



## CAPÍTULO 8

# O Sistema Neuroendócrino de Insetos.

---

**Eloi S. Garcia<sup>1</sup>, Daniele P. Castro<sup>1</sup>, Marcela B. Figueiredo<sup>1</sup>, Marcelo S. Gonzalez<sup>2</sup>,  
Patrícia Azambuja<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Pavilhão Leônidas Deane, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, 21045-900, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Morro do Valonguinho s/n – Centro – Niterói, RJ, 9 24001-970, Brasil.

Copyright: © 2012 [Eloi S. Garcia, Daniele P. Castro, Marcela B. Figueiredo, Marcelo S. Gonzalez, Patrícia Azambuja]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Considerações Iniciais

A subfamília Triatominae da família Reduviidae contém mais de 120 espécies, das quais várias são potenciais vetores de *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (Tripanosomíase Americana). As principais espécies dessa família ocorrem nas Américas (Lent e Wygodzinsky, 1979), mas um gênero e várias espécies ocorrem na Índia (Scheifer, 1998). As espécies de triatomíneos com maior importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. maculata*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*, entre outras (Dias, 2007).

Por volta de 1930, Sir Vincent Wigglesworth inovou o estudo da fisiologia de insetos, quando começou a utilizar ninfas e adultos de *Rhodnius prolixus* como modelo. A partir de seus achados foram estabelecidos os princípios básicos da endocrinologia de insetos e as interações entre os hormônios produzidos durante os processos de muda, metamorfose e reprodução. Wigglesworth observou que as fases de ninfa e a metamorfose dos insetos eram controladas por diferentes hormônios tais como o protoracicotrópico (HPTT), o juvenil (HJ) e ecdisona, por ele denominados “hormônio cerebral”, “hormônio inibidor” e “hormônio da muda”, respectivamente (Wigglesworth, 1972).

Wigglesworth também investigou outros aspectos da fisiologia do *R. prolixus*, incluindo a reprodução, desenvolvimento embrionário, cutícula, respiração, excreção (Wigglesworth, 1972). Seus clássicos trabalhos permitiram a elaboração de uma teoria coerente de como os insetos se desenvolvem e podem seletivamente ativar os hormônios responsáveis pela ecdise.

*R. prolixus*, por ser de hábito alimentar descontínuo, tem como vantagem, o fato de que uma única alimentação sanguínea por estágio é capaz de deflagrar sincronicamente eventos fisiológicos relacionados ao seu desenvolvimento além das facilidades de manipulação e criação em larga escala. Outra vantagem do uso de *R. prolixus*, é sua disposição à alimentação pela utilização de um aparato artificial, ao qual é adicionado sangue contendo anticoagulante ou desfibrinado. Este comportamento permite, em curto período de tempo, o tratamento oral dos insetos com diferentes drogas e microorganismos, inclusive tripanossomatídeos, pela simples adição ao sangue alimentar. Seu ciclo de vida no laboratório necessita, em média, de seis meses para completar o ciclo de ovo a imago, sendo que a longevidade do inseto adulto favorece os experimentos em laboratório (Garcia e cols., 1975; 1984). No laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Insetos, criado pelo Dr. Eloi Garcia há cerca de 50 anos, sob influência do saudoso “Mestre Ubatuba”, o *R. prolixus* tem sido utilizado como modelo para estudos de processos biológicos. Estas investigações são basicamente concentradas no sistema digestório, imune e neuroendócrino do inseto vetor.

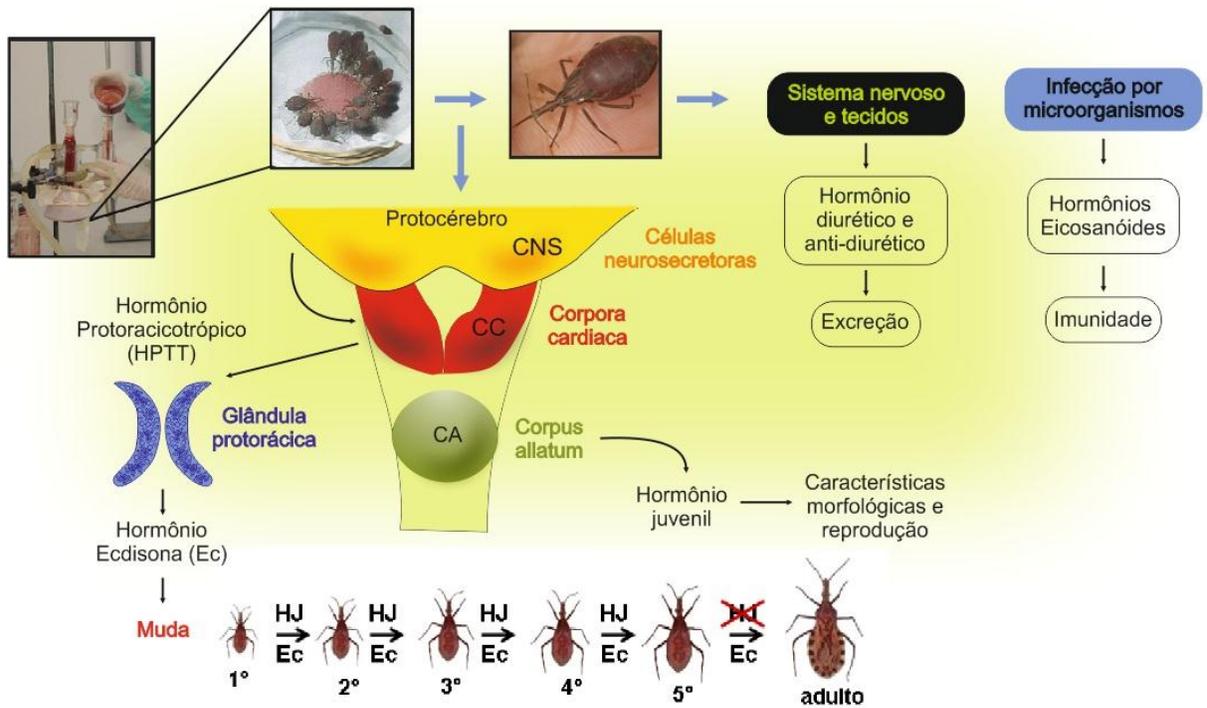
O conhecimento da fisiologia, bioquímica e imunologia do *R. prolixus* foi, visivelmente, aprofundado por diversos grupos, na grande maioria, de brasileiros. Neste sentido, inúmeras publicações se concentram em aspectos hormonais, proteases e outras enzimas hidrolíticas do tubo digestivo, fisiologia da alimentação e glândulas salivares, efeitos de produtos naturais, imunidade celular e humoral e

interação entre tripanosomatídeos (*T. cruzi* e *T. rangeli*) com o inseto vetor, dando ênfase a relação de fatores intestinais envolvidos com o estabelecimento dos parasitos (Garcia e cols., 2010).

### **O Sistema Neuroendócrino - Síntese e Liberação de Hormônios**

O sistema endócrino envolve a secreção de hormônios, definidos como substâncias químicas que atuam como sinalizadores celulares, exercendo suas funções em células alvos distantes do seu local de síntese. Em geral, os hormônios são transportados aos tecidos influenciando uma série de processos fisiológicos, tais como reprodução, comportamento alimentar, digestão, síntese e estoque de carboidratos e lipídios. Nos animais com simetria bilateral o sistema endócrino envolve populações celulares especializadas, compactadas em glândulas, conhecidas como glândulas endócrinas encontradas em várias partes do corpo. Nos insetos, os hormônios são sintetizados pelos centros neuronais, neuro-glândulares ou glandulares, como as células neurosecretoras, as “*corpora cardíaca*”, as “*corpora allata*” e as glândulas protorácicas (Hartenstein, 2006).

As células neurosecretoras (CNS) são encontradas ao longo de todo o sistema nervoso nos insetos, em sua maioria no cérebro. Com exceção do hormônio juvenil e ecdisteróides, que são produzidos pelas “*corpora allata*” (ou “*corpus allatum*” quando as glândulas são fundidas) e glândulas protorácicas, respectivamente, o sistema nervoso central produz grande parte dos hormônios conhecidos. As “*corpora cardíaca*” consistem em um par de corpos neuro-glândulares dispostos atrás do cérebro e responsáveis pelo estoque do hormônio protoracicotrópico (HPTT) (Fig 1).



**Figura 01 – Representação esquemática da síntese, liberação e ação dos principais neuro-hormônios e hormônios de *Rhodnius prolixus*.** A figura representa o alimentador e os insetos sugando sangue, o esquema do cérebro e glândulas protorácicas e “*corpus allatum*”, que produzem ecdisona e hormônio juvenil, respectivamente, e os efeitos destes hormônios sobre a muda dos estádios ninfaís e a passagem para imago. O desenho representa também outros compostos como os hormônios diurético e antidiurético e os eicosanóides e seus efeitos no inseto.

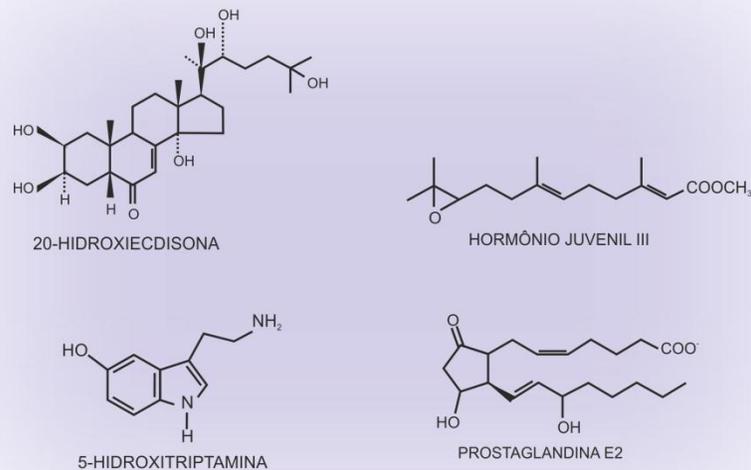
Em geral, o sistema nervoso interage com o sistema endócrino levando a mecanismos reguladores bastante específicos de muda, reprodução, morfogênese. Dessa forma, os dois sistemas atuam coordenadamente, como sistema neuroendócrino, de forma a regular as funções corporais dos insetos.

### Hormônio Protoracicotrópico e Hormônio ecdisona

O hormônio protoracicotrópico (HPTT) é sintetizado por células neurosecretoras dispostas na “*pars intercerebralis*”, a região mediana do protocérebro. A liberação do HPTT na hemolinfa, a partir das “*corpora cardíaca*”, estimula a secreção de ecdisona pelas glândulas protorácicas (Fig 1). A ecdisona é um hormônio esteróide hidroxilado, que apresenta estrutura similar aos esteróides presentes em vegetais e animais. Os ecdisteróides possuem estrutura com 27 átomos de carbono, função cetônica localizada no anel B e grande polaridade, características que diferenciam os ecdisteróides dos hormônios esteróides de mamíferos (Stoka, 1987). Os ecdisteróides constituem o primeiro grupo de compostos isolados que

apresentam atividade indutora da muda em insetos, sendo reconhecidos como ecdisteróides todos os compostos que possuem estrutura similar a ecdisona (Goodwin, 1978).

Os ecdisteróides normalmente são carregados das glândulas protorácicas até o tecido receptor periférico, através de proteínas transportadoras plasmáticas (Wigglesworth, 1972). Nos tecidos periféricos a ecdisona é convertida em 20-hidroxiecdisona, composto capaz de ativar as células hipodérmicas, com a restauração da capacidade de crescimento das mesmas e síntese protéica, permitindo a formação de uma nova cutícula, resultando na liberação da cutícula velha (apólise) (Wigglesworth, 1972) (Fig 2).



**Figura 02. Estruturas dos principais hormônios de *Rhodnius prolixus*.**

Sabe-se que a liberação de ecdisteróides ocorre na forma de pulsos, antes de cada muda, sendo controlada principalmente pelo HPTT (Vafopoulou e Steel, 1989). Em experimentos de radioimunoensaios para medição de ecdisteróides de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* foram observados dois períodos de liberação do HPTT: o primeiro ocorre poucas horas após o repasto sanguíneo e o segundo entre o quinto e sexto dias após a alimentação, em um período conhecido como “período crítico da cabeça” (Knoblock e Steel, 1989). Em *R. prolixus* são observados dois picos de ecdisona antes de cada muda. O primeiro ocorre um dia após a alimentação, com um pequeno aumento da concentração de ecdisona na hemolinfa, enquanto que o

segundo, bem maior, ocorre no meio do processo de muda (Vafopoulou e Steel, 1989).

## Hormônio Juvenil

Hormônio Juvenil (HJ) (Fig 1) tem papel essencial sobre o desenvolvimento, especialmente sobre a morfogênese, bem como sobre o comportamento e processo reprodutivo dos insetos, tais como desenvolvimento de ovário, produção de vitelogenina e captação desta para dentro do ovócito, acasalamento e oviposição (Davey, 2000) (Fig 1). Em *R. prolixus*, Davey (2000) demonstrou um fator allatotrópico, estimulador do CA –liberado pelo “corpus cardiacum” após a alimentação de fêmeas adultas. Baehr (1973), em um modelo clássico de ensaio com eletrocoagulações das células neurosecretoras localizadas na “*pars intercerebralis*”, estudou a fisiologia da muda de triatomíneo, observando também que o cérebro tem atividade estimuladora do CA. Neste caso, a “*parsectomia*”, resultou na supressão do HJ, um efeito semelhante ao encontrado quando o inseto é submetido à allatectomia.

Muitos dos eventos, morfogênicos ou reprodutivos, dependem de um período específico de liberação do HJ. Sabe-se que o hormônio pode ter o nível aumentado pela allatotropina ou diminuído pela allatostatina, duas famílias de neuropeptídeos controladores da atividade do CA (Weaver e Audsley, 2009). Kataoka (1989), a partir de um modelo *in vitro* de “*corpus cardiacum*” (CA), isolado de Lepidóptera, foi quem primeiro purificou uma allatotropina, composta por 13 aminoácidos, com atividade estimuladora da síntese de HJ (Kataoka, 1989). Desde então, outros neuropeptídeos idênticos ou semelhantes foram identificados em Orthoptera, Diptera e Coleoptera (Elekkonich e Horodyski, 2003). Resultados obtidos sugerem que o modelo de ativação do CA, via allatotropina, seja comum, mas não universal entre os insetos. Alguns autores especulam que a função cerebral allatotrópica, estimuladora da síntese de HJ, seja secundária, tendo o neuropeptídeo, primariamente, função miotrópica, como a contração intestinal vista em *Manduca sexta*, *Leucophaea maderae* e *Periplaneta americana* (Elekkonich e Horodyski, 2003).

## Hormônios diurético e antidiurético

Um dos pesquisadores que mais estudou o mecanismo de excreção de *R. prolixus* foi Simon Maddrell que começou seu trabalho no laboratório de V. B. Wigglesworth, ainda como estudante, em 1959. Maddrell focou sua investigação nos túbulos de Malpighi, os quais produzem a urina via soluto e solvente transportados através das células destes túbulos. Os sais transportados pela urina são reabsorvidos pelo intestino posterior, o que leva o inseto a excretar grandes volumes de fluidos mantendo seu balanço osmótico. Maddrell trabalhou intensamente na identificação dos hormônios responsáveis por este processo. O hormônio diurético - identificado por Maddrell nos anos de 1960 - a 5-hidroxitriptamina (5-HT, mais conhecida como serotonina) (Fig 2) (Wigglesworth, 1972), e o hormônio antidiurético CAP<sub>2b</sub>, o qual encerra a diurese 3-4 horas após a alimentação (Quilan e cols., 1997).

Embora a 5-HT seja o único hormônio diurético identificado até agora em *R. prolixus* hoje é aceito que mais de um neurohormônio atue sobre a excreção. Nesta

espécie, sabe-se que cada estágio de ninfa pode realizar um repasto sanguíneo que atinge até 10 vezes seu peso corporal. Isto restringe a mobilidade do inseto tornando-se essencial que o fluido alimentar (particularmente a água e sais) seja eliminado o mais rápido possível pelo inseto. Assim, o animal muitas vezes, começa a urinar mesmo antes de terminar a alimentação. A alimentação no *Rhodnius* induz liberação de 5-HT da massa ganglionar mesotorácica (Orchard, 2006) (Fig 1), a qual pode ser demonstrada por ensaios imunocitoquímicos com a diminuição na imunorreatividade a 5-HT em áreas específicas do tecido neurohemal. Esta mudança é coincidente com o dramático aumento na concentração de 5-HT na hemolinfa após a alimentação. O aumento deste hormônio diurético por liberação do sistema nervoso periférico na circulação estimula a secreção dos túbulos de Malpighi cerca de mil vezes e o fluido secretado é rico em NaCl. O estímulo para a liberação de hormônio diurético se relaciona com a distensão do abdômen, o qual é detectado por receptores da distensão existentes nos músculos dorsais. A resposta é muito rápida com hormônio diurético sendo detectado na circulação 15 segundos após o início da alimentação do inseto. O inseto adulto tem elevado teor de 5-HT nos primeiros três minutos.

À medida que ocorre a redução da distensão abdominal, o hormônio desaparece da hemolinfa, sendo excretado pelos túbulos do inseto. Em *R. prolixus*, além da remoção de 5-HT (e presumidamente de outro neuropeptídeo diurético) contribui também para o término da diurese, o neuropeptídeo CAP<sub>2b</sub>, reconhecido como fator antidiurético (Quilan e cols., 1997). Recentes investigações demonstraram que nervos abdominais são imunorreativos a um anticorpo que reconhece CAP<sub>2b</sub>. Assim, os nervos abdominais podem ser sítios de produção e/ou liberação dos hormônios diurético e antidiurético (Orchard, 2006).

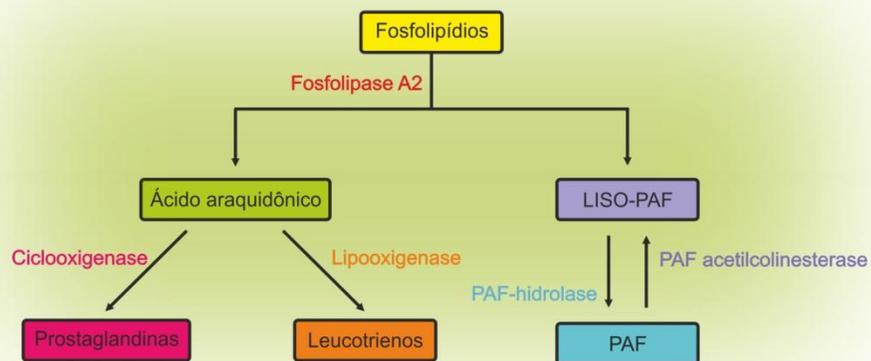
## Hormônios Eicosanóides

Os eicosanóides são importantes hormônios locais (autacóides), embora possam atuar como hormônios circulantes. São hormônios locais que possuem curto alcance, solúveis em água, e que rapidamente exercem seu efeito biológico. Degradam-se também com rapidez de maneira espontânea ou enzimática.

Os eicosanóides são metabólitos oxigenados contendo em sua estrutura de ácido graxo 20 carbonos poliinsaturados. Existem três grandes grupos de eicosanóides incluindo as prostaglandinas, ácidos epoxieicosatrienóicos e os vários produtos da lipoxigenase (Stanley e cols., 2002) (Fig 2). Cada grupo de eicosanóides é formado por vias específicas conhecidas como cicloxigenase e lipoxigenase. Primeiramente, ocorre a liberação do ácido araquidônico através da atividade catalítica da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre fosfolípídeos. Em seguida o ácido araquidônico é oxidado por vias diferentes formando os eicosanóides (Stanley 2000, 2006a; Shrestha e Kim, 2008) (Fig 3).

As prostaglandinas funcionam como hormônios autócrinos e mediadores parácrinos para uma variedade de processos fisiológicos intensamente estudados em mamíferos (Funk, 2001; Cha e cols., 2006). Os envolvimento de eicosanóides na fisiologia de invertebrados também têm despertado interesse, principalmente em relação à participação destes no controle de processos fisiológicos fundamentais como imunidade e reprodução (Stanley-Samuelson e cols. 1997; Stanley, 2000 e 2006b) (Fig 1). A presença de eicosanóides no trato reprodutivo de invertebrados é bem conhecida,

porém sua função e mecanismo de ação são pouco descritos. Trabalhos demonstraram que as prostaglandinas estão envolvidas na ovogênese de grilo *Teleogryllus commodus* (Loher 1981) e também na regulação de vitelogênese em *R. prolixus* (Medeiros e cols., 2002). Os eicosanóides também estão relacionados com a síntese de nucleotídeos cíclicos como mensageiros secundários (Funk, 2001) e AMPc relacionados com a maturação de gametas (Meijer e cols., 1986; Sagi e cols., 1995; Spaziani e cols., 1995; Medeiros e cols., 2004).



**Figura 03. Representação esquemática da síntese dos hormônios eicosanóides e do fator de agregação de plaquetas (PAF) mostrando os principais compostos e enzimas das vias envolvidas.**

Os eicosanóides também são fundamentais para a sinalização da resposta imune de insetos (Büyükgüzel e cols., 2007). Inúmeros grupos de pesquisa indicam que eicosanóides são mediadores cruciais para fagocitose, microagregação, migração de células e reações de nodulação (revisão de Stanley e Miller, 2006). Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado a importância da fosfolipase  $A_2$ , enzima que desencadeia a formação dos eicosanóides, para resposta imune dos insetos (Tunaz e cols., 2003; Park e cols., 2005; Stanley, 2006b; Shresta e Kim, 2008). Como essa enzima também participa da via de formação de plaquetas, alguns autores sugerem a participação de fatores de agregação de plaquetas (PAF) na sinalização celular de insetos (Machado e cols., 2006; Figueiredo e cols., 2008a, 2008b) (Fig 3). A fosfolipase  $A_2$  tem sido relatada como atuante sobre a digestão de insetos, resposta imune, reprodução e metabolismo (revisão de Stanley 2006).

## Produtos Naturais que Afetam o Sistema Neuroendócrino e o Sistema Imunológico

Os insetos possuem um sistema de defesa contra infecção eficiente, que inclui barreiras físicas e químicas além da resposta imune inata. O sistema imune dos insetos compreende a ativação do sistema profenoloxidase, indução de fatores antimicrobianos, formação de microagregados, fagocitose e encapsulação pelos hemócitos e formação de reativos de oxigênio e nitrogênio. Este sistema é subdividido em resposta imune celular, referente às defesas mediadas por hemócitos, e humoral, relacionada ao plasma, porém ambos atuam de maneira integrada tornando o sistema mais eficiente no sentido de minimizar ou conter a multiplicação de patógenos invasores (Garcia e cols. 2009; Ursic-Bedoya e cols. 2009).

A utilização de variadas classes de produtos do metabolismo secundário de plantas para o controle de pragas agrícolas e vetores de doenças parasitárias tem sido amplamente explorada como bioinseticidas ou reguladores do crescimento de insetos (IGRs). O Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Insetos tem desenvolvido bioensaios para investigar os efeitos de tais substâncias sobre a fisiologia de triatomíneos. Para comprovar a adequação do modelo biológico, o *R. prolixus*, demonstramos que a ingestão de certos produtos naturais misturados ao sangue alimentar, altera alguns processos neuroendócrinos, como a muda, a reprodução e a excreção, assim como, também, direta ou indiretamente, o sistema imunológico. Abaixo discutiremos, inicialmente, os efeitos de alguns compostos testados em *R. prolixus*.

### Azadiractina

Azadiractina (Aza), um triterpeno, da classe limonóide, extraído de plantas da família Meliaceae como *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* (Brahmachari, 2004) (Fig 4). Em *R. prolixus*, a Aza inibe o processo de muda por interferência sobre o sistema neuroendócrino, diminuindo os níveis de ecdisteróides na hemolinfa (Garcia e Azambuja 2004). Experimentos utilizando ninfas de 5º estágio com transplantes de cabeça entre receptores e doadores, normais ou tratados, mostraram que a Aza além de interferir bloqueando a produção de HPTT, também age diretamente nas glândulas protorácicas diminuindo significativamente os níveis de ecdisteróides (Garcia e cols., 1989, 1990, 1991). A aplicação simultânea de ecdisona reverte a inibição da ecdise causada pela Aza. Neste caso, a ação da ecdisona resulta na indução de mitose na epiderme, fenômeno básico para produção da nova cutícula e muda.

Em fêmeas adultas de *R. prolixus*, a Aza causa redução do desenvolvimento dos ovócitos e, conseqüentemente, afeta a produção de ovos, no entanto, sem alterar a viabilidade ou eclosão das ninfas. Estes efeitos foram correlacionados com os níveis de vitelogenina na hemolinfa e vitelina nos ovários. Os títulos de ecdisteróides na hemolinfa e ovários, determinados por radioimunoensaios, estavam também diminuídos nos insetos tratados com Aza. Experimentos com análise de ovários isolados sugeriram que a Aza interfere diretamente na produção de ecdisteróides por estes órgãos (Feder e cols., 1987).

Além das alterações fisiológicas de *R. prolixus*, o tratamento oral dos insetos com Aza, reduzem as respostas imunológicas de microagregação e atividade fagocítica dos hemócitos facilitando a proliferação de parasitas e bactérias na hemolinfa e, conseqüentemente, aumentando a mortalidade de insetos (Azambuja e cols. 1991).

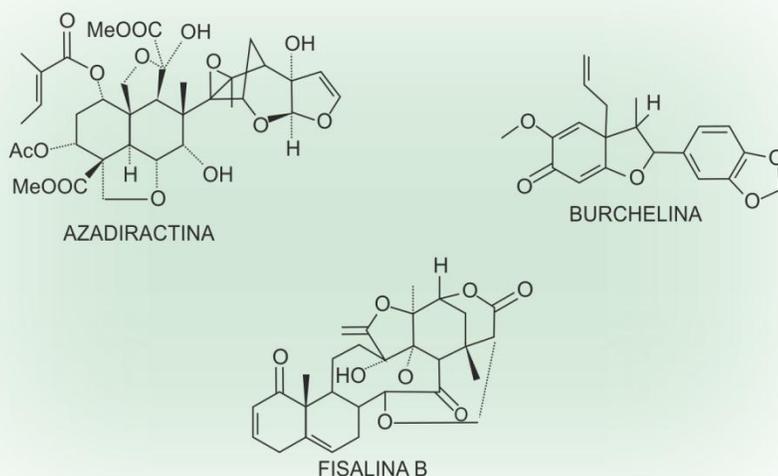
### Lignóides

Garcia e Azambuja (2004) demonstraram que lignanas e neolignanas podem afetar o sistema endócrino de *R. prolixus*. Após suplementação com sangue alimentar contendo concentrações diferentes de seis lignóides (burchelina, podofilotoxina, pinoresinol, sesamina, licarina A e ácido nordiidroguaiarético – NDGA), foi demonstrado que pinoresinol e NDGA, semelhante a Aza, pela via HPTT/ecdisona, estão envolvidos no mecanismo de ação de hormônios. A inibição da muda pode ser revertida pelo tratamento simultâneo com ecdisona adicionada à dieta dos insetos.

Por outro lado observou-se que a adição ao sangue alimentar de podofilotoxina e burchelina drasticamente diminuía a produção de urina em *R. prolixus* (Fig 4). A questão levantada foi como estes compostos interferiram na excreção do inseto. Sabe-se que a rápida diurese após a alimentação é um processo coordenado, necessitando a passagem de água e sais através do epitélio do estômago para a hemolinfa, e desta para as células dos túbulos de Malpighian para eliminação do excesso de fluido do sangue alimentar (Wigglesworth, 1972). Observou-se que a aplicação de burchelina alimentada simultaneamente com sangue contendo 5-HT revertia a inibição da excreção causada por esta droga. Este mesmo resultado foi obtido em experimentos *in vitro*, ou seja, com tubos de Malpighian isolados (Garcia e Azambuja, 2004). E mais, experimentos com túbulos isolados diminuíam a produção de urina quando tratado diretamente *in vitro*, com burchelina. Nestes experimentos, a inibição pode ser revertida pela aplicação de 5-HT e homogenatos de massa ganglionar mesotorácica (fonte de hormônio diurético) (Garcia e Azambuja, 2004).

### Fisalinas

As fisalinas são compostos isolados do metabolismo secundário da planta *Physalis angulata* L., família Solanácea, muito utilizada no Norte e Nordeste como planta medicinal. As fisalinas, caracterizadas quimicamente como seco-esteróides, possuem estruturas similares aos esteróides, quatro anéis esteroidais, porém o anel B encontra-se aberto (Tomassini e cols. 2000) (Fig 4).



**Figura 04. Estruturas de alguns compostos com ação moduladora do sistema neuroendócrino de *Rhodnius prolixus*.**

As fisalinas apresentam atividade imunomoduladora em mamíferos, atividade tripanossomicida, bactericida, moluscidas, antiinflamatória e antitumoral (Soares e cols. 2006; Pinto e cols. 2010). Os efeitos sobre o *Rhodnius* foram relatados pelos autores Garcia e cols. (2006) e Castro e cols. (2008 e 2009), os quais observaram que as fisalinas B, D, F e G alteram o sistema imunológico do *R. prolixus* aumentando a mortalidade quando desafiados com parasitas e bactérias.

Em *R. prolixus* infectados com *T. rangeli* o tratamento com fisalina B reduz a formação de microagregados de hemócitos e produção de óxido nítrico (Garcia e cols., 2006). E nos insetos desafiados por infecção bacteriana as fisalinas B, F e G interferem significativamente na formação de microagregados e fagocitose (Castro e cols., 2008).

Em 2009 os mesmos autores demonstraram que o efeito inibitório de respostas imune celulares da fisalina B sobre *R. prolixus* tem seu efeito revertido com adição de ácido araquidônico e PAF (fator de ativação de plaquetas). O ácido araquidônico é liberado pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que em seguida é oxidado formando os eicosanóides, importantes sinalizadores de resposta imune. Outro produto da ação da enzima PLA<sub>2</sub> é o lisofosfolípido, Liso-PAF que é convertido em PAF também sinalizador de resposta imune (Prescott e cols., 2000).

A atuação de PAF sobre o sistema imunológico de insetos foi descoberta por Machado e cols., (2006) e Figueiredo e cols., (2008a e 2008b) que demonstraram que a via de sinalização do PAF é mediadora tanto da formação de microagregados de hemócitos como da fagocitose em *R. prolixus*. Além disso os trabalhos demonstraram que a infecção com *T. rangeli* inibe a atividade fagocítica através da diminuição da

enzima PLA<sub>2</sub>, bem como o aumento da atividade de PAF-acetilhidrolase (PAF-AH). Esta enzima degrada PAF sendo um importante regulador dessa via de sinalização (Derewenda e Ho, 1999). A fisalina B também aumenta a atividade da enzima PAF-AH, reduzindo assim a sinalização e ativação de respostas imunológicas do inseto, porém não altera os níveis da enzima PLA<sub>2</sub> em *R. prolixus* (Castro e cols., 2009).

### Desenvolvimento de *T. cruzi* e *T. rangeli* no Inseto Vetor

*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) é um flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, subgênero Herpetosoma. Este protozoário é parasita de mamíferos e possui insetos hemípteros hematófagos como hospedeiros invertebrados. O ciclo de vida do *T. cruzi* no vetor inicia-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas pelo inseto durante o repasto sanguíneo. Após a ingestão, as formas migram para a porção anterior do intestino médio do inseto (também conhecida como “estômago”) evoluindo para formas arredondadas com (esferomastigotas) ou sem flagelos (tipo amastigotas). Logo após estas formas evoluem para epimastigotas migrando para a porção posterior do intestino médio (“intestino”) onde se multiplicam intensamente através de divisão binária. Os epimastigotas, concomitante a multiplicação no intestino, migram para a parte mais posterior do trato digestivo, e numa região conhecida como reto, e aderem-se através dos seus flagelos à cutícula e ampolas retais, evoluindo, finalmente, para as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (metaciclogênese), que podem ser eliminadas, juntamente com epimastigotas, pelo inseto através das fezes durante ou logo após o ato de alimentação do triatomíneo. No caso de insetos infectados, os parasitas presentes nas fezes, podem penetrar no hospedeiro vertebrado através de lesões geradas por soluções de continuidade da pele, em geral a partir da pequena perfuração provocada pela picada do inseto, ou mesmo como consequência do ato de coçar acabando por levar as formas infectantes às mucosas.

O flagelado *Trypanosoma rangeli*, (Tejera, 1920), assim como o *T. cruzi*, também pertence a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, subgênero Herpetosoma. Possui parte do seu ciclo de vida relacionado ao trato digestivo do hospedeiro invertebrado *R. prolixus* (Guhl e Vallejo, 2003). Para completar seu ciclo de vida, o parasita alterna-se entre o hospedeiro vertebrado (mamíferos) e o invertebrado (triatomíneos) (Tobie, 1970).

O ciclo de vida do *T. rangeli* inicia-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas pelo hospedeiro invertebrado durante o repasto sanguíneo. Estas se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, diferenciando-se inicialmente em epimastigotas, que conseguem romper a barreira do epitélio intestinal alcançando a hemocele do inseto. Uma vez na hemocele, os parasitas continuam a multiplicação, e migram para as glândulas salivares onde ocorre a metaciclogênese para formas tripomastigotas metacíclicas. Estas, no próximo repasto sanguíneo, serão inoculadas no hospedeiro vertebrado, através da picada do inseto juntamente com a ejeção da saliva (Tobie, 1970). Sendo assim, existem duas diferenças importantes em relação ao ciclo de vida do *T. rangeli* e do *T. cruzi*: 1) a forma como os parasitas são transmitidos para os hospedeiros vertebrados (através da picada do inseto no caso do *T. rangeli* ou através da urina e fezes no caso do *T. cruzi*) e 2) o parasita *T. cruzi* não está apto a

invadir a hemocele do inseto. Além disso, ao contrário do *T. cruzi* o *T. rangeli* aparentemente não é patogênico para mamíferos (Tobie, 1970).

### O controle Neuroendócrino sobre o Desenvolvimento de *T. cruzi* e *T. rangeli* no Inseto Vektor.

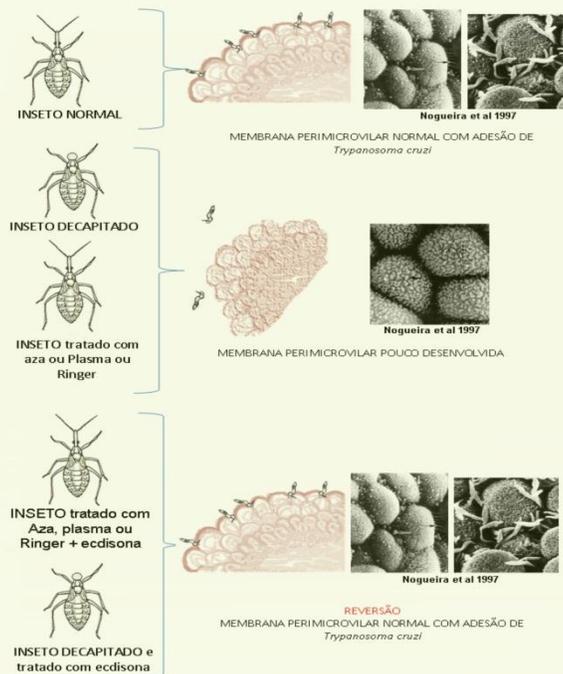
Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido internamente por uma membrana peritrófica que protege as células epiteliais contra a abrasão por fragmentos do conteúdo intestinal. Os hemípteros apresentam apenas um complexo de membrana lipoproteica desprovida de quitina, envolvendo as microvilosidades das células epiteliais, estendendo-se para o lúmen e terminando em fundo cego (Billingsley e Downe, 1986), atualmente denominado membrana perimicrovilar (PMM) (Terra, 1988) (Fig 5).

Investigações citoquímicas mostram que a PMM é uma estrutura formada de glicoproteínas, carboidratos e colesterol, que atua como carreadora de enzimas hidrolíticas. A PMM possui também em sua composição bioquímica moléculas como glicosaminoglicanos sulfatados (Garcia e cols., 1986, Dietrich e cols., 1987; Costa-Filho e cols., 2001; Souza e cols., 2004), hemozoina (Silva e cols., 2007), colesterol, Mg<sup>2+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, fosfatase alcalina, resíduos de  $\alpha$ -D-galactose, manose, ácido siálico, N-acetyl-D-galactosamina e N-acetyl-galactosamina- $\alpha$ -1,3-galactose e lectinas capazes de reconhecer N-acetyl-D-galactosamina,  $\alpha$ -D-manose,  $\alpha$ -L-fucose e  $\alpha$ -D-glicose (Albuquerque –Cunha e cols. 2009). Além disto, tem como característica a permeabilidade seletiva às enzimas digestivas, as quais atravessam a PMM para atingir o bolo alimentar. Outras funções descritas para a PMM incluem: barreira contra a invasão de patógenos, sítio de interação parasita/vetor, compartimentalização do processo de digestão enzimática por separação do epitélio intestinal através da formação dos espaços perimicrovilar e luminal (Shao e cols., 2001; Terra, 2001; Silva e cols., 2004; Terra e cols., 2006). Em ninfas de *R. prolixus*, as PMMs são especialmente evidentes entre 24 horas e cerca de 15 dias após alimentação sanguínea (Billingsley e Downe, 1986), quando se desenvolvem recobrando a membrana citoplasmática ou microvilar (MM) das células epiteliais do intestino médio.

Como visto anteriormente, o HPTT, HJ e ecdisona são três hormônios que devem estar presentes nos momentos adequados e em quantidades precisas, ao longo do ciclo de vida do inseto, para que seu desenvolvimento ocorra de forma plenamente satisfatória. Entre outros sistemas fisiológicos, estes hormônios são capazes de controlar o processo de organização ultraestrutural do trato digestivo e consequente suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* em seus insetos vetores. A adição de 20-hidroxiecdisona a culturas de células intestinais de *Calliphora erythrocephala* resultou em um marcante aumento da taxa de formação de membranas peritróficas enquanto o fornecimento de HJ obtido de *Hyalophora cecropia* levou a inibição da síntese das membranas neste sistema (Becker 1978). Ecdisona está também envolvida na organização ultraestrutural do intestino médio de *R. prolixus*. A simples distensão abdominal durante o processo de alimentação sanguínea induz a projeção das microvilosidades das células intestinais em direção ao espaço luminal e também o início de formação da primeira camada da PMM em 24 horas (Albuquerque-Cunha e

cols., 2004). Posteriormente, os sinais proprioceptivos enviados ao cérebro por receptores de distensão abdominal associados a componentes sanguíneos, como concentração de hemoglobina, determinam a produção de HPTT e ecdisona que modulam o pleno desenvolvimento da PMM durante o processo de digestão (Albuquerque-Cunha e cols., 2004). De fato, Mordue e cols. (1993) e Nasiruddin e Mordue (1993) trabalhando com *Schistocerca gregaria* e *L. migratória* demonstraram que a azadiractina altera a motilidade intestinal e bloqueia a mitose, resultando em redução do número de células regenerativas do epitélio e na produção de um intestino inábil para exercer suas funções normais em termos de eficiência digestiva perimicrovilar, e conseqüentemente, a inibição adesão do parasita. A ecdisona reverte este processo.

Em *R. prolixus*, a decapitação, antes ou durante o período crítico cerebral, ou administração de azadiractina por via alimentar afeta a organização ultraestrutural do intestino médio, reduzindo a plena expansão das microvilosidades, que também se tornam agregadas, e a baixa produção do complexo de membranas formadoras da PMM (Fig 5). Também, ocorrem nestes casos, alterações na morfologia dos esferócitos e retículo endoplasmático das regiões apical e basal das células epiteliais do intestino médio. A arquitetura ultraestrutural do órgão, porém pode ser restabelecida por transplante de cabeças de insetos doadores normais ou pela terapia com ecdisona (Nogueira e cols. 1997, Garcia e cols. 1998) (Fig 5). Substâncias químicas capazes de atuar sobre o delicado equilíbrio endócrino dos artrópodes revestem-se de especial interesse como instrumentos de trabalho que podem elucidar aspectos ainda mal compreendidos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos parasitos em seus hospedeiros invertebrados. Cleveland e Nutting (1955) observaram que ecdisona exerce um efeito letal sobre protozoários habitantes do trato digestivo de *Cryptocercus* durante o período de muda e Perlowagora-Szumlewicz e cols (1975) induziu uma diminuição da suscetibilidade de *Panstrongylus megistus* a infecção por *T. cruzi*, após a aplicação tópica de análogos do HJ nestes vetores. Beckage e cols. (1993) assinalam que a injeção de azadiractina em larvas de *Manduca sexta* parasitadas por *Cotesia congregata* afeta adversamente o desenvolvimento do endoparasito.



**Figura 05. Adesão de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* ao epitélio intestinal de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* no décimo dia após a alimentação.** As figuras obtidas de varredura e transmissão mostram as alterações ultraestruturais em insetos normais ou submetidos a diferentes tratamentos e/ou decapitados. Nos insetos deficientes de ecdisona, a exemplo dos tratados com azadiractina adicionada ao sangue alimentar, ou decapitados são observadas atrofia e desorganização das microvilosidades, bem como o pouco desenvolvimento da camada de membrana

## Lignóides e o Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no Inseto Vvetor

Como observado até o momento, à relação *T. cruzi* – triatomíneo envolve interação complexa mediada pelo parasita e pelos insetos vetores (Garcia e Azambuja, 1991; Garcia e cols., 2010). Em um protocolo experimental, desenhado para testar a sobrevivência dos parasitas em *R. prolixus*, os insetos foram alimentados com epimastigotas de *T. cruzi* e lignóides e, após a alimentação, foi observado o desenvolvimento do parasita no tubo digestivo do inseto. Dois pontos devem ser enfatizados. Primeiro, o número de parasitas por inseto aumentou mais de 30 vezes nos primeiros cinco dias após a infecção no grupo controle enquanto no grupo tratado com burchelina a infecção foi cinco vezes menor e nos insetos com sangue contendo NDGA a infecção foi cerca de 50 vezes menor do que no grupo controle. Dez dias após a infecção o controle tinha 90 vezes mais parasito, enquanto a infecção do grupo tratado com burchelina era  $\frac{1}{4}$  do controle e 170 vezes menor nos insetos tratado com NDGA. Em segundo lugar, 30 dias após a infecção/tratamento com lignóides, os três grupos experimentais receberam uma alimentação sem parasitas e lignóides. Após 24h da segunda alimentação, os números de parasitas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos detectados na excreta estavam reduzidos três vezes no grupo controle, enquanto no tratado com NDGA este número era basal.

Para responder a pergunta se a burchelina e o NDGA evitariam a infecção do inseto vetor, quando aplicadas após da infecção, grupos de insetos foram infectados com *T. cruzi* e vinte dias após os insetos foram alimentados com as drogas. Dez dias depois, o grupo tratado com burchelina somente apresentava um número basal de parasitas, entretanto o grupo tratado com NDGA tinha o mesmo índice de infecção encontrado no grupo controle, não tratado (Cabral e cols., 1999). Quando a infecção já tinha se estabelecido somente a burchelina era capaz de reduzir o numero de flagelados no tubo digestivo. Estes compostos não são tóxicos quando aplicados diretamente aos parasitas. Também foram realizados experimentos pré-tratando os insetos com burchelina e NDGA e após 20 dias do tratamento, os insetos foram infectados com *T. cruzi*. Em ambos os casos enquanto a infecção se mantinha alta no grupo controle, nos insetos que receberam burchelina e NDGA era significativamente baixa.

Estes resultados demonstraram o efeito inibitório de burchelina e NDGA aplicados durante e antes da infecção parasitária. Quando a infecção já tinha se estabelecido, somente a burchelina é capaz de reduzir o número de flagelados no tubo digestivo. Estes compostos não são tóxicos quando aplicados diretamente ao meio de cultura dos parasitas.

Assim, foram levantadas questões básicas referentes aos efeitos de lignóides na interação do *T. cruzi* e *R. prolixus*, que merecem ser investigadas e debatidas para posteriores esclarecimentos científicos dos diferentes efeitos encontrados.

## Azadiractina e o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no Inseto Vetor

Alguns estudos realizados por Garcia e cols. (1989a,b; 1991), Gonzalez e Garcia (1992) e Kollien e Schaub, (1999) observaram que a administração de Aza antes, concomitantemente ou após a infecção por diferentes cepas e clones do *T. cruzi*, é

capaz de inibir completamente o desenvolvimento do protozoário e sua eliminação pela excretas nos vetores *R. prolixus*, *Triatoma infestans* e *Dipetalogaster maximus* por longos períodos. Embora a Aza não atue diretamente sobre o parasito em meio de cultura, e também não seja capaz de interferir nas principais atividades enzimáticas digestivas do vetor sua atividade se restringe, de forma dose-dependente, ao desenvolvimento do flagelado em seus vetores (Garcia e cols., 1989b, Gonzalez e Garcia (1992). Cortez e cols. 2002, demonstraram que a terapia por ecdisona em ninfas de *R. prolixus* decapitadas estimula o desenvolvimento das formas esferomastigota e epimastigota do *T. cruzi* neste vetor e Gonzalez e cols. (1999) observaram que os efeitos da Aza sobre a ultraestrutura do trato digestivo de *R. prolixus* geram um microambiente intestinal hostil para o seu desenvolvimento, principalmente pela ausência da PMM e/ou no espaço perimicrovilar (Fig 5).

### **Adesão de *T. cruzi* ao Epitélio Intestinal e Membrana Perimicrovilar (PMM)**

Várias macromoléculas envolvidas nestes processos interativos do *T. cruzi* com células de mamíferos já foram identificadas e caracterizadas, mas existem poucas informações referentes à á moléculas capazes de modular o seu ciclo de vida em seus insetos vetores.

Sabe-se que o trato digestivo de triatomíneos hematófagos contém componentes expostos na superfície luminal que mediam a adesão de epimastigotas seguida por multiplicação no intestino médio ou metaciclologênese na cutícula e ampola retal (Garcia e cols., 2007, 2010). Neste sentido, a adesão de epimastigotas à PMM representa uma etapa crucial para a multiplicação do *T. cruzi* uma vez que a inibição ao desenvolvimento desta membrana extracelular - por manipulação neuroendócrina do vetor (Nogueira e cols., 1997; Gonzalez e cols., 1999) ou alimentação dos insetos com antisoro anti-PMM (Gonzalez e cols., 2006) – reduz drasticamente o desenvolvimento do *T. cruzi* em *R. prolixus* (Fig 5). Ensaio *in vitro*, **demonstram** que moléculas capazes de inibir o tropismo tecidual e quimiotaxia do *T. cruzi* à PMM, frequentemente, também são capazes de bloquear o desenvolvimento, *in vivo*, do protozoário em seus hospedeiros invertebrados, podendo assim atuar como alvos fisiológicos específicos para prevenir a transmissão do parasito por seus vetores (Garcia e cols., 2007). Entretanto, atualmente, apenas glicoinositolfosfolípidios (GIPLs) e proteínas hidrofóbicas da superfície de epimastigotas que se ligam a glicolipopeptídios da PMM de *R. prolixus* estão descritas como moléculas envolvidas na adesão do *T. cruzi* ao epitélio intestinal do vetor, *R. prolixus* (Nogueira e cols., 2007; Alves e cols., 2007) (Fig 5).

### **O Sistema Endócrino na Relação de *Trypanosoma rangeli* com o Inseto Vetor**

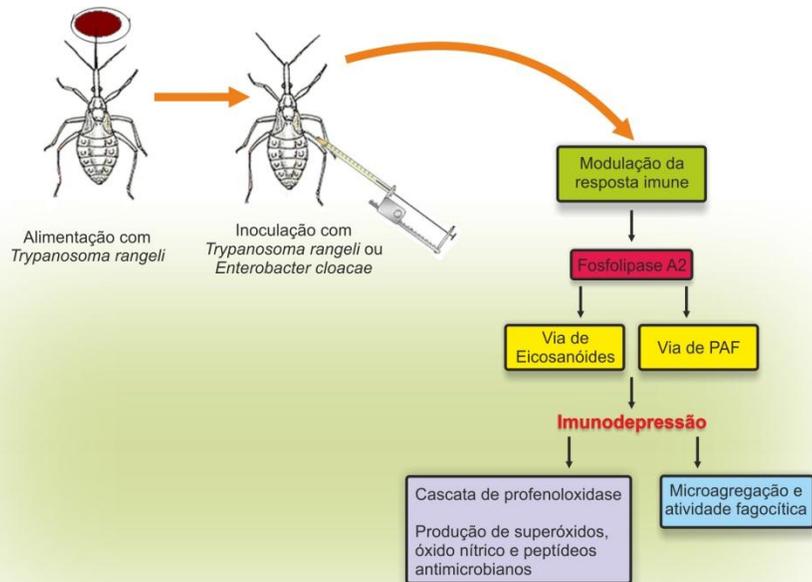
Diversos estudos demonstraram que o sistema imunológico de *R. prolixus* é afetado quando o inseto é inoculado com epimastigotas de *T. rangeli* com destaque para a melanização e formação de nódulos, além de haver um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Azambuja e cols., 1991b, 1999; Garcia e cols., 2004a,b, Whitten e cols., 2001). Garcia e cols. (2004) demonstraram que a infecção oral com *T. rangeli* inibe o processo de microagregação de hemócitos (Fig 6).

**Mello e cols.(1995) verificaram** que o *T. rangeli*, apresenta alta taxa de infecção e multiplicação na hemocele, levando ao aumento nos níveis de lisozima bem como no número de hemócitos livres e microagregados circulantes. Ao contrário das formas longas de *T. rangeli*, as formas curtas ativam o sistema profenoloxidase quando inoculadas na hemocele dos insetos (Mello e cols.,1995, Garcia e cols., 2004)

Enquanto o *T. cruzi*, após inoculação na cavidade hemocélica do inseto, é rapidamente eliminado da hemolinfa, o *T. rangeli* possui a capacidade de sobreviver na hemolinfa de *R. prolixus*. Uma das hipóteses para a sobrevivência deste parasita na hemolinfa do inseto está relacionada à capacidade de modulação de algumas respostas imunes celulares entre elas a fagocitose e microagregação de hemócitos.

Recentemente foi demonstrado que o protozoário *T. rangeli* administrado junto ao sangue alimentar de *R. prolixus* foi capaz de inibir a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (Garcia e cols., 2004b, Figueiredo e cols., 2008b) (Fig 6). Nesta espécie, os autores observaram que em insetos previamente infectados com o parasita, e tratado com ácido araquidônico, ocorre a reversão do efeito inibidor da atividade enzimática causado pelo parasita (Fig 6). Neste caso, o inseto respondeu normalmente com microagregação de hemócitos.

Figueiredo e cols. (2008b) demonstraram que a inibição da atividade fagocítica dos hemócitos obtidos de insetos infectados previamente com *T. rangeli* é revertida tanto com injeção dos insetos com ácido araquidônico como pelo tratamento com PAF (Fig 6). Também, os autores observaram inibição da atividade de PLA<sub>2</sub>, secretada e celular, bem como a elevação dos níveis de PAF-AH na hemolinfa de insetos tratados com o parasita. Os autores sugeriram que fatores bioquímicos presentes em *T. rangeli* estão envolvidos na modulação de respostas imune atuando nas vias de sinalização de eicosanóides e PAF pela inibição de PLA<sub>2</sub> (Figueiredo e cols. 2008b), facilitando assim o estabelecimento da infecção em *R. prolixus* (Fig 6). A administração, por via oral, de drogas obtidas de plantas, tais como a fisalina B, em *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*, promove a redução da formação de microagregados de hemócitos bem como a inibição da liberação de óxido nítrico, o que resulta em alta mortalidade dos insetos tratados (**Garcia e cols. 2006**). Assim, concluímos que o parasita, de alguma maneira, influencia no sistema imune do inseto o que facilita sua proliferação.



**Figura 06. Relação de *Trypanosoma rangeli* com as vias de eicosanóides e PAF de *Rhodnius prolixus*.** A figura representa o inseto em alimentação de sangue contendo epimastigotas e, posteriormente, inoculação com *T. rangeli* ou *Enterobacter cloacae* e a modulação das reações do sistema imune celular e humoral.

## Considerações Finais.

O sistema neuroendócrino é essencial para o desenvolvimento dos insetos e está correlacionado com outros sistemas como o de reprodução e imunológico. Em espécies de insetos vetores de doenças a humanos, como *Rhodnius prolixus*, o sistema neuroendócrino tem também relação com a interação do inseto e o parasita, influenciando no sucesso da infecção do parasita e completo desenvolvimento de seu ciclo no hospedeiro invertebrado. Dessa forma, a investigação com enfoque no sistema neuroendócrino dos insetos tem grande importância para descobertas que possam colaborar com o desenvolvimento de novas ferramentas para controle da transmissão de doenças.

## Referências Bibliográficas.

- Albuquerque-Cunha, J.M., Gonzalez, M.S., Garcia, E.S., Mello, C.B., Azambuja, P., Almeida, J.C., de Souza, W., Nogueira, N.F., 2009. Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Arthrop. Struct. Devel.* 38, 31-44.
- Albuquerque-Cunha, J.M., Mello, C.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., Souza W., Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F., 2004. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 815-822.
- Alves, C.R., Albuquerque-Cunha, J.M., Mello, C.B., Garcia, E.S., Nogueira, N.F., Bourguignon, S.C., de Souza, W., Azambuja, P., Gonzalez, M.S., 2007. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 116, 44-52.
- Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Warthen Jr, J.D., 1991. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, Azadirachtin. *J. Insect Physiol.* 37, 771-777.
- Beckage, N.E., Kanost, M.R., 1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 643-653.
- Billingsley, P.F., 1990. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15, 149-153.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E., 1986. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Acta Trop.* 43, 355-366.
- Brahmachari, G., 2004. Neem- an omnipotent plant: a retrospection. *Chembiochem.* 5, 408-421.
- Büyükgüzel, E., Tunaz, H., Stanley, D., Büyükgüzel, K.J., 2007. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* 53, 99-105.

- Cabral, M.M., Azambuja, P., Gottlieb, O.R., Garcia, E.S., 1999. Neolignans inhibit *Trypanosoma cruzi* infection of its triatomine insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.* 85, 184-187.
- Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C., Azambuja, P., Garcia, E.S., 2008. Immune depression in *Rhodnius prolixus* by seco-steroids, physalins. *J. Insect Physiol.* 54, 555-562.
- Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Genta, F.A., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C., Azambuja, P., Garcia, E.S., 2009. Physalin B inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis and microaggregation by the activation of endogenous PAF-acetyl hydrolase activities. *J. Insect Physiol.* 55, 532-537.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- Costa-Filho, A., Werneck, C.C., Nasciutti, L.E., Masuda, H., Atella, G.C., Silva, L.F., 2001. Sulfated glycosaminoglycans from ovary of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 31-40.
- Davey, K.G., 2000. The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 663-669.
- Derewenda, Z.S., Ho, Y.S., 1999. PAF-acetylhydrolases. *Biochem. Biophys. Acta* 144, 229-236.
- Dias, J.P., 2007. Southern cone initiative for elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I), 11-18.
- Dietrich, C.P., Nader, H.B., Toma, L., de Azambuja, P., Garcia, E.S., 1987. A relationship between the inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate synthesis and the inhibition of molting by selenate in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 652-658.
- Elekovich, M.M., Horodyski, F.M., 2003. Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla. *Peptides* 24, 1623-1632.
- Feder, D., Mello, C.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., 1997. Immune responses in *Rhodnius prolixus*: Influence of nutrition and ecdysone. *J. Insect Physiol.* 43, 513-519.
- Figueiredo, M.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2008a. Blockades of phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptors reduce the hemocyte phagocytosis in *Rhodnius prolixus*: In vitro experiments. *J. Insect Physiol.* 54, 344-350.
- Figueiredo, M.B., Genta, F.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2008b. Lipid mediators and vector infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis by modulation of phospholipase A<sub>2</sub> and PAF-acetylhydrolase activities. *J. Insect Physiol.* 54, 1528-1537.
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Garcia, E.S., Azambuja, P., 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today* 7, 240-244.

- Garcia, E.S., Azambuja, P., 2004. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Toxicon* 44, 431-440.
- Garcia, E.S., Azambuja, P., Contreras, V.T., 1984. Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and preparation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, in: Morel, C.M.,(Eds.), *Genes and Antigens of Parasites, A Laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz, World Health Organization, Rio de Janeiro, pp. 43-46.
- Garcia, E.S., Azambuja, P., de Souza, W., Feder, D., Nogueira, N.F., Gonzalez, M.S., 1998., Role of the head in the ultrastructural midgut organization in *Rhodnius prolixus* larvae: evidence from head transplantation experiments and ecdysone therapy. *J. Insect Physiol.* 44, 553-560.
- Garcia, E.S., Cabral, M.M., Schaub, G.A., Gottlieb, O.R., Azambuja, P., 2000. Effects of lignoids on a hematophagous bug, *Rhodnius prolixus*: feeding, ecdysis and diuresis. *Phytochemistry* 55, 611-616.
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Azambuja, P., 2010. Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae). *Mem. Instituto Oswaldo Cruz* 105, 605-610.
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C., Azambuja, P., 2006. *Trypanosoma rangeli*: effects of physalin B on the immune reactions of the infected larvae of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 112, 37-43.
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Genta, F.A., Azambuja, P., 2009. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors* 2, 33.
- Garcia, E.S., Feder, D., Gomes, J.E., Rembold, H., 1990. Short- and long-term effects of azadirachtin A on development and egg production of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 11-15.
- Garcia, E.S., Gonzalez, M.S., Azambuja, P., Rembold, H., 1989a. Chagas' disease and its insect vector. Effect of azadirachtin A on the interaction of a triatomine host (*Rhodnius prolixus*) and its parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Z. Naturf.* 44, 317-322
- Garcia, E.S., Macarini, J.D., Garcia, M.L., 1975. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 47, 537-545.
- Garcia, E.S., Machado, E.M., Azambuja, P., 2004a. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.* 107, 31-38.
- Garcia, E.S., Machado, E.M., Azambuja, P., 2004b. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.* 50, 157-165.
- Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Whitten, M.M., Gonzalez, M.S., Azambuja, P., 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 53, 11-21.
- Garcia, E.S., Subrahmanyam, B., Müller, T., 1989b. Absorption, storage, organ distribution and excretion of dietary [22,23-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>] dihydroazadirachtin a in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 35, 743-749
- Garcia, E.S., Uhl, M., Rembold, H., 1986. Azadirachtin, a chemical probe for the study of moulting in *Rhodnius prolixus*. *Z. Naturf.* 41, 771-775.

- Gilbert, L.I., Bollenbacher, W.E., Granger, N.A., 1980. Insect endocrinology: regulation of endocrine glands, hormone titer, and hormone metabolism. *Ann. Review Physiol.* 42, 493-510.
- Gonzalez, M.S., Garcia, E.S., 1992. Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: long-terms and comparative studies. *J. Inverteb. Pathol.* 60, 201-205.
- Gonzalez, M.S., Hamedi, A., Albuquerque-Cunha, J.M., Nogueira, N.F., De Souza, W., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., Mello, C.B., 2006. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 114, 297-304.
- Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F., Mello, C.B., De Souza, W., Schaub, G.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., 1999. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 92, 100-108.
- Goodwin, T.W., Horn, D.H.S., Karlson, P., Koolman, J., Nakanishi, K., Robbins, W.E., Siddall, J.B., Takemoto, T., 1978. Ecdysteroids: a new generic term. 1978. *Nature* 272, 122-123.
- Guhl, F., Vallejo, G.A., 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – an update review. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz* 98, 435-442.
- Hartenstein V. 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 190, 555-570.
- Judy K.J., Marks E.P. 1971. Effects of ecdysterone in vitro on hindgut and hemocytes of *Manduca sexta* (Lepidopteral). *Gen. Comp. Endocrinol.* 17, 351-359.
- Kataoka H., Toschi A., Li J.P., Carney R.L., Schooley D.A., Kramer S.J. 1989. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* 243, 1481-1483.
- Knoblock C.A., Steel C.G.H. 1989. The timing of release of prothoracothropic hormone in relation to the head critical period during larval – adult development in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera): evidence from head transplantation experiments. *J. Insect Physiol.* 35, 459-464.
- Kollien A.H., Schaub G.A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* 16, 381-387.
- Kollien A.H., Schaub G.A. 1999. The effect of azadirachtin on *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* (Insecta, Hemiptera). *Int. J. Parasitol.* 29, 403-414.
- Kotaki T., Shinada T., Kaihara K., Ohfune Y., Numata H. 2009. Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Org. Lett.* 19, 5234-5237.
- Lent H., Wygodzinsky M. 1979. Revision on the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 127-520.
- Loher W., Ganjian I., Kubo I., Stanley-Samuels D., Tobe S.S. 1981. Prostaglandins: Their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 78, 7835-7838.
- Machado E.M., Azambuja P., Garcia E.S. 2006. Web 2086, a platelet - activating factor antagonist, inhibits prophenoloxidase – activating system and hemocyte microaggregation reactions induced by *Trypanosoma rangeli* infection in *Rhodnius prolixus* hemolymph. *J. Insect Physiol.* 52, 685-692.

- Medeiros M.N., Mendonça L.H., Hunter A.L., Paiva-Silva G.O., Mello F.G., Henze I.P., Masuda H., Maya-Monteiro C.M., Machado E.A. 2004. The role of lipoxygenase products on the endocytosis of yolk proteins in insects: participation of cAMP. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 178-187.
- Medeiros M.N., Oliveira D.M.P., Paiva-Silva G.O., Silva-Neto M.A.C., Romeiro-Bozza A.M., Masuda H., Machado E.A. 2002. The role of eicosanoids on *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) endocytosis by *Rhodnius prolixus* ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 537-545.
- Meijer L., Maclouf J., Bryant R.W. 1986. Contrasting effects of fatty acids on oocyte maturation in several starfish species. *Prostaglandins Med.* 23, 179-184.
- Mello C.B., Garcia E.S., Ratcliffe N.A., Azambuja P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *J. Inverteb. Pathol.* 65, 621-628.
- Mordue A.J., Blackwell A. 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39, 903-924.
- Moskalyk L.A., Oo M.M., Jacobs-Lorena M. 1996. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 5, 261-268.
- Nasirudian M., Mordue A.J. 1993. The effect of azadirachtin in the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue and Cell* 25, 875-884.
- Nogueira N.F., Gonzales M.S., Garcia E.S., de Souza W. 1997. Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. *J. Inverteb. Pathol.* 69, 58-63.
- Nogueira N.F., Gonzalez M.S., Gomes J.E., de Souza W., Garcia E.S., Azambuja P., Nohara L.L., Almeida I.C., Zingales B., Colli W. 2007. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 116, 120-128.
- Orchard I. 2006. Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Int. Physiol.* 144, 316-324.
- Park Y., Aliza A.R., Stanley D. 2005. A secretory PLA<sub>2</sub> associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations acts in cellular immune reactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 105-115.
- Perlowagora-Szumlewicz A., Petana W.B., Figueiredo M.J. 1975. The evaluation of host efficiency and vector potential of laboratory juvenilized vectors of Chagas' disease. I. Effects of developmental changes included by juvenile hormone analogues in *Panstrongylus megistus* (hemipterareduviidae) on the susceptibility of the insects to gut infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 17, 97-102.
- Pinto N.B., Morais T.C., Carvalho K.M., Silva C.R., Andrade G.M., Brito G.A., Veras M.L., Pessoa O.D., Rao V.S., Santos F.A. 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine* (Epub ahead of print).
- Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M. 2000. Platelet-activating and related lipid mediators. *Ann. Review Biochem.* 69, 419-445.
- Quinlan M.C., Tublitz N.J., O'Donnell M.J. 1997. Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J. Exp. Biol.* 100, 2363-2367.

- Sagi A., Silkovsky J., Fleisher-Berkovich S., Danon A., Chayoth R. 1995. Prostaglandin E<sub>2</sub> in previtellogenic ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: synthesis and effect on the level of cAMP. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 308-313.
- Schaefer C.W.. Phylogeny, systematic, and practical entomology: the Heteroptera (Hemiptera). *An. Soc. Entomol.* 27, 499-511.
- Shao L., Devenport M., Jacobs-Lorena M. 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. Review. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 119-125.
- Shrestha S., Kim Y. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 99-112.
- Silva C.P., Silva J.R., Vasconcelos F.F., Petretski M.D., Damatta R.A., Ribeiro A.F., Terra W.R. 2004. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthrop. Struct. Dev.* 33, 139-148.
- Silva J.R., Mury F.B., Oliveira M.F., Oliveira P.L., Silva C.P., Dansa-Petretski M. 2007. Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 523-531.
- Soares M.B., Brustolim D., Santos L.A. 2006. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *Int. Immunopharmacol.* 6, 408-414.
- Souza M.L., Sarquis O., Gomes T.F., Moreira M.F., Lima M.M., Silva L.C. 2004. Sulfated glycosaminoglycans in two hematophagous arthropod vectors of Chagas disease, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 631-635.
- Stanley D.W. 2000. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton, Princeton Univ. Press, 277 p.
- Stanley D. W. 2006a. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 25-44.
- Stanley D. 2006b. The non-venom insect phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1383-1390.
- Stanley D.W., Miller J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119, 1-13.
- Stanley D.W., Nor Aliza A.R., Tunaz H., Putnam S.M., Park Y., Bedick J.C. 2002. Eicosanoids in insect biology. *Neotropic Entomol.* 31, 341-350
- Stanley-Samuelson D., Rana R.L., Pedibhotla V.K., Miller J.S., Jurenka R.A. 1997. Eicosanoids mediate microaggregation and nodulation responses to bacterial infections in black cutworms, *Agrotis ipsilon*, and true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Insect Physiol.* 43, 125-133.
- Stoka A. 1987. Ecdysteroids, juvenils hormones and metamorphosis in triatominae. In: Chagas Disease Vectors (Anatomic and Physiological aspects). Brenner RR, Stoka AM eds. 2, 71-99
- Tejera E. 1920. Un nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*, *Trypanossoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* sp. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 13, 527-536.
- Terra, W.R. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734.

- Terra W.R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 47-61.
- Terra W.R., Costa R.H., Ferreira C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 78, 255-269.
- Tobie E.J. 1970. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocel of *Rhodnius prolixus*. *J. Inverteb. Pathol.* 15, 118-125.
- Tomassini T.C.B., Barbi N.S., Ribeiro I.M., Xavier D.C.D. 2000. Gênero *Physalis* – uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova* 23, 47-57.
- Tunaz H., Park Y., Büyükgüzel K., Bedick J.C., Nor Aliza A.R., Stanley D.W. 2003. Eicosanoids in insect immunity: bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A<sub>2</sub> activity in tobacco hornworms. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52, 1-6.
- Ursic-Bedoya R., Buchhop J., Lowenberger C. 2009. Cloning and characterization of Dorsal homologues in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.* 18, 681-689.
- Vafopoulou X., Steel C.G. 1989. Developmental and diurnal changes in ecdysteroid biosynthesis by prothoracic glands of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) in vitro during the last larval instar. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 484-493.
- Weaver R.J., Audsley N. 2009. Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis: structures, functions, distribution, and unanswered questions. *Ann. New York Acad. Sc.* 1163, 316-329
- Whitten M.M., Mello C.B., Gomes S.A.O., Nigam Y., Azambuja P., Garcia E.S., Ratcliffe N.A. 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/ *Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp. Parasitol.* 98, 44-57.
- Wigglesworth V. B. 1985. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 7; Kerkut G. A., Gilbert L. I., Eds.; Pergamon Press, Oxford, p 1-24.
- Wigglesworth V.B. 1972. *The principles of insect physiology*. Ed. Chapman e Hall, 7<sup>th</sup> ed., London, 827p .
- Wigglesworth V.B. 1933. The physiology of cuticle and ecdysis in: *Rhodnius prolixus*, with special reference to the function of oenocytes and dermal glands. *Quart J. Micr. Sc.* 76, 269-318.