveis 1,3,6,8)

ÍNDICE

Agradecimentos.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
Lista de siglas e abreviaturas	v
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Doença de Chagas.....	8
1.2 Triatomíneos	9
1.2.1. Principais triatomíneos de importância epidemiológica	10
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	11
1.4 Digestão	14
1.5 Insetos vetores e microbiota bacteriana	17
1.5.1 Métodos para a detecção da microbiota bacteriana	23
1.6 Proteínas	26
1.6.1. Proteínas de membrana	27
1.7. Análises proteômica	28
1.7.1 Metodologia em Proteômica.....	28
1.7.2 Identificação de Proteínas	30
1.7.3 Estudos proteômicos nos Triatomíneos	31
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo General	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. METODOLOGIA	39
4.1 Insetos procedentes de colônia	40
4.2 Cultura de <i>Trypanosoma rangeli</i>	40
4.3 Infecção de <i>R. prolixus</i> com <i>T. rangeli</i>	41
4.4 Coleta dos triatomíneos do ambiente peri-domiciliar	42
4.5 Dissecção dos espécimes	42

4.6 Extração de DNA metagenômico	42
4.7 Caracterização molecular dos triatomíneos coletados em ambiente peri-domiciliar	43
4.8 Caracterização molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> pela amplificação do gene mini-exon	43
4.9 Amplificação por PCR do fragmento do gene que codifica para o 16S rRNA para análise em DGGE	44
4.10 DGGE dos fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA e sequenciamento das bandas	45
4.11 Condições de PCR do gene que codifica para o 16S rRNA, clonagem e sequenciamento	46
4.12 Amplificação e pirosequenciamento pelo 454 da região variável do gene que codifica para o 16S rRNA	46
4.13 Preparação das amostras do trato digestivo e análise por proteômica por LC-MS/MS	47
4.13.1 Precipitação de proteínas	47
4.13.2. Dosagem de proteínas	48
4.14 Identificação das proteínas no LTQ-Orbitrap XL	49
4.17 Análises de dados de proteômica	49
5. RESULTADOS	52
5.1 Caracterização morfológica e molecular dos triatomíneos coletados no peridomicílio	56
5.2 Distribuição dos genótipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcI e TcII) em espécimes de <i>Triatoma</i> coletados no peridomicílio	59
5.3 Avaliação da especificidade do genótipo TcI ou TcII a partir do DNA metagenômico	60
5.4 Perfil de DGGE da microbiota bacteriana em espécimes de <i>Triatoma</i> obtidos de colônias mantidas por diferentes períodos de tempo em insetário após a coleta do inseto no campo	62
5.5 Perfis de DGGE da microbiota bacteriana nos espécimes de <i>Triatoma</i> coletados no peridomicílio	64
5.6 Filogenia e identificação de espécies bacterianas presentes no trato digestivo de <i>Triatoma</i> coletados no peridomicílio utilizando uma biblioteca constituída de clones dogeneque codifica para o 16S rRNA	64
5.7 Pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA e análise quantitativa da microbiota bacteriana do trato digestivo de <i>Triatoma</i> coletados no peridomicílio	68
5.8 Pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA e análises quantitativas da microbiota bacteriana do trato digestivo de <i>R. prolixus</i>	

infectados com <i>T. rangeli</i>	71
5.9 Proteínas identificadas	73
5.10 Comparações das proteínas identificadas entre espécies de triatomíneos (Diagrama de Venn)	76
5.11 Identificação de proteínas relevantes	77
5.11.1 Proteínas compartilhadas entre todas as espécies	77
5.11.2 Proteínas exclusivas de cada espécie	77
5.11.3 Destaque de duas proteínas das 15 identificadas em comum da tribo Triatomini	78
5.12 Análise de Gene Ontology (GO) para as categorias funcionais	78
5.13 Predição de atividades enzimáticas	80
5.14 Predição de enzimas envolvidas em vias metabólicas	81
5.15 Identificação de Proteínas transmembrana no trato digestivo dos triatomíneos	82
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	105
8. PERSPECTIVAS	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO 1	131
Artigo 1: Characterization of the microbiota in the guts of <i>Triatoma brasiliensis</i> and <i>Triatoma pseudomaculata</i> infected by <i>Trypanosoma cruzi</i> in natural conditions using culture independent methods	
ANEXO 2	149
Artigo 2: <i>Rhodnius prolixus</i> interaction with <i>Trypanosoma rangeli</i> : modulation of the immune system and microbiota population	
ANEXO 3	162
Artigo 3 publicado em colaboração: Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: As quatro espécies de triatomíneos utilizadas no presente estudo, ninfas de quinto estágio de <i>Dipetalogaster máxima</i> , <i>Panstrongylus megistus</i> , <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Triatoma infestans</i>	10
Figura 2: Ilustração dos compartimentos do trato digestivo de <i>Rhodnius prolixus</i>	15
Figura 3: Representação esquemática do gene que codifica para o 16S rRNA ilustrando as regiões variáveis (cinza) e as conservadas (verde)	24
Figura 4: A metodologia em um estudo proteômico envolvem extração de proteínas da amostra, separação por cromatografia líquida, ionização, análise e detecção de peptídeos e análise de dados	30
Figura 5: Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI da região mitocondrial de espécies de triatomíneos coletados no peri-domicílio	58
Figura 6: Porcentagem de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcI e TcII) observadas em <i>Triatoma pseudomaculata</i> e <i>Triatoma brasiliensis</i>	60
Figura 7: Árvore filogenética baseado em máxima verossimilhança construída com as sequências do gene mini-exon a partir das sequências de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
Figura 8: Gel de DGGE de fragmentos do gene bacteriano que codifica para o 16S rRNA amplificados a partir das amostras da microbiota intestinal de triatomíneos	63
Figura 9: Gel de DGGE de fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA da microbiota bacteriana de <i>Triatoma pseudomaculata</i> (Tp) e <i>Triatoma brasiliensis</i> (Tb) coletados no habitat peridoméstico (Russas, Ceará, Brazil)	66
Figura 10: Árvore filogenética baseada em máxima verossimilhança construída com as sequências do gene que codifica para o 16S rRNA da microbiota bacteriana do trato digestivo de triatomíneos: <i>Triatoma pseudomaculata</i> (Tp) e <i>Triatoma brasiliensis</i> (Tb) coletados no habitat peridoméstico (Russas, Ceará, Brazil)	67
Figura 11: Curva de rarefação das sequências do gene que codifica para o 16S rRNA da microbiota bacteriana do trato digestivo dos triatomíneos	70
Figura 12: Composição bacteriana identificada por pirosequenciamento pelo gene que codifica para o 16S rRNA do intestino anterior de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> sete dias após alimentação com sangue sem parasita	72
Figura 13: Distribuição teórica da massa molecular das proteínas identificadas pelo “shotgun”	74
Figura 14: Distribuição teórica do ponto isoelétrico das proteínas identificadas pelo “shotgun”	75
Figura 15: Distribuição teórica do peso molecular (KDa) em relação ao ponto isoelétrico das proteínas do trato digestivo identificadas de <i>Dipetalogaster máxima</i> (Dm), <i>Panstrongylus megistus</i> (Pm), <i>Rhodnius prolixus</i> (Rp) e <i>Triatoma infestans</i> (Ti)	75

Figura 16: Diagrama de Venn utilizando as elipses que mostra o número de proteínas identificadas pelo *software* “Pattern Lab for Proteomics” e os diagramas foram criados a partir da ferramenta *online* “Interactivenn” (<http://vis.icmc.usp.br/vicg/paper/638/interactivenn-a-web-based-tool-for-the-analysis-of-sets-through-venn-diagrams>) 76

Figura 17: Classificação da função molecular (GO) nas três categorias em porcentagem das proteínas identificadas dos triatomíneos 79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Variação do perfil de DGGE de <i>Triatoma brasiliensis</i> e <i>Triatoma pseudomaculata</i> coletados no peri-domicílio, detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> e estágio de desenvolvimento dos triatomíneos utilizados na identificação da microbiota bacteriana do trato digestivo	57
Tabela 2: Insetos utilizados na comparação de condições de campo e laboratório.....	62
Tabela 3: Gêneros bacterianos identificados por pirosequenciamento do gene que codifica para o16S rRNA das amostras de trato digestivo de espécimes de <i>Triatoma brasiliensis</i> (25Tb e 35Tb) e <i>Triatoma pseudomaculata</i> (17Tp e 19Tp), coletados no ecótopo peri-domiciliar, em Russas, CE	69
Tabela 4: Estimativas de diversidade e riqueza das amostras sequenciadas	71
Tabela 5: Número de peptídeos e proteínas identificadas pelo <i>PatternLab for Proteomics</i> e validadas segundo o princípio de máxima parcimônia	73
Tabela 6: Abundância de anotações e de atividades enzimáticas para cada uma das seis classes da comissão enzimática (EC) para as proteínas identificadas nos triatomíneos	81
Tabela 7: As cinco vias metabólicas mais abundantes em número de anotações e os respectivos números de atividades enzimáticas para cada espécie estudada	82
Tabela 8: Proteínas transmembranares anotadas.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

Carlos Chagas foi quem primeiro descreveu a doença de Chagas há mais de um século (1909). Pela primeira vez na história da medicina, e até os dias atuais, permanece com o mérito de ter sido um único cientista a descrever o ciclo completo do patógeno *Trypanosoma cruzi*, no inseto vetor, alternado com os hospedeiros vertebrados mamíferos, bem como as manifestações clínicas e epidemiológicas da doença (Kropf & Sá, 2009). Atualmente, a doença de Chagas continua sendo um problema de saúde Pública em países em vias de desenvolvimento nas Américas, sendo uma das maiores causas de miocarditis aguda e cardiomiopatia progressiva crônica em regiões endêmicas de América Latina (WHO, 2016).

Aproximadamente entre seis a sete milhões de pessoas acabam desenvolvendo esta parasitose e cerca de 28 milhões de pessoas se encontram em risco da infecção crônica (WHO, 2016). Uma das causas de dispersão da doença além dos limites geográficos dos países endêmicos é a migração de populações de áreas endêmicas e alguns modos de transmissão, tais como doações de sangue e órgãos (Liu & Zhou, 2015).

Na América Latina o protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é transmitido aos humanos, principalmente através das fezes de insetos vetores, os triatomíneos. Dependendo da região geográfica, a infecção pode ser adquirida por via transfusional, via congênita, acidentalmente no laboratório, através de transplantes ou por contaminação de alimentos através da via oral (Kropf, 2009). Deste modo, a prevenção primária da doença de Chagas tem sido concentrada na redução de contatos entre humanos e vetores, usualmente pelo uso de inseticidas de ação residual nas casas e ambientes peridomésticos, como galinheiros, depósitos de lenha e telhas além de outras estruturas que ficam ao redor das casas (Schofield & Dias, 1999). Embora esta estratégia tenha sido bastante efetiva contra espécies de triatomíneos domiciliadas, a transmissão do *Trypanosoma cruzi*, continua sendo um problema de Saúde Pública, devido a re-infestação nas casas pelas espécies que normalmente habitam o ambiente peridoméstico ou silvestre (Abad Franch e col., 2013; Carrasco e col., 2014; Dias e col., 2016).

1.2 Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos da ordem Hemiptera, da Subordem Heteroptera, família Reduviidae, sub-família Triatominae encontrados desde o sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile (Schofield & Galvão, 2009). No Brasil, são vulgarmente denominados como barbeiro, chupão, procotó, chupança, vum vum, bicho da parede e piolho de piaçaba (Lenko & Papavero, 1979).

Os Triatomíneos são alados na fase adulta, enquanto as ninfas de primeiro a quinto estádios não possuem asas. São caracterizados como hemimetábolos, portanto, de metamorfose incompleta (Grimaldi & Engel, 2005). Habitam diferentes ecótopos como silvestre, peri-domiciliar e domiciliar podendo ser encontrados em diversos locais como rochas, telhas, palmeiras e outros nichos. Em decorrência do desmatamento e colonização vertiginosos, há um desequilíbrio de fauna, resultando na redução de fontes de alimento e, portanto na migração dos insetos para áreas peridomiciliares ou domiciliares. Nestes ecótopos peri-domiciliar e domiciliar, os insetos são encontrados principalmente nas fendas de cabanas de pau a pique e em locais onde os animais domésticos se albergam, levando a uma sobreposição de ciclos de transmissão do *T. cruzi* silvestre, doméstico e peri-doméstico (Sarquis e col., 2012).

Seu ciclo biológico compreende as fases de ovo, ninfas de primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto estádios e adulto. Dependendo da espécie, o tempo médio de vida dos triatomíneos é de dois anos. Seu tamanho varia de 5,0 mm em *Alberprosenia goyovargasi* Martinez e Carcavallo, 1977 a 44,0 mm em *Dipetalogaster maxima* Uhler, 1894 (Dujardin e col, 2000). Estes insetos, alimentam-se de sangue em todos os estádios ninfais e no estagio adulto e dependem deste processo para completar os estádios de muda e ecdise (Lent & Wygodzinski, 1979). Seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos (olhos compostos), ocelos (olhos simples), as antenas. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, como as pernas e as asas. O abdome inclui a maior parte dos órgãos internos do aparelho reprodutor, digestivo e excretor (Grimaldi & Engel, 2005). Além da presença dos pares de asas anterior e posterior, os adultos diferenciam-se das ninfas pela presença de ocelos e genitais bem desenvolvidos. A fêmea adulta é facilmente reconhecida pelo ápice abdominal truncado, enquanto no macho esta estrutura se mostra arredondada.

Geralmente as fêmeas são maiores que os machos. Entre as ferramentas utilizadas para a taxonomia baseada em aspectos morfológicos destacam-se a estrutura geral do corpo, tamanho e posição das antenas, asas, cabeça e genitália. O tamanho do inseto, a coloração do corpo e o conexivo são as características mais aparentes na identificação morfológica (Lent & Wygodzinski, 1979).

1.2.1 Principais triatomíneos de importância epidemiológica

Na sub-família Triatominae mais de 140 espécies foram descritas (Gurgel-Gonçalves e col., 2012) embora poucas espécies são vetores competentes para o *T. cruzi*. A sub-família Triatominae compõe-se de tribos, entre as quais temos *Rhodniini* e *Triatomini* (Schofield, 2000) como os gêneros representativos dos Triatomíneos; *Rhodnius* e os gêneros *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* e *Triatoma* respectivamente (Figura 1).



Rhodnius prolixus
Ninfa quinto estágio
Foto: Gutemberg Britto



Dipetalogaster maxima
Ninfa quinto estágio
Foto: www.zoo-wupertal.net



Panstrongylus megistus
Ninfa quinto estágio
Foto: <http://www.icb.usp.br>



Triatoma infestans
Ninfa quinto estágio
Foto: biologia.laguia2000.com

Figura 1. As quatro espécies de triatomíneos utilizadas no presente estudo. Ninfas de quinto estágio de *Dipetalogaster máxima*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*.

No presente estudo foram utilizadas as espécies mais representativas em estudos de laboratório *P. megistus*, *D. maxima*, *R. prolixus* e *T. infestans* (Figura 1). Entre os vetores de maior importância epidemiológica na transmissão da Doença de Chagas nos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai) estão o *Triatoma infestans* (Klug, 1834),

que apesar de ter sido controlado no Brasil, recentemente foi descrita sua presença no estado da Bahia no Brasil (Araújo RF e col., 2014).

Pastrongylus megistus Burmeister, 1835, por outro lado possui uma ampla distribuição no Brasil (Gurgel-Gonçalves e col., 2012; Santos Jr e col., 2013; Cavassin e col., 2014), e representa um risco potencial de doença de Chagas humana pois, além de ser encontrado em ecótopos domiciliares, também foi observada a presença de flagelados morfológicamente similares a *T. cruzi* (Maeda e col., 2012; Lima AF e col., 2012).

Apesar de *Dipetalogaster maxima* Uhler, 1894, não possuir ampla distribuição quando comparado com as outras espécies, ele é recomendado para estudos de xenodiagnóstico na doença de Chagas, visto que é facilmente infectado e produz grande volume de flagelados nas fezes (Marsden, 1986). É uma das espécies de maior tamanho dentro dos triatomíneos. Entretanto, *Dipetalogaster máxima*, não tem sido uma espécie diretamente implicada na transmissão do *T. cruzi* nos humanos (Guzmán-Bracho, 2001; Jiménez e col., 2003).

Rhodnius prolixus é um vetor encontrado em regiões da América Central e do Sul, além de ser um importante inseto modelo em estudos de fisiologia e bioquímica. Esta espécie constitui também vetor importante responsável pela transmissão de *Trypanosoma rangeli*, além do *T. cruzi* (Hashimoto & Schofield, 2012; Fellet e col., 2014; Vallejo e col., 2007).

1.3 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

O *T. cruzi* (Chagas, 1909), assim como o *T. rangeli* (Tejera, 1920), são protozoários flagelados pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (Stevens e col., 1999). As principais características destes parasitas são: i) a presença do cinetoplasto, uma organela localizada na base do flagelo que contém o DNA mitocondrial, também chamado de kDNA (Vickerman, 1976), ii) a compartimentalização da glicólise dentro de um microcorpo chamado “glicosoma” (Michels & Hannabert, 1994) e iii) o processo de *trans-splicing* pelo qual uma sequência curta e conservada de RNA, chamada *spliced leader* ou *mini exon*, é adicionada pós-transcricionalmente a todos os RNA mensageiros (Murphy e col., 1986).

T. cruzi é um protozoário hemoflagelado, parasitário de seres humanos e de outros hospedeiros vertebrados mamíferos, além dos triatomíneos que servem como hospedeiros invertebrados (Brisse e col., 2001). Esta espécie de tripanosomatídeo tem várias fases de desenvolvimento, tanto nos insetos vetores como nos hospedeiros mamíferos. Os insetos são infectados ao sugar o sangue de mamíferos com parasitos circulantes (tripomastigotas sanguíneos). No intestino médio do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas os quais se multiplicam por sucessivas divisões binárias. No intestino posterior, epimastigotas sofrem metaciclogênese, e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais, em adição aos epimastigotas e formas intermediárias, são liberados juntamente as fezes e urina (Garcia & Azambuja, 1991). O fato da excreção ocorrer principalmente durante ou logo após o repasto sanguíneo, facilita o contato com as fezes e assim possibilitar a infecção de novos hospedeiros vertebrados. A infecção de um hospedeiro mamífero decorre da penetração dos tripomastigotas metacíclicos na pele ou em mucosa oral, quer seja pela ingestão do inseto inteiro, ou do alimento contaminado. Inicialmente, no vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem os macrófagos locais e se diferenciam em amastigotas, que se replicam intensamente por divisões binárias, os quais posteriormente se diferenciam em tripomastigotas no interior das células. Estas células ao serem lisadas, liberam novos parasitas que através da corrente sanguínea infectam as células teciduais, principalmente as células musculares e ganglionares. O ciclo de transmissão é concluído quando tripomastigotas circulantes são retomados em refeições de sangue por triatomíneos e podendo assim completar o seu desenvolvimento no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (Brenner, 1972; Tyler & Engman, 2001).

T. cruzi pode ser isolado de uma variedade de hospedeiros mamíferos silvestres, animais domésticos, humanos e triatomíneos. Estes, quando isolados apresentam diferentes taxas de infectividade, patogenicidade e virulência (Roellig & Yabsley, 2010; Espinoza e col., 2010). A variação genética e fenotípica das diversas cepas de *T. cruzi* possibilitou o uso de marcadores moleculares para sua classificação. Inicialmente, foi considerada a classificação baseada em genes mini-exon (TcI, TcII and Z3) (Espinoza e col., 2010). No entanto, criaram uma reclassificação de *T. cruzi*, baseada em novos marcadores moleculares, separando o parasito em “Discrete Typing Units” (DTUs). Nesta nova classificação, TcI foi mantido como grupo, mas houve divisão do grupo TcII em cinco subtipos identificados pelas letras “a” até “e” (Zingales e col., 2012). Mais recentemente, a classificação de DTUs se refere simplesmente como TcI, que se mantém ainda como

característica uniforme do primeiro grupo, mas separando TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI (Anonymous 1999; Zingales e col., 2009; Zingales e col., 2012; Araújo CA e col., 2014) e *Tcbat* um genótipo descrito recém em humanos que está associado a morcegos (Ramirez e col., 2014; Lima e col., 2015).

Outro aspecto da infecção parasitária em triatomíneos que requer atenção é a interação entre *T. cruzi* e a microbiota bacteriana intestinal dos vetores. Há evidências de que a composição bacteriana pode afetar a capacidade vetorial na transmissão do parasita (Tchioffo e col., 2013). A citotoxicidade da *Serratia marcescens*, uma espécie de bactéria Gram-negativa, contra o *T. cruzi* foi sugerida *in vitro* como demonstrada diretamente *in vivo* em *R. prolixus* (Azambuja e col., 2005a; Garcia e col., 2010; Castro e col., 2012). Neste último modelo experimental, o tratamento dos insetos com antibióticos, visando diminuir a microbiota bacteriana, permitiu um maior crescimento de *T. cruzi* (Castro e col., 2012).

Além de *T. cruzi*, *T. rangeli* também é um protozoário heteroxeno que alterna seu ciclo de vida no triatomíneo vetor além dos hospedeiros vertebrados. A questão da patogenicidade desta espécie aos humanos é controversa (Coura e col., 1996), mas sabe-se que é patogênico para os triatomíneos (Grewal, 1957; Tobie, 1970; Añez, 1984). *T. rangeli* foi incluído no subgênero *Herpetosoma* (Hoare, 1972; Levine, 1994; Guhl & Vallejo, 2003) e como sofre a metaciclogênese nas glândulas salivares, é transmitido principalmente pela picada do inseto vetor. Os estudos de filogenética molecular dos tripanosomas mostraram que apesar de *T. rangeli* ser transmitido através da saliva, ele se posiciona junto com as espécies do subgênero *Schizotrypanum* o qual pertence à secção *Stercoraria* ao igual que *T. cruzi*. (D'Alessandro & Saraiva, 1992; Stevens e col., 1999; Stevens & Brisse, 2004; Telleria & Tibayrenc, 2010).

A importância epidemiológica do *T. rangeli* reside no fato deste parasita exibir características biológicas e distribuição geográfica muito semelhante a *T. cruzi* (De Leon, 1952) facilitando assim a possibilidade de co-infecção do hospedeiro por ambas as espécies de parasitas. Além disso, *T. rangeli* estimula uma reação sorológica cruzada com *T. cruzi*, dificultando assim o diagnóstico da doença de Chagas (de Moraes e col., 2008).

1.4 Digestão

As funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações, pois os representantes da classe Insecta estão adaptados a uma variedade de habitats e hábitos alimentares e porque o aparelho digestivo representa uma das principais interconexões entre o meio interno do inseto e seu meio ambiente. Portanto se torna uma fonte promissora de alvos para ser explorada em técnicas de controle baseadas na biologia dos insetos, especialmente nos insetos transmissores de patógenos.

O trato digestivo de insetos tem uma estrutura similar entre as diferentes ordens, no entanto, diversas modificações foram associadas ao tipo de alimentação. Basicamente, o trato digestivo tem três regiões primárias, o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (Engel & Moran, 2013; Terra, 1990). Em triatomíneos, o intestino anterior é composto pelo cibário, faringe e esôfago, intestino médio (intestino médio anterior ou “estômago” e intestino medio posterior ou “intestino”, este com aparência de um tubo delgado) e finalmente o intestino posterior (composto pela ampola retal e o reto) (Figura 2) (Garcia e col., 2010). As diferentes regiões do trato digestivo possuem especializações e são responsáveis por diferentes aspectos fisiológicos. A região do trato digestivo onde é armazenada o sangue e onde ocorre a lise dos eritrócitos é no “estômago” (Kollien & Schaub, 2000). Nesta porção também se encontra uma quantidade maior de simbiontes, principalmente actinomicetos e bactérias Gram negativas, as quais participam do processo digestivo do sangue e o fornecimento de nutrientes (Eichler & Schaub, 1998; Eichler & Schaub, 2002). Interessantemente, após a alimentação, a população de simbiontes pode aumentar nas diferentes porções do trato digestivo em até cerca de 10^9 unidades formadoras de colônia (“*colony-forming units*”, cfu). O sangue ingerido passa posteriormente em pequenas quantidades à parte digestiva e absorptiva do “intestino”. No intestino médio, após o repasto sanguíneo vários eventos fisiológicos são iniciados, tais como o rápido transporte de água e os íons para a hemolinfa e túbulos de Malpighi, digestão de proteínas e carboidratos, o que faz deste órgão um ambiente altamente nutritivo e propício ao crescimento de microrganismos. É, portanto, local porta de entrada de patógenos e de maior vulnerabilidade dos vetores (Azambuja e col., 2004). No reto ficam contidas as fezes e urina para serem eliminadas posteriormente (Terra & Ferreira, 1994).

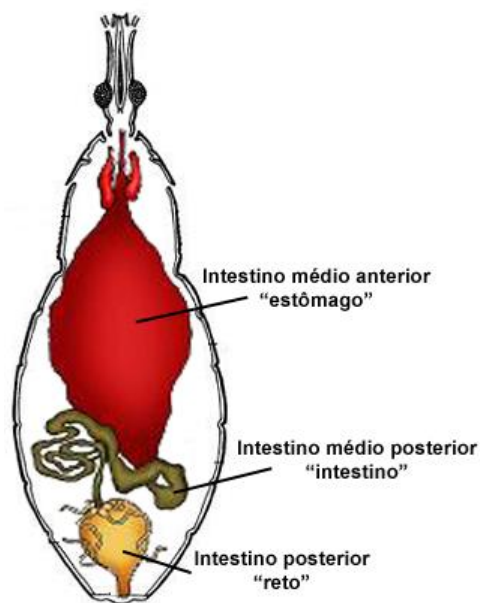


Figura 2. Ilustração dos compartimentos do trato digestivo de *Rhodnius prolixus*

Ainda em relação ao intestino médio, sabe-se que este é formado por células endodérmicas, as quais estão cobertas por um epitélio que permite aumentar a superfície de contato para a absorção das moléculas digeridas, enquanto a porção do intestino anterior e posterior é originada por células ectodérmicas, composta por quitina e proteínas denominadas glicoproteínas (Lehane, 1997). Os Diptera, após o estímulo da alimentação sanguínea, sintetizam no intestino médio a formação de uma membrana peritrófica (PM) constituída de quitina, proteínas e glicosaminoglicanos que envolve o bolo de sangue ingerido (Lehane, 1997). Os Hemiptera, são desprovidos de PM, entretanto, apresentam uma estrutura denominada de membrana perimicrovilar (PMM), a qual se deposita em camadas sobre as microvilosidades características das células epiteliais do intestino médio (Gonzalez e col., 2006; Gonzalez e col, 2011). Esta estrutura é responsável por proteger o inseto dos danos mecânicos, contra patógenos invasores da parede intestinal e de toxinas provenientes da alimentação (Alvarenga e col., 2015).

Todavia, o papel específico da PMM ainda não foi completamente detalhado, mas há indicações de que tenha funções na digestão, interação com *T.cruzi* no epitélio intestinal e de regulação da resposta imune nos diferentes tecidos (Lehane, 1997; Gonzalez e col., 2006; Terra, 1996; Vieira e col. 2014; 2016). Neste sentido, um trabalho mostra que a membrana perimicrovilar pode atuar envolvendo o alimento ingerido e assim separar o conteúdo luminal em dois compartimentos, espaço endoperitrófico (dentro da membrana) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana) (Terra, 1996). Assim o processo digestivo

neste caso ocorre em três fases: inicial, intermediária e final. Conforme o sangue vai passando gradualmente desde o estômago ao intestino posterior, a coloração de vermelha a marrom indica o início da digestão da hemoglobina. Este processo também é acompanhado da diminuição da densidade populacional dos simbioses encontrados no trato digestivo (Balczun e col., 2012).

Fundamentado nesses resultados, foram estudados os componentes (moléculas como as enzimas) e fatores que influenciam a digestão nos diversos compartimentos do trato digestivo (Terra e col., 1979; Terra & Ferreira, 1994). Desta forma se conhece que no intestino anterior dos Diptera, Lepidoptera, Phthiraptera, além de outras ordens, as enzimas digestivas mostram ter um pH no intestino médio altamente alcalino (pH 9-12), enquanto no intestino dos Heteroptera, o pH observado foi ácido (pH 4.5-5). Alguns estudos que caracterizaram as fases da digestão nos compartimentos do trato digestivo de larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Nematocera) (e.g. Terra e col., 1979) foram fundamentais para desencadear o início de pesquisas sobre a distribuição de enzimas digestivas no trato digestivo dos insetos.

A fisiologia digestiva nos insetos hematófagos da ordem Hemiptera é diferente comparada com insetos da ordem Diptera e Phthiraptera. Nos mosquitos e piolhos as enzimas responsáveis pela digestão são do tipo serino-proteínases, enquanto nos triatomíneos são do tipo aspartato ou cisteino proteases (Lehane, 1994). Em *R. prolixus*, Gooding (1969) encontrou uma proteína no intestino que apresentava uma atividade máxima no pH de 5 e que posteriormente foi caracterizada como uma catepsina B-like e uma catepsina D-like (Houseman & Downe, 1980; Houseman & Downe, 1982; Terra e col., 1988a). Estas proteases acídicas, junto com outras como a carboxi peptidase e amino peptidase foram caracterizadas também em *Triatoma phyllosoma pallidipennis* e *T. infestans* (Houseman & Downe, 1981; Kollien e col., 2004).

Os insetos hematófagos ingerem grandes quantidades de sangue. Os triatomíneos não são a exceção, onde um inseto chega a ingerir de três a cinco vezes o peso de seu corpo em cada refeição sanguínea. A hemoglobina resulta a maior fonte de proteína e consequentemente a sua digestão leva a uma grande liberação de uma molécula denominada heme no lúmen intestinal (Pascoa e col, 2002). No entanto, em seu estado livre, esta molécula age como oxidante, participando na formação de radicais livres (Ryter & Tyrrel, 2000). A ação de heme é capaz de promover a oxidação de biomoléculas tais

como ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (Haliwell & Gutteride, 1990). Desta reação resultam radicais hidroxilas, que reagem com varias biomoléculas capazes de desestruturar os fosfolipídios de membrana, rompendo sua integridade física e, portanto, levando a lise celular (Schmitt e col., 1993).

Em *R. prolixus*, o sangue ingerido é armazenado no estômago, onde a água é absorvida e os eritrócitos são lisados. A digestão de proteínas nos triatomíneos se inicia no lumen do intestino, pela ação de enzimas digestivas: proteases ácidas: Catepsina B-D-L, carboxi peptidase e amino peptidase (Houseman & Downe, 1980; Houseman & Downe 1982; Terra e col., 1988). Os oligopeptídeos resultantes da digestão da hemoglobina são transportados no espaço perimicrovilar, cujos produtos são posteriormente digeridos por dipeptidases e depois absorvidas. Por outro lado, no intestino posterior ocorre a excreção de produtos provenientes do intestino médio e dos túbulos de Malpighi (Terra & Ferreira, 1994). Além disso, os fatores antimicrobianos da resposta do sistema imune como lisozima, defensinas e prolixicina, assim como também outras proteases, formam parte dos componentes fisiológicos do inseto (Boulanger e col., 2006).

1.5 Insetos vetores e microbiota bacteriana

O estudo de insetos transmissores de doenças tem facilitado uma melhor compreensão da complexidade dos organismos como sistemas vivos (Minard e col., 2013) e mudar nosso entendimento sobre estratégias que podem determinar a interrupção da transmissão do agente biológico ou a erradicação do vetor (Dennison e col., 2014). Como uma parcela de indivíduos, considerando a maioria dos insetos, podem apresentar maior resistência a certos inseticidas normalmente utilizados, os métodos de controle de vetor e parasitas necessitam ser constantemente aprimorados. Em virtude destas dificuldades, outras estratégias de controle de insetos têm sido desenvolvidas, como por exemplo, a transformação genética do inseto através de elementos móveis de DNA, resultando em insetos transgênicos (Beard e col., 2002). Também é possível expressar um produto de um gene no inseto hospedeiro através de bactérias transformadas resultando em um inseto para-transgênico (Beard e col., 2002). Deste modo, à luz da crescente tecnologia que permite identificar microrganismos em um sistema complexo, existe a necessidade de identificar os membros bacterianos que compõem o trato digestivo dos insetos. Estes estão envolvidos nas mudanças evolutivas e fisiológicas do vetor hospedeiro para, assim,

propiciar novas abordagens que possam resolver o problema da transmissão de parasitas causadores de doenças aos homens e animais.

Até recentemente, a maioria dos estudos relacionados à microbiota bacteriana intestinal dos triatomíneos utilizavam técnicas dependentes de cultura, levando por tanto, ao pouco conhecimento da verdadeira diversidade (Azambuja e col., 2005a, Hypsa & col. 1997). Por outro lado, muitos trabalhos vêm sendo realizados com Diptera (Denison e col., 2014, Bahia e col., 2014), em geral com mosquitos de importância médica, mas não se pode generalizar as conclusões obtidas, pois ainda que sejam insetos hematófagos, guardam características fisiológicas e imunológicas distintas dos triatomíneos.

Em insetos, as bactérias encontradas no trato digestivo, podem ser divididas em dois grupos, simbioses “obrigatórias ou primárias” e simbioses “facultativas ou secundárias”. Sabe-se que a simbiose obrigatória é uma relação mutuamente vantajosa entre dois organismos vivos de espécies diferentes, sendo essencial para o processo co-evolutivo (Madigan e col., 2010). Algumas relações simbióticas são tão específicas que uma espécie não é capaz de sobreviver sem a outra. Os simbioses obrigatórios são exclusivamente ou predominantemente transmitidos verticalmente, na qual a progenitora passa os microrganismos aos ovos com alta fidelidade, podendo ser por infecção trans-ovariana. Estes microrganismos suplementam seus hospedeiros com nutrientes habitualmente deficientes na dieta ou que não são produzidos pelo organismo hospedeiro em quantidade suficiente para seu pleno desenvolvimento (Genkai-Kato & Yamamura, 1999). Os estudos de reconstrução filogenética mostraram que estas relações simbióticas primárias envolvendo hospedeiros-microrganismos são antigas e resultantes de co-dependência metabólica entre as espécies envolvidas (Douglas, 1998). Assim, como tem sido demonstrado, durante a longa história de co-evolução com seus hospedeiros, os genomas dos simbioses primários passaram por reduções drásticas de tamanho, perdendo genes inclusive considerados necessários para o simbiote procarioto (Moran & Bennett, 2014).

Um exemplo de simbiote primário bem caracterizado em inseto é a *Sulcia muelleri* isolada de *Auchenorrhyncha*, cuja associação tem registro em 270 milhões de anos. *Buchnera aphidicola*, o simbiote primário de afídeos, outro exemplo já bem estudado, tem demonstrado ser capaz de sintetizar diversos aminoácidos que são requeridos para o metabolismo do afídeo. A ausência desta bactéria nos afídeos resulta em uma fecundidade e sobrevivência extremamente baixa (Moran e col., 2005; Ferrari e Vavre, 2011). Alguns

simbiontes não só conferem um efeito nutricional (Feldhaar e col., 2007; Minard e col., 2013; Montllor e col., 2002), como podem também promover proteção contra invasão contra patógenos ou predadores. Um exemplo é a bactéria *Spiroplasma*, um dos simbiontes da *Drosophila neotestacea*, que confere proteção contra um verme nematódeo (Hamilton e col., 2014; Pais e col., 2008). Neste modelo de estudo, a razão da proteção é conferida pela toxina codificada por um bacteriófago lisogênico carregado pelo simbionte e oferece proteção ao inseto contra infecções pelo verme. (Ferrari & Vavre. 2011).

Em contraste com os simbiontes obrigatórios, as espécies de simbiontes secundários encontradas em indivíduos de uma espécie usualmente variam em frequência. Esta observação sugere que a manutenção dos simbiontes resulta do balanço entre o custo e o benefício, tornando assim as frequências das espécies de microorganismos variadas em populações de artrópodes. A vantagem que estes simbiontes podem conferir geralmente depende do ambiente, de tal forma que o benefício pode variar no espaço e no tempo, o qual acaba por contribuir para a manutenção do polimorfismo (Ferrari & Vavre, 2011). Assim, os simbiontes secundários poderiam representar uma fase intermediária, adquirindo um estilo de vida autônomo (em que os microorganismos são transmitidos através do meio ambiente ou verticalmente) e um estilo de vida no qual se torna vantajoso para seu hospedeiro.

Embora os efeitos dos simbiontes secundários sobre os patógenos naturais de alguns insetos hospedeiros sejam bem estudados, existe também evidência de que eles afetem as interações com outros organismos, como por exemplo, com as plantas hospedeiras de insetos herbívoros. O afídeo da ervilha *Acyrtosiphon pisum*, é composto por diferentes populações de insetos adaptados e especializados ao gênero e a espécies de plantas (Hendry e col., 2016). Estas populações de insetos hospedeiros tendem a levar diferentes espécies de simbiontes secundários, sugerindo que os simbiontes podem desempenhar um papel ativo na especialização de determinadas plantas. Em alguns casos, o afídeo que abriga o simbionte secundário e é encontrado em determinadas espécies de plantas, tem sua fecundidade aumentada, independentemente dos elementos nutritivos que a planta oferece (Oliver e col., 2003). Também foi sugerido que simbiontes secundários poderiam influenciar outras características como a susceptibilidade de *Glossina spp* a infecção por *Trypanosoma* e, portanto de sua capacidade de transmissão do parasita, (Wang e col., 2009; Geiger e col., 2013; Weiss e col., 2013).

Entre as estruturas que hospedam microrganismos, o trato digestivo é um órgão normalmente repleto de microrganismos que pode estabelecer níveis distintos de interação (facultativa a obrigatória) com insetos. Um trato digestivo de inseto pode ter entre 10^7 - 10^9 células procariotas (Broderick e col., 2004). A diversidade das comunidades bacterianas na maioria dos invertebrados parece ser de uma a duas ordens de grandeza menores quando comparada à microbiota dos mamíferos (Dillon & Dillon, 2004). A microbiota associada ao trato digestivo pode participar de diversas funções dentro do hospedeiro, como auxiliar na digestão do alimento, degradação de compostos xenobióticos, impedir a colonização do trato digestivo por microrganismos patogênicos e auxiliar na ciclagem de nutrientes, entre outras funções (Dillon & Dillon, 2004). Assim, os microrganismos que compõem a microbiota intestinal de insetos participam de vários processos fisiológicos importantes, da nutrição à resposta imunológica (de Souza e col., 2009, Vieira e col. 2014; 2016).

Colman e col. (2012) mostraram através de evidências experimentais, que a composição microbiana nos insetos pode ser influenciada pela dieta do hospedeiro e a taxonomia deste. Eles observaram que entre os insetos analisados de diferentes ordens, os himenópteros e os coleópteros foram os grupos que apresentavam comunidades bacterianas únicas, nos níveis de riqueza e complexidade dos membros da comunidade. Além disso, um alto grau de similaridade bacteriana foi encontrado nos diversos himenópteros, assim como em comunidades de abelhas (Martinson e col., 2011). A composição bacteriana nas abelhas indicou certo grau de semelhança entre as espécies hospedeiras analisadas, apesar do efeito de diferentes dietas terem sido mais evidentes neste grupo, do que o encontrado em himenóptera (Colman e col., 2012). Corroborando este achado, no organismo clássico *Drosophila melanogaster*, a dieta foi um dos fatores que mais influenciou a composição da microbiota bacteriana intestinal (Erkosar e Leulier, 2014).

Por outro lado, insetos capazes de se alimentar com múltiplas dietas podem ter uma ampla variedade de microrganismos, em sua maioria adquiridos pelo ambiente em que habitam (Colman e col., 2012). Em *Anopheles* mantidos em colônias de laboratório e capturados de populações de campo, utilizando métodos de cultura ou de sequenciamento pelo gene que codifica para o 16S rRNA, foram encontrados 98 gêneros bacterianos, sendo que 41 destes puderam ser identificados em mais de uma espécie de *Anopheles*. Dos 9 gêneros bacterianos mais frequentemente associados aos *Anopheles* foram, em primeiro lugar *Pseudomonas* seguido de *Aeromonas*, *Asaia*, *Comamonas*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia* (Pidiyar e col., 2004; Gendrin &

Christophides, 2013). Em *Anopheles*, presumivelmente não existe um simbiote obrigatório, como é o caso de alguns outros insetos hematófagos. Por exemplo, *Wigglesworthia* spp, foi identificado como sendo um simbiote obrigatório e fundamental para a fecundidade da mosca *tsé-tsé*, bem como *Riesia pediculicola*, no piolho de cabeça (Gendrin & Christophides, 2013). Em outro estudo, com modelo de interação tripartite inseto vetor-microbiota- parasita, Boissière e col. (2012), mostraram que a composição bacteriana identificada no trato digestivo dos *Anopheles* infectados experimentalmente com *Plasmodium*, consistia principalmente de bactérias Gram-negativas, em maior proporção por membros da família Enterobacteriaceae, quando comparados com mosquitos não infectados. Este resultado indica que tanto as espécies de Enterobacteriaceae podem favorecer a infecção por *P. falciparum*, assim como o parasito de alguma forma tem influência sobre a composição microbiana em benefício das Enterobacteriaceae do inseto (Boissière e col., 2012).

Desde os trabalhos de Duncan (1926), quando foi isolado um actinomiceto do trato digestivo de *R. prolixus*, há registros de potenciais simbioses de triatomíneos. Wigglesworth (1936), também com *R. prolixus*, isolou um actinomiceto, *Nocardia rhodnii*, e demonstrou que esta espécie fornece vitaminas B, completando as necessidades nutricionais do inseto. *Nocardia rhodnii* foi posteriormente denominado *Rhodococcus rhodnii* (Goodfellow & Anderson, 1979), em nomenclatura que se mantém até o momento. Neste sentido, diversos outros estudos focaram no papel do *R. rhodnii* sobre seu respectivo hospedeiro. Assim, em ninfas de *R. prolixus* aposimbióticas, a partir da desinfecção da superfície de ovos, evidenciou-se uma série de efeitos deletérios, como aumento do período de desenvolvimento das ninfas, incremento na mortalidade, distúrbios na digestão e excreção. Esses efeitos foram reduzidos através da reinfecção dos insetos com *R. rhodnii* ou quando alimentados com dietas ricas em vitamina B (Eichler & Schaub, 1998). O papel da bactéria foi mais recentemente explorado com o genoma de *R. rhodnii*. Neste estudo, foram identificados genes que participam da biosíntese de tiamina, riboflavina, niacina, pantotenato, piridoxal, biotina, tetraidrofolato e cobalamina (Pachebat e col., 2013).

Contrariamente à diversidade de populações microbianas encontradas em Diptera, uma menor diversidade de bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae, foram isoladas por meio de cultura, tanto em triatomíneos coletados no campo como naqueles que foram obtidos de colônias de laboratório (Figueiredo e col., 1990; Varela & Aparicio, 1951). Por outro lado, Figueiredo (1995) confirmaram uma diversidade de bactérias Gram-

negativas dos gêneros *Enterobacter* e *Serratia* nos triatomíneos mantidos em insetário e somente do gênero *Enterobacter* nos triatomíneos coletados no ecótopo silvestre. Também utilizando meios de cultura foram identificadas *Nocardia*, *Corynebacteria* e *Streptococcus* em *T. infestans* (Durvasula e col., 2008).

Espino e col. (2009) detectaram *Wolbachia* em *Rhodnius pallescens*, um vetor natural de *T. cruzi* e *T. rangeli* e da Mota e col., 2012 observaram sua presença no trato digestivo de uma ninfa de quinto estágio de *Rhodnius* sp. coletada no ecótopo silvestre da região amazônica. Esta espécie de bactéria pode ser detectada nos insetos através de oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica para o 16S rRNA (Sinkins e col., 2005). Cabe ressaltar que *Wolbachia* é um organismo intracelular, que está presente de 20 a 75% de espécies de insetos, tendo sido inicialmente descrito no mosquito *Culex pipiens* (Hertig & Wolbach, 1924).

Recentemente, da Mota e col. (2012), analisando espécies de triatomíneos, tais como *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. brasiliensis* e *R. prolixus*, a partir do uso de técnicas independentes de cultivo, descreveram a microbiota bacteriana do trato digestivo destas espécies mantidas em condições de laboratório e observaram que existe uma predominância de Enterobacteriaceae (representada pelo gênero *Serratia* e *Arsenophonus*). Além disso, também foi possível observar que as várias espécies de triatomíneos estudadas mostraram ter um grau de seletividade em relação à composição da microbiota bacteriana.

Cabe destacar que a manipulação genética de algumas espécies de bactérias pode interferir na capacidade de desenvolvimento de parasitas em seus hospedeiros invertebrados, como no caso do *R. rhodnii*. Neste simbiote de *R. prolixus* pode ser inserido um gene cuja expressão do peptídeo cecropina A foi capaz de eliminar o *T. cruzi* quando *R. prolixus* era previamente alimentado com a bactéria modificada (Durvasula e col., 1997). Nessa mesma linha de investigação, Durvasula e col. (2008) isolaram uma *Corynebacteria* de *T. infestans* modificando-a para expressar anticorpos com ação contra o *T. cruzi*. Por outro lado, *Serratia* encontrada no trato digestivo de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma* sp. (da Mota e col., 2012), além de ter uma atividade hemolítica importante para a digestão do sangue, mostrou ter uma atividade tripanolítica como demonstrada *in vitro* contra cepa Y de *T. cruzi* por Azambuja e col. (2004).

Neste contexto, torna-se importante a descrição da microbiota bacteriana em triatomíneos, pois ainda são escassos os conhecimentos sobre a definição da composição

bacteriana presentes na microbiota natural em comparação a bactérias que possam ser transientes, quando estas são adquiridas do meio ambiente no qual habita o inseto. Mais recentemente, o desenvolvimento de projetos envolvendo novas ferramentas moleculares, de uma maneira geral, tal como o é o caso da análise do gene que codifica para o 16S rRNA, tem auxiliado de forma importante a descrição da microbiota dos insetos vetores.

1.5.1 Métodos para a detecção da microbiota bacteriana

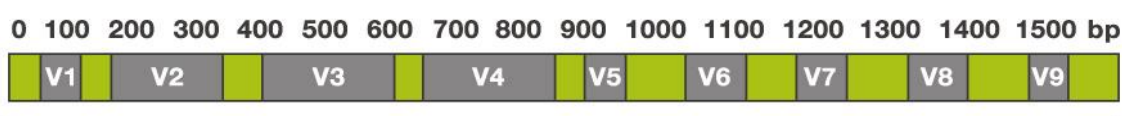
Diversas técnicas têm sido desenvolvidas nos últimos anos, surgindo a possibilidade de que bactérias estritamente anaeróbicas fossem também cultivadas. Entretanto, os métodos de cultivo são geralmente laboriosos, requerem tempo e selecionam somente uma pequena fração da diversidade microbiana total presente no trato digestivo (Coutinho e col., 1999).

Mais recentemente, para o estudo da microbiota, a extração do DNA total de uma comunidade bacteriana, seu sequenciamento gênico, além de técnicas de biologia molecular de alta geração de DNA como o pirosequenciamento passaram a ser utilizadas como alternativa para solucionar o problema dos microrganismos não cultiváveis (Ronaghi e col., 1998; Ronaghi e col., 1996; Diez e col., 2001; Nyrén, 2007). Algumas destas técnicas surgiram como recursos altamente eficientes na detecção e estudo da microbiota de inúmeros animais, tais como técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), bibliotecas de clones do gene que codifica para o 16S rRNA, sequenciamento pelo método de Sanger, pirosequenciamento entre outros (Metzker, 2005). Em insetos alguns trabalhos indicam o emprego destas ferramentas na detecção e identificação da microbiota (Andersson e col., 2008; Kautz e col., 2013),

Entretanto, a extração de DNA de diferentes amostras nem sempre é simples, já que não existe um protocolo universalmente aplicável para a extração de DNA no estudo de comunidades microbianas complexas. Neste sentido, algumas espécies microbianas têm sido subestimadas, por questões de limites técnicos, tal qual ocorre particularmente no caso de bactérias Gram-positivas como Firmicutes, as quais possuem uma parede celular grossa ou de bactérias como as Actinobacterias, que contém ácidos micólicos na parede celular. Como estratégia eficaz para análise, extração e purificação (Miller e col., 1999), foi reportada a utilização de métodos mecânicos como o uso de microesferas de vidro,

ultrassom ou alta pressão como forma mais eficiente de lise de parede celular (Ferrand e col., 2014).

Após a extração do DNA, as técnicas que envolvem a amplificação baseada em PCR de regiões dentro do gene que codifica para o 16S rRNA foram desenvolvidas especificamente para a análise da diversidade de bactérias. O tamanho do gene que codifica para o 16S rRNA é de aproximadamente 1500 bp e sua estrutura está composta de regiões altamente conservadas e regiões hipervariáveis (V1-V9) (Figura 3), permitindo assim, a construção de oligonucleotídeos universais e a identificação das espécies de forma individualizada (Van de Peer e col., 1996). Assim, é de conhecimento geral que este gene tem informações de sequências suficientes para inferências filogenéticas.



Regiões conservadas: aplicações não específicas

Regiões variáveis: aplicações a grupos ou espécies específicas

Figura 3. Representação esquemática do gene que codifica para o 16S rRNA ilustrando as regiões variáveis (cinza) e as conservadas (verde).

Dentre outras técnicas utilizadas, para a análise do gene que codifica para o 16S rRNA, destaca-se DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). O emprego da DGGE permite acessar a informação da riqueza e identificação de membros de comunidades bacterianas já que os produtos amplificados podem ser facilmente recuperados das bandas e posteriormente sequenciados. Assim, esta técnica consiste na mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida de fragmentos de DNA amplificados por PCR e parcialmente desnaturados por uréia e formamida e corrida em temperatura de 60°C (Muyzer e col., 1993; Muyzer & Smalla, 1998).

Uma sequência de oligonucleotídeos rica em guanidina e citosina (grupo de GC) que varia entre 30 a 40 bases é anexada no final 5' do oligonucleotídeo iniciador “*forward*”. Estes grampos permanecem na sua configuração de dupla fita, impedindo à completa separação de ambas as fitas de DNA e modificando o comportamento de

desnaturação, melhorando assim, a detecção das sequências após a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Muyzer e col., 1993; Muyzer & Smalla, 1998). Desta forma o fragmento amplificado por PCR, quando desnaturado na corrida eletroforética, para de migrar formando domínios de desnaturação. Mais detalhadamente, com amplicons de DNA, ainda que sejam dos mesmos tamanhos, as suas composições diferentes em pares de base, migrarão para posições diferentes no gel, gerando, assim, um perfil genotípico da comunidade (Muyzer e col., 1993; Crosby & Criddle, 2003). O perfil das bandas de DNA pode ser visualizado corando-se o gel de DGGE. A variação na composição química do gel, no caso de DGGE, ocasiona coloração desigual. O “*background*” de coloração torna difícil a distinção entre bandas fracas originadas de espécies menos abundantes nas amostras. Assim, foi utilizado como corante o SYBR-Green, o qual tem a vantagem de produzir menos “*background*” (Agnelli e col., 2004).

A escolha da amplificação das diferentes regiões do gene que codifica para o 16S rRNA para estudar as comunidades microbianas é um ponto chave na técnica de DGGE. Yu & Morrison (2004) estudando a comunidade microbiana envolvidas no rúmen de ovelhas mostraram que a amplificação das regiões V3-V5 e V6-V8 produziram melhores perfis de DGGE em comparação aos outros amplicons da região V e que a região V3 foi a que apresentou maior número de bandas no gel.

da Mota e col. (2012) por meio de análises das regiões variáveis V6-V8 do gene que codifica para o 16S rRNA avaliaram por DGGE as comunidades bacterianas encontradas no trato digestivo de diferentes espécies de triatomíneos mantidos em condições de laboratório. Neste trabalho, os autores observaram diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR, mas com algumas características de perfil similares e associadas aos gêneros de triatomíneos analisados.

Alternativamente, outra importante ferramenta para detecção de microrganismos que caracterizam a comunidade de amostras de trato digestivo é a técnica de Sanger aliada à análise de bibliotecas de clones. Vallejo e col. (2009) identificaram os microrganismos do trato digestivo de *T. infestans* coletados em ecótopo silvestre através da análise do gene que codifica para o 16S rRNA. Entretanto, esta metodologia pode expressar resultados superficiais, uma vez que o tamanho dos fragmentos amplificados do gene que codifica para o 16S rRNA, e o número de clones, são fatores limitantes que permitem identificar em alguns casos somente as populações predominantes (Sirohi e col., 2012).

Por outro lado, a técnica de sequenciamento de alta geração de DNA (NGS), por pirosequenciamento utilizando equipamento 454 da Roche, quando aplicada à investigação da diversidade bacteriana, proporciona melhores resultados que as abordagens tradicionais, permitindo identificar espécies pouco frequentes, mas que podem ter funções críticas no ambiente analisado (França e col., 2002). Desta forma, o método de pirosequenciamento tem permitido caracterizar a diversidade microbiana presente em ecossistemas complexos. A precisão da técnica vem sendo desenvolvida em paralelo em pesquisas que analisam as limitações e vantagens da utilização deste método. Neste contexto, Wahl e col. (2012), compararam a eficiência dos oligonucleotídeos cobrindo diferentes fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA em investigação da microbiota intestinal humana. Os autores, em análise das amostras utilizadas para o pirosequenciamento, demonstraram por meio de comparações entre as bibliotecas de fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA, em várias sequências curtas, que os oligonucleotídeos para as regiões V1-V3 e V3-V5 resultam em melhor determinação taxonômica dos microrganismos. Consequentemente, o aumento das regiões sequenciadas por meio do sistema 454 titanium, o qual pode analisar sequências de até 400-500 pares de bases (bp), se associada à técnica a escolha de regiões estratégicas de genes importantes para a descrição dos microrganismos, auxilia enormemente a precisão taxonômica, bem como evita possíveis erros nos resultados.

Este método é cada vez mais empregado para a análise de bibliotecas de fragmentos de DNA obtidos diretamente de um determinado ambiente e utilizado para caracterização da diversidade e da função de comunidades microbianas (da Mota e col., 2008). Constitui, portanto, uma importante ferramenta para determinação de hipóteses a respeito das interações e evolução dos ecossistemas microbianos por meio de um mapa mais detalhado dos membros encontrados na comunidade. Estas investigações são possíveis atualmente, graças à diminuição dos custos do sequenciamento e da evolução da bioinformática, a qual condiciona o processamento de um enorme número de dados (Kunin e col., 2008).

1.6 Proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contida no DNA das células. Em virtude da abundância de funções que elas realizam, as proteínas exercem um papel primordial em quase todos os fenômenos

biológicos, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (Nelson & Cox, 2005; Atkins & Jones, 2001).

1.6.1 Proteínas de membrana

As proteínas de membrana são proteínas que desempenham um papel chave na detecção e transmissão de sinais externos nas células, o que lhes permite interagir e responder ao seu ambiente de uma forma específica (Santoni, 2007). As funções que as proteínas realizam são diversas, podendo ser classificadas como: proteínas receptoras de membrana que retransmitem sinais entre o ambiente externo e interno das células, proteínas de transporte as quais transferem íons através da membrana, moléculas de adesão celular as quais permitem que as células se identifiquem entre si e interajam e enzimas de membrana com funções como a oxidoreductase (catalisam reações de oxidação-redução), transferase (transferem grupos funcionais entre doador e aceptor) ou hidrolase (promovem a cisão de um material orgânico através da utilização de água).

O reconhecimento e caracterização de proteínas de membrana é muito importante, pois muitas dessas proteínas medeiam processos biológicos fundamentais, incluindo interações e reconhecimento célula-célula, célula-patógeno e célula-substrato, osmoregulação, nutrição e metabolismo, além de todas as possíveis modificações na funcionalidade celular que podem surgir posteriormente à atividade destas proteínas de membrana (Kashino e col., 2007).

As proteínas presentes na membrana plasmática podem ser integrais (diretamente ancoradas na bicamada lipídica e com a cadeiapolipeptídica atravessando-a, através de uma região transmembranar ou modificação lipídica) ou associadas, isto é, ancoradas na bicamada lipídica através de interações não-covalentes com proteínas integrais de membrana ou outra proteína de membrana associada (Zhao e col., 2004). O sequenciamento completo do genoma de vários organismos tem demonstrado que as proteínas transmembranares representam cerca de 30% do total de proteínas. Entre as ferramentas de análise de proteínas de membrana, estão a eletroforese bidimensional, a qual oferece uma maior resolução disponível (Santoni e col., 2000), e as técnicas *gel-free* que são baseadas no fracionamento por cromatografia líquida.

1.7 Análise proteômica

A proteômica estuda as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo (Wilkins e col., 1996). Depois da exaltação provocada pelo sequenciamento do genoma de vários organismos, observou-se que mesmo sendo importante, as análises das sequências de nucleotídeos nem sempre refletem uma relação direta com os níveis de expressão gênica das proteínas e, portanto, das atividade biológicas (Gygi e col., 1999).

O genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, enquanto que o proteoma é altamente variável e dinâmico. Com a análise proteômica é possível saber se um gene esta sendo expresso, calcular a concentração relativa desse produto e estudar de forma descritiva e quantitativa o conjunto de proteínas de uma organela celular ou ecossistemas, considerando suas variações em uma população, mudanças em resposta a um ambiente ou resultantes do desenvolvimento normal ou alterado. É possível também estimar modificações ou interações com outras proteínas, além de poder quantificar proteínas que são expressas em diferentes estágios de vida de um microrganismo ou em diferentes condições experimentais (Galdos, 2009).

Simultaneamente, a disponibilização das sequências nucleotídicas pela genômica contribui para a proteômica, que por sua vez também serve para validação da anotação gênica em organismos com genomas sequenciados. Sabe-se que a existência de uma fase aberta de leitura (“*open reading frame*”, ORF) não necessariamente garante a existência de um gene funcional. Aliás, a proteômica pode contribuir para a correção de anotações de genes, identificação de variantes de *splicing* alternativo, correção de sítios de iniciação da tradução entre outras contribuições (Desiere e col., 2004; Barah & Bones, 2014).

1.7.1 Métodos em proteômica

De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas como “*bottom-up*“, “*middle-down*” ou “*top-down*”. O primeiro, também denominado “*shotgun*”, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (“*mass spectrometry*”, MS). Contrariamente, o “*top down*”, é um processo no qual as proteínas intactas (e não seus peptídeos derivados) são submetidas à análise por MS (Armirotti & Damonte, 2010).

Uma das vantagens da abordagem “*bottom-up*” é a sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos. Não obstante, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados. Por essa razão, a proteômica “*top down*” tem recebido ultimamente maior atenção da comunidade científica (Armirotti & Damonti, 2010).

Nos últimos anos, os métodos de análise proteômica, particularmente na identificação de proteínas baseada em MS, vem sendo amplamente aperfeiçoada em virtude dos avanços na instrumentação, na preparação das amostras e nas análises computacionais. O que representava um grande desafio há uns anos atrás em relação ao sequenciamento e a identificação de uma proteína individual, atualmente, a identificação e a quantificação de grande parte das proteínas expressas são realizáveis em um único experimento (Altelaar e col., 2013; Walsh e col., 2010; Walther & Mann, 2010).

Entre as técnicas proteômicas que permitem separar proteínas de misturas complexas, estão a *gel-free* baseada no fracionamento por cromatografia líquida (LC), a eletroforese unidimensional (1D-PAGE) e bidimensional (2D-PAGE) (Qian e col., 2006) acopladas a espectrometria de massas. No entanto, ambas as técnicas possuem limitações apesar de gerar muitas informações. Uma das mais importantes limitações da eletroforese 1-D e 2-D é a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, especialmente em certos fluídos corporais, o que limita a frequência das menos abundantes pois ao final é utilizada uma concentração fixa total de proteínas.

A espectrometria de massa é uma técnica central, que possibilita a análise simultânea de diversas proteínas em uma mesma amostra (Gross, 2004). Esta técnica é rápida, acurada e extremamente sensível, requerendo pouca quantidade de amostra. (Barbosa e col., 2012). Um espectrômetro de massa é composto por: uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massa que medem a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas e um detector que registra o número de íons de cada valor de m/z (Aebersold & Mann, 2003) (Figura 3).

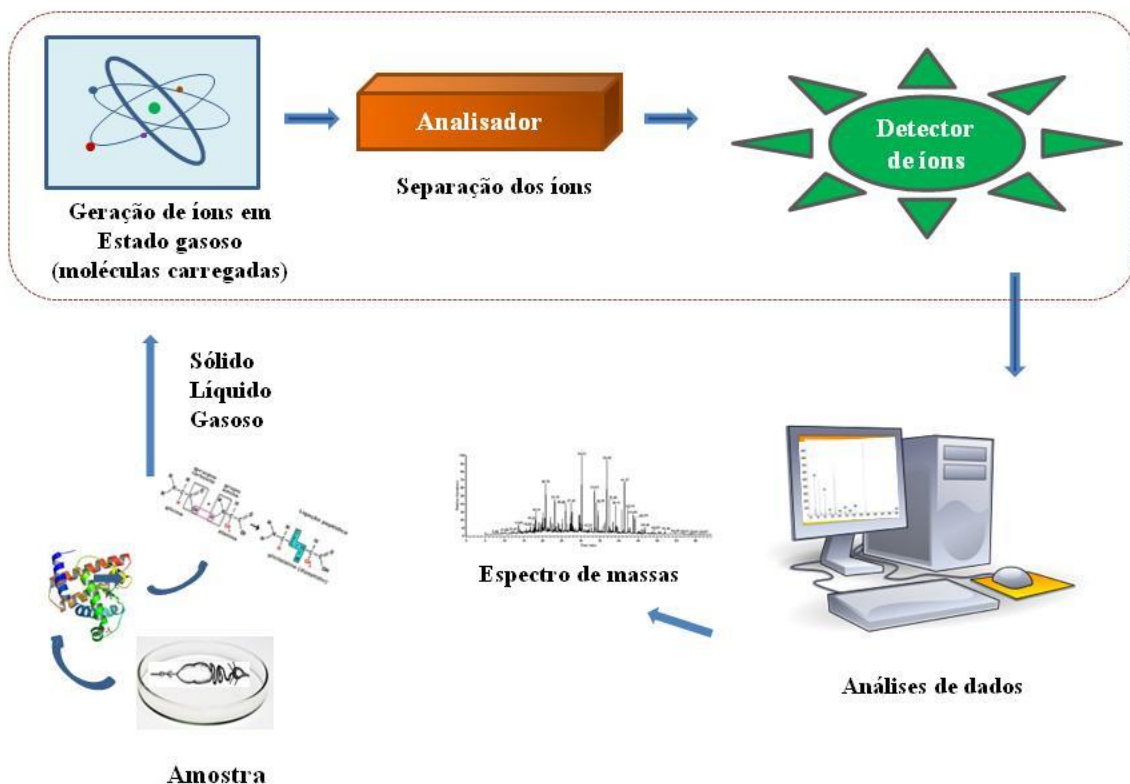


Figura 4. A metodologia de estudo proteômico envolve extração de proteínas da amostra, separação por cromatografia líquida, ionização, análise e detecção de peptídeos e análise de dados (Figura adaptada de Barbosa e col., 2012).

1.7.2. Identificação de proteínas

Muitas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para a identificação automatizada de peptídeos a partir de nano LC-MS/MS. Esses programas podem ser classificados em duas formas: a busca em um banco de dados (*Peptide spectrum match*, PSM) e o sequenciamento de novo (*de novo sequencing*) (Zhang e col., 2012). A pesquisa automatizada em um banco de dados (Uniprot, NCBI, etc) é extensamente utilizada na proteômica, contudo, precisa de uma elevada especificidade de correspondência entre a sequência e o espectro. Nesta categoria de busca encontram-se os programas Mascot (Perkins e col., 1999), Sequest (Eng e col, 1994), MaxQuant (Cox & Mann, 2008), os quais podem apresentar problemas de baixos índices de identificação e elevados *false discovery rate* (FDR), resultando em uma reduzida sensibilidade e acurácia (Zhang e col., 2012).

Neste trabalho o programa escolhido foi o *Pattern Lab for Proteomics* (Carvalho e col., 2016), que emprega um algoritmo de autocorrelação para determinar matematicamente a sobreposição entre um espectro teórico derivado de um banco de dados

e um espectro experimental MS/MS em questão. A sobreposição é dada na forma de uma pontuação (*score*).

1.7.3 Estudos proteômicos de triatomíneos

O trato digestivo, apesar de ser um importante órgão envolvido no processo alimentar, este órgão tem sido normalmente negligenciado em estudos proteômicos de triatomíneos. Em geral, nas poucas publicações referentes a identificação de proteínas que possam ser importantes na interação inseto-parasito, a maior parte, se concentra na descrição de proteínas da membrana perimicrovilar (Zhong e col., 2012; Hu e col., 2012, Dinglasan e col., 2009; Lehane e col., 1996) e proteínas de glândulas salivares (Assumpção e col., 2008, Ribeiro e col., 2004a,b; Santos e col., 2007; Bussacos e col., 2011; Ribeiro e col., 2015; Montandon e col., 2016). Só recentemente, foram desenvolvidos estudos de proteômica tanto unidimensional nas diferentes porções do trato digestivo (Ribeiro e col., 2014) e bidimensional (Rezende Vieira e col., 2015) no intestino médio anterior do trato digestivo de *R. prolixus*.

Rezende Vieira e col. (2015) identificaram o mapa proteico do intestino médio anterior de fêmeas de *R. prolixus* e classificaram as proteínas em 28 grupos funcionais envolvidos em processos fisiológicos. As proteínas identificadas foram associadas com o processo digestivo, entre as quais se destacaram as enzimas antioxidantes como a glutationa S-transferase, citocromo P450, assim como também a presença de proteases, como a catepsina D-like. As enzimas relacionadas à degradação de aminoácidos, como a tirosina e aspartato aminotransferase, foram as que tiveram maior expressão gênica no intestino do inseto. Outras proteínas que participam no metabolismo de lipídeos estavam presentes em abundância, assim como também, as proteínas transportadoras de metais e as reguladoras de pH.

Por outro lado, Ribeiro e col., 2014 também descreveram o mapa proteico, em obtenção de um total de 226 proteínas, associadas à digestão e função celular em investigação do trato digestivo de fêmeas. Neste estudo também foi possível observar que o maior número de proteínas associadas à digestão (27 proteínas) correspondia às enzimas digestivas e proteínas de detoxificação, cujos transcritos foram descritos no transcriptoma como sub expressos, enquanto aquelas correspondentes a tipo de exportação de proteínas, modificação proteica, metabolismo energético e proteínas do citoesqueleto foram as que se

encontravam em maior proporção. No entanto, somente 10% das proteínas descritas pelo transcriptoma foram validadas pela proteômica.

É importante ressaltar que, o genoma completo de *R. prolixus*, estando disponível na base de dados do *Vector Base* (www.vectorbase.org) em associação com diversos dados transcriptômicos e proteômicos do intestino médio complementam as informações sobre esta interessante espécie vetora amplamente utilizada em modelos de estudo (Mesquita e col. 2015,2016; Ribeiro e col., 2014; Rezende Vieira e col., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O impacto da doença de Chagas no Brasil é ainda importante apesar dos progressos que foram obtidos em relação ao seu controle nos últimos anos. Estudos sobre *T. cruzi*, agente causador da doença, foram mais realizados no hospedeiro humano e no modelo murino do que no hospedeiro invertebrado: o triatomíneo. Além disso, o inseto não pode ser concebido como um único elemento em um sistema biológico, pois existem componentes, tais como as comunidades bacterianas do trato digestivo, que exercem diversas funções, não somente sobre o desenvolvimento e reprodução do inseto, como também podem agir no controle de populações dos parasitas onde coabitam as comunidades microbianas. Nesse sentido, o trato digestivo dos triatomíneos é uma importante área de contato com o meio ambiente e o nicho no qual o parasito *T. cruzi* se desenvolve. O aprofundamento nos estudos relacionados com a fisiologia e bioquímica do sistema digestivo dos insetos podem levar a um aprimoramento nas técnicas de controle desses organismos (Campbell e col., 2004).

Por outro lado, sabe-se que 99% das bactérias presentes no ambiente intestinal dos insetos não são cultiváveis em meios de cultura tradicionalmente utilizados (Amann e col., 1995). Neste sentido, pouco se conhece sobre a composição da microbiota intestinal, principalmente as não cultiváveis e de triatomíneos coletados diretamente no campo (Vallejo e col., 2009; da Mota e col., 2012). Assim, torna-se um desafio novas investigações, por utilização de técnicas moleculares de identificação das bactérias que compõem a comunidade de microrganismos no trato digestivo destes insetos.

O conhecimento da microbiota bacteriana poderá ajudar na indicação de espécies de bactérias com potencial para serem utilizadas em manipulação genética (paratransgênese) (Beard e col., 1998; Beard e col, 2001), e portanto, na proposição de novas metodologias de controle da doença, como também propiciar avanços do conhecimento da interação tripartite: triatomíneo-microbiota bacteriana e tripanosomatídeo. Além disso, os resultados do presente trabalho oriundos da abordagem proteômica “*shotgun*” para estabelecimento das bases bioquímicas do meio ambiente intestinal, poderá propiciar o avanço na compreensão da interação triatomíneo com outros microrganismos associados. Neste estudo, especial foco será dado às proteínas transmembranares, por questão do contato direto com as bactérias e tripanosomas que habitam este órgão, e investigar se este ambiente varia entre *T. infestans*, *R. prolixus*, *P. megistus* e *D. máxima*. A identificação das proteínas presentes no trato digestivo dos insetos podem explicar os diferentes resultados de xenodiagnóstico, quando comparadas as

diferentes espécies de triatomíneos utilizadas para este fim e embasar novos estudos sobre a fisiologia de triatomíneos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Análise da microbiota bacteriana e da proteômica do trato digestivo de triatomíneos.

3.2 Objetivos específicos

Para uma melhor compreensão os objetivos específicos serão divididos em duas partes:

Primeira parte:

- Estabelecer os métodos independentes de cultivo para a caracterização da microbiota bacteriana.

- Confirmar a posição taxonômica, baseada no sequenciamento do gene COI, dos triatomíneos coletados no peridomicílio no bioma Caatinga (Russas, Ceará)

- Comparar a microbiota bacteriana encontrada nos tratos digestivos de triatomíneos mantidos em colônias de laboratório com a microbiota de triatomíneos coletados no peridomicílio.

- Determinar a presença dos genótipos TcI e TcII de *Trypanosoma cruzi*, baseada no sequenciamento do gene mini-exon nos espécimes dos triatomíneos coletados no peridomicílio.

- Verificar se existe alguma correlação entre a presença de *T. cruzi* (TcI e/ou TcII) e os grupos bacterianos encontrados nos tratos digestivos dos triatomíneos coletados no peridomicílio.

- Comparar a microbiota bacteriana encontrada nos tratos digestivos de *Rhodnius prolixus* obtidos de uma colônia de Laboratório, com a microbiota de insetos infectados artificialmente pelo *T. rangeli*.

Segunda Parte:

- Preparar os extratos proteicos do trato digestivo das quatro espécies de triatomíneos: *R.prolixus*, *Dipetalogaster maxima*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*

- Identificar por espectrometria de massa por LC/MS-MS a composição do perfil proteico do trato digestivo de ninfas de quinto estágio de: *D. máxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*.

- Construir um mapa proteico preliminar das proteínas encontradas no trato digestivo, com ênfase nas proteínas transmembranares.

4. METODOLOGIA

4.1 Insetos procedentes de colônia.

Neste presente estudo, foram utilizados insetos obtidos de diferentes tempos de manutenção das colônias, contados a partir das coletas dos espécimes no campo, pela equipe do Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Instituto Oswaldo Cruz liderada pela Dra. Marli Lima. Os insetos de quinto estágio foram aleatoriamente separados das colônias mantidas por: i) menos de três meses, ii) três anos e iii) cinco anos. Estes triatomíneos de colônias eram normalmente alimentados em camundongos vivos (*Mus musculus*) e anestesiados.

Nas infecções por *T. rangeli*, foram utilizadas ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* procedentes de uma colônia mantida no insetário a 28°C do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz. A alimentação dos insetos no Laboratório era realizada, artificialmente com aparato utilizando-se sangue desfibrinado de coelho, fornecida pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) e seguindo o método descrito por Garcia e col. (1984). Os procedimentos realizados no presente trabalho, de alimentação seguiram os princípios éticos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/Fiocruz), sob a licença N° L-03/12.

Para a identificação das proteínas do trato digestivo os insetos utilizados foram: *D. maxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*. As ninfas de quinto estágio das três primeiras espécies de triatomíneos foram mantidas no insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias (Fiocruz, IOC) e alimentadas com sangue de galinhas, enquanto que ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* eram alimentadas artificialmente com sangue desfibrinado de coelho e no insetário do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos. Foram utilizados triatomíneos de quinto estágio larvário para dissecação e obtenção dos tratos digestivos inteiros das espécies analisadas.

4.2 Cultura de *Trypanosoma rangeli*

Neste trabalho, foi utilizada a cepa Macias de *T. rangeli* para a infecção das ninfas de quarto estágio de *R. prolixus*. Esta cepa foi isolada de um homem na Venezuela, e posteriormente caracterizada como sendo genótipo KP1+, (Steindel e col., 1994) e cedida pela Dra. Suzete Araujo Oliveira Gomes (Universidade Federal Fluminense).

O parasito era mantido em temperatura constante de 28°C em meio de cultura de infusão de cérebro e coração (BHI, DIFCO), suplementado com 20% de soro fetal bovino, inativado pelo calor, de acordo com Azambuja e Garcia (1997). O repique da cultura de parasitas foi realizado colocando 2 mililitros (ml) do meio com os parasitas e 2 ml de meio estéril por no máximo duas vezes mantendo assim, a predominância das formas curtas de epimastigotas (99% de pureza) (Whitten e col., 2001) e a infectividade da cepa. A concentração de parasitas por mililitro (ml) foi calculada pela contagem destes em câmara de Neubauer.

4.3 Infecção de *R. prolixus* com *T. rangeli*

Ninfas de quarto e quinto estádios foram alimentadas artificialmente de acordo com o protocolo descrito em Azambuja & Garcia (1997). Uma quantidade de até 300 μ l de sangue desfibrinado de coelho (fornecida pelo Cecal) foi calculada para o consumo de cada ninfa. Para infecção de quarto estádio, primeiramente o sangue foi centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos a 4°C para separação das hemácias do plasma. Uma vez centrifugado, o plasma foi separado e descomplementarizado a 56°C por 1 hora, e, finalmente, misturado novamente com as hemácias. Estas previamente lavadas por centrifugação em tampão de fosfato de sódio 0,01 M, contendo 0,9% NaCl, pH 7,4 (PBS). As formas curtas de epimastigotas de *T. rangeli* foram adicionadas ao sangue inativado, e calculadas para uma concentração final de 10^6 parasitas por ml. Após a alimentação nesta dieta infectante, os insetos foram separados para posteriores análises e realimentação. Após a muda para o quinto estádio, foram alimentados novamente com sangue, mas desta vez em dieta sanguínea livre de parasitas (aproximadamente 38 dias após a primeira alimentação em quarto estádio). Insetos que não se alimentavam até a repleção, tanto na primeira, como na segunda alimentação, eram descartados. Para a contagem de parasitas, previamente, as ninfas foram dissecadas para a retirada do trato digestivo, sendo o intestino médio anterior separado do intestino posterior e macerado com PBS. As contagens foram realizadas utilizando câmaras de Neubauer e observação em microscópio ótico. A infecção por *T. rangeli* foi verificada no 2º e 7º dias após alimentação infectiva, por contagem de parasitas nas amostras do trato digestivo, e em grupos de 5 insetos cada.

4.4 Coleta dos triatomíneos do ambiente peri-domiciliar

Um total de 33 espécimes foram capturados em 2012 em ambientes peridomiciliares da municipalidade de Russas (Ceará) localizada no vale de Jaguaribe na região nordeste de Brasil (4°56'25"S e 37°58'33"W). O clima desta região é tropical, quente e semiárido correspondente ao Bioma denominado Caatinga. Os triatomíneos foram depositados em tubos Falcon de 50 ml de polipropileno estéreis, e transportados vivos até o laboratório, primeiramente para classificação dos insetos e imediata extração do trato digestivo. A identificação morfológica dos triatomíneos capturados em ambiente peridomiciliar foi realizada segundo Lent e Wygodzinsky (1979).

4.5 Dissecção dos espécimes

Para evitar contaminação dos tecidos por bactérias procedentes da estrutura externa do inseto, estes foram submergidos em uma solução de hipoclorito de sódio 0.5% e enxaguados três vezes em água destilada e autoclavada. A membrana do conectivo dos insetos procedentes do peridomicílio e insetário (identificação da diversidade bacteriana) e dos insetos procedentes do insetário (para a identificação de proteínas) foi cortada e retirada com a ajuda de pinças autoclavadas e agulhas estéreis, utilizando um estereoscópio modelo Motic Q766 (Quimis, Diadema, SP, Brasil) e aumento de 12X. Após os cortes laterais dos segmentos abdominais, a cutícula dorsal foi cuidadosamente levantada. As amostras do trato digestivo (desde o proventriculo até o reto) das ninfas e adultos dos triatomíneos foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml (mantidos dentro de um isopor com gelo) e armazenadas a -80°C até a extração do DNA. Esta metodologia de dissecção foi utilizada de igual maneira para a obtenção e a precipitação de proteínas totais. No entanto, devido a grande contaminação do sangue ingerida pelos insetos, muitas proteínas do plasma sanguíneo foram encontradas previamente no perfil unidimensional e bidimensional proteico (dados prévios). Assim, para melhorar a identificação das proteínas encontradas no trato digestivo do inseto utilizando a metodologia proteômica “*shotgun*” foi realizada a lavagem dos tecidos com tampão PBS 1X.

4.6 Extração de DNA metagenômico.

O DNA metagenômico do trato digestivo dos insetos foi extraído por meio do Fast Prep DNA Extration Kit for Soil (Qbiogene, CA, USA), seguindo o protocolo do

fabricante. O DNA foi visualizado em gel de agarose 1% (peso/volume) para verificar a integridade e pureza do material genético extraído.

4.7 Caracterização molecular dos triatomíneos coletados em ambiente peridomiciliar

A posição filogenética dos 33 espécimes coletados em Russas (Ceara) foi realizada através do fragmento codificante do gene citocromo oxidase I (COI) (Folmer e col., 1994). As sequências de DNA (metagenômico) amplificadas (amplicons) de 709 bp foram obtidas por PCR e uso dos iniciadores ou oligonucleotídeos (*primers*) LCO 1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG-3') e HCO2198 (5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Cada reação continha: 1X tampão de uso, MgCl₂ 0,5 mM, 0,1 µM dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,05 U GoTaq DNA polymerase (Promega, USA), 50 ng de DNA da amostra e água ultrapura para um volume final de 25 µl.

Em cada amplificação foi adicionado um controle negativo contendo somente água ultrapura (Promega, USA) para assegurar que as reações não estavam contaminadas. As condições empregadas de PCR foram: 94°C durante 3 min, 5 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguindo mais 35 ciclos de 51°C por 1 min, 72°C por 1 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo com uso de um transiluminador com luz ultravioleta (longitud de onda de 302 nm). Posteriormente os amplicons foram enviados para sequenciamento em um sequenciador ABI Prism 3730 XL (Applied Biosystems). As sequências foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank utilizando o BLASTN (Altschul e col., 1990). Os primeiros 10 melhores hits foram alinhados através de ClustalW2 (Larkin e col., 2007) e examinados com o Bioedit (Hall, 1999). Uma árvore filogenética foi construída baseada em máxima verossimilhança seguindo o modelo GTR com 1000 bootstrap utilizando o programa Mega v.5.01 (Tamura e col., 2011).

4.8 Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* pela amplificação do gene mini-exon.

Para a identificação de *T. cruzi* (TcI e TcII) nas amostras de conteúdo intestinal dos espécimes utilizados no presente trabalho, foi empregada a técnica de PCR, de acordo com os protocolos de Silva e col.(2006) e de Fernandes e col. (2001). Na caracterização foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para cada um dos grupos TcI e TcII, bem como

o oligonucleotídeo ME, comum em ambos os grupos. Os oligonucleotídeos utilizados foram ME (5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3') TcI (5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3') e TcII (5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCA T-3'). O oligonucleotídeo ME foi originalmente desenhado para amplificar a região do gene mini-exon específico para *T. cruzi* (Fernandes e col., 2001; Silva e col., 2006). Controles positivos foram adicionados em cada reação utilizando epimastigostas de cultura do clone DM28c e da cepa Y de *T. cruzi*, para os grupos TcI e TcII, respectivamente. A partir dos amplicons obtidos (200-250 bp), foi possível caracterizar a presença de cepas pertencentes a estes dois grupos e observar, em alguns casos, a coinfecção. O sequenciamento das bandas obtidas foi usado para confirmar a especificidade das bandas e do sistema nas condições da PCR com DNA metagenômico de *Triatoma*, uma vez que esses oligonucleotídeos haviam sido testados anteriormente apenas para culturas puras dos parasitos.

Para estas reações de PCR, a cada tubo era adicionado aproximadamente 50 ng de DNA quantificado previamente pelo nanodrop (Thermo Fisher Scientific Nanodrop 2000c), 1X tampão de uso, 0,2 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 0,28 µM de cada oligonucleotídeo, 0,0125 U GoTaq DNA polymerase (Promega, USA) e água para um volume final de 25 µl. Os controles negativos de amplificação de PCR para TcI e TcII continham somente água ultrapura ao invés do DNA genômico. As condições de PCR utilizadas foram: 95°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 57°C para TcI e 51°C para TcII ambos a 30 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os amplicons foram visualizados como descrito na secção prévia. Para confirmar os genótipos TcI ou TcII, uma árvore filogenética foi construída utilizando as sequências dos “amplicons” e os melhores hits analisados em GenBank (BLASTn), como descrito previamente.

4.9 Amplificação por PCR dos fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA para análise em DGGE

Para avaliar a correlação entre a infecção por *T. cruzi* e a composição bacteriana da microbiota intestinal dos espécimes de triatomíneos coletados no ambiente peridomiciliar, os fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA correspondentes a região V6-V8 do gene que codifica para o 16S rRNA de *E. coli* foram amplificados. A mesma técnica foi também utilizada para avaliar a complexidade e possíveis mudanças no padrão da

microbiota intestinal bacteriana dos espécimes de *Triatoma* mantidos no insetário. As amostras de DNA metagenômico foram amplificadas por uso de um termociclador (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando o par de oligonucleotídeos U968-GC (5' – CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e L1401 (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3'), descrito em Nübel e col. (Nubel e col., 1996). Cada reação continha: 50 ng de DNA metagenômico, 1X buffer, 0,25 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,125 U GoTaq DNA polymerase (Promega, USA) e água para um volume final de 50 µl. As ampliações foram realizadas a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 48°C por 1,5 min, e extensão a 72°C por 1,5 min com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os amplicons (430 bp) foram analisados como descrito na secção prévia e armazenados a -20°C até a análise por DGGE.

4.10 DGGE dos fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA e sequenciamento das bandas

Os padrões (*fingerprints*) da microbiota de todas as amostras de trato digestivo dos espécimes analisados foram obtidos utilizando a técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Denaturante (DGGE) como descrito em da Mota e col. (da Mota e col., 2012) com o sistema D-code (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Os amplicons obtidos do gene que codifica para o 16S rRNA bacteriano foram colocados num gel de poliacrilamida (6%), contendo um gradiente desnaturante de 45% a 65% de ureia (7M) e formamida (40%). Os géis correram numa solução tampão TAE (Tris-acetic, EDTA, Anexo 2) a 60°C por 16 h a 75 V. Depois deste tempo, os géis foram corados com SYBR Green I (Sigma Aldrich, MO, USA). A captura das imagens dos géis, em formato digital, foi obtida utilizando um scanner Thyphoon Trio (GE Healthcare Life Science, USA) com 400 nm de excitação e filtros de emissão de 520 nm. As bandas dominantes e escuras foram marcadas e cortadas dos géis e transferidas a um tubo de 1,5 ml. Os pedaços de gel foram posteriormente macerados com uma ponteira estéril em 50 µl de água ultrapura. O eluente, então, foi utilizado como molde de DNA na reação de PCR, com uso dos oligonucleotídeos U968 e L1401. O sequenciamento de DNA foi realizado na plataforma de sequenciamento de DNA utilizando o analisador genético ABI (Applied Biosystems, CA, USA). As seqüências parciais do gene que codifica para o 16S rRNA das bandas de DGGE, as quais contém a informação da posição taxonômica bacteriana até o nível de gênero foram submetidas ao programa SeqMatch (Wang e col., 2007) do Ribosomal

Database Project (RDP) e preliminarmente identificadas como membros bacterianos da microbiota dos triatomíneos estudados.

4.11 Condições de PCR do gene que codifica para o 16S rRNA, clonagem e sequenciamento

Com o objetivo de identificar com maior precisão a posição taxonômica das bactérias encontradas nos tratos digestivos de *T. brasiliensis* (35Tb e 37Tb) e *T. pseudomaculata* (17Tp), os quais mostraram, uma alta diversidade bacteriana, optamos por sequenciar o gene que codifica para o 16S rRNA completo. A amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeos pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e oligonucleotídeo pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'), como descrito em Massol-Deya e col. (1995). As condições de PCR foram realizadas conforme descrito em da Mota e col. (2012). Os amplicons com o peso molecular esperado foram retirados do gel de agarose (1% p/v) depois da eletroforese e purificados com o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). Os amplicons purificados foram utilizados para realizar a ligação no vector o plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e sequenciados com o método de Sanger com o Big Dye reagent version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) com os oligonucleotídeos M13 (desenhados para sequenciamento de insertos no vector plasmídico pGEM-T) e um oligonucleotídeo universal 341f (5'- CCT ACG GCA GGC AGC AG -3') utilizando o sequenciador de DNA automático Applied Biosystems ABI Prism 3730 xl. As sequências completas foram depositadas no GenBank com números de acesso KP713412 a KP713432. Para identificar com maior precisão as bactérias, foram construídas árvores filogenéticas como descrito anteriormente, com as sequências obtidas do GenBank (Altschul e col., 1990).

4.12 Amplificação e pirosequenciamento da região variável V3-V1 do gene que codifica para o 16S rRNA

Para as análises quantitativas da microbiota, os amplicons do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras de *T. brasiliensis* (35Tb e 37Tb) e de *T. pseudomaculata* (17Tp e 19Tp) e de *R. prolixus* infectados ou não com *T. rangeli* foram submetidos ao pirosequenciamento no FLX-Titanium. As amostras foram amplificadas e sequenciadas utilizando os oligonucleotídeos para a região variável V3-V1 do gene que codifica para o 16S rRNA seguindo o protocolo do HMP 3730 16S versão 4.2 (Andersson e col., 2008) e

disponível no HMP Data Analysis and Coordination Center website [<http://hmpdacc.org/>].

Um total de 76.842 sequências brutas das quatro amostras de *Triatoma* foram processadas com o software do GL FLX. As sequências com um valor menor ao limite do FLX foram descartadas e as restantes foram processadas (“*trimmed*”).

Vale ressaltar que os sequenciadores de DNA automatizados ocasionalmente produzem sequências de baixa qualidade, particularmente perto da sequência do oligonucleotídeo ou no final das sequências. Por exemplo, em bibliotecas de clones de DNA, frequentemente é encontrado a sequência do vector, as sequências poly A ou outras. Portanto se estas sequências não são removidas por “*trimming*”, as análises das sequências podem ser distorcidas quando forem comparadas com sequências de referência. No caso do pirosequenciamento, as sequências além de conter os oligonucleotídeos, contém sequências “*barcoding*”, as quais devem ser removidas para poder ter uma sequência sem contaminação (Countinho e col., 19993; da Mota e col., 2012).

Posteriormente, as sequências foram alinhadas utilizando o programa INFERNAL (Nawrocki e col., 2007). As sequências quimeras foram detectadas e removidas com o programa UCHIME (Edgar e col., 2011). A análise das sequências limpas foi realizada utilizando o *Pipeline* baseado no Ribosomal Database Project (RDP) (Cole e col., 2009) e a classificação taxonômica foi designada com base no RDP (Wang e col., 2007), com um nível de confiança de 0.90. Para estimar a diversidade microbiana, foi utilizada uma cobertura Good (calculado como $[1-(n/N)] \times 100$, donde n é o número de filotipos únicos e N é o número de sequências), o índice de diversidade de Shannon-Wiener e Chao 1. O índice de diversidade de Shannon-Wiener e a equitabilidade foram calculados utilizando a equação $H = -\sum RA_i \ln(RA_i)$, e $E_H = H/\ln(S)$, respectivamente (donde RA_i é a proporção de i^{ro} OTU e S é o número total de OTUs) (Dethlefsen e col., 2008).

4.13 Preparação das amostras dos tratos digestivos e análise proteômica por LC-MS/MS

4.13.1 Precipitação de proteínas

Logo após a extração dos tratos digestivos inteiros (intestino anterior, médio e posterior), as amostras após rompimento das paredes do intestino médio e reto, foram lavadas três vezes em PBS 1X e dispostas em tubos separadamente em 2 insetos de cada espécie de *D. maxima*, *P. megistus* e *R. prolixus* e 3 insetos de *T. infestans*. Estes foram

preservados no gelo e pesados para cálculo da adição de tampão de lise (Tampão RIPA: 50 mM Tris-CL pH8, 150 mM NaCL, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato, 1 mM CaCL₂) utilizado por amostra. Posteriormente foi adicionado coquetel de inibidores de protease (P8340 da Sigma na proporção de 1:100) e a lise foi realizada através de dois a três pulsos rápidos (10 segundos) de sonicação mantendo os tubos no gelo, com a ajuda do aparelho Misonix sonicator XL-2000 (Qsonica LLC).

4.13.2 Dosagem de proteínas

As proteínas, após extração, foram precipitadas por ácido tricloroacético (TCA) 17% gelado (Sanchez, 2001) e mantidas por 20 min a -20°C, centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 min, e lavadas duas vezes com acetona/2% TEA (trietanolamina) gelada. Em seguida, foram novamente centrifugadas à 13,000 rpm por 5 min e ressuspensas em tampão de reidratação (IEF - *Isoelectric Focusing Buffer*). A concentração de proteína foi determinada utilizando o método modificado de Lowry e col. (1951) RCDC, da BIORAD, que é compatível com reagentes de solubilização para focalização bidimensional. O procedimento utilizado em triplicata foi o mesmo descrito pelo fornecedor. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. A curva padrão foi elaborada utilizando concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) que variaram entre 0,2 mg/mL a 1,4 mg/mL. Foram também testados outros métodos de quantificação proteica já que a cor das amostras pela contaminação com o sangue interfere na dosagem. No entanto, os resultados obtidos pelo método do RCDC da BIORAD foram os que forneceram informação mais confiável, ao ser realizado controle de concentração pela visualização em gel SDS-PAGE corado com prata. As amostras foram armazenadas a -80°C.

As amostras proteicas dos tratamentos digestivos de ninfas de quinto estágio de *D. maxima*, *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus* armazenadas a -80°C foram preparadas para a análise por nano LC-MS/MS de acordo com o protocolo utilizado por Valente R. H. (comunicação pessoal de Andre Ferreira do Laboratório de Toxinologia/IOC). Para cada 100 µg de proteína foi adicionado 20µl de bicarbonato de amônio 0,4M e Uréia 8M e acrescentados 5µl de ditioneitol 100 mM, seguido de incubação a 37°C, por 3 horas. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 min, cobertas com papel alumínio, com 400 mM de iodoacetamida, à temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas com 1µl de tripsina (0,2 µg/ul em ácido acético 50 mM) (Promega, USA), por 17 horas a 37°C.

A reação foi interrompida com ácido fórmico em água (q.s.p. 1% v/v). Os peptídeos foram purificados pelas colunas MacroSpin C18 (The NestGroup, Southbotough, MA), dosados por nanodrop e secos no *speedvac* por aproximadamente 30 min. Depois os peptídeos, foram enviados para análise no LTQ Orbitrap XL (Thermo, USA) da Plataforma de Proteômica do PDTIS (RPT02A-RJ).

4.14 Identificação das proteínas no LTQ-Orbitrap XL

Os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico (0,1%) e aplicados para análise no sistema de nano-HPLC - LC-MS/MS acoplado em linha a um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap XL, e equipado com interface de ionização por nano electrospray – nano ESI (Thermo Fisher Scientific) em gradiente linear de acetonitrila variando de 5 a 40% por 240 min. O espectrômetro de massas operou no modo de aquisição dependente de dados (*Data dependente acquisition* - DDA), alternando automaticamente entre MS e MS/MS. Cada DDA consiste em um escaneamento de busca em uma faixa de 300-2000 m/z e resolução de 60,000 (FWHM @ m/z 400). Para cada MS1, os sete íons mais intensos eram isolados no “*trap linear*” (LTQ) para análise por MS/MS, excluindo-se os precursores monoprotionados. Para fragmentação dos íons no LTQ, foi utilizado o método de dissociação induzida por colisão (“*collision induced dissociation*”, CID), com valor alvo de 1×10^6 íons. Todos os íons fragmento foram analisados no trap linear.

4.17 Análises dos dados de proteômica

Os arquivos brutos com os dados do LTQ-Orbitrap gerados (extensão .RAW) a partir da quantificação “*label free*” (método baseado na fragmentação MS²) foram analisadas no programa *PatternLab for Proteomics* (Carvalho e col., 2016). O programa *PatternLab for Proteomics* utiliza como ferramenta de busca o programa COMET com banco de dados de Hemiptera proveniente do UniProt (versão 05-janeiro-2016), contendo aproximadamente, 157,154 sequências. Os parâmetros utilizados de busca foram carbamidometilação de cisteína, oxidação de metionina, definidos como modificações variáveis, máximo de um sítio de clivagem perdido pela tripsina e tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos fragmentos de 50 ppm e 0,40 Da. Os dados gerados foram validados com a ferramenta SePro do *PatternLab for Proteomics*, com a abordagem *Peptide spectrum matching* – PSM. Sua principal característica é a comparação de espectros experimentais para aqueles teoricamente gerados a partir de uma base de dados

de sequências de proteínas. Os contaminantes, as entradas identificadas no banco de dados reverso e as identificações por sítio foram filtradas. Um dos parâmetros de filtro foi de ao menos um peptídeo único com um *false discovery rate* (FDR) de 0,02 para peptídeo e de 0,01 por proteína.

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com as categorias de ontologia gênica (“*Gene Ontology*”, GO). As principais categorias do GO são: (1) Componente celular, (2) Função molecular e (3) Processo biológico. Dentro de cada uma destas categorias, há uma estrutura de subcategorias específicas. Foi realizada uma comparação de programas para categorização das proteínas identificadas: PIKE (“*Protein Information Knowledge Extractor*” desenvolvido por Medina-Aunon e col., 2010), STRAP (“*Software Tool for Rapid Annotation of Proteins*”, Vivek e col., 2009) e Blast2GO (Conesa & Götz, 2008). O Blast2GO por ser uma plataforma bioinformática que permite a análises de dados em nível de categorias funcionais, mapeamento e anotação funcional foi selecionado para apresentação dos resultados de forma mais completa. Como a anotação das proteínas presentes no banco de dados de Hemiptera ainda não foi finalizada, muitas das proteínas se encontram anotadas como hipotéticas ou putativas. Desta forma, fez-se necessário utilizar um banco de dados com anotação mais refinada com o objetivo de identificar os genes homólogos nos triatomíneos. Para tal, a base de dados utilizada foi de *Drosophila*. Este gênero de inseto foi escolhido para identificar os diferentes genes dos triatomíneos já que apresenta a maior parte de seus genes bem anotados.

A comparação das proteínas identificadas entre as espécies utilizadas foi realizada utilizando o diagrama de Venn com a ferramenta online “Interactivenn” (<http://vis.icmc.usp.br/vicg/paper/638/interactivenn-a-web-based-tool-for-the-analysis-of-sets-through-venn-diagrams>) (Heberle e col., 2015).

A avaliação do peso molecular (MW) e o pI teórico das proteínas identificadas foram calculados utilizando a ferramenta online (http://web.expasy.org/compute_pi/) de acordo com as sequências de aminoácidos previstas.

Além disso, foi utilizado o banco de dados *Protein Data Bank of Transmembrane Proteins* (PDBTM), o qual é mantido pelo Institute of Enzymology by the Membrane Protein Bioinformatics Research Group (Hungria) para identificação das proteínas transmembranar presentes na lista geral de proteínas identificadas.

Para identificar proteínas transmembranares, presentes nas amostras dos triatomíneos obtidas pela proteômica, foi realizada uma comparação de similaridade utilizando o programa Blastp contra o banco de dados de proteínas transmembrana PDBTM com parâmetros predefinidos.

Dois arquivos disponíveis no PDBTM <http://pdbtm.enzim.hu/> (Acesso em 03/04/2016) foram baixados: `pdbtm_alpha_nr.seq` e `pdbtm_beta_nr.seq` e juntados num arquivo único. O número de sequências totais não redundantes foi de 502.

Por outro lado, foi realizada uma identificação das proteínas transmembranares com a informação disponível do transcriptoma e proteoma do trato digestivo de *R. prolixus* (Ribeiro e col., 2014) obtida do "Vector Base" (<https://www.vectorbase.org>), na seção de download (https://www.vectorbase.org/downloads?field_organism_taxonomy_tid=393&field_download_file_type_tid=942&field_download_file_format_tid=472&field_status_value=Current). Os arquivos baixados foram:

1. *Rhodnius prolixus* EST/RNA-seq: Rhodnius-prolixus-NIAID_TSA_GAHY01.fa.gz
2. *Rhodnius prolixus* Geneset/Transcripts: Rhodnius-prolixus-NIAID_TSA_GAHY01.fa.gz
3. *Rhodnius prolixus* Geneset/Peptides: Rhodnius-prolixus-CDC_PEPTIDES_RproC3.1.fa.gz

5. RESULTADOS

No intuito de facilitar a apresentação dos resultados, a tese foi estruturada da seguinte forma:

A primeira parte: descreve, a microbiota bacteriana encontrada no trato digestivo de: **i)** insetos coletados no peridomicílio em Russas (Ceará) e de **ii)** insetos mantidos em condições de Laboratório. Como metodologia, foram utilizadas técnicas independentes de cultivo de bactérias, tais como, reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), clonagem, sequenciamento e pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA. Este assunto resultou numa publicação, cuja referência completa é: “Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods publicado em 2015, no periódico Parasite and Vectors, Apr 24;8:245. doi: 10.1186/s13071-015-0836-z, com a seguinte ordem de autores: **Gumiel M**, da Mota FF, Rizzo V, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM, Garcia Eloi S, Carels N, Azambuja P, e se encontra em anexo ao final da tese (página 133) (anexo 1).

iii) Avaliação do efeito da infecção de ninfas de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma rangeli* sobre a microbiota bacteriana intestinal do inseto. Como metodologia, foi utilizado também o pirosequenciamento, uma técnica independente de cultura. Este assunto resultou numa publicação, cuja referência completa é: *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population, em 2015, no periódico Parasites and Vectors, Mar 1;8:135. doi: 10.1186/s13071-015-0736-2, com a seguinte ordem de autores Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, **Gumiel M**, da Mota FF, Castro DP, Garcia ES, Azambuja P, e também se encontra anexada ao final da tese (página 151) (Anexo 2).

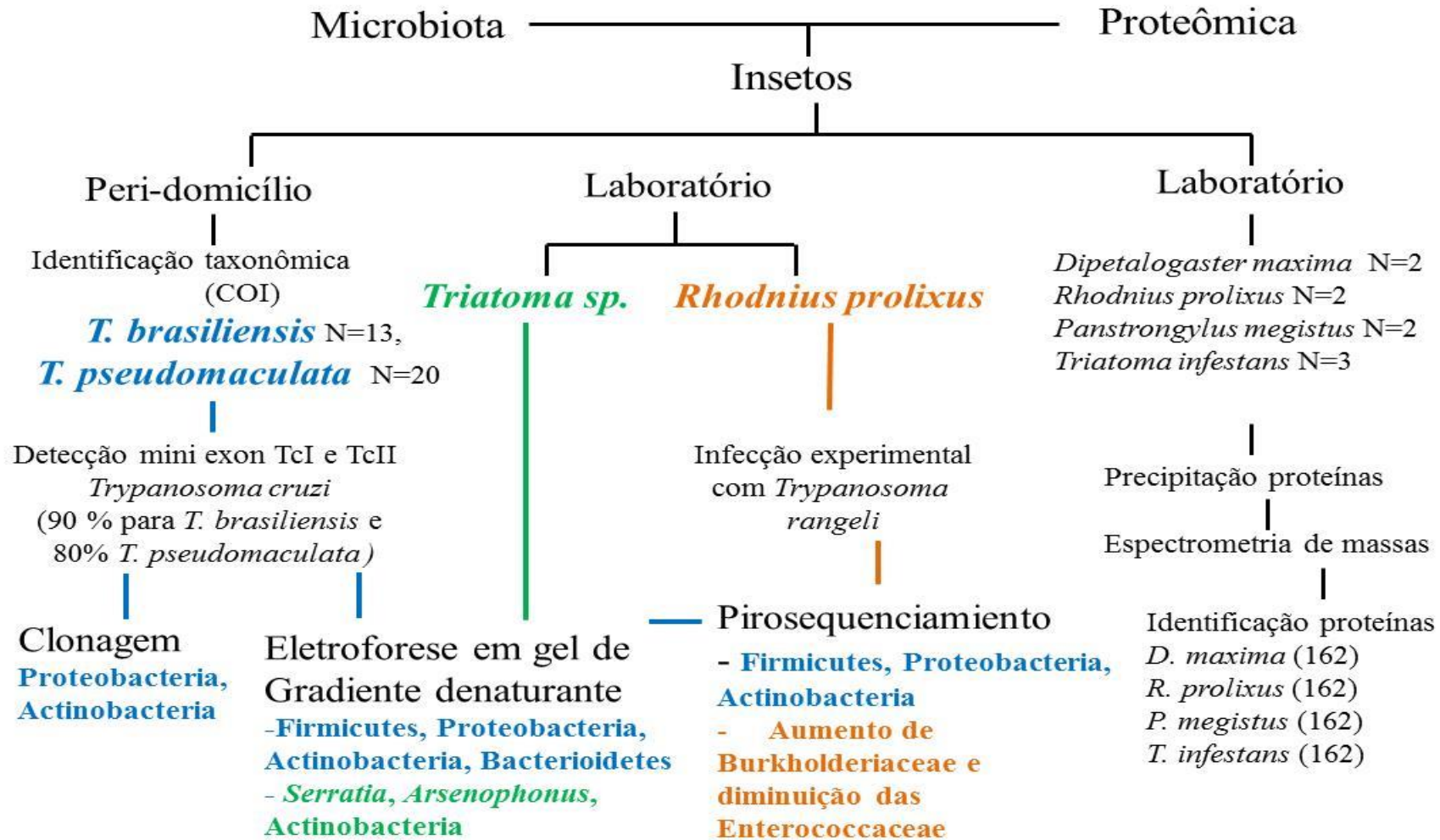
A segunda parte inclui a análise proteômica (“shotgun proteomics”) do trato digestivo de *Dipetalogaster maximus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* visando uma melhor compreensão do ambiente bioquímico intestinal onde normalmente desenvolvem as bactérias e tripanosomatídeos.

Este trabalho de tese foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. As análises da microbiota foram realizadas sob supervisão e co-orientação do Dr. Fabio Mota do Laboratório de Genômica Funcional e Sistemas IOC/FIOCRUZ, e a proteômica sob supervisões da Dra.

Mariana Waghabi (Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática -LAGFB), Dr. Nicolas Carels (Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde -CDTS) sob orientação de Dra. Patricia de Azambuja no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos - LABFISI).

Os trabalhos foram realizados com apoio experimental e suportes da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, PDTIS; plataforma de proteômica RPT02A, RJ - Espectrometria de Massa, RPT02B, RJ – Eletroforese 2D e Fracionamento, RPT02C, RJ - Eletroforese 2D, RPT01A, RJ - Sequenciamento de DNA e da Plataforma de Sequenciamento de Alta Vazão, Instituto Oswaldo Cruz.

Resumo dos Resultados



Primeira Parte:

(i) Identificação da microbiota em insetos coletados no peri-domicílio e (ii) insetos mantidos no insetário

5.1 Caracterização morfológica e molecular dos triatomíneos coletados no peridomicílio.

Os 33 triatomíneos coletados (adultos: fêmeas e machos, e ninfas de terceiro, quarto e quinto estádios) foram identificados no gênero *Triatoma* utilizando características moleculares (Tabela 1). As espécies de triatomíneos com características semelhantes são endêmicas no Ceará, portanto foi importante a utilização de uma técnica molecular baseada no sequenciamento do COI (“*barcoding*”) para a identificação das espécies. A identificação morfológica, previamente, foi de 13 espécimes de *T. pseudomaculata* e 20 de *T. brasiliensis* (Tabela 1). E através dos fragmentos do gene que codificam o COI foram sequenciadas as amostras correspondentes aos espécimes coletados no peridomicílio e alinhadas com as melhores dez sequências disponíveis no GenBank para os gêneros *Triatoma*, obtidas das espécies *T. brasiliensis*, *T. guasayana*, *T. circummaculata*, *T. rubrovaria*, *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. infestans*, *T. dimidiata* e *T. pseudomaculata* e *Rhodnius*, com as espécies *R. neivai*, *R. pictipes* e *R. prolixus*, sendo estes dois últimos utilizados como “*outgroup*”. A árvore filogenética derivada do alinhamento das sequências do COI junto com todas as sequências dos insetos coletados no peridomicílio mostrou as espécies divididas em dois clados para *Triatoma* (Figura 5). O primeiro clado foi suportado por um valor de “*bootstrap*” de 90%, incluindo 20 espécimes do peridomicílio estreitamente relacionadas às sequências dos *T. brasiliensis* de outras localidades da região nordeste de Brasil. O segundo clado foi suportado por um valor de 99% de “*bootstrap*”, incluindo os 12 espécimes coletadas no peridomicílio tendo sido as sequências alinhadas de acordo com as sequências de *T. pseudomaculata* previamente depositadas em banco de dados (Figura 5).

Tabela 1. Variação do perfil de DGGE de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* coletados no peri-domicílio, detecção de *Trypanosoma cruzi* e estágio de desenvolvimento dos triatomíneos utilizados na identificação da microbiota bacteriana do trato digestivo. Os insetos foram coletados no peri-domicílio, Russas (Ceará). A posição taxonômica de todos os triatomíneos foi confirmada pelo gene mitocondrial COI. O perfil de DGGE foi identificado utilizando o gene que codifica para o 16S rRNA (V6-V8).

Amostra	Espécie <i>Triatoma</i> *Caracterização molecular	Infecção		Perfil DGGE	Estádio
		TcI	TcII		
9Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	P	P	A	Ad♂
10Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	C	Ad♀
12Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	A	Ad♂
13Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	D	Ad♀
14Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	F	Ad♂
15Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	E	Ad♀
16Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	B	Ad♀
17Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	P	G	N5
19Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	P	P	H	Ad♂
20Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	N	I	Ad♀
21Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	N	J	Ad♀
22Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	ND	ND	N	Ad♀
50Tp	<i>T. pseudomaculata</i>	N	N	N	N5
24 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	N	N	C	Ad♂
25 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	K	Ad♀
26 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	Ad♀
27 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	L	Ad♀
28 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	C	Ad♂
29 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	Ad♂
30 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	Ad♂
31 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	Ad♂
32 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	N	P	A	Ad♂
33 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	Ad♂
35 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	M	N5
37 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	P	C	N5
38 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	C	N5
39 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	C	N5
40 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	C	N5
41 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	E	N4
42 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	N	N	C	N4
43 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	C	N3
48 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	A	N5
49 Tb	<i>T. brasiliensis</i>	P	N	A	N5

*Caracterização molecular determinada pelo Citocromo Oxidase I (COI); ♀ = fêmea; ♂ = macho; Ad = adulto; N3; N4; N5 estágio ninfal. P = positivo e N = negativo na determinação da presença de *Trypanosoma cruzi*. ND = Não determinado.

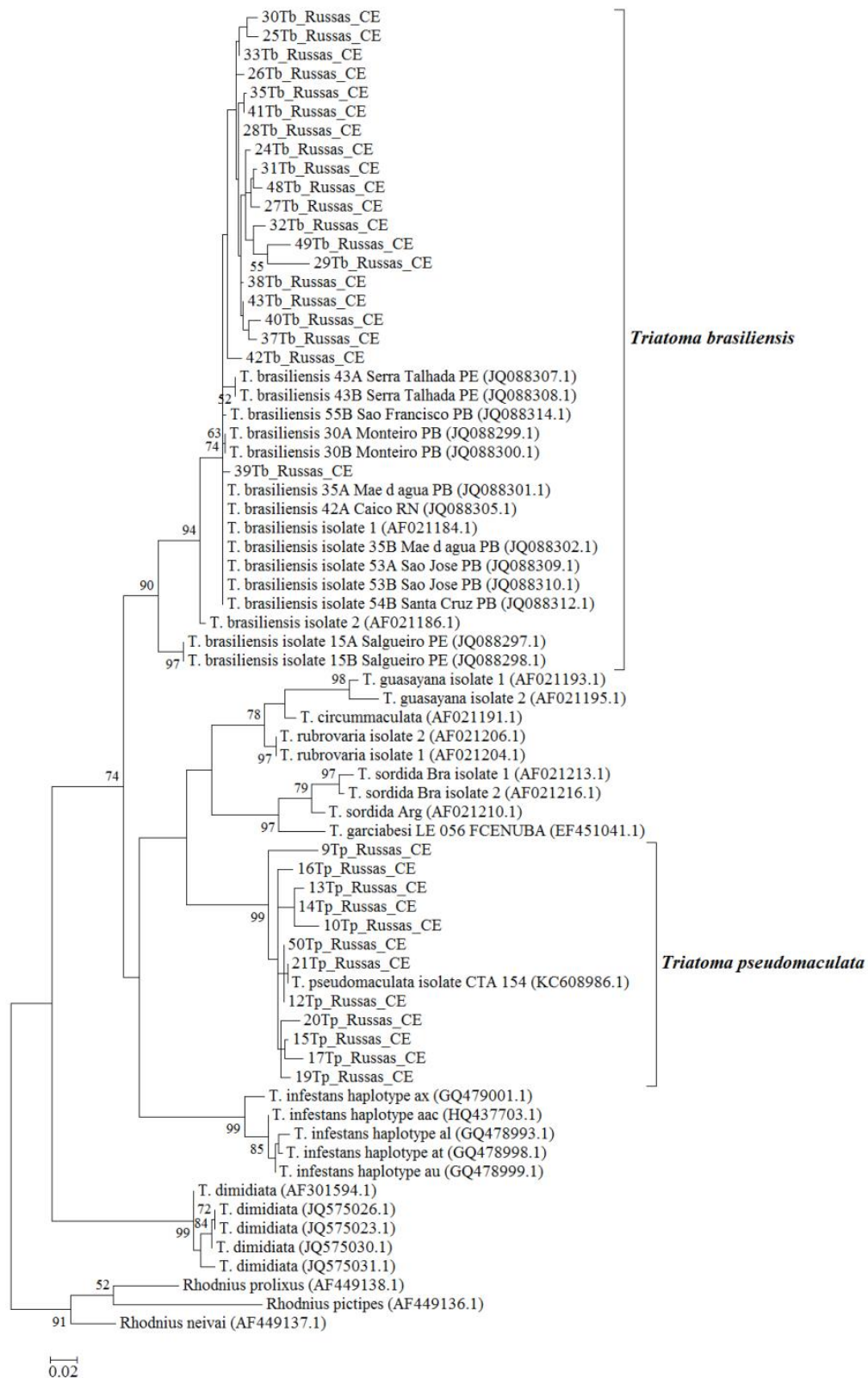


Figura 5. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI da região mitocondrial de triatomíneos. As 32 sequências foram obtidas a partir de espécimes de *Triatoma brasiliensis* e *T. pseudomaculata* coletadas em peridomicílio (Russas, Ceará, Brasil), as quais puderam ser comparadas com outras sequências do gênero *Triatoma* obtidas a partir do GenBank. *Rhodnius* foi utilizado para formar grupos externos. Os valores relativos (%) foram baseados em 1.000 réplicas de bootstrap.

5.2 Distribuição dos genótipos de *Trypanosoma cruzi* (TcI e TcII) em espécimes de *Triatoma* coletados no peridomicílio

Um total de 32 espécimes dos 33 coletados no peridomicílio (12 de *T. pseudomaculata* e 20 de *T. brasiliensis*) foi analisado pela sequência do gene do mini-exon para caracterização da infecção de *T. cruzi*. A porcentagem total de infecção pelo *T. cruzi* em *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis* foi de 80% e 90%, respectivamente. Em *T. pseudomaculata*, 60% dos indivíduos foram positivos somente para TcII e 20% mostraram coinfeção por TcI e TcII (Figura 6). No entanto, em 10% dos triatomíneos adultos de *T. brasiliensis* observou-se infecção somente por TcI e também de 10% somente para TcII, enquanto 70% desta espécie mostraram infecções mistas (TcI e TcII) (Figura 6). Em contraste aos adultos, 70% das ninfas de *T. brasiliensis* mostraram infecção somente pelo TcI, enquanto a coinfeção por TcI e TcII foi de 20% (Figura 6). Amostras negativas para PCR tanto para TcI e TcII variaram de 10 a 20% dos espécimes dos grupos analisados (Figura 6).

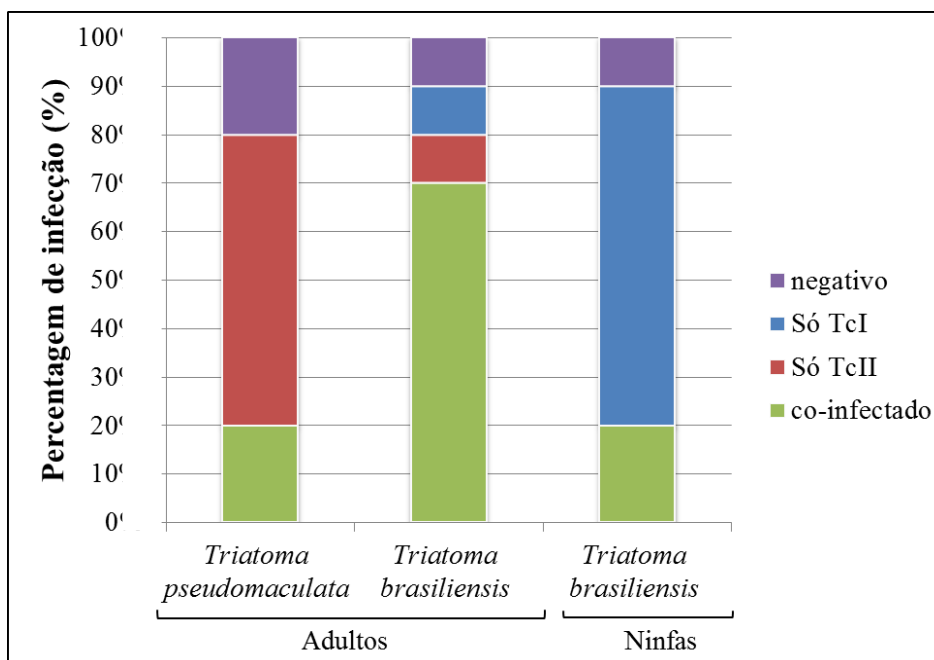


Figura 6. Porcentagem de infecção por *Trypanosoma cruzi* (TcI e TcII) observadas em *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma brasiliensis*. Ninfas e adultos foram coletados no habitat peridomiciliar de Russas (Ceará, Brasil). Cepas de *Trypanosoma cruzi* foram genotipadas pelo marcador do gene mini-exon.

5.3 Avaliação da especificidade do genotipo TcI ou TcII a partir do DNA metagenômico

Para confirmar a especificidade das condições de PCR singleplex no diagnóstico dos genótipos TcI ou TcII em DNA metagenômico de algumas amostras de trato digestivo dos insetos, foi realizado o sequenciamento parcial (200-250 bp) do gene mini-exon pelo método de Sanger. 18 sequências de *T. cruzi* do gene mini-exon de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* infectados com *T. cruzi*, foram alinhados com as sequências de referência das cepas correspondentes a TcI e TcII depositados no GenBank. A árvore filogenética obtida mostrou 2 clados entre o *T. cruzi* correspondentes a TcI e TcII (Figura 7). As sequências amplificadas com oligonucleotídeos para o TcI foram agrupadas no clado TcI junto com as sequências de referência deste clado, enquanto o outro conjunto de sequências também amplificadas com os oligonucleotídeos para TcI foram agrupadas dentro de um clado derivado das sequências de referência de TcII. Por comparação similar com depósitos no GenBank, foram detectados genótipos de *T. cruzi* que diferiram de TcI e TcII em algumas amostras co-infectadas (Figura 7).

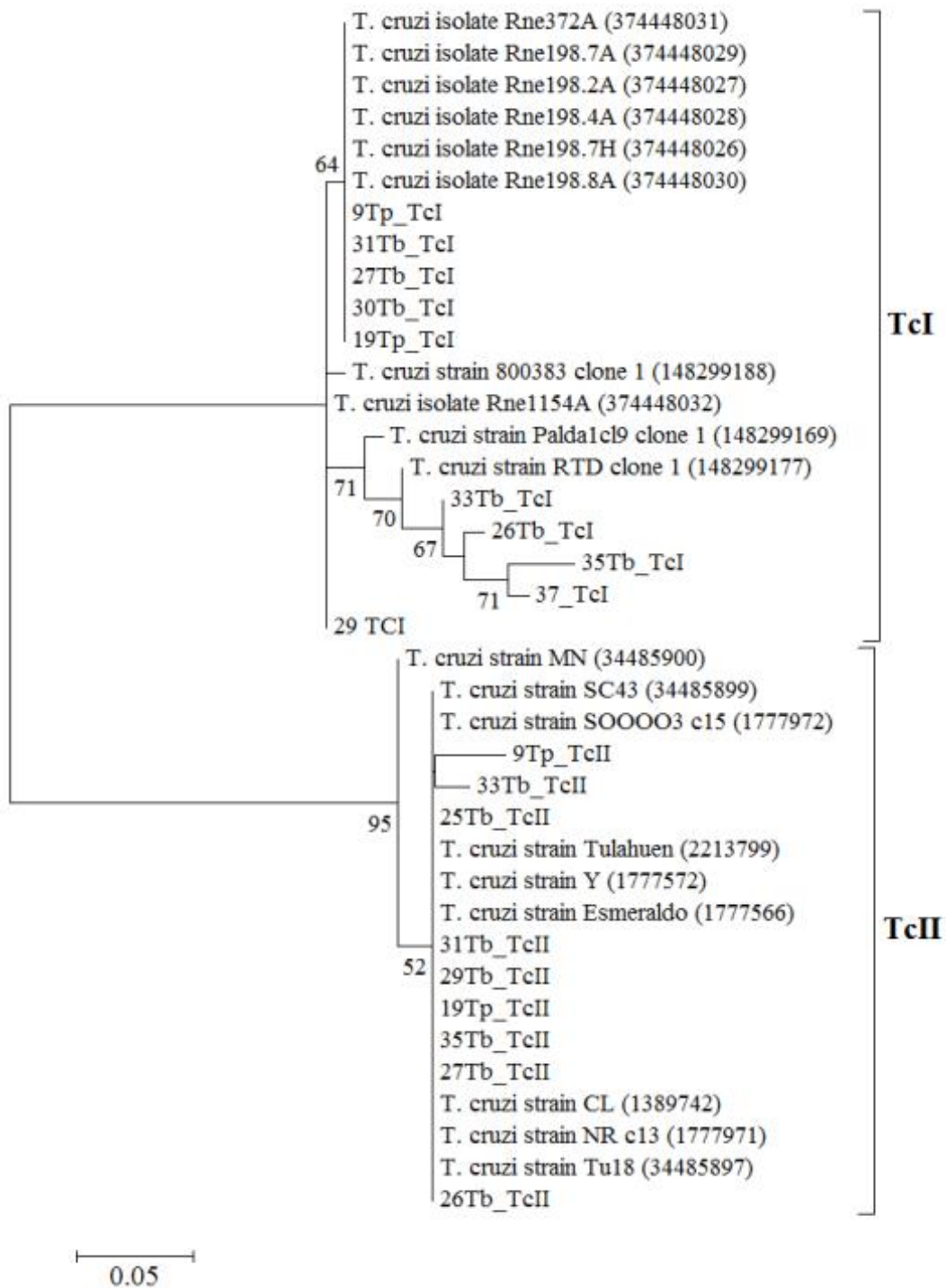


Figura 7. Árvore filogenética baseada em máxima verossimilhança construída com as sequências do gene mini-exon de *Trypanosoma cruzi*. As sequências representativas identificadas como cepas TcI e TcII em *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* coletados no peridomicílio (Russas, Ceará, Brasil) foram comparadas com outras sequências obtidas a partir do GenBank. Os valores relativos (%) em ramos foram baseados em 1.000 réplicas de “bootstrap”.

5.4 Perfil de DGGE da microbiota bacteriana em espécimens de *Triatoma* obtidos de colônias mantidas por diferentes períodos de tempo em Laboratório.

Os perfis de DGGE de *T. brasiliensis* obtidos de colônias mantidas em insetário por menos de três meses (colunas C a G), três anos (H a J) e cinco anos (A a B) de insetos trazidos do peridomicílio (Tabela 2), diferiram na composição da microbiota bacteriana (Figura 8). Os perfis de DGGE foram os mesmos para cada replicata da mesma categoria. Os sequenciamentos das bandas revelaram o gênero bacteriano correspondente como sendo: bandas 1 a 8 foram identificadas como membros do gênero *Arsenophonus* e as bandas 9 a 12 correspondentes ao gênero *Serratia* (Figura 8). As mudanças de composição bacteriana foram observadas quando os triatomíneos passaram do campo às condições do Laboratório, com uma redução notável na população de *Serratia* balanceada por um incremento dos organismos intracelulares, como o *Arsenophonus*.

Tabela 2. Espécies de triatomíneos utilizadas na comparação da microbiota bacteriana do trato digestivo. Os insetos foram obtidos de colônias mantidas por diferentes tempos em Laboratórios.

Linha	Espécie	Procedência	Tempo da manutenção da colônia
A	<i>Triatoma infestans</i>	Laboratório	5 anos
B	<i>Triatoma vitticeps</i>	Laboratório	5 anos
C	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Campo	Menos de três meses
D	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Campo	Menos de três meses
E	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Campo	Menos de três meses
F	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Campo	Menos de três meses
G	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Campo	Menos de três meses
H	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Laboratório	3 anos
I	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Laboratório	3 anos
J	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Laboratório	3 anos

Insetos mantidos no Laboratório de Medicina Tropical (A-B) e no Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas (C-J), ambos do IOC/FIOCRUZ.

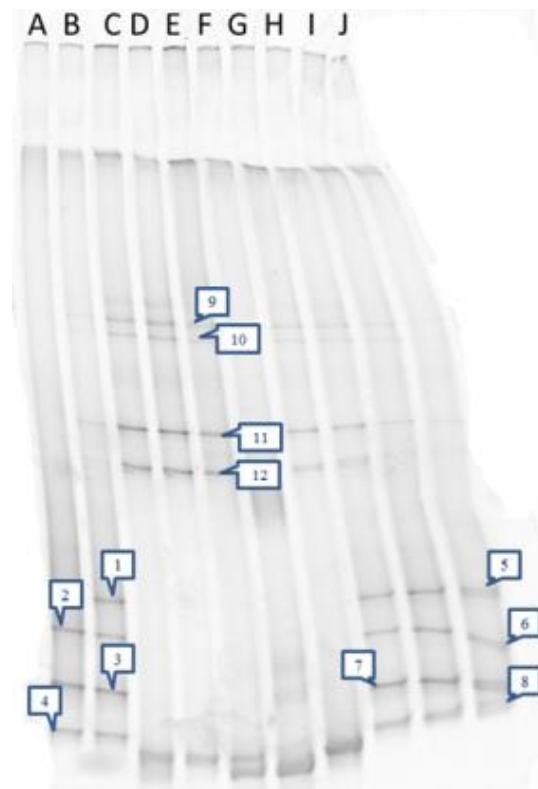


Figura 8. Gel de DGGE de fragmentos do gene bacteriano que codifica para o 16S rRNA amplificados a partir das amostras da microbiota do trato digestivo de triatomíneos. As linhas correspondem aos espécimes de (A) *Triatoma infestans* e (B), *Triatoma vitticeps* mantidos no insetário (Fiocruz / IOC) em colônia por cinco anos, (C a G) *Triatoma brasiliensis* (espécimes de colônia de menos de três meses) e (H e J) *T. brasiliensis* obtidos de uma colônia de três anos. Bandas de 1 a 8 correspondem ao gênero *Arsenophonus* e 9 a 12 ao gênero *Serratia*.

5.5 Perfis de DGGE da microbiota bacteriana nos espécimes de *Triatoma* coletados no peridomicílio

Os perfis de DGGE das comunidades bacterianas de amostras do trato digestivo correspondentes a 13 espécimes de *T. pseudomaculata*, resultaram em 11 perfis diferentes de DGGE (A - J e N), enquanto somente dois espécimes apresentaram o mesmo perfil (A e N) (Figura 9 e Tabela 1). Em contraste, para *T. brasiliensis* foram observados somente seis diferentes perfis de DGGE (C, A, E, K, L e M) de 20 amostras correspondentes ao trato digestivo sendo que destas, 13 amostras pertencerem somente ao perfil C e três ao perfil A. (Figura 9 e Tabela 1).

As análises realizadas através do SeqMatch das sequências associadas com as bandas de maior representatividade no DGGE mostraram que a microbiota bacteriana é formada por nove diferentes gêneros correspondentes a quatro filo: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (Figura 9). As sequências associadas com as bandas de DGGE, por referências ao “match” mais próximo com 99% de identidade da sequência, indicaram uma comunidade bacteriana constituída dos seguintes gêneros: *Serratia* (bandas 5 a 8, 12, 13 e 15); *Pantoea* (banda 31); *Enterococcus* (bandas 1 e 19); *Bacteroidetes* (banda 35); *Gordonia* (bandas 2, 10, 26, 32 e 34); *Mycobacterium* (bandas 3, 4, 9, 11, 22 a 25, 27, 29 e 39); *Corynebacterium* (banda 20); *Dietzia* (bandas 18); *Rhodococcus* (bandas 28, 37 e 38); Enterobacteriaceae (bandas 14, 16, 17, 20, 21 e 30); e Nocardiaceae (banda 33 e 36) (Figura 9). *Serratia*, *Gordonia* e *Mycobacterium* foram os gêneros de maior predominância nos espécimes procedentes do peridomicílio correspondentes aos espécimes de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*. (Figura 9).

5.6 Filogenia e identificação de espécies bacterianas presentes no trato digestivo de *Triatoma* coletados no peridomicílio utilizando uma biblioteca constituída de clones do gene que codifica para o 16S rRNA

A árvore filogenética foi construída a partir de 21 sequências completas derivadas de clones do gene que codifica para o 16S rRNA de uma biblioteca obtida das análises da microbiota bacteriana dos tratos digestivos dos espécimens de *Triatoma*. Esta árvore foi montada com os melhores 10 “hits” de sequências disponibilizadas no GenBank, resultando quatro clados relacionados a *Corynebacterium* spp., *Gordonia* spp., *Dietzia* spp. e *Serratia* spp. (Figura 10). Alguns clones procedentes de *T. pseudomaculata* (17Tp) foram agrupados com *Corynebacterium stationis*, enquanto outros clones agruparam com

Corynebacterium glutamicum. Outros clones foram agrupados com sequências de *Dietzia* sp., no entanto, nestes casos, não foi possível chegar a uma identificação de espécie utilizando as sequências dos amplicons.

Os clones identificados como *Gordonia terrae* foram agrupados com as sequências de *Gordonia* sp. O genoma KTR9 junto com os clones relacionados a *Serratia marcescens* foram agrupados em dois clados correspondendo a (i) cepas de *Serratia marcescens* WW4 e SCBI cujos genomas já foram sequenciados e disponibilizados, e (ii) cepas MH6, H3010 e SS04. Ambos os clados contendo sequências de *Serratia* não cultiváveis e (JQ410834 e JQ410840) previamente isoladas do trato digestivo de *R. prolixus*. Curiosamente, algumas sequências obtidas das análises de isolados clínicos identificadas como *Corynebacterium stationis* (NML 94-0424 e ATCC 14403) e *Dietzia maris* (CA160) foram agrupadas com as sequências do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras de trato digestivo de *T. pseudomaculata* capturados no peridomicílio. (Figura 10).

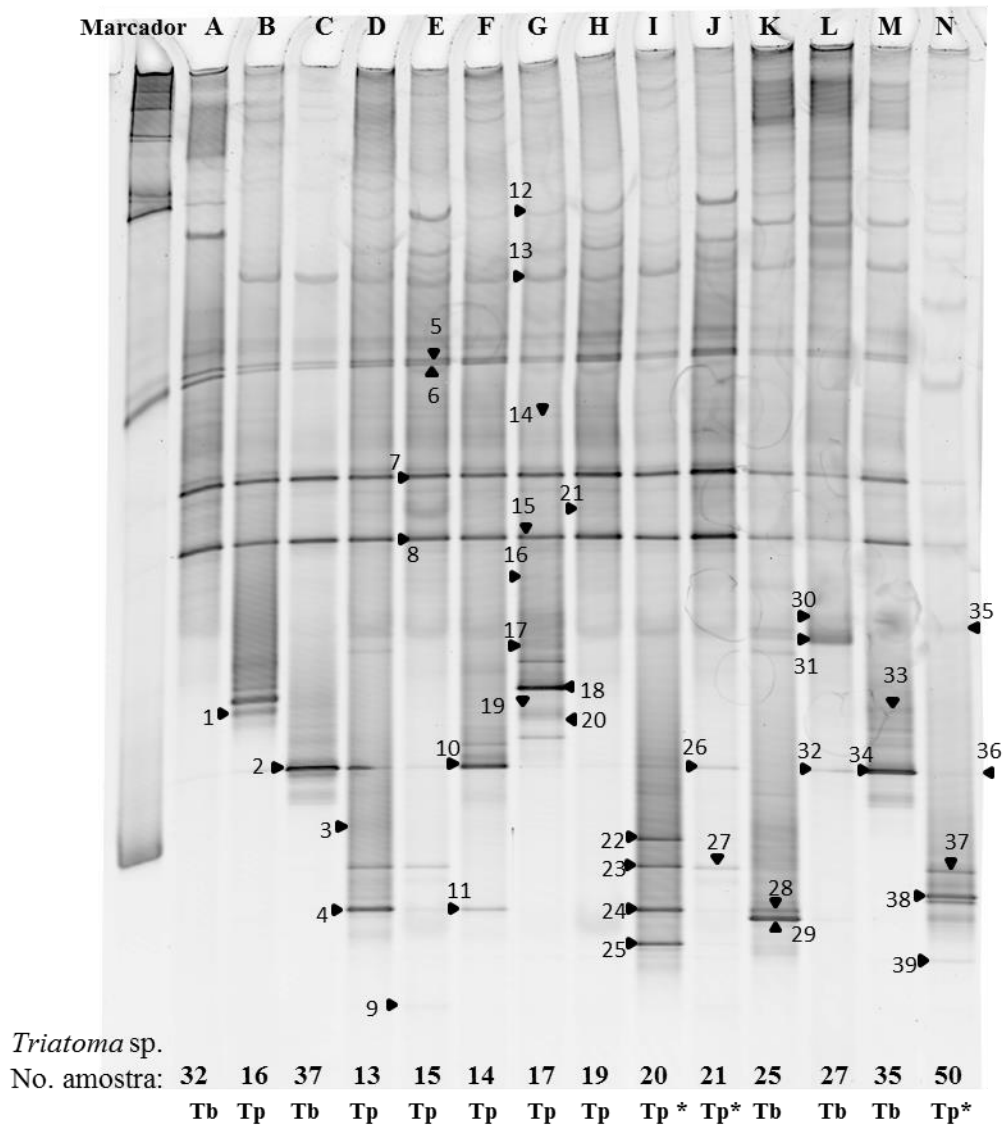


Figura 9. Gel de DGGE de fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA da microbiota bacteriana de *Triatoma pseudomaculata* (Tp) e de *Triatoma brasiliensis* (Tb) coletados no habitat peridoméstico (Russas, Ceará, Brazil). As letras A - N correspondem aos perfis das variações de bandas identificadas nas amostras dos triatomíneos. As bandas correspondentes a *Serratia* (5 a 8, 12, 13 e 15); *Pantoea* (31); *Enterococcus* (1 e 19); *Bacteroidetes* (35); *Gordonia* (2, 10, 26, 32 e 34); *Mycobacterium* (3, 4, 9, 11, 22 a 25, 27, 29 e 39); *Corynebacterium* (20); *Dietzia* (18); *Rhodococcus* (28, 37 e 38); Enterobacteriaceae (14,16, 17, 20, 21 e 30); e Nocardiaceae (33 e 36). (*) representa as amostras negativas para *Trypanosoma cruzi*.

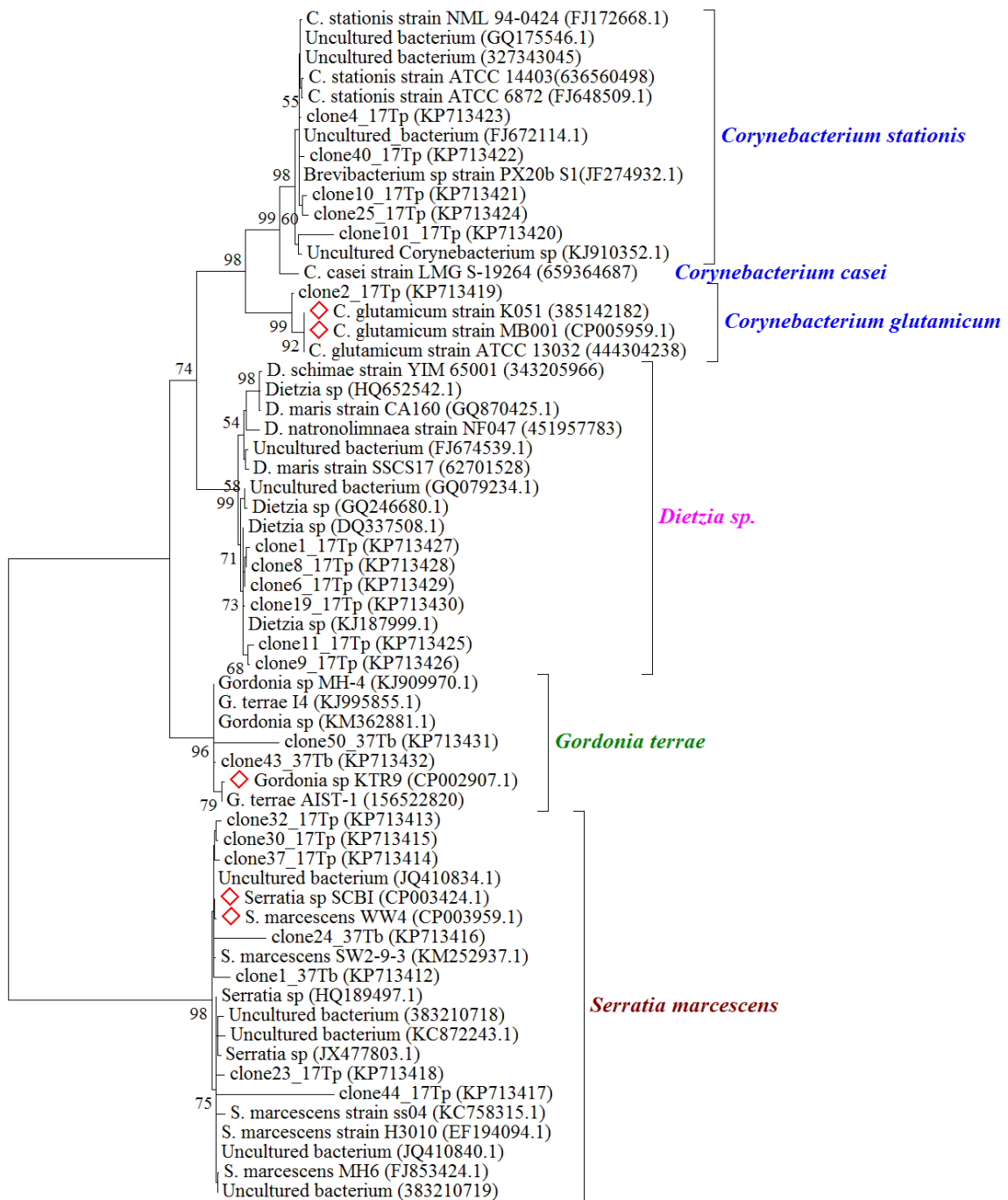


Figura 10. Árvore filogenética baseada em máxima verossimilhança construída com as sequências do gene que codifica para o 16S rRNA obtidas das análises da microbiota bacteriana do trato digestivo de *Triatoma pseudomaculata* (Tp) e *Triatoma brasiliensis* (Tb) coletados no habitat peridoméstico (Russas, Ceará, Brazil). As 21 sequências parciais representativas identificadas como genes bacterianos foram comparadas com outras sequências parciais obtidas no GenBank. Dessas sequências algumas delas são de espécies com genomas completos (marcado com losangos vermelhos). As porcentagens foram baseadas num “bootstrap” de 1000.

5.7 Pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA e análise quantitativa da microbiota bacteriana do trato digestivo de *Triatoma* coletados no peridomicílio

Através do pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras correspondentes ao trato digestivo das quatro espécies de triatomíneos, foram obtidas 32,580 sequências e classificadas em 30 gêneros bacterianos (Tabela 3). Os gêneros bacterianos com maior abundância encontrados em *T. brasiliensis* foram (i) *Mycobacterium* sp. (74%), *Rhodococcus* sp. (24%) e *Serratia* sp. (1%), na amostra 25Tb e (ii) *Gordonia* sp. (96%) e *Serratia* sp. (3%) na amostra 35Tb (Tabela 2). Em relação ao *T. pseudomaculata*, os gêneros bacterianos com maior abundância foram (i) *Dietzia* sp. (67%), *Corynebacterium* sp. (27%) e *Serratia* sp. (5%) em 17Tp, e (ii) *Serratia* sp. (97%) seguidos de outros gêneros como *Mycobacterium* sp., *Hydrogenophilus* ssp., *Williamsia* sp. e *Gordonia* sp., cada um com menos de 1%, na amostra 19Tp (Tabela 3). Apesar dos diferentes gêneros bacterianos encontrados para cada espécime avaliado, a microbiota do trato digestivo de *Triatoma* foi composta predominantemente por gêneros da subordem Corynebacterinae (81%), tal como *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Williamsia* (marcados em negrito na Tabela 3). *Serratia*, um gênero bacteriano da família Enterobacteriaceae, foi o único encontrado em todas as amostras analisadas e representou 18% de todas as sequências obtidas pelo pirosequenciamento do 454.

As curvas de rarefação (Figura 11A e 11B) obtidas para 25Tb, 35Tb e 17Tp mostraram que a composição bacteriana da microbiota destes espécimes foi devidamente analisada estando as amostras pirosequenciadas próximas de uma saturação. Em contraste, na curva representada para o espécime 19Tp se observa que não está próxima de uma saturação e faltam muitas espécies bacterianas a serem desvendadas (Figura 11B). Portanto, o espectro real de espécies bacterianas desta amostra poderia efetivamente ser maior do que os 19 gêneros reportados neste trabalho (Tabela 3; Figura 11A).

Tabela 3. Gêneros bacterianos identificados por pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras de trato digestivo de espécimes de *Triatoma brasiliensis* (25Tb e 35Tb) e *Triatoma pseudomaculata* (17Tp e 19Tp), coletados no peridomicílio, em Russas, CE.

Gênero bacteriano	25Tb	35Tb	17Tp	19Tp
<i>Acinetobacter</i>		1		2
<i>Actinomyces</i>			1	
<i>Adhaeribacter</i>				1
<i>Bradyrhizobium</i>	1			
<i>Chryseobacterium</i>				1
<i>Comamonas</i>		1		
<i>Corynebacterium</i>*		1	2015	
<i>Diaphorobacter</i>			2	1
<i>Dietzia</i>*		1	5008	
<i>Enterococcus</i>			2	6
<i>Geobacillus</i>		2		
<i>Gordonia</i>*	1	11825		10
<i>Haemophilus</i>		1		
<i>Hydrogenophilus</i>		6	1	15
<i>Janthinobacterium</i>		1		
<i>Marinomonas</i>				1
<i>Microvirga</i>				2
<i>Mycobacterium</i>*	5737			27
<i>Propionibacterium</i>		1		5
<i>Pseudomonas</i>		4	3	2
<i>Rhodococcus</i>*	1855			5
<i>Serratia</i>	116	426	422	4917
<i>Shinella</i>				2
<i>Sphingomonas</i>				1
<i>Staphylococcus</i>	1	3		
<i>Stenotrophomonas</i>			1	
<i>Streptococcus</i>		1		1
<i>Streptophyta</i>		2		1
<i>Williamsia</i>*		3		15
<i>Xanthobacter</i>		1		
Não assinados (gênero >90% bootstrap)	52	13	9	45

*subordem Corynebacterineae

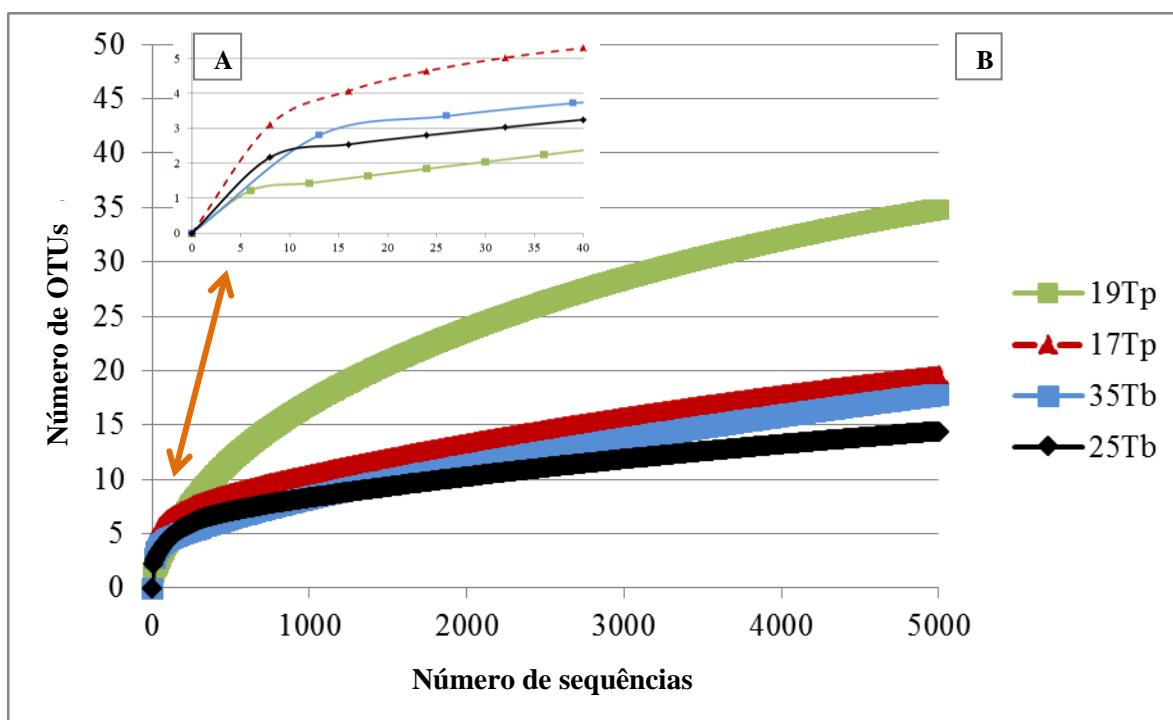


Figura 11. Curva de rarefação das sequências do gene que codifica para o 16S rRNA da microbiota bacteriana do trato digestivo dos triatomíneos. As curvas de rarefação foram calculadas utilizando o pipeline do RDP a partir das bibliotecas dos fragmentos do gene que codifica para o 16S rRNA de *Triatoma brasiliensis* (25Tb e 35Tb) e *Triatoma pseudomaculata* (17Tp e 19Tp). No panel A: pode-se observar a amplificação do número das diferentes OTUs 1-5 em função do número de clones sequenciados pelo pirosequenciamento (0-40 sequências). No panel B: *T. pseudomaculata* (19Tp) não chegou próximo a saturação das OTUs bacterianas ainda que tenham sido analisadas 5000 sequências amostradas, em contraste, a microbiota bacteriana de *T. brasiliensis* (25Tb e 35Tb) e de *T. pseudomaculata* (17Tp) que chegaram próximas uma saturação da curva de rarefação com somente 5 e 155 sequências amostradas, respectivamente. Os números de OTUs se referem a grupos de OTUs com distância de 0.05.

Em relação aos valores das coberturas de Good estimadas das bibliotecas de 16S rRNA, houve variação de 99,8 e 99,7% entre as amostras *T. brasiliensis* (25Tp e 35Tp) e 99,7 e 99,3 para *T. pseudomaculata* (17Tp e 19Tp), indicando uma boa representatividade da microbiota. Em relação ao índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), o maior valor foi para a amostra 17Tp, provavelmente influenciado pela alta equitabilidade entre os 23 OTUs (Tabela 3). E, contrariamente, o menor valor foi para a amostra 19Tp, que apresentou baixa equitabilidade, provavelmente devido à presença dominante do gênero *Serratia* (Tabela 2). No entanto, esta amostra teve o maior número de clusters com 35 OTUs (Figura 11A e 11B), e com 19 gêneros bacterianos encontrados, resultando na

amostra com maior diversidade (Tabela 3). Por outro lado na amostra 35Tb foi observado o maior valor do estimador Chao 1 resultando na amostra com maior riqueza e contrariamente a amostra 25Tb teve o menor valor do estimador Chao1.

Tabela 4. Estimativa da diversidade e riqueza das amostras de trato digestivo de *Triatoma brasilienses* (Tb) e *Triatoma pseudomaculata* (Tp) coletados no peridomicílio em Russas (Ceará). Índice Shannon-Wiener (H'), estimador Chao 1 (chao), Equitabilidade (E), N= Número de sequências analisadas, Número de clusters observados por cada distância (%) relacionados ao gênero OTU 0.05.

Distância OTU (%)	Amostra	N	clusters	chao	H'	E
0,05	25Tb	7763	17	20,8	75,063	26,494
0,05	35Tb	12293	29	59	92,225	27,389
0,05	17Tp	7464	23	30,2	122,261	38,993
0,05	19Tp	5060	35	41,6	25,944	7,297

ii) Identificação da microbiota bacteriana em ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. rangeli*

5.8 Pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA e análises quantitativas da microbiota bacteriana do trato digestivo de *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*

Após a infecção de ninfas de quarto estágio com *T. rangeli*, foi confirmada a presença de parasitas vivos no trato digestivo dos insetos e encontrado 93% de positividade no 7º dia após a alimentação infectiva. Em quinto estágio, após alimentação não infectiva, pode ser constatada a manutenção da infecção pelo parasita num percentual acima de 73,3% dos insetos após o 7º dia de alimentação.

Através do pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras correspondentes ao trato digestivo de quatro ninfas de quinto estágio, obtidas do grupo de insetos infectados previamente no quarto estágio com *T. rangeli*, bem como de quatro ninfas de quinto estágio sem o parasita (controle não infectado), foram obtidas mais

de 30,000 sequências e classificadas em famílias bacterianas (Figura 12).

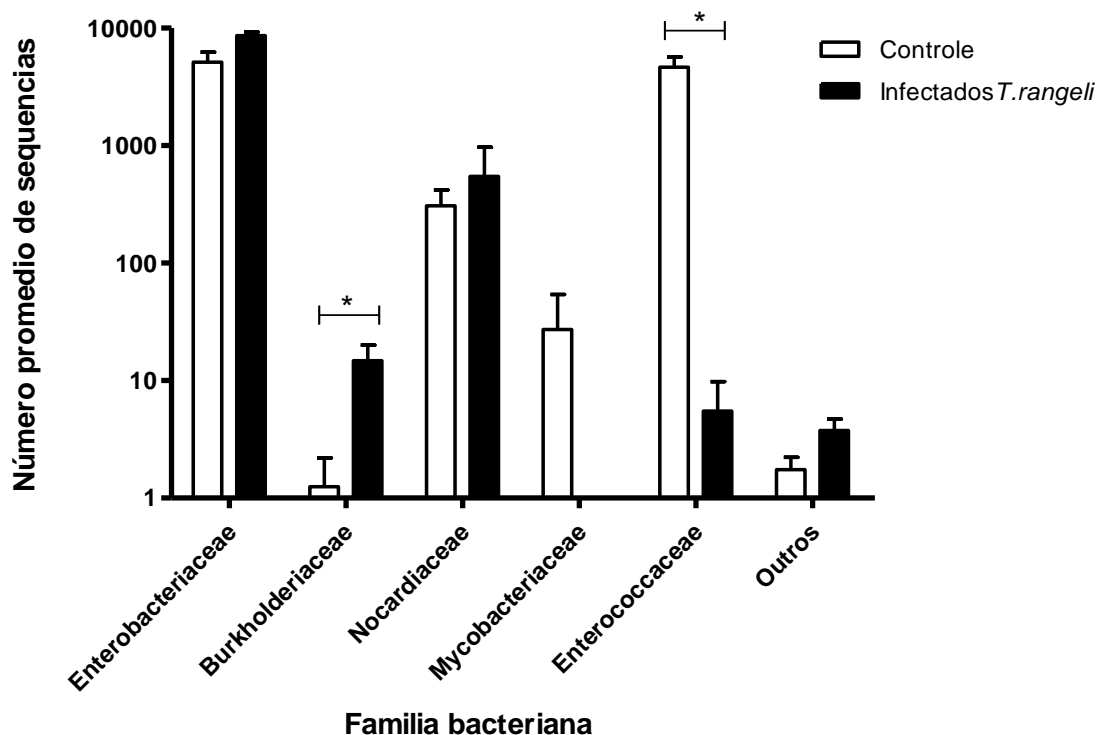


Figura 12. Composição bacteriana identificada por pirosequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA das amostras de intestino médio anterior de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma rangeli* sete dias após alimentação. Previamente, ninfas de quarto estágio foram alimentadas com sangue inativado de coelho, tendo sido adicionado *Trypanosoma rangeli* na concentração de 1×10^6 epimastigotes/ml. Os insetos após a muda para quinto estágio, foram realimentados com sangue normal para análise da microbiota. As sequências em *reads* designadas às famílias bacterianas de quatro insetos por grupo infectado ou controle (não infectado), estão representadas no histograma. Outros: representa as famílias encontradas com uma ou duas sequências sendo Pseudomonadaceae, Comamonadaceae, Rhodobacteraceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobacteriaceae, Staphylococcaceae, Bacillaceae, Nitrospiraceae, Flavobacteriaceae. As médias foram comparadas utilizando o Test – T e Mann Whitney, $p < 0.05$.

A microbiota bacteriana do intestino médio anterior das ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. rangeli* foi predominantemente composta por famílias de Enterobacteriaceae e Enterococcaceae, nas quais estão incluídos os gêneros de *Serratia* e *Enterococcus* respectivamente, assim como também bactérias da família Nocardiaceae. Sete dias após a alimentação dos insetos em quinto estágio, houve alterações significativas nas famílias Enterococcaceae e Burkholderiaceae da microbiota bacteriana das ninfas infectadas pelo parasito se comparados aos dados encontrados aos insetos do grupo

controle não infectados. Enquanto nos insetos infectados o número de sequências de Enterococcaceae apresentou uma diminuição, Burkholderiaceae resultou no aumento quando as amostras do trato digestivo foram comparadas aos insetos controles, não infectados (Figura 12).

Segunda parte: Análise proteômica

5.9 Proteínas identificadas

Após extração proteica do trato digestivo de cada espécie de triatomíneo de *D. máxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans* obteve-se aproximadamente a concentração de 300 µg/ml por amostra. A análise do perfil proteico por SDS-PAGE indicou equivalência aproximada entre as amostras das diferentes espécies de insetos.

Foram identificadas proteínas das quatro espécies estudadas utilizando o algoritmo do programa *PatternLab for Proteomics* com os parâmetros descritos. Foram identificadas 630 proteínas para as quatro espécies estudadas, e entre elas 195 foram anotadas no banco de dados como não caracterizadas. Foram identificados 560 peptídeos correspondentes à 162 proteínas para *D. maxima*, 479 peptídeos e 153 proteínas para *P. megistus*, 441 peptídeos e 139 proteínas para *R. prolixus*, 592 peptídeos e 176 proteínas para *T. infestans* (Tabela 5), validadas segundo o princípio de máxima parcimônia.

Tabela 5. Número de peptídeos e proteínas identificados nos tratos digestivos de triatomíneos pelo *PatternLab for Proteomics* e validadas segundo o princípio de máxima parcimônia.

<u>Espécie</u>	<u>Peptídeos</u>	<u>Proteínas</u>
<i>D. maxima</i>	560	162
<i>P. megistus</i>	479	153
<i>R. prolixus</i>	441	139
<i>T. infestans</i>	592	176

As proteínas identificadas apresentaram massa molecular (MM) variando de 9-967 kDa em todas as espécies estudadas. De forma interessante foi observado que a maioria das proteínas identificadas nas diferentes espécies apresentaram MM variando entre 15-45 kDa, sendo 54,2% em *D. maxima*, 59,6% em *P. megistus*, 45,8% em *R. prolixus* e 50,3% em *T. infestans* (Figura 13). Esta análise também revelou dados referentes ao ponto isoelétrico (pI) das proteínas identificadas. Observou-se que em todas as espécies o pI

variou de 4 a 11. Entretanto, a maioria das proteínas apresentavam pI entre 5-7, sendo 57,2% do total das proteínas do trato digestivo de *D. maxima*, 59,6% de *P. megistus*, 58,6 de *R. prolixus* e 50,0% de *T. infestans* (Figura 14). Foi realizada uma análise de relação massa molecular x ponto isoelétrico (MM x pI) para cada espécie (Figura 15), obtidos dos resultados representados nas Figuras 13 e 14.

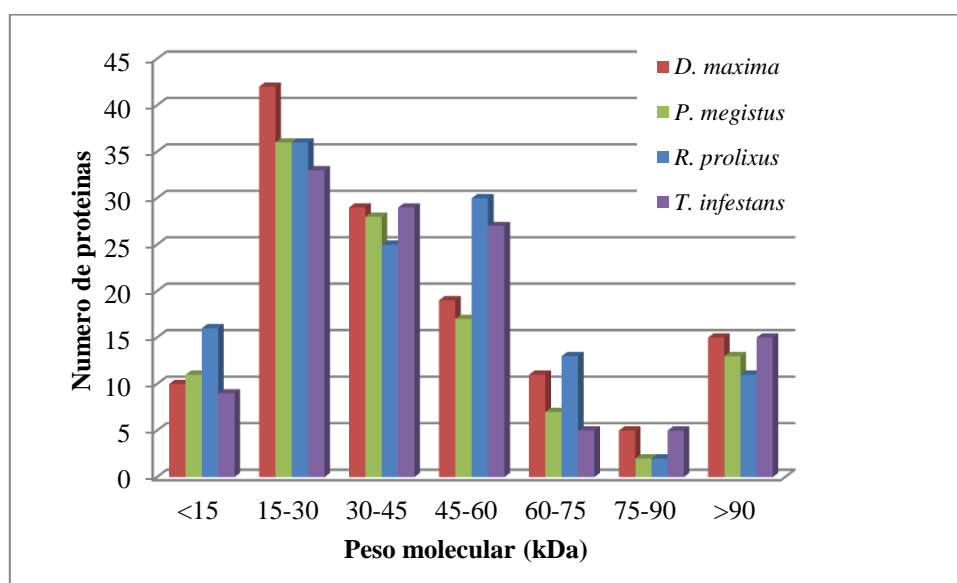


Figura 13. Distribuição teórica da massa molecular das proteínas identificadas pelo “shotgun”. A massa molecular (kDa) das proteínas foi calculada utilizando a ferramenta compute pI/Mw (“Molecular weight”, Mw) (http://web.expasy.org/compute_pi/), de acordo com as sequências dos aminoácidos das proteínas identificadas.

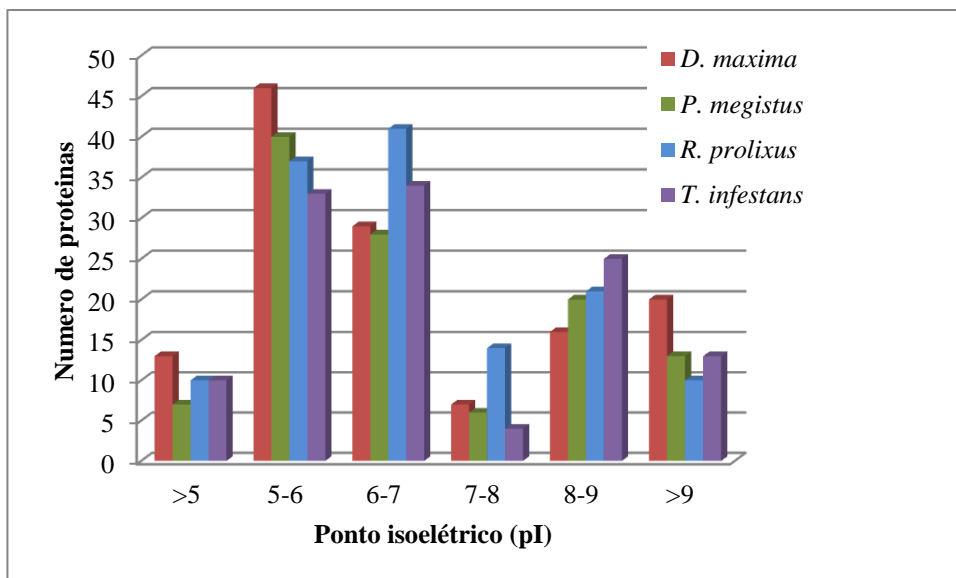


Figura 14. Distribuição teórica do ponto isoelétrico das proteínas identificadas pelo “shotgun”. O ponto isoelétrico (pI) das proteínas foi calculado utilizando a ferramenta compute pI/Mw (“Isoelectric point”, pI) (http://web.expasy.org/compute_pi/), de acordo com as sequências dos aminoácidos das proteínas identificadas.

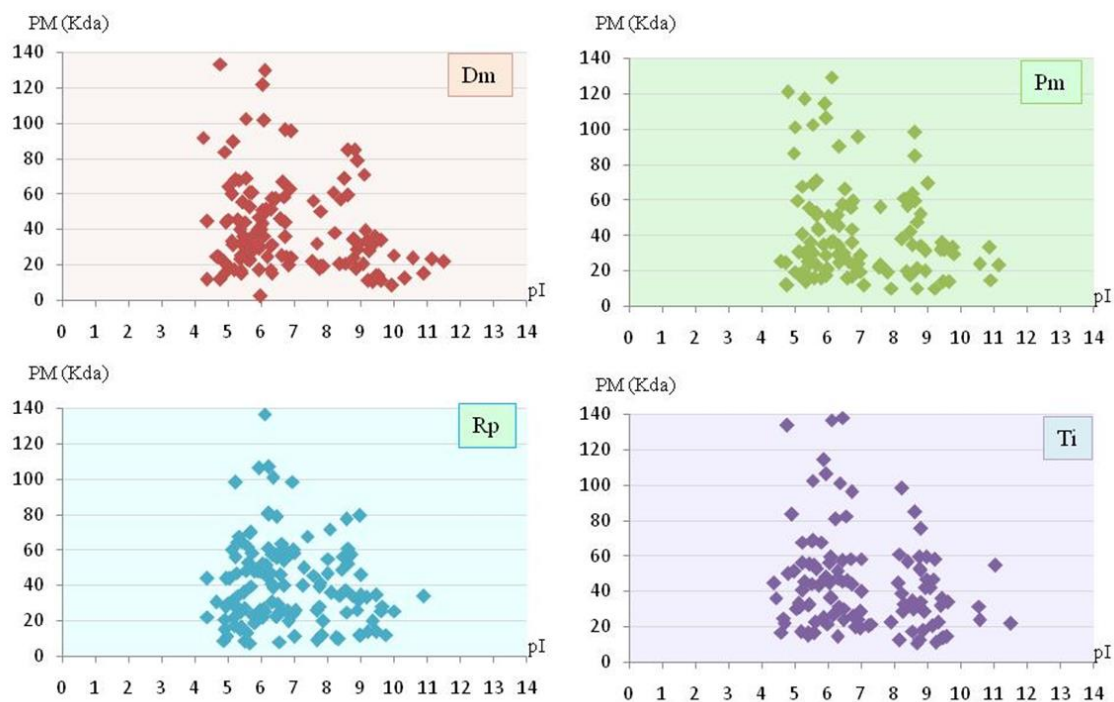


Figura 15. Distribuição teórica do peso molecular (KDa) em relação ao ponto isoelétrico das proteínas identificadas do trato digestivo de *Dipetalogaster maxima* (Dm), *Panstrongylus megistus* (Pm), *Rhodnius prolixus* (Rp) e *Triatoma infestans* (Ti). As proteínas com pesos moleculares maiores que 140 KDa foram excluídas para melhor comparação entre as quatro espécies.

5.10 Comparações das proteínas identificadas entre espécies de triatomíneos (Diagrama de Venn)

Foi observada grande variação das proteínas presentes entre as espécies estudadas (Figura 16). Enquanto muitas proteínas foram identificadas apenas em uma das espécies (proteínas únicas), correspondendo a 74 (45,7%) em *D. maxima*, 81 (52,9%) em *P. megistus*, 112 (80,6%) em *R. prolixus* e 106 (60,2%) em *T. infestans*, apenas quatro proteínas (0,7%) se mostraram compartilhadas entre as quatro espécies estudadas. Observou-se que a tribo Triatomini apresentou um maior número de proteínas compartilhadas, sendo 31 entre *D. maxima* e *P. megistus*, 26 entre *D. maxima* e *T. infestans*, 15 entre *P. megistus* e *T. infestans* (Figura 16).

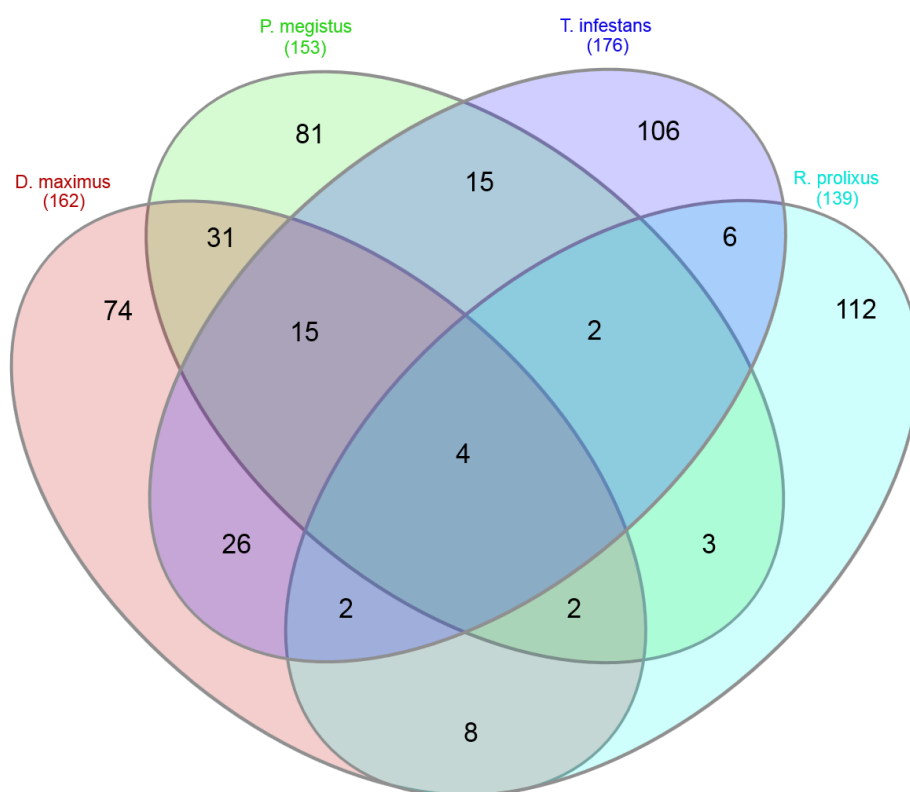


Figura 16. Diagrama de Venn utilizando as elipses mostrando os números de proteínas identificadas pelo software “Pattern Lab for Proteomics”. Os diagramas foram criados a partir da ferramenta online “Interactivenn” (<http://vis.icmc.usp.br/vicg/paper/638/interactivenn-a-web-based-tool-for-the-analysis-of-sets-through-venn-diagrams>). O número total de proteínas identificadas no trato digestivo de *Dipetalogaster máxima*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* está indicado na parte superior de cada elipse.

Por outro lado, foi observado pouco compartilhamento de proteínas da tribo Triatomini, com o representante da tribo Rhodniini, *R. prolixus*. Neste caso, o máximo de compartilhamento foi observado com a espécie *D. maxima* com 8 proteínas em comum (Figura 16).

5.11 Identificação de proteínas relevantes

5.11.1 Proteínas compartilhadas entre todas as espécies

O número total de proteínas compartilhadas, segundo o código identificador, entre todas as espécies foi de quatro, descritas como: R4FKH5 –Uncharacterized protein, Q86PP6 –Actin, A0A023FAR3 –4-hydroxy phenil pyruvate dioxigenase e A0A069DVN7 – Succinil CoA 3 ketoacid coenzyme A.

5.11.2 Proteínas exclusivas de cada espécie

A base de dados Uniprot foi utilizada para as análises de bioinformática e a obtenção da informação bioquímica e funcional relevante das proteínas encontradas no trato digestivo das espécies estudadas. As proteínas encontradas foram categorizadas como (i) enzimas envolvidas no metabolismo proteico, lipídeos e carboidratos, (ii) as chaperonas, proteínas em resposta ao estresse ou imunidade e (iii) crescimento, apoptose, metabolismo dos aminoácidos e metabolismo energético. Todas estas proteínas fazem parte da função do trato digestivo e podem ter implicações em relação à espécie de triatomíneo. Das enzimas sintetizadas e secretadas no trato digestivo, as responsáveis pela quebra das macromoléculas ingeridas na alimentação sanguínea foram: a “carboxipeptidase” encontrada em *D. maxima*, a “cathepsin B-like” encontrada em *P. megistus*, “dipeptidase” encontrada no *R. prolixus* e a “aspartate protease cathepsin” encontrada no *T. infestans*. Por outro lado, foram identificadas diversas chaperonas como a “putative 60 kDa heat shock protein mitochondrial-like isoform 1” identificada em *D. maximus*, a “putative heat shock protein 70 b2” identificada em *P. megistus*, a “putative cold shock protein transcription” identificada em *R. prolixus* e a “putative heat shock protein hsp 90-alpha” identificada em *T. infestans*. Também as proteínas relacionadas ao metabolismo energético foram encontradas como a “glucose 6-phosphate isomerase” em *D. maximus*, “phosphoglycerate mutase” em *P. megistus*, “malic enzyme” em *R. prolixus* e “putative fructose-16-bisphosphatase” em *T. infestans*.

5.11.3 Destaque de proteínas da tribo Triatomini

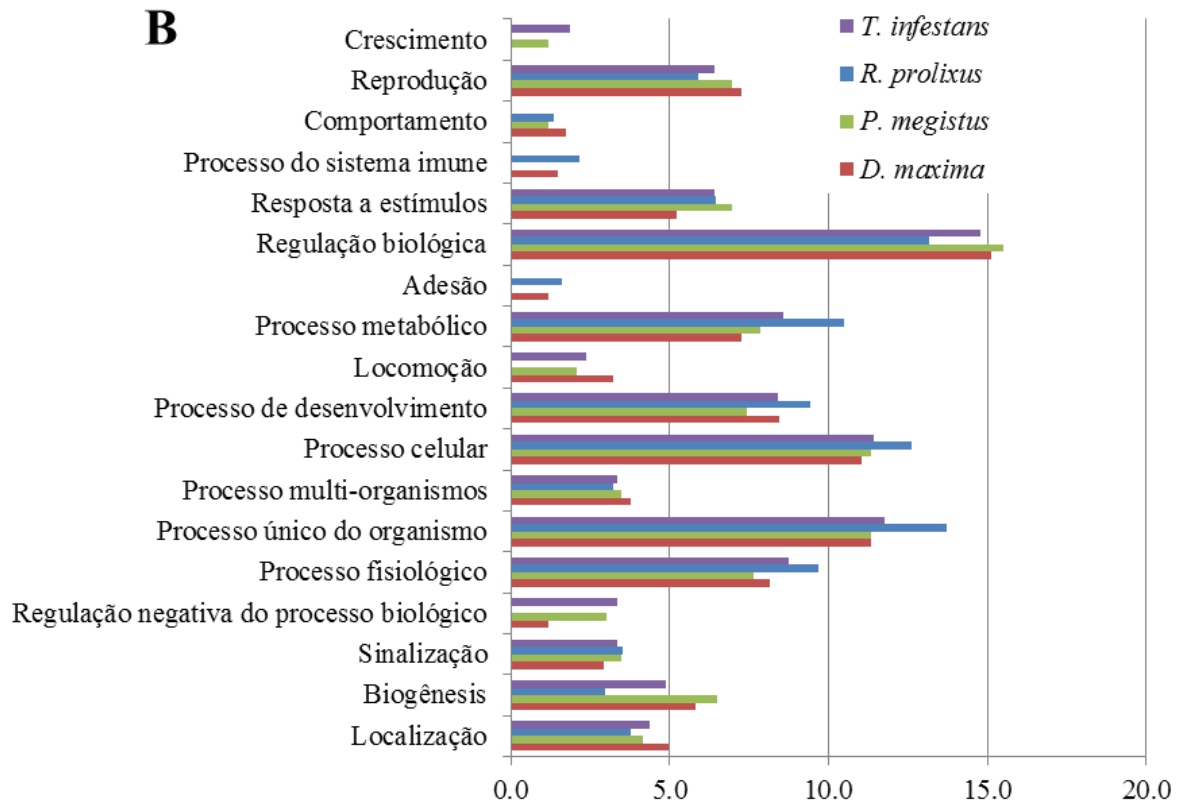
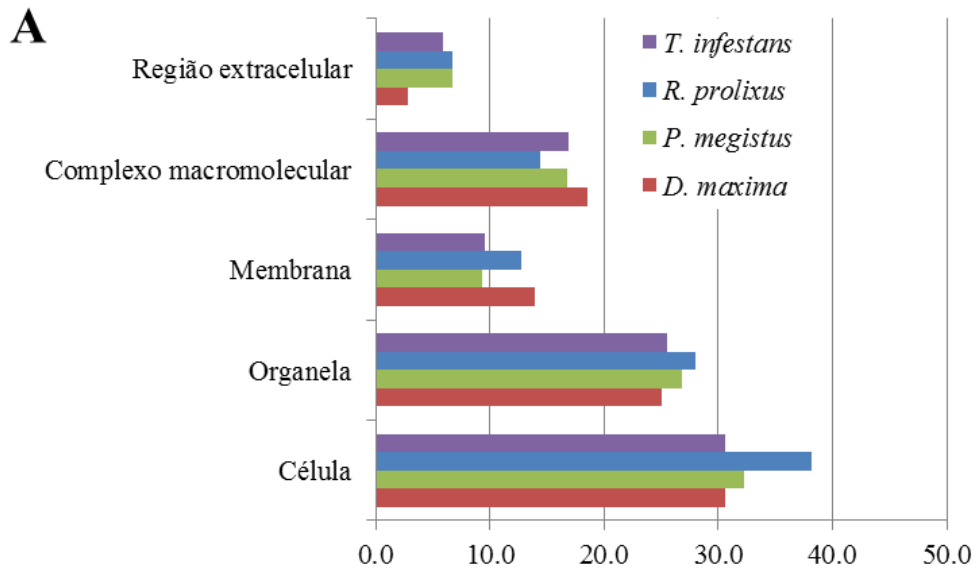
Na Tribo Triatomini, das 15 proteínas identificadas em comum destacam-se a “calponin” e a “malate deshidrogenase”. Foram escolhidas estas enzimas já que participam de processos do desenvolvimento e do metabolismo dos insetos e podem ser alvo de pesquisa em futuros trabalhos como controle nos insetos.

5.12 Análise de Gene Ontology (GO) para as categorias funcionais

Utilizando a anotação do “*Gene Ontology*” do programa Blast2GO, a análise do GO das proteínas únicas de *D. maxima* (total de 74), *P. megistus* (total de 81), *R. prolixus* (total de 89), *T. infestans* (total de 106), indicaram que estavam envolvidas nas categorias de componente celular, função molecular e processo biológico (Figura. 17 A,B,C). Somando essas três categorias, 1.354 anotações foram geradas e distribuídas em 246 proteínas totais e identificadas como únicas para as espécies. Pelo algoritmo do Blast2GO, uma única identificação pode receber mais de uma anotação de GO.

Dentro do componente celular, GO, o termo célula foi o mais abundante para todas as espécies que mostraram valores quase uniformes. Portanto é apresentado aqui o calculo promedio das porcentagens para as quatro espécies que foi de 32,9 % do total das anotações para o termo célula, seguido de organela com 26,3 %, complexo macromolecular com 16,6 % para membrana 11,4 % e região extracelular com 5,6 % (Figura 17A). Esta classificação de GO é generalista, pois para anotações mais específicas há necessidade do conhecimento prévio da proteína e da informação anotada nos bancos de dados sobre a localização subcelular da molécula descrita.

Foram sugeridas as porcentagens dentro dos termos GO para processo biológico com 14,6 %, para regulação biológica, 12 % para processo único do organismo, 11,6 % para processo celular, 8,5 % para processo metabólico, 8,5 % para processo fisiológico 8,4% para processo de desenvolvimento, 6,6% reprodução, 6,6 % resposta a estímulos, 5 % biogênese, 4,3 % localização, 3,3 % sinalização, 3,5 % processo multi-organismos, 1,9 % locomoção, 1,9 % regulação negativa do processo biológico, 1,1 % comportamento, 0,9% processo do sistema imune, 0,8 % crescimento, 0,7 % adesão (Figura 17B).



C)

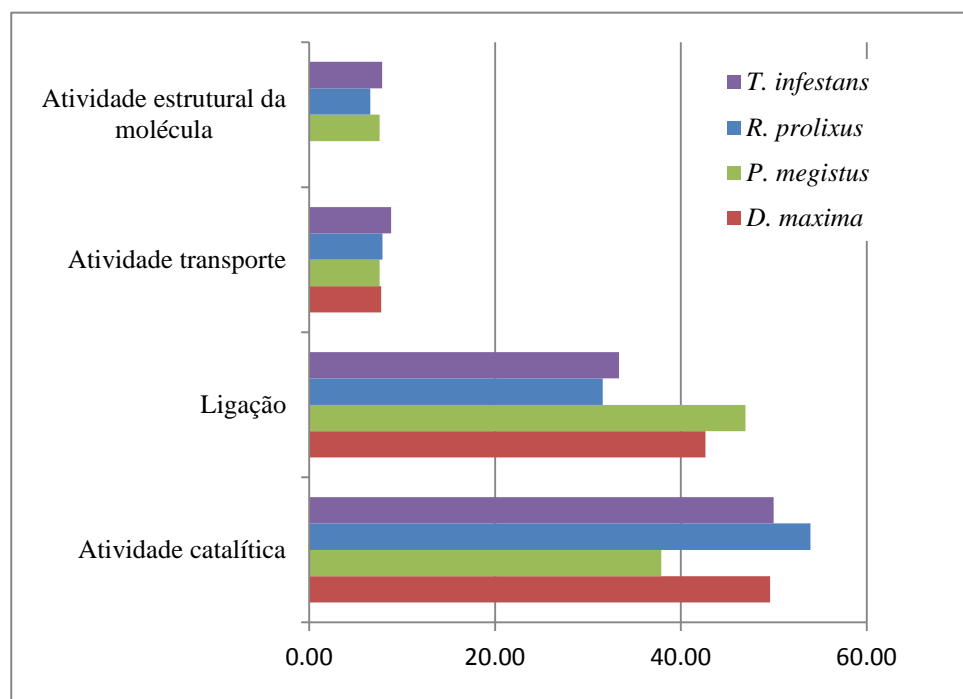


Figura 17. Classificação da função molecular (GO) nas três categorias em porcentagem das proteínas identificadas dos triatomíneos. A classificação foi realizada pelo programa Blast2GO das proteínas do trato digestivo de *Dipetalogaster maxima*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*. A) Componente celular, B) Processo biológico e C) Função molecular.

Finalmente para a função molecular, os termos GO resultantes da classificação das proteínas identificadas com maior porcentagem foram: atividade catalítica 47,8 %, ligação com 38,6 %, atividade de transporte com 8 %, atividade estrutural da molécula com 5,5 % (Figura 17C). O Blast2GO classifica as proteínas por níveis, as porcentagens descritas aqui para os três processos correspondem ao nível 2. Portanto, para as três categorias geradas pelo Blast2GO, pode existir um termo GO que é integrante de um outro termo GO mais abrangente e ambos serem considerados classificações distintas.

5.13 Predição das atividades enzimáticas

Uma predição das atividades enzimáticas foi investigada para as proteínas identificadas segundo a classificação da Nomenclatura de Enzimas (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), de acordo com a reação que catalisam (EC 1 a 6). Da mesma maneira, as anotações de GO, uma

mesma identificação pode receber mais de uma anotação de EC segundo a classificação do Blast2GO. Foram anotadas entre 24 a 40 proteínas para todas as espécies, de um total de 143 anotações, sendo as classes mais representativas as EC 1 (oxidoredutases) e EC 3 (hidrolases) com 70 e 37 anotações, respectivamente. Esta grande quantidade de anotações de oxidoredutases e hidrolases está condizente com a elevada porcentagem de anotações também pelo termo GO de mesma função molecular. Estas duas classes reuniram 49 e 32 atividades enzimáticas diferentes (Tabela 6).

Tabela 6. Abundância de anotações e das atividades enzimáticas para cada uma das seis classes (EC) das proteínas identificadas nos triatomíneos. A classificação foi realizada pela ferramenta Blast2GO de proteínas do trato digestivo de *Dipetalogaster máxima* (Dp), *Panstrongylus megistus* (Pm), *Rhodnius prolixus* (Rp) e *Triatoma infestans* (Ti).

Classe de enzima	Anotação				Atividade enzimática				
	EC	Dm	Pm	Rp	Ti	Dm	Pm	Rp	Ti
1. Oxidoredutase		23	9	23	15	9	8	19	13
2. Transferase		1	4	3	7	1	4	2	7
3. Hidrolase		13	6	9	9	13	4	8	7
4. Liasa		0	4	3	4	0	0	3	1
5. Isomerase		2	1	1	1	2	1	1	1
6. Ligase		0	0	1	4	0	1	1	4
Total		39	24	40	40	25	18	34	33

5.14 Predição de enzimas envolvidas em vias metabólicas

As proteínas identificadas foram anotadas por KEGG *pathways* – Blast2GO em mais de 20 vias metabólicas para cada uma das espécies estudadas, das quais as cinco mais representativas em relação ao número de anotações por via estão listadas na Tabela 7 A via metabólica de biossíntese de antibióticos (peptídeos antimicrobianos) apresentou a maior variedade de atividades enzimáticas (Enzyme ID do sistema EC) com um máximo de 13

atividades enzimáticas distintas. Na Tabela 7 estão detalhadas as atividades enzimáticas e os nomes de entrada relativos às cinco vias metabólicas mais abundantes em número de anotações.

Tabela 7. As cinco vias metabólicas mais abundantes em número de anotações e os respectivos números de atividades enzimáticas para cada espécie estudada. *Dipetalogaster maxima* (Dm), *Panstrongylus megistus* (Pm), *Rhodnius prolixus* (Rp) e *Triatoma infestans* (Ti).

Via metabólica	Anotação				Atividade enzimática			
	Dm	Pm	Rp	Ti	Dm	Pm	Rp	Ti
Biosíntese de antibióticos	5	5	11	13	7	4	9	12
Metabolismo arginina e prolina	3				3			
Metabolismo das purinas	10	3			5	1		
Metabolismo glutatona			6				4	
Metabolismo da tiamina	8		4		1		2	
Metabolismo Beta alanina		3		4		2		3
Metabolismo do butanoato		3		4		2		4
Glicolise / Gluconeogênese	3		4	4	3		4	4
Metabolismo do triptófano			5				3	
Metabolismo do propanoato				4				3
Degradação de ácidos grassos		3				2		

5.15 Identificação de proteínas transmembranares no trato digestivo dos triatomíneos

Das 320 proteínas transmembranares encontradas no PDBTM, 135 proteínas foram homólogas com *R. prolixus* (dados do genoma disponíveis no vector base). Desta forma, este conjunto de proteínas pode ser considerado como o mais completo da categoria transmembranar, se comparadas as proteínas encontradas no genoma *R. prolixus* com as identificadas pela proteômica em amostras do trato digestivo de *D. maxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*.

Para o efeito o BLASTp realizado das proteínas encontradas pela proteômica nas quatro espécies estudadas deu informação de 20 proteínas com identidade \geq a 40% para *D. máxima*, 20 proteínas com identidade \geq 40% para *P. megistus*, 21 proteínas com identidade \geq a 40% para *R. prolixus*, e 29 proteínas com identidade \geq a 40% para *T. infestans*.

Diante destes resultados foram comparadas as sequências homologas de *R. prolixus* com o conjunto de sequências das quatro espécies obtendo um total de 63 proteínas para as quatro espécies. Na Tabela 8 pode ser observado o conjunto do proteoma experimental das quatro espécies que corresponde a 10 proteínas transmembranares das 63 proteínas encontradas com anotação conhecida.

Tabela 8. Proteínas transmembranares de *Dipetalogaster maxima*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*.

Descrição*	Código*	Hit	Dm	Pm	Rp	Ti
Odorant receptor	T1H7Z1	RPRC000125-PA				x
Putative fatty acid desaturase	R4G4I7	RPRC000617-PA			x	
Carboxylic ester hydrolase	T1HID3	RPRC003806-PA			x	x
Tyrosine-protein kinase	T1HWB4	RPRC008334-PA		X		x
V-type proton ATPase subunit a	T1HWI3	RPRC008403-PA	x			x
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	R4G8P6	RPRC008584-PA				x
Anion exchange protein	T1I017	RPRC009637-PA	x		x	x
Transporter	T1I1H1	RPRC010141-PA	x			
Transporter	T1I4T4	RPRC011303-PA			x	
Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial	T1I7I4	RPRC012256-PA			x	x

*A descrição da proteína e o código identificador foram provenientes do Uniprot

Com o objetivo de conferir se estas proteínas se encontram presentes no conjunto de dados de proteômica de Ribeiro e col (2014), foi realizado um BLASTp com estes dados e os dados do arquivo do transcriptoma do trato digestivo de *R. prolixus*. No conjunto de dados de Ribeiro e col. (2014) foram encontradas 38 sequências com identidade > 40% considerando as 225 sequências do arquivo de Ribeiro e col.(2014). Assim a comparação da lista de Ribeiro e col. (2014) (38 sequências) com a lista de 63 sequências das proteínas identificadas de *R. prolixus* homólogas ao proteoma das quatro espécies de triatomíneos resultou em uma lista de 80 sequências.

A comparação das proteínas transmembranares do banco de dados PDBTM com as proteínas obtidas da anotação do genoma de *R. prolixus* resultou em 320 proteínas, as quais foram reduzidas para 135 distintas e putativamente classificadas como sendo

transmembranares com limiar de similaridade de 40% e que representa o potencial de todas as proteínas transmembranares do *R. prolixus*. No trato digestivo, há suposição de que deste conjunto de proteínas esteja expresso somente uma fração. A lista das proteínas obtidas neste trabalho e no trabalho de Ribeiro e col. (2014) representa o conjunto de proteínas transmembranar atual. As proteínas identificadas neste trabalho indicaram conter quase o dobro de proteínas identificadas em relação ao observado por Ribeiro e col. (2014).

6. DISCUSSÃO

Triatoma brasiliensis e *Triatoma pseudomaculata* são duas espécies de triatomíneos comumente encontrados no Nordeste do Brasil. Esta região, além de ser considerada a terceira com maior diversidade de triatomíneos, tem sido também atribuída como um epicentro de dispersão destas duas espécies, (Dias, 2000; Gurgel-Gonçalves e col., 2012; Sarquis e col., 2004). *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* mostram um comportamento eclético em relação aos ecótopos onde são encontrados, o que os tornam importantes na epidemiologia da doença de Chagas. Além do ambiente doméstico, *T. brasiliensis* é uma espécie normalmente encontrada em ambientes peridomésticos, sendo seu habitat natural composto de pilhas de madeira, cactos, pedras nos quais também habitam pequenos roedores, podendo também estar associada a outros animais, tais como galinhas, cachorros, cabras (Argolo e col., 2008, Sarquis e col., 2010). Estes dois últimos animais, frequentemente diagnosticados com infecções pelo *T. cruzi* (Lima e col., 2012; Bezerra e col., 2014).

Apesar do sucesso da erradicação de *T. infestans*, através do uso de inseticida em alguns países da América, incluindo o Brasil, (Dias, 1987; Coura, 2013), o controle das espécies que habitam o peridomicílio, tais como *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, provaram não ser efetivas (Diotaiuti e col., 2000; Sonoda e col., 2010). Trata-se de um desafio o controle destas populações de insetos, porque seu habitat natural dificulta as borrifações com inseticidas e estas espécies atuam como reservatório do *T. cruzi*, aumentando ainda mais o risco aos moradores pela possibilidade de invasão aos domicílios (Sarquis e col., 2012; Coutinho e col., 2014; Sarquis e col., 2006). Assim, na região nordeste, onde tem sido registradas ocorrências de re-infestação das casas por triatomíneos, torna-se fundamental uma atenção particular pelos agentes de Saúde Pública no controle da doença de Chagas (Costa e col., 2003; Costa & Lorenzo, 2009).

O trato digestivo dos insetos é colonizado por uma comunidade microbiana composta por diferentes grupos, tais como bactérias, parasitas, fungos e vírus, os quais então podem desempenhar um papel importante na fisiologia, reprodução e defesa imunológica contra infecções e patógenos do inseto (Dillon & Dillon, 2004; Cirimotich e col., 2011). Desta forma, uma descrição das interações tripartite entre *T. cruzi*-triatomíneos e a microbiota bacteriana é relevante não só para o desenvolvimento do inseto, como também para o entendimento da suscetibilidade do inseto ao parasita, na epidemiologia da doença de Chagas. Neste contexto, foram avaliadas as microbiotas

bacterianas do trato digestivo dos triatomíneos, assim como as infecções por *T. cruzi*, genótipo TcI e/ou TcII em *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* coletados no peridomicílio da região nordeste do Brasil e a caracterização molecular dos triatomíneos utilizando o “código de barras” COI.

O marcador molecular COI é bastante utilizado em estudos de populações de insetos, principalmente quando há polimorfismo e espécies crípticas, o que é consistente em alguns casos aplicados aos triatomíneos (Garcia e col., 2001; Justi e col., 2014). No presente estudo, a construção de uma árvore filogenética a partir das sequências mitocondriais do COI obtidas dos triatomíneos, permitiu acessar a classificação taxonômica dos espécimes de estádios ninfais e confirmar as espécies previamente identificadas por características morfológicas no estágio adulto. Os espécimes de *T. brasiliensis* foram agrupados num clado monofilético, exclusivamente composto por *T. brasiliensis*, o qual incluía as sequências de referência depositadas no GenBank para esta espécie. Estas sequências pertenciam a espécimes anteriormente encontrados na região nordeste do Brasil (Gardim e col., 2013; Gardim e col., 2014). Em relação ao *T. pseudomaculata*, as sequências dos espécimes coletados no peridomicílio ficaram próximas as sequências dos espécimes reportados em coletas na mesma região pertencente a *T. pseudomaculata* (Garcia e col., 2001; Gardim e col., 2013; Sainz e col., 2004). *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* são espécies sinantrópicas da região nordeste que apresentam altas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi* (Sarquis e col., 2004; Carbajal de la Fuente e col., 2009).

No presente trabalho, as análises dos espécimens coletados no peridomicílio, desenvolvidas com PCR e uso dos oligonucleotídeos específicos para a região do mini-exon, possibilitou a detecção da infecção dos insetos, indicando percentuais de infecção de 90% e 80% pelo *T. cruzi* em *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, respectivamente, com variações na suscetibilidade aos genótipos TcI e TcII. Corroborando estes resultados, no estudo de Barbosa-Silva e col. (2016) foram detectadas também altas taxas de infecção pelo *T. cruzi* (TcII e TcIII) em *T. brasiliensis* (24,5 %), *T. pseudomaculata* (22,7 %) e *P. lutzii* (78,1%) procedentes de diversos ecótopos no estado de Rio Grande do Norte. Já o TcI foi encontrado em vários estudos realizados em *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* procedentes de peridomicílio e no ambiente selvático em diversas localidades de Ceará (Pacheco e col., 2005; Brito e col., 2008). Alguns autores tem reportado que os genótipos

de *T. cruzi* variam em relação aos hábitos específicos ecológicos das espécies vectoras (Zingales e col., 2009; Macedo e col., 1998; Torres-Montero e col., 2012).

Sabe-se que a taxa de infecção do hospedeiro por *T. cruzi* obtida por técnicas que utilizam PCR depende da escolha dos marcadores moleculares utilizados no diagnóstico e dos genotipos de cepas presentes na amostra coletada. Neste sentido, marcadores moleculares tais como o 24a rRNA, 18S rRNA, tem sido utilizados para detectar um amplo espectro de cepas de *T. cruzi*. Os oligonucleotídeos desenhados por Fernandes e col. (2001), possuem uma resolução que permite um diagnóstico de detecção de *T. cruzi* com a informação mais precisa da presença ou ausência deste, mas não chega a uma classificação taxonômica atualizada para a identificação dos seis genotipos de Tc (TcI – TcVI), conforme a nova classificação de Zingales e col.(2009). A técnica de PCR de escolha utilizada no presente trabalho, segundo Fernandes e col. (2001) mostrou que a porcentagem de infecção dos triatomíneos por *T. cruzi* foi elevada, um resultado que concerne a importância epidemiológica destas espécies de triatomíneos na doença de Chagas da localidade estudada, o distrito de Russas (Ceará). As porcentagens de infecção de ninfas e adultos das duas espécies de *Triatoma* podem estar relacionadas as características comportamentais, como por exemplo, da dispersão pelos adultos (somente no estágio adulto os insetos apresentam asas), coprofagia, escolha dos animais utilizados como fonte alimentar, do número de repasto sanguíneo das ninfas e adultos. Em resumo, o fato do *T. brasiliensis* ter sido encontrado numa variedade de nichos próximos aos domicílios, e com altas taxas de infecção, ressalta a importância de uma atenção pelos agentes de saúde, em vista de aumentar a chance de transmissão do *T. cruzi* por esta espécie de inseto. Na mesma região, alguns trabalhos demonstram o aumento do risco de transmissão do parasita pelo *T. brasiliensis* quando comparado a *T. pseudomaculata* (Bezerra e col., 2014; Câmara e col., 2013; Pacheco e col., 2005).

A complexidade da microbiota dos triatomíneos associada à presença de *T. cruzi*, nesta região pode ter sido influenciada pelas altas proporções dos genotipos TcI e TcII encontradas nas ninfas e nos adultos de *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis* coletados no peridomicílio.

A diversidade da microbiota bacteriana do trato digestivo de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, ambos coletados no ecótopo peridomiciliar, em análises do gene que codifica para o 16S rRNA (regiãoV6-V8) por DGGE, mostrou uma quantidade

relativamente baixa de bandas por amostra. Foram encontrados 14 diferentes perfis entre os 33 espécimes analisados, não sendo possível correlacionar uma alteração nos perfis de DGGE com a infecção natural pelo *T. cruzi*. O baixo nível de diversidade de comunidades bacterianas encontradas nos tratos digestivos foi confirmado pelo pirosequenciamento. Como esperado, outros OTUs foram identificados por sequenciamento completo do gene que codifica para o 16S rRNA, em relação as análises por meio do DGGE. O baixo nível de diversidade bacteriana observada em outras espécies de insetos hematófagos, tais como *A. gambiae* e *A. coluzzi* (Wang e col., 2011; Gimonneau e col., 2014), contrasta com os resultados reportados na literatura para os insetos não hematófagos, como exemplos dos encontrados em cupins, os quais abrigam uma diversidade muito grande de comunidades bacterianas (Brauman e col., 2001). Uma possível explicação seria a de que a dieta sanguínea mais restrita em nutrientes poderia limitar a diversidade microbiana, no processo coevolutivo entre o hospedeiro e o inseto vetor hematófago (Engel & Moran 2013; Keebaugh & Schlenke, 2014). Além disso, apesar do comportamento coprofágico dos triatomíneos, o sangue por si só é estéril, o qual poderia diminuir, em parte, a chance de contaminação ambiental e, portanto, restringindo assim a complexidade da microbiota bacteriana no trato digestivo do inseto. Por outro lado, as pressões intrínsecas do inseto tais como as respostas imune, associadas as condições extrínsecas, como as condições ambientais bem como as diferenças na fonte de alimentação, poderiam modular as comunidades bacterianas encontradas no intestino (Vieira e col., 2014; Vieira e col., 2016).

O estudo da interação da microbiota bacteriana com o parasita nos insetos vetores vem sendo intensificado nos últimos anos graças ao desenvolvimento na tecnologia de técnicas de biologia molecular e a disponibilidade de dados genômicos. No presente estudo a utilização de um kit de isolamento de DNA metagenômico de solo foi utilizado, visto que foi descrito como o mais eficiente para a extração de DNA fecal de amostras de ratos (Ferrand e col., 2014) e o método que obteve uma quantidade maior de DNA (baseado na extração mecânica) do que com outros métodos que utilizam o princípio da extração química (Guo e Zhang, 2013). Utilizando este kit de extração, da Mota e col (2012), analisou diferentes espécies de triatomíneos mantidos em condições de laboratório. Os autores demonstraram que a composição da microbiota bacteriana das amostras de trato digestivo foi, aparentemente seletiva para as diferentes espécies de bactérias e diferiram em cada gênero de triatomíneo analisados. *T. infestans* e *T. vitticeps* apresentaram uma

diversidade maior de microbiota bacteriana quando comparadas as encontradas em *R. prolixus*, *P. megistus* ou *D. maxima* (da Mota e col., 2012).

Na presente tese, o filo Actinobacteria foi quantitativa e qualitativamente variável nas análises do trato digestivo dos triatomíneos, tendo sido encontrados diferentes gêneros e espécies bacterianas. As actinobacterias exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabolitos secundários e compostos bioativos antimicrobianos (Alderson e col., 1993). Foi observado que nas amostras do trato digestivo de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* houve a predominância de Actinobacteria, e da subordem Corynebacterinae (Actinomycetales). Corynebacterinae, tais como *Dietzia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Gordonia*, representam grupos de bactérias produtoras de antibióticos, e são amplamente encontradas em solos ácidos, como os encontrados na Região Nordeste do Brasil (Alderson e col., 1993; da Mota e col., 2008; Kitagawa e col., 2014; Takeya e col., 1978; Pátek e col., 1986). O hábito coprofágico dos triatomíneos deve favorecer a contaminação dos insetos por Corynebacterinae uma vez que estas se encontram misturadas com o solo em ambientes misturados a fezes dos insetos. Neste sentido, a coprofagia, pode explicar a diversidade das comunidades bacterianas no trato digestivo dos triatomíneos (Beard e col., 2001). Interessantemente, algumas sequências do gene que codifica para o 16S rRNA do trato digestivo dos triatomíneos analisados ficaram próximas as amostras de isolados clínicos pertencentes a *Corynebacterium stationis* e *Gordonia terrae*, ambas obtidas de cultura de sangue (Bernard e col., 2010; Grisold e col., 2007). A presença destas bactérias apoia a ideia de que estas possuem um sistema metabólico e enzimático que permite obter nutrientes do sangue. Por outro lado, a predominância de *Mycobacterium* nos insetos estudados aqui pode explicar que estes vectores parecem ter um papel primordial na transmissão da Hanseníase. Recentemente Neumann e col., (2016) demonstraram experimentalmente que *Mycobacterium leprae* permaneceu viável durante 20 dias no trato digestivo de *R. prolixus*. Este resultado sugere que este inseto pode estar envolvido na transmissão da hanseníase aos humanos ao contrair a bactéria na sangue de vertebrados como os tatus que são reservatórios naturais também de *T. cruzi*.

R. rhodnii, foi encontrado em alguns espécimes de *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*. Esta espécie de bactéria, um simbiote primário, naturalmente encontrado de

R. prolixus, tem sido reportado como provedor de vitaminas do complexo B ao inseto (Wigglesworth, 1936; Beard e col., 1998). Por outro lado, outros simbiontes já descritos em *Triatoma infestans* (Durvasula e col., 2008), foram reportados neste estudo em vários espécimes analisados: espécies do gênero *Corynebacterium*. Sabe-se que este gênero participa do suplemento de ácido pantotênico para *T. infestans* (Durvasula e col., 2008). Assim, o encontro destes microrganismos simbiontes em *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*, indica *R. rhodnii* e *Corynebacterium spp.* não são restritos a *R. prolixus* e *T. infestans*, respectivamente.

O filo Proteobacteria, representado por *Serratia marcescens*, a qual foi encontrada em praticamente todos os espécimes analisados, tanto naqueles mantidos no Laboratório como nos coletados diretamente no peridomicílio. A presença marcante desta espécie bacteriana sugere que não seja transiente estando bem adaptada aos triatomíneos. Resultados prévios do presente trabalho indicam que esta espécie bacteriana foi encontrada em alguns oócitos maduros, o que sugere que pode ser transmitida de inseto a inseto pela via vertical (dados não mostrados). Estudos posteriores poderão esclarecer se a bactéria se encontra internamente ou externamente a camada coriônica dos oócitos.

Por outro lado, a coexistência de *Serratia marcescens* e outras bactérias da subordem Corynebacterinae no trato digestivo dos triatomíneos, sugere um mecanismo de resistência a antibióticos produzidos entre as espécies desta subordem (Méndez & Salas, 1998).

Proteobacteria foi o filo de maior predominância nas comunidades bacterianas encontradas nas amostras dos tratos digestivos dos triatomíneos analisados. Tem sido registrado na literatura, que este filo bacteriano é também predominante na microbiota intestinal de vários outros invertebrados, tais como Coleoptera, Diptera, Mollusca, etc (Azambuja e col., 2005a; Jonathan e col., 2007; Dillon e col., 2010; Marchini e col., 2002; Jones e col., 2013). A ampla distribuição das Enterobacteriaceae nos invertebrados sugere funções importantes que contribuem, indiretamente no “fitness” dos hospedeiros, como, por exemplo, pela competição com microrganismos patogênicos (Tchioffo e col., 2013; Azambuja e col., 2005a; Castro e col., 2012; Engel & Moran, 2013; Behar e col., 2005; Grimont & Grimont, 2006; Azambuja e col., 2004).

Neste trabalho, *Serratia* foi o gênero de maior representatividade nas análises dos tratos digestivos de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* coletados no peridomicílio, assim como também nos insetos mantidos em condições de laboratório. A bactéria anaeróbia facultativa *S. marcescens* biotipo A1 foi isolada do trato digestivo de *Rhodnius prolixus* e foi reportada por apresentar uma atividade tripanolítica in vitro, especialmente contra a cepa Y de *T. cruzi* (Azambuja e col., 2004; Genes e col., 2011). Castro e col. (Castro e col., 2007a,b) propuseram que a atividade tripanocida está relacionada à fimbria bacteriana, a qual foi demonstrada por conter receptores sensíveis a manose. Esta estrutura confere a adesão da bactéria à superfície do *T. cruzi* promovendo, in vitro, não se sabe por que mecanismo citotóxico, a lise do flagelado (Castro e col., 2007 a,b). Neste trabalho de tese, apesar de ter sido encontrada *Serratia* na maioria dos triatomíneos coletados no campo, não foi possível encontrar uma correlação quantitativa ou qualitativa clara entre a presença do gênero *Serratia* e do *T. cruzi* (TcI ou TcII). A amostra numérica dos insetos de campo, não infectados, foi insuficiente para uma análise estatística mais acurada.

Aparentemente, os gêneros *Serratia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*, encontrados nos triatomíneos não resultaram na proteção dos insetos às infecções pelo *T. cruzi*. Neste trabalho, como as análises do gene que codifica para o 16S rRNA foram feitas utilizando o trato digestivo inteiro dos triatomíneos, não foi possível esclarecer a distribuição das espécies bacterianas nos diferentes compartimentos do órgão. De uma maneira geral, *T. cruzi* após uma fase replicativa no intestino médio, nesta mesma região do trato digestivo, tende a sofrer uma queda na população e se acumular predominantemente, em jejum prolongado no reto do inseto (Kollien & Schaub, 1998). É possível que a microbiota bacteriana neste compartimento, de alguma maneira, associada a outros fatores do inseto constitua num ambiente menos hostil ao parasita.

Por outro lado, há trabalhos que demonstram que a infecção de triatomíneos por *T. cruzi* resulta na ativação da resposta imune humoral (Castro e col., 2012, Vieira e col., 2016; Azambuja e col., 2005b). Houve regulação positiva da expressão da defensina C, um peptídeo com atividade antimicrobiana, em ninfas de *R. prolixus* infectadas com *T. cruzi* e *T. rangeli*, sendo que nestes mesmos grupos de insetos infectados, ocorreram diminuições significativas das populações bacterianas cultiváveis, incluindo neste caso a *S. marcescens* (Vieira e col., 2014; 2016).

Azambuja e col. (2004) e Castro e col. (2012) observaram que após uma alimentação sanguínea de *R. prolixus*, populações de bactérias cultiváveis aumentam gradativamente alcançando um pico no oitavo dia após alimentação. Nesse sentido, Vieira e col. (2014) observaram que além do aumento significativo da microbiota bacteriana, houve paralelamente um aumento dos picos de atividade antibacteriana bem como alterações nos níveis de expressão de AMPs e de lisozimas. Curiosamente, recentemente, Vieira e col. (2016), reportaram que além da indução da expressão dos genes *def C* e *prolixicina*, no epitélio do trato digestivo de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi* houve também aumento da expressão destes genes no corpo gorduroso, demonstrando assim, uma resposta imunológica sistêmica do inseto. Assim, estas variações imunológicas, locais, parecem estar respondendo de forma regular às populações de bactérias e parasitas presentes no trato digestivo.

Este trabalho permitiu observar que a diversidade bacteriana encontrada nos triatomíneos coletados no peridomicílio, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, é baixa, se comparada as registradas a outros hospedeiros, tais como vertebrados (Clemente e col, 2012; Theis e col., 2013) ou mesmo certas espécies de invertebrados como em cupins, baratas, mosquitos (Brune & Dietrich, 2015; Douglas, 2015). da Mota e col. (2012), com técnicas independentes de cultivo (DGGE e clonagem e sequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA) com diferentes gêneros de triatomíneos procedentes de colônia, já havia constatado um baixo nível de complexidade da microbiota bacteriana.

Neste trabalho, além dos estudos da microbiota de triatomíneos infectados naturalmente com *T. cruzi*, foi constatado que, *R. prolixus* infectados artificialmente adicionando epimastigotas de *T. rangeli* ao sangue alimentar dos insetos, houve uma diminuição significativa das bactérias da família Enterococaceae no trato digestivo em relação ao grupo controle não infectado. Contrariamente, as bactérias da família Burkholderiaceae aumentaram significativamente nos insetos infectados. O resultado sugere que *T. rangeli* influencia a composição da microbiota em benefício destes grupos bacterianos.

A fisiologia e imunologia do hospedeiro invertebrado são influenciadas por microrganismos simbiotes ou comensais os quais modulam a resposta imune, de tal forma que ativam ou inibem a expressão gênica (Lee e col., 2008; Há e col., 2009). Como observado por Castro e col. (2012), e Vieira e col. (2016) houve aumento na atividade

antimicrobiana contra bactérias intestinais em ninfas de *R. prolixus* infectadas por *T. cruzi*. No entanto, a infecção por *T. cruzi* induziu um aumento da atividade fenoloxidásica dos insetos Castro e col. (2012). Neste presente trabalho, a presença de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado resultou na inibição desta resposta imunológica com significativa diminuição das atividades fenoloxidásicas espontânea e total (dados não apresentados e publicados em Vieira e col., 2015). Estas evidências sugerem que há complexidade na dinâmica populacional dos microrganismos que compõem a microbiota em triatomíneos, assim como nas respostas imunológicas dos insetos infectados por diferentes tripanosomatídeos.

A Enterobacteria do gênero *Arsenophonus* foi encontrada nas análises dos espécimes mantidos em condições de laboratório, mas não nos espécimes de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* coletados no peridomicílio. Uma das explicações seria de que o isolamento dos insetos por um longo período em Laboratório, cujas condições são mantidas controladas, poderia propiciar a seleção de certas espécies bacterianas (Eichler & Schaub, 2002; Martinson e col., 2012). Assim, a manutenção do gênero *Arsenophonus*, observada na presente tese, poderia ser beneficiada pelas condições uniformes de laboratório. Por outro lado, insetos livres na natureza, tem probabilidade de aumentarem o contato com bactérias do solo, ingerindo e ampliando a diversidade da microbiota intestinal bacteriana, tal como foi observado no presente estudo.

Quanto as técnicas utilizadas para a identificação de microrganismos podem-se destacar vantagens e desvantagens. As investigações sobre diversidade bacteriana no trato digestivo de triatomíneos baseadas no cultivo bacteriano por alguns autores, mostraram a predominância de Proteobacteria e Actinobacteria (Figueiredo e col., 1990; Vallejo e col., 2009). Assim, os métodos dependentes de cultivo, ainda que sejam tradicionalmente utilizados, apresentam desvantagens para descrever a diversidade das comunidades bacterianas de uma forma total. Por exemplo, os simbiontes intracelulares, tais como a *Wolbachia*, *Rohrkolberia* e algumas espécies de *Arsenophonus* que foram reportados no trato digestivo dos triatomíneos não crescem em meios de cultura artificiais (da Mota e col., 2012; Hypsa & Dale, 1997; Espino e col., 2009), mas, neste presente trabalho, puderam ser evidenciadas pelos métodos moleculares independentes de cultivo.

A técnica de DGGE é um método que utiliza a electroforese, amplificação de genes por PCR e a visualização qualitativa dos amplicons. Portanto, a técnica de DGGE pode ser

aplicada ao rastreamento e agrupamento de um número considerável de amostras individuais, tal como foi analisada a microbiota bacteriana do trato digestivo dos triatomíneos. Neste trabalho de tese, a descrição das comunidades bacterianas da microbiota pode ser complementada pela extração das bandas evidenciadas nos géis, para posteriores clonagem e sequenciamento. No entanto, uma descrição quantitativa da microbiota pela técnica de DGGE é muito subjetiva, pois não existe precisão na intensidade de uma banda relacionada à concentração de DNA. Em contraste, a caracterização da comunidade bacteriana pelo uso do pirosequenciamento pelo 454, quando o resultado quantitativo é proporcional ao número de sequências obtidas do gene que codifica para o 16S rRNA, resulta em maior precisão do que pelo emprego da técnica da DGGE (Legge, 2012). Constatamos que de fato, pela técnica de pirosequenciamento o resultado do número de sequências obtidas do gene que codifica para o 16S rRNA, foi maior se comparado ao DGGE, apesar de que o bias na amplificação do gene por PCR é semelhante em ambas metodologias.

Uma das diferenças mais relevantes nos resultados obtidos pela técnica de DGGE-Sanger e pelo pirosequenciamento é que, com exceção de Actinobacteria, os gêneros de menor predominância, observados pelo pirosequenciamento nas amostras 35Tb e 19Tp não foram evidenciados pelo emprego do DGGE-Sanger ou pela clonagem e sequenciamento do gene que codifica para o 16S rRNA. Diversas explicações podem ser consideradas para esta discrepância. Primeiro, a amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA foi obtida através de oligonucleotídeos universais. Alguns autores mostram que, as regiões hipervariáveis escolhidas para amplificação influenciam os resultados e, conseqüentemente, alteram a obtenção da informação da diversidade bacteriana (Yu & Morrison, 2004; Yu e col., 2008). A região V3-V1 utilizada para o pirosequenciamento tem sido taxonomicamente mais informativa que a região V6-V8, (Anderson e col., 2008; Yu & Morrison, 2004). Por outro lado, a região V6-V8 tem sido utilizada em muitos estudos que empregam a técnica de DGGE, já que produz perfis de bandas de alta qualidade, com maior nitidez se comparados aos perfis obtidos pela escolha da região V3-V1 (Yu & Morrison, 2004). No presente trabalho foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para a região V6-V8, U968-GC e R1401, para gerar os perfis de DGGE, pelas questões aqui expostas.

Neste trabalho, constatamos que a amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA, clonagem e posterior sequenciamento pelo método de Sanger, permitiu, em alguns

casos, obter as sequências completas do gene que codifica para o 16S rRNA (aproximadamente 1.5 Kb) que na maioria das vezes foi possível chegar a uma classificação bacteriana ao nível de espécie. Por outro lado, foi observado que as sequências parciais das bandas do gene que codifica para o 16S rRNA separadas pela DGGE (aproximadamente 430 bp) ou pelo pirosequenciamento pelo 454 (aproximadamente 400 bp) permitiu a classificação bacteriana somente ao nível de gênero.

Assim, como esperado, a escolha dos métodos adotados na presente tese, para análise da composição bacteriana de triatomíneos, ainda que sejam todos com base molecular e, portanto, independente de cultivo bacteriano, resultou em vantagens e desvantagens, que aparentemente são inerentes a qualquer metodologia científica.

O trato digestivo dos insetos é o sítio principal de digestão, nutrição, além da interação com a microbiota, e, conseqüentemente defesa contra patógenos. Neste sentido, torna-se fundamental o mapeamento de proteínas do trato digestivo de triatomíneos de importância médica para uma maior compreensão dos processos biológicos relacionados ao desenvolvimento do inseto e interação com seus parasitas naturais. Na presente tese, foram identificadas um total de 162 proteínas para *D. máxima*, 153 para *P. megistus*, 139 para *R. prolixus* e 177 para *T. infestans* pela proteômica *shotgun* do trato digestivo das ninfas de quinto estágio. Embora o número de proteínas identificadas tenha sido menor do que os reportados em outros estudos com outros insetos vetores (Rezende Vieira e col., 2015), a constatação da diversidade de proteínas encontradas, comprovou a sensibilidade da técnica. Neste estudo as amostras utilizadas (em duplicata biológica) corresponderam a um único trato digestivo de cada espécie, em contraste ao pool de tratos digestivo utilizados por outros autores (Rezende Vieira e col., 2015). Por outro lado, foi observado que os membros da tribo Triatomini apresentaram maior número de proteínas com função conhecida em relação a *R. prolixus*.

Os triatomíneos ingerem sangue em todos os estágios ninfais podendo atingir até 12 vezes o peso corporal após um único repasto (Schofield, 1980). Durante o processo de digestão, a disponibilidade de nutrientes propicia o crescimento de bactérias cultiváveis que alcançam um pico de crescimento no 7º dia após a alimentação sanguínea de *R. prolixus* (Castro e col., 2012; Eichler & Schaub, 2002). Neste estudo utilizamos insetos de quinto estágio após duas semanas de alimentação, tempo no qual a população de bactérias é baixa. Neste período, em pleno processo de muda ninfal para adulto, as células epiteliais do

trato digestivo sintetizam não somente enzimas, peptídeos, como também hormônios que serão liberados nas diferentes porções do trato digestivo (Terra & Ferreira. 1994).

Foi observado que as proteínas identificadas no trato digestivo das quatro espécies estudadas mostram uma leve separação entre o pI 7 e pI 8, sugerindo que possam ter relação ao segmento do trato digestivo onde estão presentes, *i.e.* intestino médio anterior e intestino médio posterior (Schwartz e col., 2001).

Balczun e col. (2012) evidenciou que em ninfas de quinto estágio de *T. infestans* não alimentadas, os valores de pH do conteúdo do estômago, e três regiões do intestino variaram entre 6,3 - 6,7. Entretanto, as medidas de pH estimadas imediatamente após a alimentação até 10 dias, no intestino médio anterior e intestino médio posterior foi de pH 5,2. Nos 15 dias subsequentes a ingestão do sangue, os valores subiram até aproximadamente pH 7,4.

A identificação das 489 proteínas da porção do intestino médio anterior de fêmeas de *R. prolixus* por técnica de electroforese 2D estavam distribuídas entre um pI de 5 a 7 e um peso molecular de 35 a 70 KDa (Rezende-Vieira e col. 2015), corroborando os dados observados no presente estudo. Aparentemente o outro grupo de proteínas observado na presente tese, correspondente a uma porcentagem menor de proteínas, estava distribuído em pI acima de 7. Em insetos fitófagos, as proteínas encontradas nos segmentos do intestino posterior (reto) são predominantemente com pI acima de 7 (Terra, 1988). No entanto, Kiraga e col. (2007), observaram que os proteomas de diversos organismos usualmente são bimodais e com frações pequenas de proteínas com um pI cercano a 7,4, corroborando assim os resultados apresentados neste trabalho.

As proteínas envolvidas na digestão como a “carboxipeptidase”, “aspartate protease cathepsin D”, “cathepsin B-like proteínase”, “dipeptidase” foram identificadas nos diferentes triatomíneos. No trato digestivo de triatomíneos o valor de pH do intestino médio é ácido (Schaub, 2009), portanto as diferentes proteases que digerem as proteínas do sangue possuem uma atividade ótima em cerca de pH 5 como as catepsinas B e L. O pI calculado para a “aspartate protease cathepsin D” e “cathepsin B like proteínase” foi de 5,23 e 5,87. As atividades da catepsina B e a catepsina D foram identificadas em *R. prolixus*. Interessantemente, a catepsina B tinha uma atividade de pH ótimo em torno a 5,5, enquanto a catepsina D mostrou ter uma maior atividade num pH de 3,5, sendo este pH muito mais ácido do que o observado em condições fisiológicas no intestino médio dos

triatomíneos (Terra e col., 1988). Por outro lado, Balczun e col. (2012) mostraram uma indução da catepsina D encontrada nas diferentes porções do intestino médio de *T. infestans* com atividade máxima cinco dias após alimentação. No presente trabalho de tese, o qual foi desenvolvido no 15º dia após a alimentação dos triatomíneos, foi identificada a “aspartate protease cathepsin D” em *T. infestans*, o que corrobora os resultados de Balczun e col., (2012) que observou um incremento de catepsina D (*TiCatD2*) entre os 10-20 dias após alimentação. Uma “dipeptidase” observada em *R. prolixus* e uma “carboxipeptidase” identificada em *D. maximus*, podem estar também envolvidas no processo de digestão. Waniek e col., (2014) identificaram duas carboxipeptidases no intestino médio de *T. brasiliensis* cujas atividades aumentaram no lumen do intestino médio 10 dias após alimentação. Até o momento, somente as sequências de carboxipeptidases identificadas em *T. infestans* e *T. brasiliensis* estão disponíveis no GenBank. Estes resultados indicam que para conhecer melhor as atividades das enzimas envolvidas no processo de digestão seria importante realizar uma cinética das proteases em relação ao tempo de alimentação. Outros fatores como a quantidade de sangue ingerido bem como a fonte alimentar (animal utilizado) também devem ser considerados.

O processo de digestão no trato digestivo dos insetos inclui o movimento muscular e a digestão bioquímica (Pauchet e col., 2008). Algumas das proteínas associadas à movimentação muscular foram identificadas nas espécies estudadas como a “actin”, “myosin class II heavy chain”, “myofilin”, “putative troponin skeletal muscle”, “arginine kinase”, “putative titin”. A contração muscular é um passo crítico na mecânica da digestão e na qual também participa a movimentação do bolo alimentício ao longo do trato digestivo (Saadati Bezdji e col., 2002; Qiu e col., 2005, Jin, 2000). Durante a contração muscular os filamentos grossos (compostos por uma proteína chamada miosina) e os filamentos finos (feitos de uma proteína chamada actina) participam do processo, e a proteína “arginine kinase” que se une a actina toma parte na produção de ATP no processo de contração muscular (Yao e col., 2009). A presença abundante das proteínas do citoesqueleto no trato digestivo dos triatomíneos de quinto estágio após duas semanas de alimentação pode indicar o transporte do alimento ingerido e a necessidade de contrações do trato digestivo, por movimentos peristálticos.

As proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos como a “glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”, “enolase”, “phosphoglycerate kinase” foram identificadas. No processo de glicólise a “glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase participa na

produção de alta energia (Kunieda e col., 2006), enquanto a “enolase” possui papel de converter o 2-phosphoglycerate em phosphoenol pyruvate. Outras enzimas encontradas no trato digestivo de insetos fitófagos (Saadati Bezdi e col., 2012) como a triose fosfato isomerase, glutamato desidrogenase também estão envolvidas no metabolismo dos carboidratos. A “malate dehydrogenase” é uma enzima que pertence à família das desidrogenases dependentes de NAD (*Nicotinamide dinucleotide*) e foi encontrada nas espécies da tribo Triatomini (Rzezniczak & Merritt, 2012). Esta enzima catalisa a conversão de oxalacetato a malato, sendo uma reação muito importante no metabolismo celular. A “malic enzyme” (ME) encontrada aqui somente em *R. prolixus* participa na oxidação do malato a piruvato produzindo dióxido de carbono e NADPH, esta enzima está envolvida na regulação do piruvato celular, no metabolismo de lipídios, no controle do metabolismo energético e nos níveis celulares de ROS (Geer e col., 1979). Kim e col. (2015) mostraram que a sobexpressão desta enzima no estágio de larva aumenta o tempo de vida da mosca *D. melanogaster*. No entanto, as atividades das proteínas, enzimas, factores de transcrição devem ser consideradas no contexto de uma interação entre varias entidades e não como um entidade única. A contribuição da ME por exemplo parece estar influenciada pelo jejum, assim como outras enzimas do pool das NADH como a G6PD e a IDH que mostraram uma atividade maior em condições de estresse oxidativo (Rzezniczak & Merritt, 2012)

A “acyl-codehydrogenase”, “putative fatty acid binding protein”, presente nas três espécies da tribo Triatomini estudadas são reconhecidamente enzimas chave no metabolismo de lipídios e na beta oxidação (Liu e col., 2009). Em *R. prolixus*, no presente trabalho, apesar de não ter sido identificada nenhuma destas proteínas, foram identificados dois transcritos para a “acyl-codehydrogenase” nas diferentes porções do trato digestivo desta mesma espécie de inseto por Ribeiro e col., (2014).

Por outro lado, a observação de “ATP-synthase”, “arginine kinase” junto com outras proteínas como a “cytochrome C oxidase”, “ubiquinol cytochrome C reductase” encontradas nos triatomíneos, participam do metabolismo energético. É importante ressaltar que algumas das proteínas envolvidas no metabolismo energético, e necessárias para a hidrólises de carboidratos, lipídeos e proteínas como fontes de alimento, nem sempre estavam presentes nas quatro espécies analisadas. Estes resultados podem sugerir que a taxa da expressão de genes para proteínas dos insetos estudados varia entre as espécies podendo estar relacionada à quantidade de alimento ingerido ou processo

digestivo. Como a maioria das proteínas presentes nos insetos, pertenceram ao grupo do metabolismo energético e de carboidratos há indicações de que os insetos utilizam predominantemente fontes de gordura como reserva para o processo de muda, quando o gasto energético é intenso.

Uma proteína envolvida no transporte de ferro também foi identificada como a “ferritin” em *D. maximus* e *P. megistus*. A presença desta proteína sugere a sua participação na digestão e processo de excreção do ferro. Em recente estudo, Ribeiro e col. (2014) não detectaram transcritos para o gene que codifica a ferritina nas bibliotecas genicas procedentes do trato digestivo de *R. prolixus*, em contraste, encontraram transcritos altamente expressos de genes da transferrina, uma proteína envolvida no transporte de ferro, particularmente no intestino médio posterior.

A identificação de proteínas envolvidas na divisão celular, apoptose, desenvolvimento, como na via de síntese de hormônio juvenil, calponina e “fkbp” “putative tumor protein d52”, “yippee” foram encontradas quer seja em *D. megistus* ou *P. megistus* ou *R. prolixus* ou *T. infestans*, sendo que somente a calponina foi encontrada em todas as espécies de triatomíneo estudadas neste trabalho. A expressão destas proteínas sugere uma relação com a elevada atividade das células do trato digestivo no processo de digestão devido à regeneração constante das células epiteliais do intestino médio implicadas também no metabolismo acelerado do processo de muda.

O desenvolvimento e crescimento do inseto são regulados por dois hormônios lipofílicos; um esteroide denominado 20 hidroxiecdisona (20E) e o hormônio juvenil (JH). O início da muda e outros processos biológicos essenciais são controlados pela 20E, enquanto a modulação da expressão gênica dos ecdisteroides é realizada pelo JH (Kozłowska e col., 2014; Riddiford, 1994; Riddiford e col., 2000; Liu e col., 2011). Contrariamente ao 20E, cujo modo de ação é bem conhecido, o mecanismo da regulação gênica do hormônio juvenil é pouco entendido (Riddiford e col., 2000). Como resultado, a sinalização entre as duas vias permanece pouco conhecida. No entanto, Li e col. (2007) identificaram duas proteínas nucleares que são a calponina e a proteína de ligação fkbp39, as quais quando suprimidas bloqueiam a indução do hormônio juvenil. Nos triatomíneos o estudo da sinalização dos hormônios não tem sido muito explorado, sendo que a maior parte dos trabalhos encontrados aborda o efeito de supressão do hormônio juvenil em *R. prolixus* (Azambuja e col., 1984, Garcia e col., 1979).

A calponina se encontra entre as proteínas de ligação ao citoesqueleto, assim como também a “coronin” identificada em *T. infestans* e “transgelin” que foi identificada nas três espécies da tribo Triatomini. A “transgelin” é uma proteína encontrada em abundância e já foi identificada em muitas espécies como um membro da família das calponinas ou de proteínas ligantes a actina. No entanto, parece ter um papel em funções não relacionadas ao citoesqueleto, como uma proteína moduladora do sinal hormonal como evidenciado em *Helicoverpa armigera*, (Li e col., 2004).

A “Glutathione S-transferase” (GST) é parte de uma família de enzimas envolvidas na detoxificação. A enzima pode atuar em diferentes formas, por exemplo catalisando a conjugação de compostos eletrofílicos com o grupo tiol da glutathione reduzida, cujo produto se torna solúvel em água. Facilitando a sua excreção. Nos insetos, as GST do microsoma e do citosol parecem ser parte de uma família multigênica. O sistema de detoxificação nos insetos depende do estímulo externo, o qual pode aumentar a produção das enzimas especializadas na proteção, como a GST. No proteoma de *D. maximus*, *P. megistus* e *T. infestans* foram identificadas proteínas putativas com similaridade a GST. Em *T. infestans* a GST foi associada a resistência ao DTT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)etano) e um gene semelhante foi identificado em *R. prolixus* (Sívori e col., 1997).

Como resultado da digestão sanguínea, a hemoglobina (Hb) é liberada no trato digestivo dos triatomíneos e conseqüentemente a liberação de peptídeos, aminoácidos e heme (Francis e col., 1997). Assim no seu estado livre a molécula heme atua como um potente agente citotóxico, levando a lises de muitas células e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da decomposição catalítica de hidroperóxidos orgânicos (Van der Zee e col., 1996). A geração de ROS promove um estresse oxidativo com danos as biomoléculas, podendo oxidar as pontes dissulfeto, o que leva a um desdobramento das proteínas e, portanto, a perda da atividade (Halliwell & Gutteride, 1990). Neste sentido a participação de chaperonas como a "protein disulfide isomerase" identificada em todas as espécies de triatomíneos estudados pode regular o dano oxidativo ocasionado pela oxidação nas pontes dissulfeto. Esta proteína tem um papel importante no rearranjo das pontes de enxofre, em dobramento correto das proteínas, prevenindo a agregação das proteínas e na reparação das proteínas não enoveladas.

No presente trabalho, a presença das proteínas de shock térmico de 60 kDa, 70 kDa, 90kDa, foram identificadas nas distintas espécies estudadas. Proteínas de shock térmico 70kDa foram encontradas no tecido do trato digestivo em *Drosophila melanogaster*, em resposta ao estresse ocasionado pela temperatura (Krebs & Feder, 1998). No entanto, para a proteína de shock térmico 90, foi reportada uma função de transporte (Saadati Bezdi e col., 2012). Estas proteínas de shock térmico possuem atividade de chaperona podendo ajudar no dobramento dos polipeptídeos produzidos em condições de estresse (Timperio e col., 2008).

Catalases, são enzimas antioxidantes foram observadas no trato digestivo das quatro espécies de triatomíneos analisados, sugerindo, portanto, uma proteção do epitélio intestinal contra o peróxido de hidrogênio e estresse oxidativo gerado pela alimentação (Barbehenn, 2002; Oliveira e col., 2011). Por outro lado, o acúmulo de ROS, que pode ser gerado abruptamente como parte da resposta imune do inseto aos patógenos, promove a ação de diversas enzimas, como a superóxido dismutase, glutathione s-transferase identificadas em *R. prolixus*, ao mecanismo da detoxificação das ROS (DeJong e col., 2007; Paes e col, 2001).

Outra proteína encontrada nos triatomíneos e que pode estar envolvida na fisiologia do inseto foi a citocromo P450, já identificada também em mosquitos (Strode e col., 2012). Apesar de estar envolvida em vários processos e metabolismos como dos lipídeos e esteroides, também participa do metabolismo de xenobióticos e em resposta ao estresse oxidativo (Feyereisen, 1999).

As três categorias do GO identificadas nos triatomíneos analisados tiveram uma porcentagem muito semelhante, dentro da função molecular. As de atividades catalíticas e de atividades de ligação foram as que tiveram maior porcentagem nas quatro espécies estudadas. Apesar de não ter uma porcentagem elevada, a atividade antioxidante foi identificada somente em *R. prolixus*. Nesta espécie, foi possível observar entre as proteínas envolvidas na atividade antioxidante, a superóxido dismutase e glutathione S-transferase, sugerindo que estas enzimas são importantes no processo de detoxificação no processo de digestão sanguínea.

A defensina, um peptídeo com função antimicrobiana foi identificada somente em *T. infestans*. Recentemente, diversos estudos estão abordando a expressão de peptídeos antimicrobianos envolvidos na resposta imune detectada nos diferentes compartimentos do

trato digestivo de *R. prolixus*, quer seja pela ingestão de parasitos e bactérias ou pelo crescimento da microbiota bacteriana intestinal como resultado da alimentação sanguínea (Azambuja e col., 2004; Castro e col., 2012; Vieira e col., 2014; 2015; 2016). A defensina, em *R. prolixus*, foi identificada por Lopez e col. (2003). Nos resultados apresentados aqui, não foram identificados outros peptídeos antimicrobianos, provavelmente pela falta de estímulo indutor da resposta imune nestes insetos ou porque estes peptídeos antimicrobianos são sintetizados em maior quantidade nos hemócitos.

Neste trabalho a serpina foi evidenciada em *P. megistus* e *T. infestans*. Sabe-se que em *P. megistus* a concentração da serpina é maior na hemolinfa, seguida do corpo gorduroso e do intestino médio (Moreira e col., 2014). Estudos posteriores devem ser realizados para entender sua função nos triatomíneos, já a infecção pelo *T. cruzi* aumentou a expressão do gene em diferentes tecidos de *P. megistus* e sua presença relacionada ao sistema de defesa do inseto (Moreira e col., 2014). A relação da serpina com mecanismo de resposta imune foi também observada em plantas (Roberts & Hejgaard, 2008).

Em conclusão, a análise do proteoma do sistema digestivo nos triatomíneos revelou diferentes proteínas nas ninfas de quinto estágio. As proteínas identificadas tais como actina, tropomiosina, as proteínas envolvidas nos diferentes metabolismos de carboidratos, lipídeos e as proteínas envolvidas na síntese de ATP indicaram o alto grau de atividade metabólica neste estágio ninfal dos triatomíneos e o papel destas proteínas na utilização das moléculas de alimento. As proteínas de defesa identificadas aqui como a catalase e proteínas de controle de tumor no trato digestivo destes insetos sugerem que este órgão é uma importante barreira para os entomopatógenos. Por outro lado, a presença das proteínas antioxidantes revelou que neste órgão diversas reações de oxido redução tem papel importante. O maior número de proteínas correspondeu ao *T. infestans* (com três amostras biológicas), *D. maxima* (duas amostras biológicas), *P. megistus* (duas amostras biológicas) e *R. prolixus* (duas amostras biológicas). Por outro lado, para atribuir a exclusividade das proteínas em relação as espécies estudadas torna-se necessário em estudos posteriores um aumento do número das amostras biológicas ou enriquecimento em pools de homogenatos intestinais, barateando assim os custos.

Com o recente desenvolvimento de ferramentas especializadas e técnicas aprimoradas, que permitiram os estudos de genômica (Mesquita e col., 2015), transcriptômica (Ribeiro e col., 2014), proteômica (Ribeiro e col., 2004a; Ribeiro e col.,

2004b; Ribeiro e col, 2015; Schwarz e col., 2014; Rezende Vieira e col. 2015, Ribeiro e col., 2014) e metabolômica (Antunes e col., 2013) permitiram obter maiores informações que podem melhor explicar o sucesso da interação entre o parasito (*T. cruzi*) e vetor (triatomíneo).

No artigo recentemente publicado por Mesquita e col., (2015) do genoma de *R. prolixus* foram encontrados 15.546 genes putativos. A informação gerada mostrou que este hemíptero possui um repertório de genes substancialmente distintos dos dípteros e diferenças na via de sinalização imunológica. Também foi possível desvendar aspectos sobre a fisiologia e evolução do inseto. Por outro lado, a metodologia da genômica baseada apenas na sequência necessita ser complementada pela análise direta dos produtos codificados pelos genes, em análise de genômica funcional.

Antunes e col. (2014) com o estudo do metaboloma em amostras fecais de *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*, contribuíram ao conhecimento da composição química do trato digestivo destes insetos. Neste estudo foi observado que 80% das moléculas encontradas tinham grupos de metabolitos com sequências uniformes para as três espécies, enquanto os 20% restantes variaram entre estas espécies de triatomíneos estudadas. Os metabolitos encontrados na categoria comum a todas as espécies estudadas pertenciam a diferentes categorias como dos ácidos graxos, esteroides, nucleotídeos, açúcares, glicolipídeos. Entretanto na categoria variável para cada gênero estavam os metabolitos de aminoácidos, glicerolipídeos, esteroides, fenol, ácidos graxos e derivados, ácido benzoico e derivados, benzopiranos, quinolinas, glicerofosfolipídeos entre outros.

No presente estudo, as proteínas identificadas pela proteômica *gel free* participam do metabolismo geral, como componentes da musculatura, proteínas de transporte, proteínas em resposta ao estresse, chaperonas e outras. Estes resultados juntamente com trabalhos de genoma, transcriptoma e metaboloma permite uma visão global das proteínas envolvidas nos diferentes processos biológicos em condições normais.

7. CONCLUSÕES

Primeira Parte

As análises da microbiota bacteriana presente no trato digestivo de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* coletados no peridomicílio (Russas, Ceará), mostraram:

1. Serem constituídas, predominantemente pela *S. marcescens* e espécies de Actinobacteria, da subordem Corynebacterianae.
2. Ambas as espécies de triatomíneos apresentaram altas porcentagens de infecção pelo *T. cruzi* (genotipo TcI e/ou TcII).
3. Houve variação na composição da microbiota dos insetos mantidos em Laboratório, por três anos ou mais tal qual ocorreu com *T. infestans*, *T. vitticeps* e *T. brasiliensis*. Nestes insetos, houve predomínio de *Arsenophonus*, como exemplo de bactérias intracelulares e redução de actinobactérias.
4. A infecção de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* resultou na alteração da microbiota bacteriana com aumento de bactérias pertencentes a família Burkolderiaceae e diminuição das bactérias da família Enterococaceae em relação aos insetos controles, não infectados.

Segunda Parte

5. A análise do proteoma no trato digestivo de ninfas de quinto estágio *D. maxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*, revelou diferentes proteínas nas ninfas de quinto estágio.
6. Foram identificadas poucas proteínas compartilhadas entre as quatro espécies: *D. maxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *T. infestans*, e muitas proteínas únicas para cada espécie.
7. As proteínas envolvidas nos diferentes metabolismos de carboidratos, lipídeos e proteínas envolvidas na síntese de ATP indicaram um alto grau de atividade metabólica dos insetos e o papel destas proteínas na utilização das moléculas de alimento.
8. Em *R. prolixus*, a evidência das enzimas superóxido dismutase e da glutathione S-transferase, indicam processo de detoxificação da ingestão sanguínea.

9. O número de proteínas identificado em *R. prolixus* com anotação funcional desconhecida foi maior do que as proteínas identificadas nos membros da tribo Triatomini.

8. PERSPECTIVAS

Futuras pesquisas devem considerar outros biomas brasileiros além da Caatinga, visto que as alterações ambientais presumivelmente devem acarretar em variações da microbiota bacteriana intestinal de diferentes espécies de triatomíneos. Além disso, a questão da interação do inseto com os microorganismos deve ser melhor explorada, não só pela questão das variações genéticas das populações de *T. cruzi*, assim como das espécies de insetos estudadas. Análises proteômicas de diferentes compartimentos do trato digestivo de triatomíneos, com e sem lavagem prévia das bactérias intestinais, poderão abrir novos caminhos para a compreensão da simbiose, particularmente sobre o processo digestivo e nutricional, para uma melhor compreensão do desenvolvimento do inseto e parasitas associados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: *cui bono?* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 Apr;108(2):251-4.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003 mar 13;422(6928):198-207.
- Agnelli A, Ascher J, Corti G, Cecherini MT, Nannipieri P, Pietramellara G. Distribution of microbial communities in forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. Soil Biol Biochem. 2004;36:859-68.
- Alderson G, Ritchie DA, Cappellano C, Cool RH, Ivanova NM, Huddleston AS, *et al.* Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. Res Microbiol. 1993;144:665-72.
- Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. Nat Ver Genet. 2013 jan;14(1):35-48.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215:403-10.
- Alvarenga ESL, Mansur JF, Justi AS, Figueira-Mansur J, dos Santos VM, Lopez SG, *et al.* Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. Insect Biochem Mol Biol. 2015 April 22;15:00070-3.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev. 1995 Mar;59(1):143-69.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS One. 2008;3:e2836.
- Anonymous. Recommendations from a Satellite Meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(II):429-32.
- Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII - Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79:249-55.
- Antunes LCM, Han J, Pan J, Moreira CJC, Azambuja P, Borchers CH *et al.* Metabolomic signatures of Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by Metabolomics. PLoS One. 2013;8(10):e77283.
- Araújo CA, Waniek PJ, Jansen AM. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. Parasit Vectors. 2014;7:94.
- Araújo RF, José Mendonça V, Rosa JA, Matos JF, Lima SC, de Araújo Figueiredo MA. Description of a newly discovered *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) Foci in Ibipeba, State of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014 Jul;47(4):513-6.
- Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil, 1ª. ed., Imperial Novo Milênio, Rio de Janeiro, 2008.
- Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. Proteomics. 2010;8(1):81-94.
- Assumpção TCF, Francischetti IMB, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JCM. An insight into the sialome of the blood sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease. Insect Biochem Mol Biol. 2008;38:213e322.

Atkins P, Jones L. Princípios de química: questionando a vida moderna e o médio ambiente. Porto Alegre: Bookmas, 2001.

Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol*. 2004;107:89-96.

Azambuja P, Furtado AF, Garcia ES. Effects of juvenile hormone analogue on ecdysis prevention induced by precocene in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984 Oct-Dec; 79(4):419-23.

Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol*. 2005a;12:568-72.

Azambuja P, Garcia ES. Care and maintenance of triatomine colonies. In Crampton JM, Beard CB, Louis C (eds), *Molecular Biology of Insect disease vectors. A Methods Manual*, Chapman and Hall, 1997, 56-64.

Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*. 2005b;77(3):397-404.

Bahia AC, Dong Y, Blumberg BJ, Mlambo G, Tripathi A, BenMarzouk-Hidalgo OJ, Chandra R, Dimopoulos G. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ Microbiol*. 2014 Sep;16(9):2980-94.

Balczun C, Siemanowski J, Pausch JK, Helling S, Marcus K, Stephan C, et al. Intestinal aspartate proteases TiCatD and TiCatD2 of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Reduviidae): sequence characterisation, expression pattern and characterisation of proteolytic activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012 Apr;42(4):240-50.

Barah P, Bones AM. Multidimensional approaches for studying plant defence against insects: from ecology to omics and synthetic biology. *J Exp Botany*. 2014; doi:10.1093/jxb/eru48.

Barbehenn RV. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *J Chem Ecol*. 2002 Jul;28(7):1329-47.

Barbosa BE, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Trovó de Marqui AV, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev. Assoc. Med. Bras*. [Internet]. 2012;58(3):366-75.

Barbosa-Silva AN, Câmara AC, Martins K, Nunes DF, Oliveira PI, Azevedo PR, et al. Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Feb;49(1):57-67.

Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol*. 2002;47:123-41.

Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31:621-7.

Beard CB, Durvasula RV, Richards FF. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg Inf Dis*. 1998;4:581-91.

Behar A, Yuval, Jurkevitch E. Enterobacteria mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol Ecol*. 2005;9:2637-43.

- Bernard KA, Wiebe D, Burdz T, Reimer A, Ng B, Singh C, *et al.* Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. Nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalinize citrate. *Int J System Evol Microbiol.* 2010;60:874-9.
- Bezerra CM, Cavalcanti LP, Souza RC, Barbosa SE, Xavier SC, Jansen AM, *et al.* Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:887-98.
- Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS pathogens.* 2012 May;8(5):e1002742.
- Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol.* 2006 Jun;22(6):262-8.
- Brauman A, Doré J, Eggleton P, Bignell D, Breznak JA, Kane MD. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;35:27-36.
- Brener Z. A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host. *J Protozool.* 1972;19:23-27.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2001;31:1218-26.
- Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R, *et al.* Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008 Oct;103(5):1111-7.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *App Environ Microbiol.* 2004;70,293-300.
- Brune A, Dietrich C. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:145-66.
- Bussacos AC, Nakayasu ES, Hecht MM, Assumpção TC, Parente JA, Soares CM, *et al.* Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J Proteomics.* 2011 Aug 24;74(9):1693-700.
- Câmara AC, Lages-Silva E, Sampaio GH, D'Ávila DA, Chiari E, da Cunha Galvão LM. Homogeneity of *Trypanosoma cruzi* I, II, and III populations and the overlap of wild and domestic transmission cycles by *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil. *Parasitol Res.* 2013;112:1543-50.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasites and hosts genetics. *Curr Mol Med.* 2004;4:549-62.
- Carbajal de la Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla DE. The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol.* 2009;9:54-61.
- Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic

cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasit Vect.* 2014;7:602. DOI: 10.1186/s13071-014-0602-7.

Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FB, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF *et al.* "Integrated analysis of shot gun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0". *Nature Protocols.* 2016;11:102-17.

Castro DP, Moraes CS, Garcia ES, Azambuja P. Inhibitory effects of d-mannose on trypanosomatid lysis induced by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol.* 2007a;115:200-4.

Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One.* 2012;5:e36591.

Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, de Souza W, Azambuja P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol.* 2007b;117:201-7.

Cavassin FB, Kuehn CC, Kopp RL, Thomaz-Soccol V, Da Rosa JA, Luz E, *et al.* Genetic variability and geographical diversity of the main Chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera : Triatominae) in Brazil based on ribosomal DNA intergenic sequences. *J Med Entomol.* 2014 May;51(3):616-28.

Chagas C. Nova trypanosomiase humana. Estudos sobre a prophologia e o cyclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909;1(2):159-218.

Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe.* 2011 Oct 20;10(4):307-10.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1258-70. Doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035.

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D141-5.

Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology* 2012;21:5124-37.

Conesa A, Götz S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *Int J Plant Genomics.* 2008;2008:619832.

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993–1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:443-9.

Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009;104(1).

Countinho HLC, Oliveira VM, Manfio GP, Rosado AS. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais Acad Bras Ciências.* 1999; 71(3):491-503.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, *et al.* Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:278-279.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Dec; 108(8):962-7.

- Coutinho CF, Souza-Santos R, Teixeira NF, Georq I, Gomes TTF, Boia MN, *et al.* An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad Saúde Publica*. 2014;30:785-93.
- Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec;26(12):1367-72.
- Crosby LD, Criddle CS. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Bio Techniques*. 2003;34:71-78.
- da Mota FF, Gomes EA, Marriel IE, Paiva E, Seldin L. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18:805-14.
- da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJC, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, *et al.* Cultivation independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatominae vectors of Chagas disease. *Plos Negl Trop Dis*. 2012;6:e1631.
- D'Alessandro A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*. In *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego, 1992, 1-54p.
- De Leon JR. Trypanosomiasis humana por el *Trypanosoma rangeli* em Guatemala. *Publicaciones del Instituto de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. 1952;8:12.
- de Moraes MH, Guarneri AA, Girardi FP, Rodrigues JB, Eger I, Tyler KM, Steindel M, Grisard EC. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasit Vectors*. 2008 Jul 8;1(1):20.
- de Souza DJ, Bezier A, Depoix D, Drezen JM, Lenoir A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. *BMC Microbiol*. 2009;9:29. Doi:10.1186/1471-2180-9-29.
- DeJong RJ, Miller LM, Molina-Cruz A, Gupta L, Kumar S, Barillas-Mury C. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Nac Acad Sci*. 2007;104(7):2121-6.
- Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci*. 2014 Sep 1;3:6-13.
- Desiere F, Deutsch E, Nesvizhskii A, Mallick P, King N, Eng J, *et al.* Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry. *Genome Biol*. 2004;6: R9.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008;6:2383-400.
- Dias JC. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*. 1987 Nov;3(11):336-41.
- Dias JCP. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. *Cad Saúde Publica*. 2000;16:43-59.
- Dias JV, Queiroz DR, Martins HR, Gorla DE, Pires HH, Diotaiuti L. Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the Brazilian Southeast Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Jan;111(1):43-50.
- Diez B, Pedros-Alio C, Marsh TI, Massana R. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:2942-51.

- Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: non pathogenic interactions. *Annu Rev Entomol.* 2004;49:71-92.
- Dillon RJ, Webster G, Weightman AJ, Keith CA. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010;97:69-77.
- Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, McHugh CA et al. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochem Mol.* 2009;39:125-34.
- Diotaiuti L, Faria Filho OF, Carneiro FC, Dias JC, Pires HH, Schofield CJ. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. *Cad Saúde Publica.* 2000;16:61-7.
- Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol.* 2015 Jan 7;60:17-34.
- Douglas AE. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annu Rev Entomol.* 1998;43:17-38.
- Dujardin JP, Panzera F, Schofield CJ. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques, Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS v. 24, n. 5, 2000.
- Duncan JT. On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids. *Parasitol.* 1926;18:238-52.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Apr 1;94(7):3274-8.
- Durvasula RV, Sundaram RK, Kirsch P, Hurwitz I, Crawford CV, Dotson E, et al. Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.* 2008;119:94-8.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinf.* 2011;27:2194-200.
- Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomae bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol.* 2002; 100:17-27.
- Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol.* 1998;44(2):131-40.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1994;5 (11):976-89.
- Engel P, Moran N. The gut microbiota of insects, diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37:699-735.
- Erkosar B, Leulier F. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. *FEBS Letters.* 2014;588:4250-4257.
- Espino CI, Gómez T, González G, do Santos MF, Solano J, Sousa O, et al. Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:547-50.

- Espinoza B, Rico T, Sosa S, Oaxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, et al. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection mode. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:890672.
- Feldhaar H, Straka J, Krische M, Berthold K, Stool S, Mueller MJ, Gross R. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biol.* 2007;5:48. Doi.10.1186/1741-7007-5-48.
- Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One.* 2014 Aug 19;9(8):e105255.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:97-9.
- Ferrand J, Patron K, Legrand-Frossi C, Fripiat JP, Merlin C, Alauzet C, Lozniewski A. Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *J Microbiol Methods.* 2014;105:180-5.
- Ferrari J, Vavre F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Phil Trans R Soc.* 2011;366:1389-1400.
- Feyereisen R. Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol.* 1999;44:507-33.
- Figueiredo AR, da Silva MAP, Hofer E, Moraes AML, Oliveira PC, Coura JR. Microorganisms of the Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi*. Microorganismos de triatomíneos vetores do *Trypanosoma cruzi*. III-Isolamento e caracterização de bactérias e fungos do trato digestivo de *P. megistus* negativos e positivos para *T. cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990;85:114.
- Figueiredo AR. Isolamento da Microbiota bacteriana de triatomíneos e persistência do *Enterobacter cloacae* em *Rhodnius prolixus*, 1859. [Dissertação Mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz, 1995.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3:294-9.
- França LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 2002 May;35(2):169-200.
- Francis SE, Sullivan Jr DJ, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51:97-123.
- Galdos ACR. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos. [Dissertação Mestrado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- García BA, Moriyama EN, Powell JR. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *J Med Entomol.* 2001; 38:675-83.
- Garcia ES, Azambuja P, Contreras VT. Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and preparation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. In Morel CM (Eds.), *Genes and antigens of parasites, A Laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz, World Health Organization, Rio de Janeiro. 1984; 43-6.
- Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today.* 1991;7(9):240-4.

- Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2010;10:499-505
- Garcia ML, Mello RP, Garcia ES. Ecdysone, juvenile hormone and oögenesis in *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. 1979;25(9):695-700.
- Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RM, *et al.* Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. Infect Genet Evol. 2014;23:74-9.
- Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, da Silva MT, Ambrosio DL, *et al.* Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in Central western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:766-74.
- Geer BW, Krochko D, Williamson JH. Ontogeny, cell distribution, and the physiological role of NADP-malic enzyme in *Drosophila melanogaster*. Biochem Genet. 1979;17:867-79
- Geiger A, Fardeau ML, Nijokou F, Ollivier B, *Glossina* spp gut bacterial flora and their role in fly-hosted trypanosome development. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3-34.
- Gendrin M, Christophides GK, The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. Intech. [Internet] 2013; Chapter 17. Disponível em: <http://dx.do.org/10.5772/55107>.
- Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya JD, Triana O. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. Parasit Vectors. 2011;4:66.
- Genkai-Kato M, Yamamura N. Evolution of mutualistic symbiosis without vertical transmission. Theor Popul Biol. 1999 Jun;55(3):309-23.
- Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Boissière A, Awono-Ambéné PH, Nsango SE, Christen R, Morlais I. Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. Infect Genet Evol. 2014 Dec;28:715-24.
- Gonzalez MS, Hamedi A, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NFS, de Souza W Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES, Mello CB. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. Experimental Parasitology. 2006;114:297-304.
- Gonzalez MS, Silva LC, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NF, Mattos DP, Castro DP, Azambuja P, Garcia ES. Involvement of sulfated glycosaminoglycans on the development and attachment of *Trypanosoma cruzi* to the luminal midgut surface in the vector, *Rhodnius prolixus*. Parasitology. 2011 Dec;138(14):1870-7.
- Goodfellow M, Anderson G. Validation of the publication of the new names and combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 2. Int J Syst Bacteriol. 1979;29:79-80.
- Gooding RH. Studies on proteínases from some blood sucking. Proc Ent Soc Ont. 1969; 100:139-145.
- Grewal MS. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. Exp Parasitol. 1957;6:123-130.
- Grimaldi D, Engel MS. Evolution of the insects. Cambridge University Press, p. 755, 2005.
- Grimont F, Grimont PAD. The genus *Serratia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. Prokaryotes. New York: Springer-Verlag. 2006, p. 219-24.

- Grisold AJ, Roll P, Hoenigl M, Feierl G, Vicenzi-Moser R, Marth E. Isolation of *Gordonia terrae* from a patient with catheter related bacteraemia. *J Med Microbiol*. 2007;56:1687-8.
- Gross B. Conference Proceeding IEEE Eng Med Bio Soc. *Bio Me Ms*. 2004;7:5129.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Jun;98(4):435-42.
- Guo F, Zhang T. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:4607-16.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med*. 2012;2012:1-15.
- Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol*. 2001;17(8):372-6.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotech*. 1999;17(10):994-9.
- Há EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, Kim J, Lee WJ. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. *Nat Immunol*. 2009;10:949-57.
- Hall TA. BioEdit. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp*. 1999;41:95-8.
- Halliwell B, Gutteridge, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1-86.
- Hamilton PT, Leong JS, Koop BF, Perlman SJ. Transcriptional responses in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Mol Ecol*. 2014 Mar;23(6):1558-70.
- Hashimoto K, Alvarez H, Nakagawa J, Juarez J, Monroy C, Cordón-Rosales C, *et al*. Vector control intervention towards interruption of transmission of Chagas disease by *Rhodnius prolixus*, main vector in Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Nov;107(7):877-87.
- Hashimoto K, Schofield CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors*. 2012 Feb 22;5:45.
- Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. *InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams*. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:169.
- Hendry TA, Clark KJ, Baltrus DA. A highly infective plant-associated bacterium influences reproductive rates in pea aphids. *R Soc Open Sci*. 2016 Feb 10;3(2):150478.
- Hertig M, Wolbach S. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res* 1924;44:329-74.
- Hoare C. The trypanosome of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific publications. 1972;288-314.
- Houseman JG, Downe ERA. Characterization of an acidic proteínase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera:Reduviidae). *Insect Biochem*. 1982;12:651-5.
- Houseman JG, Downe ERA. Endoproteínase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera:Reduviidae). *Insect Biochem*. 1980;10:363-6.

- Houseman JG, Downe ERA. Identification and partial characterization of digestive proteínases from *Triatoma phyllosoma pallidipennis* Stål (Hemiptera:Reduviidae). *Comp Biochem Phys B*. 1981;70:713-7.
- Hu X, Chen L, Xiang X, Yag R, Yu S, Xiaofeng W. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth instar larvae, *Bombyx mori*. *Mol Biol Rep*. 2012;39:3427-34.
- Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47:1140-4.
- Jiménez ML, Llinas J, Palacios C. Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae:Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape Region, Baja California Sur, México. *J Med Entomol*. 2003;40(1):18-21.
- Jin JP. Titin-thin filament interaction and potential role in muscle function. *Adv Exp Med Biol*. 2000;481:319-33.
- Jonathan G, Lundgren R, Michael L, Joanne CS. Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (Coleoptera:Carabidae). *Annals Entomol Soc America*. 2007;100:275-82.
- Jones RT, Sanchez LG, Fierer N. A cross taxon analysis of insect associated bacterial diversity. *PLoS One*. 2013;8:e61218.
- Justi SA, Russo CA, Mallet JR, Obara MT, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vectors*. 2014 Mar 31;7:149.
- Kashino Y, Harayama T, Pakrasi HB, Satoh K. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr 15;849(1-2):282-92.
- Kautz S, Rubin BER, Russell JA, Moreau CS. Surveying the microbiome of ants: Comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(2):525-34.
- Keebaugh ES, Schlenke TA. Insights from natural host-parasite interactions: the *Drosophila* model. *Dev Comp Immunol*. 2014;42:111-23.
- Kim GH, Lee YE, Lee GH, Cho YH, Lee YN, Jang Y, et al. Overexpression of malic enzyme in the larval stage extends *Drosophila* lifespan. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 9;456(2):676-82.
- Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, Smolarczyk K, Dudek MR, Cebrat S. The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics*. 2007 Jun 12;8:163.
- Kitagawa W, Hata M, Sekizuka T, Kuroda M, Ishikawa J. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824, an Aurachin RE antibiotic producer. *Genome Announc*. 2014;2:e01026-14.
- Kollien AH, Schaub GA. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector - a review. *Tokai J Exp Clin Med*. 1998 Dec;23(6):335-40.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000 Sep;16(9):381-7.

- Kollien AH, Waniek PJ, Nisbet AJ, Billingsley PF, Schaub GA. Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Mol Biol*. 2004;13:569-79.
- Kozłowska M, Tarczewska A, Jakób M, Szpotkowski K, Wojtas M, Rymarczyk G, *et al.* Calponin-Like Chd64 Is Partly Disordered. *PLoS ONE*. 2014;9(5): e96809.
- Krebs RA, Feder ME. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *J Insect Physiol*. 1998 Nov;44(11):1091-101.
- Kropf SP, Sá MR. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2009 Jul 16;1(I):13-34.
- Kropf, S.P (2009). *Doença de Chagas, Doença do Brasil : ciência, saúde e nação, 1906-1962* (Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ). doi:10.7476/9788575413159. ISBN 9788575411759.
- Kunieda T, Fujiyuki T, Kucharski R, Foret S, Ament SA, Toth AL, *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Mol Biol*. 2006;15:563-76.
- Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P. A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Dec;72(4):557-78.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, Higgins DG. ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinf*. 2007;21:2947-8.
- Lee WJ. Bacterial modulated signaling pathways in gut homeostasis. *Sci Signal*. 2008;1:24.
- Legge R. Analysis of microbial diversity by amplicon pyrosequencing. [Dissertação PhD]. University of Nebraska Lincoln, USA. 2012.
- Lehane MJ. Digestive enzymes, haemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood-sucking insects. *Int J Parasitol*. 1994 Feb;24(1):27-32.
- Lehane MJ, Allingham PG, Weglicki P. Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Cell Tissue Res*. 1996;283:375-84.
- Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*. 1997;42:525-50.
- Lenko K, Papavero N. Insetos no Folclore. Série Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas. Coleções Folclore n. 18, São Paulo. 1979.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Natur Hist*. 1979; 163:123-520.
- Levine ND, Corlissa JO, Cox EEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozoology*. 1994;27:37-58.
- Li Y, Zhang Z, Robinson GE, Palli SR. Identification and characterization of a juvenile hormone response element and its binding proteins. *J Biol Chem*. 2007;282: 37605–17.
- Lima AF, Jeraldo VL, Silveira MS, Madi RR, Santana TB, Melo CM. Triatomines in dwellings and outbuildings in an endemic area of Chagas disease in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Dec;45(6):701-6.
- Lima MM, Sarquis O, de Oliveira TG, Gomes TF, Coutinho C, Daflon-Teixeira NF, *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic

- survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:143-9.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015 Nov;151:166-77.
- Liu J, Zheng S, Liu L, Li L, Feng Q. Protein profiles of the midgut of *Spodoptera litura* at the sixth instars feeding stage by shotgun ESI-MS approach. *J Proteome Res.* 2009;2010:2117;42.
- Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF. The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS One.* 2011;6:e19776.
- Liu Q, Zhou XN. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty.* 2015 Dec 28;4:60.
- Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003 Apr;33(4):439-47.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
- Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today.* 1998;14:119-23.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock.* 12 Ed. Edit. Artmed 2010.
- Maeda MH, Knox MB, Gurgel-Gonçalves R. Occurrence of synanthropic triatomine (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Feb;45(1):71-6.
- Marchini D, Rosetto M, Dallai R, Marri L. Bacteria associated with the oesophageal bulb of the midfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Curr Microbiol.* 2002;44:120-4.
- Marsden PD. *Dipetalogaster máxima* ou *D. maximus* como agente no xenodiagnóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1986 Out-Dez;19:205-7.
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran NA. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol.* 2011 Feb;20(3):619-28.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:2830-40.
- Massol-Deya AA, Odelson DA, Hickey RF, Tiedje JM. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S–23S ribosomal DNA and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans ADL, Van Elsas JD, De Bruyn FJ, editors. *Molecular Microbiol Ecology Manual.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 1-8.
- Medina-Aunon JA, Paradela A, Macht M, Thiele H, Corthals G, Albar JP. PIKE: Discovering biological information from proteomics data. *Proteomics.* 2010;10(18): 3262-71. Doi:10.1002/pmic.201000093.

- Méndez C, Salas JA. ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;158:1-8.
- Mesquita *et al.* [Correction] Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2016 Mar 8;113(10):E1415-6.
- Mesquita RD, Vionette-Amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro FA, Minx P, *et al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2015 Dec 1;112(48):14936-41.
- Metzker M. Emerging Technologies in DNA Sequencing. *Genome Research.* 2005;15(12):1767-76.
- Michels P, Hannabert V. The evolution of kinetoplastid glycosomes. *J Bioenerg Biomembr.* 1994 Apr;26(2):213-9.
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov; 65(11):4715-24.
- Minard G, Mavingui P, Valiente Moro C. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vec.* 2013;6:146.
- Montandon CE, Barros E, Vidigal PM, Mendes MT, Anê AC, de Oliveira Ramos HJ, *et al.* Comparative proteomic analysis of the saliva of the *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri* triatomines reveals a high interespecific functional biodiversity. *Insect Biochem Mol Biol.* 2016 Apr;71:83-90.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. Facultative bacterial endosymbiont benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol.* 2002;27:189-195.
- Moran NA, Bennett GM. The tiniest tiny genomes. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:195-215.
- Moran NA, Tran P, Gerardo NM. Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8802-10.
- Moreira CJ, Waniek PJ, Valente RH, Carvalho PC, Perales J, Feder D, *et al.* Isolation and molecular characterization of a major hemolymph serpin from the triatomine, *Panstrongylus megistus*. *Parasit Vectors.* 2014 Jan 14;7:23.
- Murphy S, Tripodi M, Melli M. A sequence up-stream from the coding region is required for the transcription of the 7SK RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:9243-60.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:695.
- Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton van Leeuwenhoek.* 1998;73:127.
- National Institute of Health Common Fund Human Microbiome Project (HMP) [Internet]. Disponível em: <http://www.hmpdacc.org/> (2008). <Citado em 2014 Dez 15>.
- Nawrocki EP, Eddy SR. Query-Dependent Banding (QDB) for faster RNA similarity searches. *PLoS Comput Biol.* 2007;3:e56.

- Nelson DL, Cox MM. Lehninger's Principles of Biochemistry (4th ed.). New York, New York: W. H. Freeman and Company; 2005.
- Neumann AS, Dias FA, Ferreira JS, Fontes ANB, Rosa PS, Macedo RE, *et al.* Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. PLoS One. 2016 May 20; 11(5): e0156037.
- Nyrén, P. The History of Pyrosequencing. Methods Mol Biology. 2007;373:1-14.
- Oliveira JH, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, *et al.* Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. PLoS Pathog. 2011 Mar;7(3):e1001320.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003;100:1803-7.
- Pachebat JA, van Keulen G, Whitten MMA, Girdwood, Del Sol R, Dyson PJ, Facey PD. Draft genome of *Rhodococcus rhodnii* Strain LMG5362, a symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the principle vector of *Trypanosoma cruzi*. Genome Announcements. 2013 May/June;1(3):e00329-13.
- Pacheco RS, de Brito CM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. Biochem Genet. 2005 Oct;43(9-10):519-30.
- Paes MC, Oliveira MB, Oliveira PL. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. Arch Insect Biochem Physiol. 2001;48:63-71.
- Pais R., Lohs C., Wu Y. N., Wang J. W., Aksoy S. The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. Appl. Environ. Microbiol. 2008;74:5965-74.
- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, *et al.* *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. Insect Biochem Mol Biol. 2002;32:517-23.
- Pátek M, Hochmannová J, Nesvera J, Stránský J. Glutamicin CBII, a bacteriocin-like substance produced by *Corynebacterium glutamicum*. Antonie Van Leeuwenhoek. 1986;52:129-40.
- Pauchet Y, Muck A, Heckel DG, Preiss S. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. J Proteome Res. 2008;7:1629-39.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis. 1999 Dec;20(18):3551-67.
- Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS, Shouche YS. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:597-603.
- Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG, Smith RD. advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry based proteomics profiling for clinical applications. Mol Cell Proteomics. 2006 Oct;5(10):1727:44.
- Qiu F, Brendel S, Cunha PMF, Astola N, Song B, Furlong EEM, *et al.* Myofilin, a protein in the thick filaments of insect muscle. J Cell Sci. 2005;118: 1527-36.

- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, Cucunubá ZM. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014 Nov;61(7):477-9.
- Rezende Vieira L, Polompe A, Mesquita RD, Salmon D, Braz GRC, Bousbata S. Protein 2DE reference map of the anterior midgut of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Proteomics*. 2015;15:3901-4.
- Ribeiro JMC, Andersen J, Silva Neto MAC, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG. Exploring the sialome of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004a;34:61-79.
- Ribeiro JMC, Charlab R, Pham VM, Garfield M, Valenzuela JG. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004b;34:543-63.
- Ribeiro JMC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO, *et al*. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neg Trop Dis*. 2014;8:25-94.
- Ribeiro JMC, Schwarz A, Francischetti IMB. A deep insight into the sialotranscriptome of the chagas disease vector, *Pastrongylus megistus* (Hemiptera:Heteroptera). *J. Med Entomol*. 2015;52:351-8.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm*. 2000;60:1-73.
- Riddiford LM. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. general considerations and premetamorphic actions. *Advances in insect physiol*. 1994;24:213-74.
- Roberts TH, Hejgaard J. Serpins in plants and green algae. *Funct Integr Genomics*. 2008 Feb;8(1):1-27.
- Roellig DM, Yabsley MJ. Infectivity, pathogenicity, and virulence of *Trypanosoma cruzi* isolates from sylvatic animals and vectors, and domestic dogs from the United States in ICR strain mice and SD strain rats. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:519-22.
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998 Jul 17;281(5375):363-365.
- Ronaghi U, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996;242(1):84-9.
- Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity, heme oxygenase has both proand antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med*. 2000;28:289-309.
- Rzezniczak TZ, Merritt TJ. Interactions of NADP-reducing enzymes across varying environmental conditions: a model of biological complexity. *G3 (Bethesda)*. 2012 Dec;2(12):1613-23.
- Saadati Bezdi M, Toorchi M, Farshbaf Pourabad R, Zarghami N. Protein map of gut in adult sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put) (Hemiptera:Scutelleridae): two dimensional electrophoresis technique. *Munis Entomol Zool*. 2012;7:229-37.
- Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genet*. 2004;121:229-40.
- Sanchez L. TCA protein precipitation protocol. 2001 [Internet] Disponível em: http://www.its.caltech.edu/~bjorker/TCA_ppt_protocol.pdf, Acesso em 2014 mar 8.

- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis*. 2000;21(6):1054–70.
- Santoni V. Plant plasma membrane protein extraction and solubilization for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*. 2007;355:93-109.
- Santos A, Ribeiro JM, Lehane MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant'Anna MR, et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37:702-12.
- Santos Jr JE, Viola MG, Lorosa ES, Machado EM, Ruas Neto AL, Corseuil E. Evaluation of natural foci of *Panstrongylus megistus* in a Forest fragment in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Sep-Oct;46(5):575-83.
- Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas disease in Jáguaçuana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:263-70.
- Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D Andrea PS, de Oliveira TG, et al. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol*. 2010 Dec;35(2):385-94.
- Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T.pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitol Res*. 2012;110:1481-5.
- Sarquis O, Sposina R, de Oliveira TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, et al. Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:143–7.
- Schaub GA. Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv Insect Physiol*. 2009;37:177-242.
- Schmitt TH, Frezatti WA, Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys*. 1993;307:96-103.
- Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*. 1999;42:1-27.
- Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*. 2009 May-Jun;110(2-3):88-100.
- Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the triatomine. *Cad Saúde Pub*. 2000;16(2):89-92.
- Schofield CJ. Nutritional status of domestic populations of *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74:770-8.
- Schwarz A, Medrano-Mercado N, Schaub GA, Struchiner CJ, Barges MD, Levy MZ, et al. An updated insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations. *PLoS Neg Trop Dis*. 2014;8:e3372.
- Silva MB, Nai GA, Rosa JA. Caracterização biológica e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* da doença de Chagas. *Rev Pat Trop*. 2006;35:213-26.

- Sinkins SP, Walker T, Lynd AR, Steven AR, Makepeace BL, Godfray HC, *et al.* *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* 2005;436:257-260.
- Sirohi SK1, Singh N, Dagar SS, Puniya AK. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Sep;95(5):1135-54.
- Sívori JL, Casabé N, Zerba EN, Wood EJ. Induction of Glutathione S-transferase Activity in *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997 Nov–Dec;92(6)797:802.
- Sonoda IV, Dias LS, Bezerra CM, Dias JC, Romanha AJ, Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma brasiliensis* from state of Ceará, Northeastern Brazil, to the pyrethroid deltamethrin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:348-52.
- Steindel M, Neto ED, Pinto CJC, Grisard EC, Menezes CLP, Murta SMF, Simpson AJG, Romanha AJ. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41:261-267.
- Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LE, Gibson W. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol.* 1999;29:749-57.
- Stevens JR, Brisse S. Systematics of Trypanosomes of medical and veterinary importance. Em *The Trypanosomiasis*. Eds. Maudlin I, Holmes PH, Miles MA. Cambridge: CABI Publishing. 2004. p. 1-23.
- Strode C, Melo Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoSOne.*2012;7:1-8.
- Schwartz R, Ting CS, King J. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res.* 2001 May;11(5):703-9.
- Takeya K, Shimamoto M, Mizuguchi Y. Physicochemical and biological properties of mycobactericin M12 produced by *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol.* 1978;109:215-23.
- Tamura K, Peterson D, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-9.
- Tchioffo MT, Boissière A, Churcher TS, Abate L, Gimonneau G, Nsango SE, *et al.* Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS One.* 2013;8:e81663.
- Tejera E. Um nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli*. *Bull Soc Pat Exot.* 1920;13:527-30.
- Telleria J, Tibayrenc M. *American Trypanosomiasis. Chagas disease One hundred years of research.* 1st edition. Elsevier. 2010.
- Terra W. Evolution of Digestive tube of insects. *Ann Rev Entomol.* 1990;35:181-200.
- Terra WR, Ferreira C, De Bianchi AG, 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J Insect Physiol.* 1979;25:487-94.
- Terra WR, Ferreira C, Garcia ES. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 1988;18:423-34.

- Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994;109:1-62.
- Terra WR. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência Cult.* 1996;48:317e324.
- Terra WR. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Bras J Me Biol Res.* 1988; 21:675-734.
- Theis KR, Venkataraman A, Dycus JA, Koonter KD, Schmitt-Matzen EN, Wagner AP, Holekamp KE, Schmidt TM. Symbiotic bacteria appear to mediate hyena social odors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 3;110(49):19832-7.
- Timperio AM, Egidio MG, Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J Proteomics.* 2008 Oct 7;71(4):391-411.
- Tobie EJ. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol.* 1970;15:118-125.
- Torres-Montero J, López-Monteón A, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A. House infestation dynamics and feeding sources of *Triatoma dimidiata* in Central Veracruz. *Mexico Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:677-82.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001;31:472-81.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, *et al.* Interacción *Trypanosoma* – vector – vertebrado y su relación con la sistemática y epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomedica.* 2007 Jan;27(1):110-8.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub G. Triatominae-*Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli*. Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 2009;110:137-47.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* 1996 Sep 1; 24(17):3381-91.
- Van der Zee J, Barr DP, Mason RP. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert -butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:199-206.
- Varela G, Aparicio A. Intestinal bacteria found in *Triatoma* and *Ornithodoros*. *Am J Trop Med Hyg.* 1951;31(1):381-2.
- Vickerman K. The Diversity of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976; p. 1-34.
- Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, *et al.* *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasit Vectors.* 2015 Mar;1:8:135.
- Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors.* 2016 Mar 1;9(1):119.
- Vieira CS, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, *et al.* Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors.* 2014;7:232.

Vivek N, Bhatia, David H, Perlman, Catherine E. Costello, *et al.* Software tool for researching annotations of proteins: Open-source protein annotation software with data visualization. *Analyt Chem* 2009;81(23):9819-23.

Wahl B, Ernst F, Kumar Y, Muller B, Stangier K, Paprotka T. Defining the Microbial Composition of Environmental Samples Using Next Generation Sequencing. [Internet] GATC Biotech. 2012; Disponível em: <https://www.gatc-biotech.com/fileadmin/Kundendaten/Upload_8.0/Dokumente/16S%20Environment_130218.p>

Walsh GM, Rogalski JC, Klockenbucsh C, Kast J, Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging Technologies and future strategies. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e30.

Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010; 190(4):491-500.

Wang JW, Wu YN, Yang GX, Aksoy S. Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tse tse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:12133-12138.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5261-7.

Wang Y, Gilbreath TM 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One.* 2011;6(9):e24767.

Waniek PJ, Araújo CA, Momoli MM, Azambuja P, Jansen AM, Genta FA. Serine carboxypeptidases of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae): Sequence characterization, expression pattern and activity localization. *J Insect Physiol.* 2014 Apr;63:9-20.

Weiss BL, Wang J, Maltz MA, Wu Y, Aksoy S. Trypanosome Infection Establishment in the Tsetse Fly Gut Is Influenced by Microbiome-Regulated Host Immune Barriers. *PLoS Pathog.* 2013 April;9(4):e1003318.

Whitten MM, Mello CB, Gomes SA, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES, *et al.* Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae) / *Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp Parasitol.* 2001;98:44-57.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact Sheet N° 340. [Internet] 2016. From: [who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/Updated March 2016](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/Updated%20March%202016), (Acceso em 2016 mar 22). Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Wigglesworth VB. Symbiotic bacteria in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera:Triatomidae). *Parasitol.* 1936;28:284-9.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology.* 1996 Jan;14(1):61-5.

Yao H, Xiang X, Chen L, Guo A, He F, Lan L, Lu X, Wu X. Identification of the proteome of the midgut of silkworm, *Bombyx mori* L, by multidimension liquid chromatography LTQ – Orbitrap mass spectrometry. *Biosci Rep.* 2009;29:363-73.

Yu Z, García-González R, Schanbacher FL, Morrison M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling methanogens by Archaea-specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:889-93.

Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:4800-6.

Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, *et al.* PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Apr;11(4):M111.010587.

Zhao Y, Zhang W, Kho Y, Zhao Y. Proteomic Analysis of Integral Plasma Membrane Proteins. *Anal.Chem.* 2004; 76:1817-23.

Zhong X, Zhang L, Zou Y, Yi Q, Zhao P. Shotgun analysis on the peritrophic membrane of the silkworm *Bombyxmori*. *Biochem Mol Biol Reports* 2012;665-70.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1051-4.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12:240-53.

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3