

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

LUCIANA SILVA LOBO

**ASPECTOS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE
INFECÇÃO DE *Triatoma infestans* POR *Beauveria bassiana***

**Goiânia
2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [] Dissertação [X] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Luciana Silva Lobo

Título do trabalho: Aspectos comportamentais, bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de infecção de *Triatoma infestans* por *Beauveria bassiana*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Wolf Christian Luz
Universidade Federal de Goiás - UFG
IPTSP / DMIPP Mat. 241283

Data: 19/01/18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

LUCIANA SILVA LOBO

**ASPECTOS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE
INFECÇÃO DE *Triatoma infestans* POR *Beauveria bassiana***

Tese de Doutorado desenvolvida no Laboratório de Patologia de Invertebrados, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz, IPTSP, UFG, Goiânia

Co-orientador: Prof. Dr. Nicolas Pedrini, INIBIOLP, UNLP, La Plata

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva Lobo, Luciana

Aspectos comportamentais, bioquímicos e moleculares envolvidos
no processo de infecção de *Triatoma infestans* por *Beauveria bassiana*
[manuscrito] / Luciana Silva Lobo. - 2016.

xcvi, 96 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz ; co-orientador Dr. Nicolás
Pedrini .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras.

1. controle biológico triatomíneos. 2. fungos entomopatogênicos. 3.
triatomíneos. 4. transmissão de doença de Chagas . I. , Wolf Christian
Luz, orient. II. , Nicolás Pedrini, co-orient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE LUCIANA SILVA LOBO - Aos vinte e dois dias do mês de junho do ano de 2015 (22/06/2015), às 13:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. WOLF CHRISTIAN LUZ, ELIANE DIAS QUINTELA, MARCOS RODRIGUES DE FARIA, WALQUIRIA ARRUDA e PEDRO VITOR LEMOS CRAVO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO DE *Beauveria bassiana* PARA CONTROLE de *Triatoma infestans*"**, em nível de DOUTORADO, área de concentração em PARASITOLOGIA, de autoria de LUCIANA SILVA LOBO, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador Prof. Dr. WOLF CHRISTIAN LUZ, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wolf Christian Luz

Dra. Eliane Dias Quintela

Dr. Marcos Rodrigues de Faria

Profa. Dra. Walquíria Arruda

Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo

Aprovada / Reprovada

Aprovada

APROVADA

APROVADA

APROVADA

APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Luciana S. Lobo (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h10 min, a presidência da mesa encetou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Aspectos comportamentais, bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de infecção de *Triatoma infestans* por *Beauveria bassiana*.

Prof. Dr. Wolf Christian Luz (IPTSP/UFG) _____

Dra. Eliane Dias Quintela (EMBRAPA/GO) _____

Dr. Marcos Rodrigues de Faria (EMBRAPA/DF) _____

Profa. Dra. Walquíria Arruda (ICB/UFG) _____

Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo (IPTSP/UFG) _____

Secretário da Pós-Graduação: _____

Dedico este trabalho a meus pais, Adair Silva Lobo e Luciano Lobo, pelo apoio irrestrito, amor e fé depositados em mim, mesmo a grande distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Christian Luz, a quem serei eternamente grata pela confiança, orientação e amizade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Éverton K. K. Fernandes pelos conselhos e presteza.

A todos os colegas que passaram ou estão no Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI), em especial a Nathalia A. de Souza e Juscelino R. Filho pela amizade, apoio e auxílio.

Ao Dr. Nicolás Pedrini, do Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), La Plata, Argentina, pelos conhecimentos transmitidos e pelo entusiasmo de sempre. A colega Carla Huarte Bonnet pela ajuda com os experimentos, pela amizade e carinho em La Plata.

Ao Dr. Marcelo Lorenzo, do Centro de Pesquisas René Rachou, por fornecer triatomíneos para que pudéssemos iniciar a criação do LPI.

A Prof^a. Dr^a Ligia Miranda F. Borges, do Centro de Parasitologia Veterinária (CPV/UFG) por abrir as portas do seu laboratório para minhas ninfas, e a colega Lorena Lopes Ferreira pela companhia e ajuda durante os experimentos noturnos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da UFG, pela oportunidade, a UFG pela bolsa regular concedida, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o doutorado-sanduíche.

A todos que levaram um pouco de mim e deixaram um pouco de si durante essa minha jornada em Goiânia e La Plata. São muitos, e não quero correr o risco de esquecer alguém.

Ao meu querido Bruno, pela força, incentivo e compreensão. A minha família, meu lar, meu norte, meu chão.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Triatomíneos.....	3
2.1.1	Comunicação em triatomíneos.....	3
2.1.2	Mecanismos de quimiorrecepção olfativa e comunicação química em triatomíneos.....	4
2.1.2.1	Feromônios de alarme e defesa.....	6
2.1.3	Atividade e busca por abrigos.....	6
2.1.4	Imunidade em triatomíneos.....	8
2.2	<i>Triatoma infestans</i>	9
2.2.1	Importância médica de <i>T. infestans</i>	9
2.2.2	Aspectos gerais de <i>T. infestans</i>	10
2.2.3	Controle de <i>T. infestans</i>	12
2.2.4	Métodos alternativos de controle.....	13
2.3	Fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos.....	13
2.3.1	Aspectos gerais.....	13
2.3.2	Fungos entomopatogênicos e comportamento de artrópodes.....	15
2.4	<i>Beauveria bassiana</i>	16
2.4.1	Toxinas produzidas por <i>B. bassiana</i>	17
2.4.2	Controle de <i>T. infestans</i> com <i>B. bassiana</i>	18
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	Objetivo geral.....	21
4.2	Objetivos específicos	21
5.	RESULTADOS.....	22
5.1	Manuscrito 1.....	23
5.2	Manuscrito 2.....	38
5.3	Manuscrito 3.....	63
6	DISCUSSÃO GERAL.....	81
7	CONCLUSÕES.....	82
8	BIBLIOGRAFIA.....	83
9	ANEXOS.....	94
9.1	Primeiras páginas do artigo publicado.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto.....	5
Figura 2.	<i>Triatoma infestans</i> adulto sobre madeira.....	11
Figura 3.	Galinheiro em peridomicílio de casa (a). Região do Grande Chaco, entre o Rio Paraguai e os Andes (b).....	12
Figura 4.	Ciclo de fungo hifomicético em inseto hospedeiro.....	15
Figura 5.	Estrutura química de algumas toxinas produzidas por <i>Beauveria bassiana</i>	18

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AGCC	cidos graxos de cadeia curta
aaCR	aminoácidos de cadeia ramificada
a.t.	após o tratamento
ANOVA	análise de variância
ARSEF	isolado fúngico da coleção de culturas de fungos entomopatogênicos do Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
<i>BbtenS</i>	nome dado ao gene que codifica para tenelina sintetase
<i>BbbeaS</i>	nome dado ao gene que codifica para beauvericina sintetase
<i>BbbslS</i>	nome dado ao gene que codifica para bassianolida sintetase
BDA	batata, dextrose e gar
CAR/PDMS	carboxeno e polidimetilsiloxano
CPV	Centro de Parasitologia Veterinária
CGC	cromatografia gasosa capilar
CGC -EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa
CVO	composto volátil orgânico
DC	doença de Chagas
DIC	detector de ionização em chama
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzeno, carboxeno e polidimetilsiloxano
FE	fungo entomopatogênico
h	horas
IK	ndice de Kovats
INIBIOLP	Instituto de Investigações Bioquímicas de La Plata
IP	isolado fúngico da coleção de culturas de fungos entomopatogênicos armazenados no IPTSP
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LPI	Laboratório de Patologia de Invertebrados
min	minutos
PAM	peptídeo antimicrobiano
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	polidimetilsiloxano e divinilbenzeno
qRT - PCR	PCR quantitativa em tempo real

SDL	sabouraud, dextrose e extrato de levedura
SNK	teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls
SPME	microextração em fase sólida
<i>Ti actina</i>	nome dado ao gene que codifica para actina
<i>Ti-bckdc</i>	nome dado ao gene que codifica para o sistema transportador de aminoácidos de cadeia ramificada
<i>Ti-bnrq</i>	nome dado ao gene que codifica para alfa cetoácido desidrogenase mitocondrial
<i>TiDEF</i>	nome dado ao gene que codifica para defensinas
<i>TiHL</i>	nome dado ao gene que codifica para hemolectina
<i>TiPPO</i>	nome dado ao gene que codifica para profenoloxidase
TL₅₀	tempo letal 50%
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNLP	Universidade Nacional de La Plata
UR	umidade relativa

RESUMO

Triatoma infestans é o vetor principal da doença de Chagas na Argentina, Bolívia e Paraguai. *Beauveria bassiana* se destaca por ser eficiente contra todos os estágios de vida de *T. infestans*. A dinâmica da infecção desse fungo em seus hospedeiros ainda não foi muito estudada, e são necessários mais estudos básicos para a elucidação de aspectos dessa interação. O presente estudo caracterizou compostos voláteis orgânicos (CVO) liberados por *T. infestans* fisicamente perturbados e infectados por *B. bassiana* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa, e analisou o padrão de expressão de genes envolvidos na produção e liberação desses voláteis (*Ti-brnq* e *Ti-bckdc*) em função do progresso da infecção, através de PCR em tempo real. Foi estudado também o padrão de expressão de genes envolvidos na biossíntese de toxinas de *B. bassiana* (*BbtenS*, *BbbeaS*, *BbbslS*) durante o processo da infecção em ninfas tratadas com conídios ou blastosporos, e de genes envolvidos na resposta imune humoral (*TiPPO*, *TiHL*, *TiDEF*) nas mesmas ninfas. Além disso, foi analisada a influência de conídios de *B. bassiana* sobre o comportamento de *T. infestans*. Não foi encontrado efeito claro de repelência de ninfas a conídios. O CVO majoritário encontrado foi o ácido isobutírico, mas houve efeito da infecção somente sobre a produção do ácido propiônico 1–3 dias após o tratamento (a.t.). A expressão de *Ti-brnq* e *Ti-bckdc* foi significativamente maior aos 4 dias a.t. que aos 10 dias para as duas concentrações de conídios testadas, com efeito significativo somente para o primeiro gene. Em indivíduos imersos em conídios na maior concentração, a expressão de *BbtenS* e *BbbeaS* apresentou um pico 3 e 12 dias a.t., já na menor concentração, o pico de expressão ocorreu aos 9 dias a.t. Em insetos injetados com blastosporos, o pico da expressão desses genes ocorreu 24 h a.t. e em cadáveres expostos a câmara úmida. Para ninfas imersas em suspensão de conídios, foi encontrado efeito significativo do tempo sobre a expressão de *TiPPO* nas duas concentrações testadas. *TiDEF* e *TiHL* tiveram um pico de expressão aos 6 dias a.t. para as duas concentrações testadas. Em ninfas injetadas com blastosporos, a expressão dos três genes de imunidade variou significativamente de acordo com o tempo de infecção somente com a menor dose de blastosporos. Os resultados ressaltaram a importância de esclarecer melhor a dinâmica da infecção de *T. infestans* com *B. bassiana* para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico desse vetor com fungos entomopatogênicos.

ABSTRACT

Triatoma infestans is the main vector of Chagas disease in Argentina, Bolivia and Paraguay. *Beauveria bassiana* is effective against all developmental stages of *T. infestans*. The dynamics of the host infection with *B. bassiana* has not been well studied yet and more basic research is necessary to elucidate aspects of this interaction. The present study characterized volatile organic compounds (VOC) secreted by *T. infestans* physically disturbed and infected with *B. bassiana* employing gas chromatography coupled to mass spectrometry. The expression of genes potentially involved in the biosynthesis of this volatiles (*Ti-brnq* and *Ti-bckdc*) was analysed according to the progress of infection with quantitative reverse transcription real-time (qPCR) methodology. The time-related expression of *B. bassiana* genes involved in the biosynthesis of fungal toxins (*BbtenS*, *BbbeaS*, *BbbslS*) in nymphs treated with conidia or blastospores was measured, as well as the gene expression levels of insect proteins belonging to the humoral immune response (*TiPPO*, *TiHL*, *TiDEF*) in the same nymphs. Moreover, the influence of conidia on nymphal behavior was analysed. No clear repellent effect of conidia was found. Isobutyric acid was the most abundant VOC found, however, significant effect of the fungal on propionic acid secretion was found 1–3 days after treatment (a.t.). *Ti-brnq* and *Ti-bckdc* expression was higher 4 d a.t. than at 10 d a.t. in both conidial concentrations tested, but a significant effect of the time was found only with the first gene. In individuals immersed in the higher conidial concentration the expression of *BbtenS* and *BbbeaS* peaked 3 and 12 days a.t. respectively, and 9 days a.t with individuals treated with the lower concentration. In blastospore-injected nymphs, these genes peaked 24 h a.t. and in dead insect exposed in humid chamber. A significant effect of time on the expression of *TiPPO* in nymphs immersed in both conidial concentrations was found. *TiDEF* and *TiHL* peaked 6 days a.t. to both conidial concentration tested. In insects injected with blastospores significant increase in the expression pattern of all genes was found at the lower dose tested. Results emphasized the importance to elucidate better the dynamics of infection of *T. infestans* with *B. bassiana* in order to develop biological control strategies of these vectors with entomopathogenic fungi.

1 INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é uma das espécies de fungos entomopatogênicos (FE) mais utilizada para o controle de pragas agrícolas, e é muito estudada também para o controle de artrópodes de importância médica (LUZ et al., 1998, KANZOK; LORENA, 2006, FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Já foram feitos vários trabalhos com *B. bassiana* e *Triatoma infestans* devido a grande importância desse vetor doença de Chagas (DC) na América do Sul. Sabe-se que *B. bassiana* atua sobre todos os estágios de vida de *T. infestans*, e sua eficiência já foi comprovada sobre esse e outros vetores da DC tanto em condições de laboratório quanto de campo (LUZ et al., 1998; PEDRINI et al., 2009, LUZ et al., 2004, JUÁREZ et al., 2008; FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011). Apesar disso, ainda falta elucidação sobre questões chave no processo de infecção desse fungo em seus hospedeiros.

A infecção de um inseto com FE se inicia com o contato do conídio com a cutícula (ALVES, 1998). Portanto, um novo hospedeiro deve tocar um indivíduo morto por infecção fúngica e micotizado (com micélio e conídios sobre a cutícula), ou uma área tratada com conídios. A detecção de conídios e posterior comportamento de repelência por um possível hospedeiro poderia determinar o fracasso de um micoinseticida. Ainda não foi estudado o comportamento de *T. infestans* ou de outras espécies de triatomíneos frente a propágulos de *B. bassiana* e outro FE.

Outro fator importante que pode interferir na dinâmica de uma micose em um habitat de hospedeiros é a comunicação química entre os hospedeiros. Adultos de *T. infestans* perturbados fisicamente secretam compostos voláteis orgânicos (CVO) que atuam como feromônio de alarme e defesa (KALIN; BARRET, 1975, SCHOFIELD; UPTON, 1978). Esses CVO afastam ninfas e outros adultos da fonte de liberação. Não são conhecidos trabalhos que avaliem se a infecção de indivíduos por *B. bassiana* induz ou altera a liberação desses voláteis, ou se uma infecção fúngica tem impacto sobre o comportamento de defesa de *T. infestans* que estão nas proximidades de fontes com fungo.

Em condições favoráveis de umidade e temperatura, os conídios de *B. bassiana* germinam e formam hifas que penetram a cutícula e chegam a hemocele (ST. LEGER et al., 1991). Nesses momentos são ativados mecanismos da defesa inata do inseto, principalmente a imunidade humoral (PAL; ST. LEGER; WU, 2007). As hifas de *B.*

bassiana produzem metabólitos secundários tóxicos como a tenelina, bassianolida e beauvericina, entre outras, mas existem poucas informações sobre quando essas toxinas são produzidas durante o curso da infecção fúngica e sua importância na patogênese (ELEY et al., 2007, XU et al. 2008; 2009).

Conhecimentos básicos que levem a um melhor entendimento do comportamento de *T. infestans* frente a *B. bassiana*, bem como sobre a atuação desse agente de controle biológico contribuirão para o desenvolvimento de micoinseticidas mais eficientes contra esse vetor da DC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Triatomíneos

Triatomíneos são artrópodes pertencentes à classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Esta subfamília está representada por pelo menos 148 espécies descritas (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), e a maioria delas é encontrada na América Latina. No Brasil são popularmente conhecidos como barbeiro, chupão, chupança ou bicudo (DIAS, 1989). Os triatomíneos são insetos hemimetábolos, com ciclo constituído por ovo, cinco estádios ninfais e adulto, e vivem em média dois anos. As ninfas se diferenciam dos adultos pelo tamanho, por não possuírem asas e por não serem capazes de se reproduzir. Todos os estádios ninfais e os adultos exercem a hematofagia (LAVOPIERRE, 1959).

Os triatomíneos são ectoparasitas temporários, e o contato que mantêm com seus hospedeiros restringe-se ao período de repasto. Possuem em sua saliva componentes anticoagulantes e vasodilatadores que são injetados no hospedeiro no momento da picada (RIBEIRO, 1987). A quantidade de sangue ingerida a cada repasto sanguíneo varia de acordo com o sexo, estágio de desenvolvimento e estado nutricional. Uma fêmea adulta de *Triatoma infestans* pode ingerir em uma única refeição até 312 mg de sangue (NAKAMURA; RUBIÃO; SIQUEIRA-BATISTA, 2007). Uma ninfa necessita de pelo menos um repasto sanguíneo para desencadear a ecdise. Já os adultos necessitam da alimentação sanguínea para atividades como dispersão e reprodução (LENT; WYGODZINSKI, 1979, DIOTAIUTI, 2007). Uma vez alimentado, um novo repasto só será necessário de 7 a 14 dias depois, dependendo do estágio ninfal, das atividades do indivíduo, da temperatura e umidade, dentre outros fatores ambientais. Muitos triatomíneos podem subsistir sem alimentar-se por longos períodos de tempo sem desidratar-se ou sofrer danos fisiológicos aparentes (FRIEND; SMITH, 1985).

A maioria das espécies de triatomíneos habita ambientes silvestres, dentro ou na proximidade dos abrigos de hospedeiros, como ninhos de aves, esconderijos de gambá, tocas de tatu. Gêneros e espécies apresentam adaptações e preferências.

2.1.1 Comunicação em triatomíneos

Um dos modos de comunicação entre triatomíneos é a emissão de vibrações que eles produzem ao esfregar o rostro contra um sulco estriado localizado entre as pernas dianteiras. Essa comunicação é denominada estridulação, e a capacidade de triatomíneos estridular foi reconhecida há muito tempo (SCHOFIELD, 1977). Algumas espécies desta subfamília são capazes de produzir sons que são audíveis para o homem, mas o que é biologicamente relevante é a vibração (isto é, ondas que se propagam através do corpo do inseto e através do substrato), porque triatomíneos não têm órgãos auditivos e nenhuma evidência comportamental indica que eles respondem a sons transportados por via aérea (MANRIQUE; LAZZARI, 1994, ROCES; MANRIQUE, 1996, MANRIQUE, SCHILMAN, 2000, LAZZARI; MANRIQUE; SCHILMAN, 2006). A ocorrência espontânea de estridulação foi observada em fêmeas não receptivas durante as tentativas de acasalamento dos machos, (MANRIQUE; LAZZARI, 1994, LAZZARI; MANRIQUE; SCHILMAN, 2006) bem como na defesa contra predadores (LAZZARI; MANRIQUE; SCHILMAN, 2006).

Outro modo de comunicação entre os triatomíneos é a comunicação química, que pode estar relacionada ao encontro de parceiros para o acasalamento, comportamento de agregação, mecanismos de alarme e defesa e busca de refúgio (KALIN; BARRET, 1975, SCHOFIELD; PATTERSON, 1977, SCHOFIELD; UPTON, 1978, MANRIQUE; LAZZARI, 1995, LORENZO; LAZZARI, 1996).

2.1.2 Mecanismos de quimiorrecepção olfativa e comunicação química em triatomíneos

As antenas dos triatomíneos, assim como as de outros insetos, são o principal órgão responsável pela percepção de odores. Moléculas de odores podem ser capturadas por pêlos olfativos ou sensilas (Figura 1). Estes órgãos sensoriais possuem um ou vários neurônios associados a uma estrutura cuticular que contém um grande número de pequenos poros. Através deles as moléculas a serem detectadas penetram nos poros, passam à linfa da sensila e, após serem transportados por proteínas solúveis ligadoras de odor, estimulam receptores na membrana dos dendritos (CHAPMAN, 1998, NATION, 2002). Nos dendritos, as moléculas de odor serão reconhecidas por proteínas receptoras. A conformação da proteína receptora é alterada pela ligação da molécula de odor, levando à abertura de canais de sódio na membrana da célula nervosa e desencadeando

potenciais de ação que vão conduzir a informação ao sistema nervoso central (CHAPMAN, 1998).

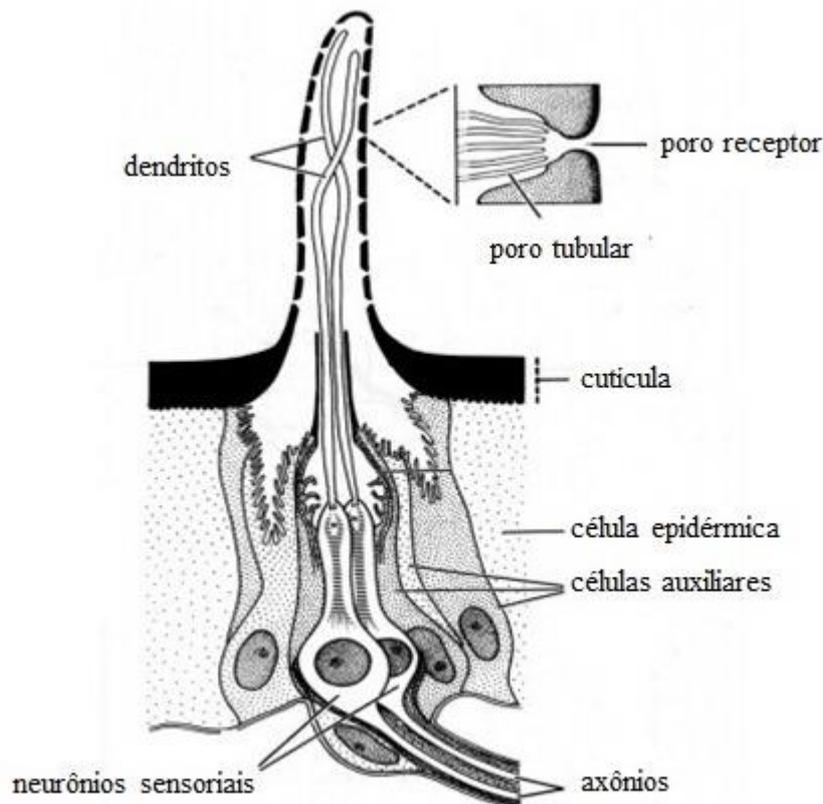


Figura 1. Representação esquemática de uma sensila olfativa de inseto. Adaptado de CHAPMAN (1998).

Substâncias químicas que são relevantes na transmissão de informações entre organismos são denominadas semioquímicos. Um infoquímico é um semioquímico que carrega informações que disparam uma resposta fisiológica ligada ou não a um comportamento que pode ser detrimental ou benéfico para o inseto receptor. Existem vários tipos de infoquímicos baseados no tipo de interação: feromônios são infoquímicos intraespecíficos, já alomônios (positivo para o emissor e prejudicial para o receptor), cairomônios (positivo para o receptor e prejudicial para o emissor) e sinomônios (positivo para ambos) são infoquímicos interespecíficos (NORDLUND; LEWIS, 1976).

Triatomíneos demonstram uma resposta anemotática característica, ou seja, orientam-se contra o fluxo de ar quando confrontados com correntes de ar que carregam certos odores, como por exemplo os associados ao hospedeiro, como CO₂, nonanal e 1-

octen-3-ol (BARROZO, 2003, GUERESTEIN; GUERIN, 2001). Estudos de comportamento sexual em *T. infestans* sugerem que existe um sinal químico que pode ser emitido durante a cópula por ambos sexos, que promove a agregação de machos em volta do casal em cópula (MANRIQUE; LAZZARI, 1995, DE BRITO SANCHÉZ et al., 1995). Além disso, triatomíneos usam odores próprios como mecanismos de alarme e defesa contra predadores.

2.1.2.1 Feromônios de alarme e defesa

Triatomíneos adultos possuem as glândulas de Brindley, estruturas como sacos simples que estão localizados dorsalmente e se estendem para a parte lateral do segundo segmento abdominal. A abertura para o exterior é através de um orifício situado na mesopleura. Essas glândulas produzem compostos voláteis orgânicos (CVO) e os liberam quando os indivíduos são perturbados fisicamente, como em perturbação induzida por agitação em experimentos ou quando atacados por predadores por exemplo (KALIN; BARRET, 1975, SCHOFIELD; UPTON, 1978).

Os CVO liberados pelas glândulas de Brindley consistem em uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta (1 a 6 carbonos) que inclui ácido isobutírico, álcoois alifáticos, ésteres e compostos aromáticos (HACK et al., 1980, JUAREZ; BRENNER, 1981). Com base na resposta comportamental desses insetos para ácido isobutírico sintético, WARD (1981) sugeriu que compostos emitidos pelas glândulas de Brindley atuam como um feromônio de alarme.

Particularmente em *T. infestans*, esses CVO quando presentes em grande quantidade representam um sinal de alarme para outros indivíduos receptores, ninfas e adultos, afastando-os da fonte de liberação. A atuação dos CVO das glândulas de Brindley ocorre de maneira dose-dependente, pois baixas doses induzem efeitos atrativos em ninfas (WARD, 1981, CRUZ LÓPEZ; MORGAN; ONDARZA, 1995).

Além de perturbação física não são conhecidos outros fatores que estimulam ou influenciam a excreção dos voláteis liberados pelas glândulas de Brindley. Não se sabe, por exemplo, se a infecção por *Trypanosoma cruzi* ou outros parasitos e patógenos, como fungos entomopatogênicos alteraria o perfil qualitativo e quantitativo desses voláteis durante a infecção.

2.1.3 Atividade e busca por abrigos

A maioria dos triatomíneos, tanto ninfas quanto adultos, permanece inativa durante o dia, quando podem ser encontrados agregados em lugares protegidos e com reduzida iluminação, devido à sua intensa fototaxia negativa. Mesmo assim, durante a noite, a maioria dos adultos das espécies de triatomíneos é atraída por luz artificial, que os ajuda a guiar-se para o interior de casas (REISENMAN; LAZZARI; GIURFA, 1998).

Durante a noite, triatomíneos são mais ativos aparentemente iniciando a busca de alimento nas primeiras horas de escuridão e procurando refúgios ao amanhecer (NÚÑEZ, 1987, LAZZARI, 1992, LORENZO; LAZZARI, 1998).

T. infestans, por exemplo, possui um ritmo circadiano de atividade locomotora, com dois picos de atividade controlados de forma endógena: o primeiro no início da escotofase e o segundo no começo da fotofase. Foi proposto que os picos de atividade mencionados estejam relacionados com a busca do hospedeiro e do abrigo, respectivamente (LAZZARI, 1992, LORENZO; LAZZARI, 1998). O nível de atividade espontânea de ninfas de *T. infestans*, ou seja, a atividade promovida por motivação endógena na ausência de pistas sensoriais emitidas por hospedeiros aumenta com o jejum. Dessa forma, as ninfas apresentam uma maior tendência a permanecerem fora de abrigos quando estão em jejum (LORENZO; LAZZARI, 1998).

Durante as primeiras horas após a queda do crepúsculo, os triatomíneos começam a explorar seu ambiente em busca de potenciais fontes de alimento, ou seja, vertebrados de sangue quente. A detecção de fonte de alimento é conseguida através da detecção de correntes de ar que transportam odores distintos, vapor de água e calor. Quando sinais químicos proveniente de potenciais hospedeiros são detectados em estreita proximidade, eles podem estimular indivíduos e atraí-los em direção a fonte. Semelhante a praticamente todos os insetos sugadores de sangue CO₂ emitido pelos hospedeiros pode atrair triatomíneos (BARROZO; LAZZARI, 2004a, GUERESTEIN; HILDEBRAND, 2008), bem como outros odores de hospedeiros, tais como nonanal, ácido isobutírico, 1-octen-3-ol e amoníaco (TANEJA; GUERIN, 1997, GUERESTEIN; GUERIN, 2001, BARROSO; LAZZARI, 2004b).

Os esconderijos preferidos de triatomíneos são aqueles com microclimas amenos nos quesitos umidade relativa (UR) e temperatura. Foi verificada preferência de *T. infestans* a ambientes mais secos, o que pode prevenir infecções por fungos entomopatogênicos (ROCA; LAZZARI, 1994, GUARNERI et al., 2002). Em relação à termopreferência, imediatamente após a alimentação, ninfas e adultos preferem

permanecer em temperaturas mais altas e se movem em direção a temperaturas mais baixas com o aumento do tempo de jejum. Se o contato com um novo hospedeiro não for possível, os triatomíneos tendem a reduzir seu metabolismo e mover-se para ambientes mais frios (LAZZARI, 1991).

As fezes de ninfas e adultos de *T. infestans* emitem feromônios que atraem indivíduos da mesma espécie e, quando depositados próximos a refúgios, constituem um sinal de orientação (LORENZO; LAZZARI, 1996). Voláteis emitidos a partir de excrementos de triatomíneos guiam outros indivíduos a pontos de acesso aos refúgios (LORENZO; LAZZARI 1996, VITTA et al., 2002). Para ser útil, esse sinal deve persistir no ambiente e ao mesmo tempo evitar atrair insetos em direção a refúgios desabitados. A duração média da atratividade das fezes de triatomíneos é aproximadamente 10 dias (FIGUEIRAS; LAZZARI, 2000).

Nos refúgios, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus* apresentam um comportamento gregário que é mediado por tigmotaxia (estreito contato com o substrato e entre indivíduos da mesma espécie) e feromônios presentes nas fezes (SCHOFIELD; PATTERSON, 1977, LORENZO FIGUEIRAS; KENIGSTEN; LAZZARI, 1994). Além disso, um sinal agregativo presente na cutícula de *T. infestans* também é responsável pela mediação do comportamento gregário dessa espécie. O sinal depositado por eles em substratos permanece como “pegadas”. Esse sinal não volátil é composto por uma mistura de hidrocarbonos de origem cuticular e exige contato físico com o receptor (LORENZO FIGUEIRAS; LAZZARI, 1998).

2.1.4 Imunidade em triatomíneos

Triatomíneos, como os insetos em geral, não possuem imunidade adquirida nem memória imunológica após infecção por um microorganismo. Suas respostas fisiológicas dependem apenas da imunidade inata, a qual inclui basicamente dois mecanismos: a) mecanismos humorais, tais como a indução da síntese de moléculas citotóxicas como peptídeos e proteínas antimicrobiais (HOFFMANN; HETRU; REICHHART, 1993, LOWENBERGER, 2001), produção de lectinas e a ativação da cascata proteolítica da profenoloxidase (MUTA; IWANAGA, 1996, GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997); b) mecanismos celulares, mediados pelos hemócitos (células da hemolinfa), e compreendem a fagocitose, a formação de nódulos e o encapsulamento de patógenos (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997).

A resposta imune humoral se caracteriza por uma limitada variedade de receptores que reconhecem componentes específicos da superfície de microorganismos. Esses componentes são chamados de “padrões moleculares associados a patógenos”. Os mais conhecidos são componentes de membrana celular como lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, ácido lipoteicóico e peptidoglicanos de bactérias gram-positivas, 1-3 glucanas de fungos e glicosilfosfatidilinositol de protozoários (ASHIDA, 1990; TEIXEIRA; ALMEIDA; GAZZINELLI; 2002).

A resposta humoral de triatomíneos que foi mais caracterizada envolve os peptídeos antimicrobianos (PAM), liberados na hemolinfa durante uma infecção. Os PAM mais importantes são as defensinas (DIMARCQ et al., 1997). Em *R. prolixus* e *T. brasiliensis* já foram reportadas diferentes isoformas de defensinas (LOPEZ et al., 2003). Outro importante mecanismo da resposta imune humoral é a ativação de cascatas proteolíticas (CERENIUS; SODERHALL, 2004). Dentre elas se destaca a cascata da profenoloxidase, que irá promover a deposição de melanina sobre o organismo invasor, imobilizando-o e/ou impedindo a progressão da infecção e posteriormente promovendo a sua eliminação da hemolinfa (BEUTLER, 2004). A ativação da profenoloxidase é desencadeada pela presença de componentes da parede de células microbianas, tais como, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, na hemolinfa dos insetos. As serina-proteases convertem a profenoloxidase circulante em fenoloxidase. Esta ativação é estritamente regulada por serpinas (inibidores de serino proteases), inibidores da profenoloxidase e lectinas, restringindo a atividade da profenoloxidase à superfície do patógeno (FERRANDON et al., 2007, GILLESPIE; KANOST; TRENCZEC, 1997).

2.2 *Triatoma infestans*

2.2.1 Importância médica de *Triatoma infestans*

T. infestans é hoje o principal vetor da doença de Chagas (DC) na Argentina, Bolívia e Paraguai. A DC é uma antrozoonose endêmica na América Latina, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido ao homem através das fezes de triatomíneos infectados. A forma mais importante de transmissão vetorial da doença é a contaminação do local da picada com fezes contaminadas de triatomíneos (adulto ou qualquer dos estádios ninfais). A transmissão também pode ocorrer sem o

vetor por transfusão de sangue contaminado, congenitamente, transplante de órgãos infectados e mais recentemente divulgada, por ingestão do parasita em açaí e cana-de-açúcar (OMS, 2013).

Estima-se que a DC acomete aproximadamente 8 milhões de pessoas ao redor do mundo, a maioria na América Latina. No Brasil predominam os casos crônicos da doença, e os casos agudos se concentram na Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amazônia, Amapá, Rondônia, Roraima, parte do Tocantins, Maranhão e Mato Grosso. A maioria dos casos agudos da DC tem sido descritos no Brasil relacionado à ingestão de alimentos contaminados com vetores triturados ou seus dejetos. No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de mil e duzentos novos casos, 70% por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e 22% sem identificação do modo de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A infecção afeta o tecido nervoso autônomo e os tecidos musculares do coração, esôfago e cólon, além de comprometer o sistema nervoso periférico. Estas lesões desencadeiam diversas complicações no sistema circulatório e digestivo (MONCAYO, 1999, PUNUKOLLU et al., 2007).

Não há vacina ou tratamento antiparasitário efetivo para a cura durante a fase crônica da DC, portanto o controle dos vetores em áreas domiciliares e peridomiciliares é uma das principais estratégias para prevenir infecções humanas em regiões com transmissão vetorial até hoje (OMS, 2013).

2.2.2 Aspectos gerais de *T. infestans*

T. infestans apresenta a cabeça fusiforme alongada, pescoço nítido unindo a cabeça ao tórax, e aparelho bucal contendo probóscida, com origem anterior aos olhos, adaptada à picada e sucção (Figura 2) (FORATTINI, 1980).



Figura 2. *Triatoma infestans* adulto sobre madeira. Fonte: ARGOLO et al., 2008.

T. infestans teve sua origem geográfica e epicentro de distribuição no Vale de Cochabamba, na Bolívia, mas se dispersou pelos países do cone sul da América Latina. Após a adaptação a ambientes domésticos, que se iniciou há 3.500 anos (PANZERA et al., 2007), o principal mecanismo de dispersão desta espécie se deu através de migrações humanas, uma vez que sua capacidade de vôo é reduzida (SCHOFIELD, 1994).

No Brasil, no final de década de 70 essa espécie era encontrada nos estados de Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LENT; WYGODZINSKI, 1979). Em 2000, os focos se restringiam ao Sudeste do Piauí, Sul do Tocantins, Nordeste de Goiás, Oeste da Bahia e Nordeste do Rio Grande do Sul (VINHAES; DIAS, 2000).

T. infestans era encontrado quase exclusivamente em ambientes domésticos e peridomésticos (FORATTINI, 1980), podendo ser vistos em grandes números em frestas de paredes, atrás de quadros, dentro de caixas, e em esconderijos no peridomicílio em galinheiros, chiqueiros e estábulos, por exemplo (Figura 3a). Acreditava-se que esta espécie não se encontrava mais em ambientes silvestres, mas já foram encontrados focos silvestres na região do Grande Chaco, compreendendo a Bolívia, Argentina e Paraguai (Figura 3b) (BERMÚDEZ; VALDERRAMA; TORRICO, 1993, ROLÓN et al., 2011, CEBALLOS et al., 2009).

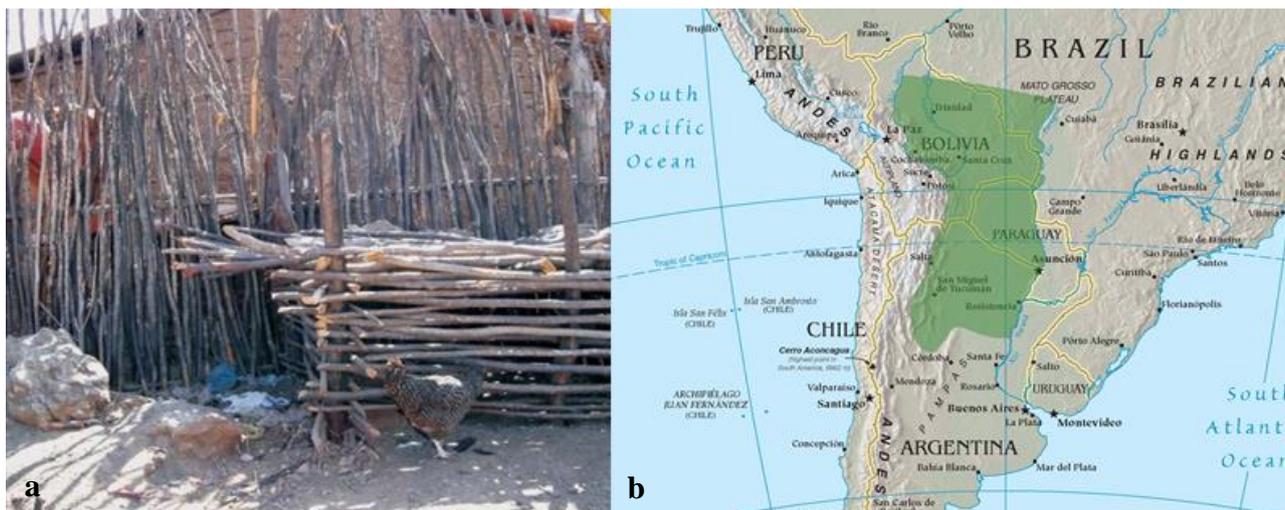


Figura 3. Galinheiro em peridomicílio de casa (a). Região do Grande Chaco, entre o Rio Paraguai e os Andes (b) Fonte: ARGOLO et al., 2008

2.2.3 Controle de *Triatoma infestans*

Há 30 anos o combate aos triatomíneos encontrados em ambientes domésticos é realizado com a aplicação de inseticidas de ação residual. Até hoje ainda são utilizados inseticidas do grupo dos piretróides (deltametrina, alfacipermetrina, betacipermetrina) e carbamatos em geral com efeito residual maior que um ano (COURA; DIAS, 2009). Anteriormente eram utilizados inseticidas organoclorados (como hexaclorobenzeno e dieldrin) e organofosforados (como fenitrotion) (ROCHA E SILVA, 1979).

Em 1991, os países do cone sul da América Latina endêmicos para a DC, decidiram juntar esforços contra a doença, firmando uma cooperação internacional denominada Iniciativa dos Países do Cone Sul, envolvendo a Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (SILVEIRA, 2002). A partir disso, o Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil passou a priorizar áreas de ocorrência de *T. infestans*, e a vigilância epidemiológica foi ampliada (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002, SILVEIRA, 2002). Dez anos de esforços resultaram numa redução de 94% da incidência da DC nos países do cone Sul e dessa forma, *T. infestans* foi efetivamente controlado. Em 2006, o Brasil foi declarado livre de transmissão vetorial de DC por essa espécie (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA; 2006).

Entretanto, com o passar dos anos vêm surgindo relatos preocupantes sobre populações de *T. infestans* resistentes a piretróides no Norte da Argentina e Sul da Bolívia (PICOLLO et al., 2005, ORIHUELA et al., 2008, CARDOZO et al., 2010,

JUÁREZ et al., 2010). Atualmente, o controle do vetor nessa região voltou a ser feito com organofosforados. Além disso, ainda existem populações silvestres dessa espécie na Bolívia, e a invasão de ambientes silvestres pelo homem pode levar à infestação e nova dispersão do inseto nas casas. Outro problema grave é o processo de domiciliarização de espécies silvestres como *T. sordida*, para ocupar “vazio ecológico” deixado por *T. infestans*, o que ressalta a necessidade de vigilância permanente e controle anti-vetorial (GUHL; PINTO; AGUILERA, 2009).

2.2.4 Métodos alternativos de controle

Apesar de um controle com químicos sintéticos ser muito eficiente contra *T. infestans*, esses produtos podem causar danos ao homem e ao meio ambiente, além de levar ao desenvolvimento de tolerância e resistência dos vetores a produtos, e assim comprometer o sucesso de campanhas (DIAS, 2009). Uma alternativa ao controle químico de triatomíneos, inserida em um método de controle integrado, poderia ser o uso de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos (FE). Micoinseticidas já são utilizados na agricultura para o controle de pragas, especialmente produtos que contêm fungos dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, ou *Isaria* (FARIA; WRAIGHT, 2007). Esses fungos têm alta efetividade em fases diferentes de desenvolvimento de insetos e outros artrópodes e podem ser produzidos em larga escala.

2.3 Fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos

2.3.1 Aspectos gerais

FE foram os primeiros patógenos utilizados no controle biológico de pragas. Muitos FE são patógenos de largo espectro e estão dispersos em diferentes ambientes, como solos, vegetais, água e ar (BENZ, 1987, HAJEK; ST. LEGER, 1994, INGLIS et al., 2001). São conhecidos cerca de 90 gêneros com 700 espécies de FE. Esses causam em torno de 80% das doenças de insetos de interesse na agricultura ou saúde pública, sendo que, cerca de vinte espécies de FE incidem sobre pragas de importância econômica (FERNANDES; ALVES, 1991, ALVES, 1998). A ordem Hypocreales reúne importantes FE. São isolados a partir de cadáveres de artrópodes que apresentam indícios de morte por infecção fúngica como mumificação e formação de micélio e

conídios sobre a cutícula. O interesse em FE para controle de insetos de importância médica, como mosquitos, carrapatos e triatomíneos aumentou muito nos últimos anos (SCHOLTE et al., 2005, KANZOK; LORENA, 2006, FERNANDES; BITTENCOURT, 2008, SOUSA et al., 2013).

O processo de infecção do artrópode por fungo ascomicético em fase assexuada ocorre basicamente em quatro etapas: adesão de conídios, germinação, penetração e colonização (Figura 4). A adesão se inicia imediatamente após contato entre conídios e a cutícula do inseto e envolve forças hidrofóbicas, eletrostáticas e interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1991, HAJEK; ST. LEGER, 1994, PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007). A cutícula do inseto atua como barreira mecânica e bioquímica de defesa contra a infecção fúngica (ST. LEGER et al., 1991). Após a adesão, e em condições favoráveis principalmente de umidade, os conídios iniciam a germinação, que se completa entre 12 e 24 horas, em condições favoráveis, com formação do tubo germinativo e apressório que auxilia a penetração das hifas (ALVES, 1998). A penetração da cutícula por hifas é favorecida pela pressão exercida por elas em áreas membranosas ou esclerosadas associada a enzimas como proteases, quitinases e lipases produzidas durante a penetração (KHACHATOURIANS, 1998) (Figura 4). Proteases (MORAES; SCHRANK, VAINSTEIN, 2003) e metabólitos secundários tóxicos (ST. LEGER et al., 1991) são considerados fatores chave para a eficiência do processo de invasão. Após a penetração das hifas, que dura entre 6 e 12 horas, estas se ramificam e colonizam a cutícula do inseto e em seguida atingem a hemocele. Mecanismos de defesa interna do inseto são ativados, como estímulo da fagocitose, destruição de plasmócitos, encapsulação do fungo e formação de nódulos (HAJEK; ST. LEGER, 1994), para evitar o crescimento fúngico. O fungo escapa do sistema imune através da formação de corpos hifais, que produzem toxinas as quais suprimem a resposta imune de insetos (PAL; ST. LEGER; WU, 2007). Essas toxinas associadas a alterações patológicas na hemocele e bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido à biomassa fúngica causam a morte do inseto. No cadáver, micélio coloniza o corpo gorduroso, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipoderme, sistema nervoso, músculos e traquéias. Em condições apropriadas, micélio começa a emergir sobre o cadáver e inicia-se a conidiogênese externa seguida pela disseminação de novos conídios no meio ambiente, e contaminação e infecção de outros indivíduos (ALVES, 1998) (Figura 4).

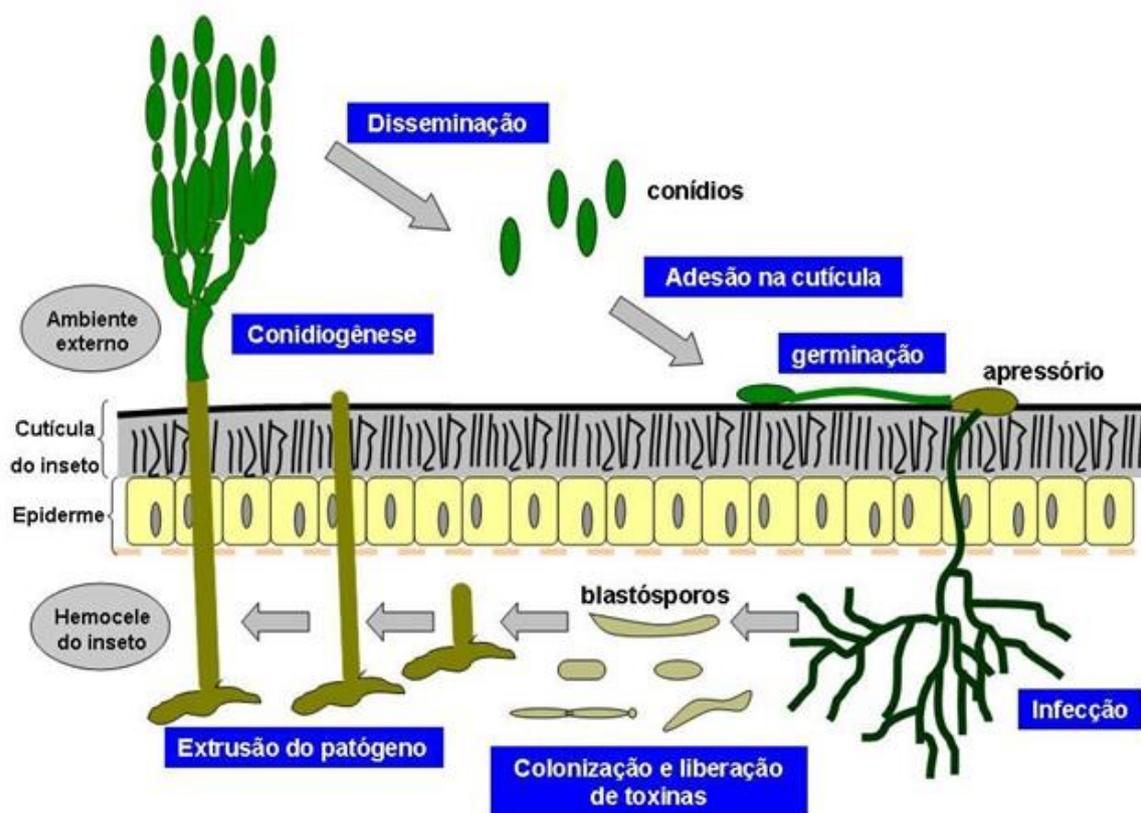


Figura 4. Ciclo de fungo ascomicético em inseto hospedeiro. Fonte: MASCARIN; PAULI (2010).

2.3.2 Fungos entomopatogênicos e comportamento de artrópodes

Fungos patogênicos utilizam diversas estratégias para alcançar seu principal objetivo no hospedeiro, que é maximizar sua reprodução. A evolução dessas estratégias levou a diferentes tipos de interação entre artrópodes e fungos, como por exemplo febre comportamental induzida pelo fungo, procura do artrópode por locais mais quentes e elevados, resposta reduzida a semioquímicos e mudanças no comportamento reprodutivo (ROY et al., 2006).

A detecção de sinais específicos de inimigos, como químicos voláteis à distância, e a capacidade de evitá-los é parte fundamental do comportamento defensivo de muitas ordens de insetos (GRIPENBERG et al., 2010, NAJAR-RODRIGUEZ et al., 2010, ROHLFSS; CHURCHILL, 2011, TURCOTTE ; CORRIN; JOHNSON, 2012). Ao detectar risco de exposição e detecção de um fungo entomopatogênico e evitar o local contaminado, ou através de comportamento de limpeza (CORY; HOOVER, 2006), os

insetos ganham uma vantagem seletiva. Essas respostas podem reduzir a eficiência de fungos como agentes para controle biológico. Em contraste, fungos patogênicos teriam a vantagem se atraíssem ou fossem imperceptíveis a seus hospedeiros (BAVERSTOCK; ROY; PELL, 2010).

Comportamentos de repelência a fungos entomopatogênicos foram reportados em insetos sociais e semisociais, como várias espécies de cupins (STAPLES; MILNER, 2000, SUN et al., 2008), abelhas (VILLANI et al., 1994) e grilos (THOMPSON; BRADENBURG, 2005). O cupim *Macrotermes michaelseni* evitou contato físico com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e houve correlação entre virulência e repelência para diferentes isolados desses fungos (MBURU et al., 2011; MBURU; MANIANIA; HASSANALI, 2013). Em outros estudos, foram encontradas claras diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de voláteis emitidos por dois isolados de *M. anisopliae* e de *B. bassiana* que demonstraram diferentes níveis de repelência em cupins (HUSSAIN et al., 2010, MBURU et al., 2011). Já anofelíneos e culicíneos não foram repelidos por superfícies tratadas com conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. (MNYONE et al., 2010). Fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* não detectaram conídios e ovipuseram sobre superfície tratada com *M. anisopliae*, mesmo tendo a opção de ovipor em áreas não tratadas (LOBO, 2011).

Insetos podem ser atraídos por metabólitos secundários de fungos e outros microrganismos. Por exemplo, fêmeas grávidas de *Culex quinquefasciatus* são atraídas por voláteis emitidos pelo fungo não entomopatogênico *Trichoderma viride* (GEETHA et al., 2003). A maioria dos estudos indica que insetos não sociais não são capazes de detectar fungos entomopatogênicos, ou podem detectar o fungo, mas não percebem que estes podem lhes causar danos (BAVERSTOCK; ROY; PELL, 2010).

Não são conhecidos estudos de comportamento de atração ou repelência de triatomíneos a fungos entomopatogênicos.

2.4 *Beauveria bassiana*

B. bassiana é um FE terrestre com distribuição ampla. É patógeno de inúmeras espécies de artrópodes em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Fatores abióticos como umidade, temperatura e radiação solar influenciam a germinação na cutícula do hospedeiro e a sobrevivência desse fungo no meio ambiente. A germinação e o crescimento ocorrem entre 25° e 30° C para *B. bassiana* (ALVES, 1998). *B.*

bassiana é um fungo facilmente cultivável em meios de cultivo e já é produzido para formulações comerciais para o controle de pragas agrícolas (ALVES, 1998, FARIA; WRIGHT, 2007). A ocorrência natural desse fungo e poucos casos relatados de efeitos tóxicos a animais domésticos e seres humanos (relatos de alergia), bem como ao ambiente estimulam o uso de micoinseticidas (FARIA; MAGALHÃES, 2001, THUNGRABEAB; TONGMA, 2007, BORGES; NOVA, 2011, OLIVEIRA-FILHO, et al. 2011). Temperaturas maiores ou iguais a 35°C são a principal barreira ao crescimento desse fungo sobre muitos vertebrados, inclusive o homem (ROBERTS; CAMPBELL, 1977). Não existem relatos de infecção, morte de pessoas ou de desequilíbrios ambientais provocados por *B. bassiana* (ZIMMERMANN, 2007, COSTA; HAIDA, 2009).

2.4.1 Toxinas produzidas por *Beauveria bassiana*

Durante a fase patogênica, *B. bassiana* produz uma grande variedade de peptídeos naturais não ribossômicos que atuam como imunossupressores, toxinas em geral ou toxinas hospedeiro-específicas. Entre eles estão os ciclo-oligômeros não ribossômicos depsi-peptídeos, como tenelina, beauvericina e bassianolida (XU et al., 2008) (Figura 5).

A beauvericina possui diversas atividades biológicas, como atividade antibacteriana e antifúngica moderada (HAMIL et al., 1969) além de atividade antiproliferativa contra linhagens de células humanas cancerosas (JOW et al., 2004). A atividade inseticida de beauvericina já foi confirmada em *Calliphora erythrocephala* (Diptera), *A. aegypti* (Diptera), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) e *Schizaphis graminum* (Hemiptera) (FORNELLI; MINERVINI; LOGRIECO et al., 2004, LELAND et al., 2005, JESTOI, 2008). A ação da beauvericina consiste no estímulo a cascatas que levam a apoptose (XU et al., 2008).

Outra toxina, a tenelina, é tóxica para eritrócitos de mamíferos, mas seus mecanismos de patogenicidade em insetos não foram demonstrados na infecção do lepidóptero *Galleria mellonella* por *B. bassiana* (ELEY et al., 2007).

A toxina bassianolida foi detectada em cadáveres de larvas de *Bombyx mori* (Lepidoptera) mortas por *B. bassiana*, demonstrando que a produção desse metabólito coincide com a infecção e morte do inseto (KWON et al., 2000). A bassianolida foi

indicada como um fator de virulência altamente significativo para *B. bassiana*, com efeito nas contrações musculares de três diferentes lepidópteros (XU et al., 2009).

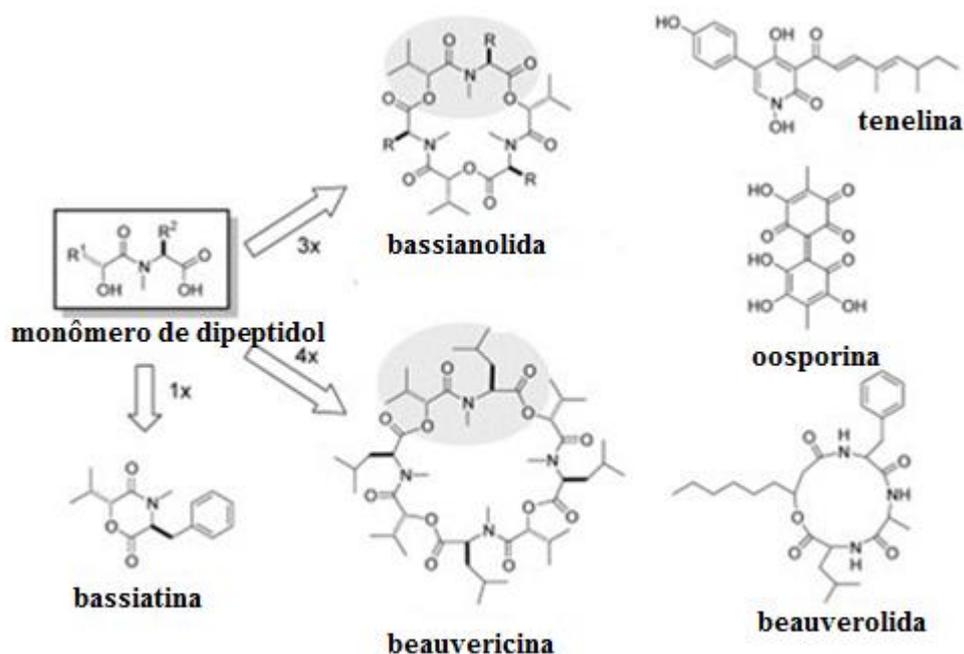


Figura 5. Estrutura química de algumas toxinas produzidas por *Beauveria bassiana*. Adaptado de XU et al. (2008).

Os genes que codificam para a beauvericina sintetase, a tenelina sintetase e para a bassianolida sintetase já são conhecidos (ELEY et al., 2007, XU et al. 2008; 2009). Porém, ainda não são conhecidos os níveis de expressão desses genes de fungo em um inseto infectado que esteja vivo, ou morto e micotizado.

2.4.2 Controle de *Triatoma infestans* com *Beauveria bassiana*

T. infestans e outras espécies de triatomíneos são altamente suscetíveis a FE em condições de laboratório (ROMAÑA; FARGUES, 1992, LUZ et al., 1998; LUZ; ROCHA; NERY, 2004, PEDRINI et al., 2009, ROCHA; SILVA; LUZ, 2011, ROCHA; LUZ, 2011, LUZ; RODRIGUES; ROCHA, 2012), inclusive *T. infestans* resistentes a piretróides (PEDRINI et al., 2009). *B. bassiana* é eficiente ao infectar ovos, ninfas e adultos de *T. infestans* e outros triatomíneos em condições de laboratório, e alta umidade aumenta a infecção e induz o fungo a reciclar-se permitindo que a micose se espalhe (LUZ et al., 1994; 1998, LUZ; FARGUES, 1998).

Em campo, no Brasil, foi testada formulação oleosa de *B. bassiana* confirmando seu potencial para controle de *T. infestans*, mas com atividade reduzida, ou seja, menor mortalidade de indivíduos quando comparada a condições de laboratório (LUZ et al., 2004). Provavelmente isso se deve as condições deletérias do ambiente, como baixa umidade e altas temperaturas. Os propágulos fúngicos devem ser melhor formulados, ou seja, misturados a veículos, que podem proteger esses propágulos e aumentar a eficiência do FE (BURGES, 1998).

Uma armadilha baseada em formulação de conídios de *B. bassiana* com um atraente químico já foi testada com sucesso para controle de *T. infestans* em casas na Província de Salta, Argentina (JUÁREZ et al., 2008; 2010). Entretanto, a validação da armadilha e do método ainda estão pendentes (JUÁREZ et al., 2008; FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011).

O característico comportamento de agregação de *T. infestans* facilita o contato entre os indivíduos e conseqüentemente possibilita a transmissão fúngica por autodisseminação ou transmissão fúngica horizontal, o que foi comprovado em laboratório (PEDRINI et al., 2009) e campo (FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Triatoma infestans é um inseto modelo importante- fácil de criar em laboratório, bem conhecido e estudado - para demonstrar aspectos da infecção com FE, dessa forma contribui para o estudo de controle de outras espécies de triatomíneos.

Tendo em vista a existência de populações silvestres de *T. infestans* e os relatos de resistência desse triatomíneo a inseticidas sintéticos, é necessário estudar medidas inovadoras, eficientes, econômicas, e menos tóxicas para o homem e que não causem danos ambientais em comparação ao controle químico convencional dessa espécie. O agravante fato da domiciliarização de outras espécies de triatomíneos enfatiza ainda mais essa necessidade.

O uso de agentes de controle biológico específicos, que atuem em todos os estádios do desenvolvimento de *T. infestans* favorecerá seu controle. Resultados promissores a nível experimental com *B. bassiana*, apontam esse fungo para fortalecer um controle integrado e sustentável de *T. infestans*.

O estudo dos mecanismos envolvidos no processo de infecção do hospedeiro com um agente biológico, bem como do comportamento do hospedeiro e seus mecanismos de defesa é importante na escolha da melhor estratégia de controle e irá avançar com conhecimentos para o desenvolvimento de um micoinseticida de tratamento focal contra os vetores da DC.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Contribuir com conhecimentos para elucidar processos envolvidos na infecção de *T. infestans* por *B. bassiana*, e dessa forma colaborar para o desenvolvimento de micoinseticidas efetivos para um controle integrado de triatomíneos.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar CVO liberados por *T. infestans* infectados ou não por *B. bassiana*;
- Estudar, em diferentes tempos após o tratamento, o padrão de expressão de genes envolvidos:
 - na biossíntese de CVO em adultos infectados ou não
 - na produção de toxinas produzidas por *B. bassiana* em ninfas infectadas
 - na imunidade humoral de *T. infestans* infectados ou não
- Avaliar o efeito de conídios de *B. bassiana* sobre o comportamento de ninfas de *T. infestans* não tratadas

5 RESULTADOS

5.1 Manuscrito 1 – Efeito da presença de conídios de *Beauveria bassiana* sobre o comportamento de *Triatoma infestans*

5.2 Manuscrito 2 - Avaliando a expressão gênica durante a patogênese: Uso de qRT-PCR para acompanhar a produção de toxinas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* durante a infecção, e resposta imune do hospedeiro *Triatoma infestans*.
(PUBLICADO)

5.3 Manuscrito 3 - Síntese e secreção de compostos voláteis orgânicos liberados por *Triatoma infestans* infectados com *Beauveria bassiana*.

5.1 MANUSCRITO 1 - Efeito da presença de conídios de *Beauveria bassiana* sobre o comportamento de *Triatoma infestans*

Resumo: Propágulos de fungos entomopatogênicos liberam compostos voláteis orgânicos (CVO) que podem ser detectados e influenciar o comportamento de alguns insetos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta comportamental de ninfas de *T. infestans* frente a presença de conídios de *B. bassiana*. Em ensaio em placa de Petri, conídios de *B. bassiana* foram aplicados em área de papel filtro a 10^8 conídios/cm², e ninfas tiveram opção de escolher entre permanecer em área tratada ou não. Em outro ensaio, uma ninfa morta por infecção por *B. bassiana* e apresentando conídios na superfície foi colocada em esconderijo simulado e ninfas saudáveis tiveram a opção de escolher entre esconderijo contendo a ninfa morta e micotizada ou não. O comportamento de escolha de ninfas frente a conídios também foi avaliado em olfatômetro em Y. No ensaio em placa de Petri com área de papel filtro tratada ou não, a preferência por área tratada com conídios foi significativa somente para ninfas de 1º estágio (N1) 90 minutos após o início do experimento ($\chi^2 = 6,4$; $P = 0,01$). Já para o ensaio com esconderijos simulados e ensaio em olfatômetro em Y, não foi encontrado efeito da presença de conídios sobre a escolha das ninfas ($0 \geq \chi^2 \leq 0,4$; $0,5 \geq P \leq 1$; $\chi^2 = 3,5$; $P = 0,06$, respectivamente). As ninfas não foram capazes de detectar conídios de *B. bassiana* ou não foram repelidas pela presença do fungo nas condições testadas, o que enfatiza a escolha desse fungo para um controle biológico de *T. infestans*.

Palavras-chave: triatomíneos, micoinseticidas, compostos voláteis orgânicos, comportamento de insetos.

1. Introdução

Insetos enfrentam uma gama diversificada de inimigos naturais que incluem predadores, parasitóides, parasitas e agentes patogênicos. A capacidade de reconhecer e responder defensivamente a tais perigos é um traço importante de sobrevivência para qualquer espécie. Detecção de semioquímicos específicos do “inimigo” é muitas vezes uma parte fundamental da defesa de muitos insetos (DICKE; GROSTAL, 2001). Embora fungos entomopatogênicos possam causar mortalidades significativas em populações de insetos suscetíveis, poucos estudos têm relatado as respostas olfativas desses insetos para tais fungos. O comportamento de evitar contato com fungos entomopatogênicos já foi demonstrado principalmente para insetos sociais, como os cupins (MBURU et al., 2009, MBURU; MANIANIA; HASSANALI, 2013).

O controle biológico de *Triatoma infestans*, principal vetor da Doença de Chagas em alguns países da América do Sul, com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* tem sido amplamente estudado, como uma alternativa para um controle integrado desse vetor. A eficiência de *B. bassiana* sobre todos os estágios de vida de *T. infestans* já foi confirmada em condições de laboratório e de campo (LUZ et al., 1998; PEDRINI et al., 2009, LUZ; RODRIGUES; ROCHA, 2012, JUÁREZ et al., 2008; FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011). A maioria desses estudos se baseia em uma aplicação indireta de propágulos fúngicos para controle, ou seja, em tratamento sobre uma área que o indivíduo entrará em contato posteriormente, uma abordagem mais realista que um tratamento direto sobre os vetores.

O processo de infecção de *B. bassiana* em seus hospedeiros se inicia com contato do conídio com a cutícula, dessa forma, o comportamento de vetor de se aproximar ou se afastar de uma fonte com fungo é determinante para o estabelecimento ou não de uma infecção. Ainda não são conhecidos estudos específicos sobre comportamento de *T. infestans* frente presença de propágulos de *B. bassiana*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento de ninfas de *T. infestans* em relação a presença de conídios de *B. bassiana* em área tratada ou em ninfas mortas e micotizadas. Além disso, foi avaliado o efeito de compostos voláteis orgânicos (CVO) de conídios de *B. bassiana* sobre ninfas.

2. Material e métodos

2.1 Origem e criação de *Triatoma infestans*

A colônia teve origem em *T. infestans* cedidos pelo Laboratório de Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos, do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Uberlândia, Minas Gerais. Os indivíduos foram criados em frascos cilíndricos de plástico transparente, com 15 cm de diâmetro, altura de 20 cm, e fundo forrado com papel filtro. Dentro de cada frasco foi colocada uma tira de cartolina dobrada em forma de sanfona para aumentar a superfície interna. Os frascos com os triatomíneos foram mantidos a 27 ± 5 ° C e 60 ± 10 % de UR e fotofase natural. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos conforme LIMA, et al. (2009).

2.2 Origem e cultivo de *Beauveria bassiana*

B. bassiana GHA foi isolada originalmente de larva-alfinete de milho (*Diabrotica speciosa*) em milho, em Oregon, Estados Unidos e está depositada como ARSEF 201 na Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos do Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ARSEF), Ithaca, Estados Unidos e na coleção de culturas de fungos entomopatogênicos do IPTSP, UFG. Antes dos testes foi realizada uma passagem de fungo em ninfa de terceiro instar (N3) de *T. infestans* com o objetivo de padronizar a virulência do fungo (LUZ et al., 1999). O fungo foi reisolado da N3 morta, e cultivado em placa de Petri de vidro (100 mm de diâmetro × 20 mm de altura) com meio de batata, dextrose e ágar (BDA) (HiMedia[®], Mumbai, Índia) a 25° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h por 15 dias.

2.3 Preparo de inóculos e avaliação da viabilidade de conídios

Aproximadamente 5 mg de conídios de GHA foram coletados da superfície da cultura com o auxílio de uma espátula. Os conídios foram suspensos em 10 ml de Tween 80 (mono-oleato de polioxietileno sorbitano) estéril a 0,01%, colocados em tubo de vidro (1 cm de diâmetro x 14 cm de altura) com ± 20 pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) e agitados em vórtex por 3 min e filtrados em algodão hidrófilo. Após diluição, o número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer e a concentração de conídios/cm² ou de conídios/ml foram ajustadas às concentrações finais requeridas para os testes.

No início de cada teste a viabilidade dos conídios foi verificada pela inoculação de 100 µl de conídios suspensos em água (10⁶ conídios/ml) em meio SDAL (Sabouraud, Dextrose, Ágar, Extrato de levedura a 1%) em placas de Petri. Entre 6–24 h de incubação do meio a 25° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h, a germinação foi quantificada em 100 conídios em quatro diferentes áreas do meio. Conídios foram considerados germinados quando os comprimentos dos tubos germinativos foram superiores aos diâmetros dos conídios (LUZ; FARGUES, 1998).

2.4 Produção de ninfas mortas por infecção fúngica

Para produção de ninfas de terceiro estágio (N3) mortas por infecção fúngica, cada indivíduo vivo foi mergulhado por 6 s em 5 ml de suspensão aquosa de conídios a 10⁸ conídios/ml com auxílio de pinça, e imediatamente colocado sobre papel absorvente. Em seguida, entre 5–10 ninfas tratadas foram transferidas para uma placa de Petri de vidro (90 mm de diâmetro e 15 mm de altura) com papel filtro no fundo, e as placas

incubadas a 28°C, UR > 98% e fotofase de 12 h. A mortalidade das ninfas foi avaliada diariamente por até 10 dias, as ninfas mortas foram retiradas e colocadas em nova placa estéreis, e estas incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas. O desenvolvimento de micélio e novos conídios na superfície dos indivíduos mortos foi avaliado diariamente com estereomicroscópio.

2.5 Avaliação do comportamento de ninfas expostas a conídios

2.5.1 Ensaios de escolha em placa de Petri

Em uma primeira série de experimentos, a parte superior e inferior de papel filtro circular (37,7 cm²) foram divididas em dois semicírculos iguais de 18,8 cm² cada. Um dos semicírculo em cada superfície foi tratado com auxílio de pincel, com conídios puros e recém raspados a 10⁸ conídios/cm². O papel filtro foi cuidadosamente perfurado com ponteiros cortadas (20 mm), e 4 foram colocadas na periferia do papel filtro e opostas em forma de cruz, e uma em posição central (Figura 1a) e o papel filtro foi ajustado a 10 mm do fundo. Cada papel preparado dessa forma foi colocado em uma placa de Petri (140 mm de diâmetro e 20 mm de altura) permitindo livre acesso das ninfas a ambas as superfícies do papel dentro da placa (LUZ; RODRIGUES; ROCHA, 2012) (Figura 1a). Em cada placa foi colocada no centro uma ninfa de primeiro estágio (N1), N3 ou ninfa de quinto estágio (N5), 10–15 dias após a muda (ou eclosão, no caso de N1). As placas com as ninfas foram mantidas a 27 ± 5 ° C e UR a 70 ± 10 % e fotofase de 12 hs. Os ensaios foram procedidos das 20:00–22:00 h, correspondente ao pico de atividade de *T. infestans*, em total escuridão (exceto durante um intervalo de aproximadamente 60 s que foram usados para achar a posição das ninfas nas placas). A posição das ninfas foi avaliada 30, 60, 90 e 120 min após o início do teste. Uma placa com cada estágio ninfal com papel filtro sem tratamento em ambos os semicírculos foi utilizada como controle para avaliar o comportamento das ninfas nas condições experimentais.

Em outra série de experimentos, o comportamento de escolha de esconderijo de ninfa de *T. infestans* foi monitorado em esconderijos simulados colocados em placas. Papéis filtro (50 cm²) foram enrolados em forma de tubo e colocados dentro tubos Falcon cortados na altura dos 30 ml constituindo um esconderijo padronizado simulado para *T. infestans* (Figura 1b). Em seguida, uma N3 morta por infecção fúngica e com desenvolvimento de conídios na superfície do cadáver foi colocada em um dos esconderijos. Um esconderijo com o cadáver e outro sem (controle) foram colocados em

placa de Petri (140 mm de diâmetro e 2 mm de altura) (Figura 1b). Em cada placa foi colocada no centro uma N1, N3 ou N5, 10–15 dias após a muda (ou eclosão, no caso da N1). As placas com os esconderijos e ninfas foram mantidas a $27 \pm 5^\circ \text{C}$ e UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 hs. Os ensaios foram procedidos e avaliados da mesma forma que o ensaio anterior. Ninfas encontradas nas placas, mas fora de esconderijos, foram consideradas presentes no esconderijo controle (sem conídios). Uma placa para cada estágio ninfal com dois esconderijos sem a presença de ninfa morta foi utilizada como controle para avaliar o comportamento das ninfas nas condições experimentais.

Foram feitas 10 repetições (cada uma com uma ninfa diferente) para cada um dos bioensaios.

2.5.2 Ensaio em olfatômetro em Y

A resposta comportamental de *T. infestans* a CVO liberados por *B. bassiana* foi avaliada em olfatômetro em Y feito em acrílico, com 36 cm total de comprimento, cada braço com 13 cm, corpo de 18 cm e 6 cm de diâmetro (Figura 2). Cada abertura dos braços foi conectada com mangueira de silicone de 1 cm de diâmetro a dois kitsatos de 50 ml. Um dos kitsatos foi preenchido com água destilada enquanto o outro servia para a liberação do odor. A evaporação da água presente nos kitsatos cria uma atmosfera de alta umidade no interior do olfatômetro, o que facilita a percepção dos químicos pelos artrópodes em teste. No fim da conexão do último kitsato de cada lado havia um fluxômetro regulado em 100 ml/min e um filtro de carvão ativado (Fluka, Sigma Aldrich[®], St. Louis, Estados Unidos). O fluxo de ar foi gerado por um compressor (Diapump/Fanem[®], São Paulo, Brasil) conectado à abertura do corpo do olfatômetro por uma mangueira de silicone, com comprimento de 2 m e 1 cm de diâmetro (OLIVEIRA FILHO, 2014).

Papéis filtro foram recortados em retângulos de 6 cm². Cada papel foi tratado, com auxílio de pincel, com conídios de *B. bassiana* a 10^8 conídios/cm² e imediatamente colocado em um dos kitsatos para a liberação de odor. No outro kitsato de liberação de odor foi colocado papel filtro sem conídios (controle).

N3 (n=56) foram colocadas delicadamente e individualmente na área de liberação do olfatômetro, em seguida, foram observadas entre 10 s e 2 min para registro do braço de escolha. As ninfas que não optaram ou não caminharam na haste durante esse período foram retiradas e reintroduzidas mais uma vez posteriormente. Durante os

ensaios o olfatômetro foi limpo com álcool etílico (99,5 %) no intervalo de três testes. Também a foi feita a inversão do braço tratado e controle a cada três testes.

Antes dos testes com conídios, foi testada a atração de ninfas (n=88) a CO₂ para padronização da técnica.

2.5.3 Análise estatística

Para todos os ensaios foi feito o teste do qui-quadrado (χ^2), com diferenças entre os grupos consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Ensaios em placa de Petri

No ensaio em placa de Petri com área de papel filtro tratada ou não com conídios de *B. bassiana* não foi encontrado efeito da presença de conídios sobre a escolha das ninfas independentemente do tempo ($0,4 \leq \chi^2 \leq 1,6$; $0,2 \leq P \leq 0,5$) (Tabela 1).

Já para o ensaio com esconderijos em placa de Petri, não foi encontrado efeito da presença da ninfa morta e micotizada sobre a escolha de esconderijo pelas ninfas, independentemente do estágio ninfal testado ou do tempo ($0 \leq \chi^2 \leq 0,4$; $0,5 \leq P \leq 1$) (Tabela 2).

3.2 Ensaio em olfatômetro em Y

No ensaio em olfatômetro em Y, ninfas demonstraram preferência significativa para o CO₂ ($\chi^2=5,5$; $P=0,02$). Testando conídios, não foi encontrado efeito significativo dos voláteis de conídios de *B. bassiana* sobre a escolha das ninfas para um braço do olfatômetro, 41,1% das ninfas escolheram o braço referente aos voláteis de conídios ($\chi^2=3,5$; $P = 0,06$).

4. Discussão

A infecção de um inseto com *B. bassiana* se inicia com o contato do conídio com a cutícula. Portanto, um novo hospedeiro deve estar próximo de um indivíduo morto por infecção fúngica e micotizado (com micélio e conídios sobre a cutícula), ou ter contato uma área tratada com conídios. A detecção desses conídios e posterior comportamento de repelência por um possível hospedeiro poderia determinar o fracasso de um micoinseticida. É notável nos esconderijos de *T. infestans* tanto no domicílio

quanto no peridomicílio a presença de centenas de indivíduos de todos os estágios e o comportamento de agregação dos mesmos, inclusive com cadáveres. Dessa forma, um cadáver com presença de conídios e micélio na superfície é importante fonte de contaminação e estabelecimento de uma epizootia induzida em condições favoráveis para o fungo.

Os testes de escolha por áreas tratadas com conídios de *B. bassiana* ou por esconderijos com presença da ninfa morta e micotizada indicaram que as ninfas não foram capazes de detectar os conídios em ambos os casos, ou não tiveram sua escolha influenciada pela presença do fungo. Outros insetos já apresentaram o mesmo comportamento: fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* não detectaram conídios de *M. anisopliae* sobre papel filtro úmido e ovipuseram nesses locais em testes de laboratório e campo (LOBO; RODRIGUES; LUZ, 2016) e o mosquito *Anopheles gambiae* não detectou conídios de *B. bassiana* e pousaram sobre substratos tratados (MNYONE et al., 2010).

Já foi observado efeito repelente de fungos entomopatogênicos em insetos, como por exemplo *A. gambiae* adultos foram repelidos por conídios secos de *M. anisopliae* (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004). Também foi observado efeito repelente de *B. bassiana* ao hemíptero *Anthocoris nemorum* e da joaninha *Coccinella septempunctata* (OMOND, 2007). KRAMM; WEST; ROCKENBACH (1982) demonstraram que *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae) saudáveis não entraram em contato com cadáveres infectados com *M. anisopliae*, sugerindo mediação de um sinal volátil.

O perfil de voláteis liberados por *B. bassiana* já foi caracterizado, e pode variar de acordo com o isolado fúngico, e outros fatores, como se conídios estão em cultura ou secos, e o meio em que são cultivados (CRESPO et al. 2006, MBURU et al., 2009). No presente trabalho, tanto em ensaios de placa quanto em olfatômetro Y foram utilizados conídios recém raspados da superfície de cultura BDA, um meio simples e comumente utilizado para o cultivo de alguns fungos entomopatogênicos, e o fungo foi passado em hospedeiro antes do repique para os testes. Condições de crescimento diferentes de *B. bassiana* ou mesmo preparo diferentes dos conídios, poderiam alterar o perfil de CVO liberados e consequentemente a resposta das ninfas. Não se sabe ainda se a liberação desses voláteis pelos conídios pode variar qualitativamente ou quantitativamente em função do tempo.

A concentração do inóculo também pode influenciar na resposta comportamental de um hospedeiro artrópode a fungos. A formiga *Coptotermes formosanus*, por exemplo, é capaz de diferenciar *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *B. brongniartii* por seus odores específicos, e as respostas da antena por eletroantenografia aumentaram com o aumento da concentração de conídios na suspensão, que variou de 10^3 a 10^7 conídios/ml (YANAGAWA; YOKOHARI; SHIMIZU, 2008). O presente estudo teve caráter qualitativo, portanto foi utilizado de 10^8 conídios/cm², quantidade de conídios suficiente para a infecção de um triatomíneo em condições favoráveis ao fungo. Mesmo com esse inóculo alto, ninfas de *T. infestans* não foram repelidas por conídios de *B. bassiana* nas condições testadas, reforçando seu potencial para controle biológico desse vetor.

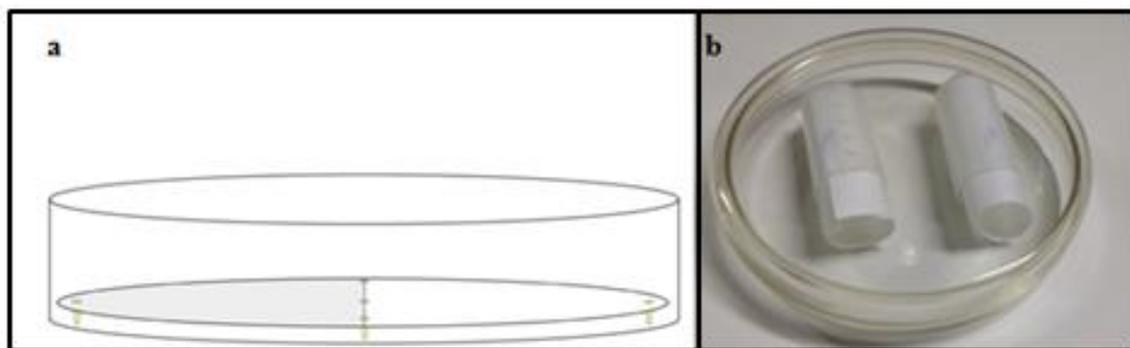


Figura 1. Ensaios em placa de Petri. Representação esquemática de placa com papel filtro circular dividido em dois semicírculos e apoiado sobre ponteiros cortadas, permitindo livre acesso das ninfas a superfície inferior e superior do papel (a). Placa contendo dois esconderijos simulados (b). Fonte: arquivo pessoal, 2014.

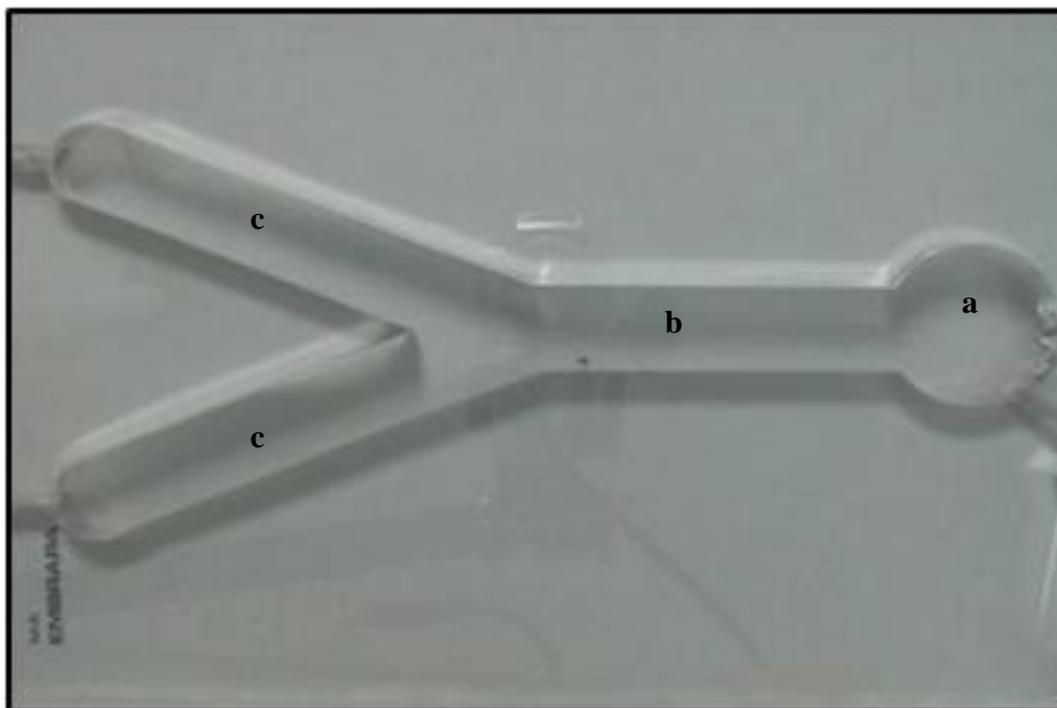


Figura 2. Olfatômetro em Y em acrílico. Área de liberação das ninfas (a), haste ou corpo (b), braços para escolha das ninfas (c). Fonte: arquivo pessoal, 2014.

Tabela 1. Porcentagem (%) de ninfas de primeiro, terceiro ou quinto estágio (N1, N3, N5) de *Triatoma infestans* encontradas sobre área tratada com conídios de *Beauveria bassiana* a 10^8 conídios/cm², em diferentes tempos após o início do ensaio.

Tempo (min) ^a	% de ninfas encontradas em área tratada		
	N1	N3	N5
30	30	50	60
60	30	50	60
90	20	30	60
120	40	60	60

a) min = minutos

Tabela 2. Porcentagem (%) de ninfas de primeiro, terceiro e quinto estágio (N1, N3, N5) de *Triatoma infestans* encontradas em esconderijo com a presença de ninfa morta e micotizada com conídios de *Beauveria bassiana*, em diferentes tempos após o início do ensaio.

Tempo (min) ^a	% de ninfas encontradas em esconderijo com cadáver micotizado		
	N1	N3	N5
30	50	50	50
60	50	50	60
90	50	40	60
120	50	40	60

a) min = minutos

5. Bibliografia

DICKE, M.; GROSTAL, P. Chemical detection of natural enemies by arthropods: an ecological perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 1–23, 2001.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, P. Contribution of the horizontal transmission on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Journal of Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, p. 135–140, 2011.

JUÁREZ, M. P. et al. Trap for hematophagous insects, control method and method of detection of these insects (*Triatoma infestans*). Patent pending, Argentina. AR068790 INPI. Boletín 568:5. Spanish, 2008.

KRAMM, K. R.; WES, D. F.; ROCKENBACH P. G. Termite pathogens: transfer of entomopathogen, *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 1–6, 1982.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 34–47, 2013.

LIMA, W. P. et al. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 638–641, 2009.

LOBO, L. S.; RODRIGUES J; LUZ, C. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 386–401, 2016.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 97–103, 1998.

LUZ, C. et al. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, 839–846, 1998.

LUZ, C. et al. Control of *Triatoma infestans* with *Beauveria bassiana*: preliminary assays on formulation and application in the field. **Anais da Sociedade de Entomologia Brasileira**, v. 28, p. 101–110, 1999.

LUZ, C; RODRIGUES, J.; ROCHA, L. F. N. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, v. 122, p. 29–35, 2012.

MBURU, D. M. et al. 2009. Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the

termite *Macrotermes michaelseni*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 774–780, 2009.

MBURU, D. M.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A. Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michealseni*, **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 101–108, 2013.

MNYONE, L. L. et al. Anopheline and culicine mosquitoes are not repelled by surfaces treated with entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Parasite and Vectors**, v. 3, p. 80, 2010.

OLIVEIRA FILHO, J. G. **Presença de repelentes naturais no odor de cães da raça beagle contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

OMOND, E. The overwintering interactions of the seven spot ladybird (*Coccinella septempunctata*) and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. PhD thesis. Anglia Ruskin University, Cambridge, 2007.

PEDRINI, N. et al. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p. 434, 2009.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* among adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 45.

YANAGAWA, A.; YOKOHARI, F.; SHIMIZU, S. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* to entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 165–170, 2008.

**5.2 Manuscrito 2 - Avaliando a expressão gênica durante a patogênese:
Uso de qRT-PCR para acompanhamento da produção de toxinas pelo
fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* durante a infecção e
resposta imune do hospedeiro *Triatoma infestans*.**

Lobo et al. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 128, p. 14–21, 2015.

Resumo: Fungos entomopatogênicos secretam metabólitos secundários tóxicos durante a invasão na hemocele do inseto, como parte do processo de infecção. Esses compostos não são frequentemente mencionados como fatores de virulência, e o papel da maioria deles é insuficientemente compreendido, além disso, a expressão desses metabólitos durante a infecção ainda é questionada. Um grande obstáculo à elucidação desses questionamentos ainda é a baixa sensibilidade das técnicas de detecção bioquímicas (por exemplo, HPLC) em amostras complexas que podem conter apenas traços de moléculas fúngicas dentro do inseto. No presente estudo, PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada para medir os níveis de transcritos do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* que codificam para as enzimas sintetases dos metabólitos secundários tenelina (*BbtenS*), beauvericina (*BbbeaS*) e bassianolida (*BbbslS*) durante a infecção em *Triatoma infestans*, vetor da doença de Chagas. Foi feita quantificação absoluta em tempos diferentes após o tratamento dos insetos com várias concentrações de propágulos, tanto pela imersão de indivíduos em suspensão de conídios, quanto pela injeção de blastosporos. *BbtenS* e *BbbeaS* foram altamente expressos em indivíduos tratados com conídios, 3 e 12 dias após o tratamento. Nos indivíduos injetados com blastosporos, a expressão de *BbtenS* e *BbbeaS* teve um pico 24 horas após a injeção e também foram grandemente expressos em cadáveres. Os níveis de transcritos de *BbbslS* foram muito menores em todas as condições testadas. Os padrões de expressão de genes que codificam para proteínas da imunidade humoral de *T. infestans* foram também avaliados pela mesma técnica. Essa metodologia baseada em qRT-PCR pode contribuir para decifrar, a nível molecular, as dinâmicas da infecção por fungos entomopatogênicos.

Palavras-chave: metabólitos secundários, peptídeos não ribossomais, vetor da doença de Chagas, imunidade humoral, interação fungo-inseto.

1. Introdução

Beauveria bassiana s.l. é um fungo entomopatogênico generalista utilizado em programas de controle microbiano em todo o mundo. Esse fungo representa uma ferramenta promissora para o controle de artrópodes vetores com importância médica (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012, GEORGE et al., 2013, JUÁREZ et al., 2000; LUZ et al., 1998, 2004, PEDRINI et al., 2009, ROMAÑA & FARGUES, 1992), porque assim como outros fungos Hipocreales, não precisa ser ingerido para

iniciar a infecção, e pode invadir os insetos hospedeiros através da cutícula. Existe abundante informação bioquímica sobre a habilidade de *B. bassiana* degradar proteínas, quitinas e lipídeos cuticulares (a maioria hidrocarbonetos) (FANG et al., 2005, 2009, PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007, PEDRINI et al., 2010, 2013, ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986, ST. LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986, ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1988, ZHANG et al., 2012). Hifas penetram na hemocele, onde o fungo coloniza e se prolifera pelo hospedeiro, replicando-se como corpos hifais (LEWIS; ROBALINO; KEYHANI, 2009, WANCHOO; LEWIS; KEYHANI, 2009).

Durante o processo de invasão, muitas linhagens de fungos secretam compostos tóxicos ou imunossupressores, frequentemente considerados metabólitos secundários que facilitam e/ou protegem o processo de invasão fúngica, ou ainda conferem resistência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, respectivamente (FERRON, 1985, ROBERTS; GUPT; ST. LEGER, 1992, TRIENENS; ROHLFS, 2012). Esses compostos têm sido bem caracterizados em uma variedade de fungos filamentosos e incluem policetídeos e peptídeos não ribossomais (GUPTA et al., 1991, MOLNAR; GIBSON; KRASNOFF, 2010). *B. bassiana* s.l. produz os peptídeos ciclo-oligômeros não-ribossomais beauvericina e bassianolida, a dicetomorfolina bassiatina, o peptídeo cíclico beauverolides, a dibenzoquinona oosporina e a 2-piridona tenelina (GIBSON et al., 2014, MOLNAR, GIBSON, KRASNOFF, 2010). As biossínteses de tenelina, beauvericina e bassianolida são bem conhecidas, e os genes que codificam para tenelina sintetase (*BbtenS*), beauvericina sintetase (*BbbeaS*) e bassianolida sintetase (*BbbslS*) já foram caracterizados (ELEY et al., 2007, XU et al., 2008, 2009). Apesar de alguns desses compostos não serem requeridos para uma infecção, é provável que metabólitos secundários não letais contribuam para o processo da doença no inseto de várias formas sutis, por exemplo, perturbando processos bioquímicos e fisiológicos que tenham o potencial de exercer efeitos na infecção fúngica como um todo; ao enfraquecer sistemas de defesa do hospedeiro, e/ou limitando microrganismos competidores. Abordagens moleculares com alta sensibilidade em amostras biológicas complexas são necessárias para um melhor entendimento de onde e como esses compostos atuam durante várias fases do processo patogênico (ROHLFS; CHURCHILL, 2011).

Após uma invasão microbiana, o inseto inicia dois tipos de reações imunes inatas: as respostas celulares e as humorais. As primeiras envolvem fagocitose, agregação de hemócitos e encapsulação do patógeno. As segundas incluem a indução de

vários peptídeos antimicrobianos (AMPs), lectinas e a cascata da profenoloxidase. A transcrição de AMPs é regulada principalmente pela via de transdução de sinal por receptor tipo Toll, e os peptídeos resultantes são então secretados na hemocele para prevenir a proliferação microbiana (PAL; WU, 2009). *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), um vetor importante da doença de Chagas na América Central, induz AMPs, por exemplo defensinas, tanto na hemolinfa quanto no intestino do inseto após a infecção bacteriana (LOPEZ et al., 2003). Entretanto, infecção com o protozoário parasita *Trypanosoma rangeli* não modifica a expressão de defensinas, mas ativa lectinas, afetando a motilidade do parasita e sua sobrevivência, além de ativar a cascata da profenoloxidase (GARCIA et al., 2009).

B. bassiana é efetiva contra todos os estádios de *Triatoma infestans*, vetor importante da doença de Chagas em alguns países da América do Sul, tanto em laboratório quanto em campo (LUZ et al., 1998, PEDRINI et al., 2009). Utilizando uma formulação em pó contendo *B. bassiana* e terra diatomácea, mortalidades de ninfas variaram de 80–100%, com tempos letais entre 5 e 9 dias, enquanto 90% dos adultos morreram entre 10–11 dias (FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011). Uma armadilha de “atração-infecção” baseada nessa mesma formulação em pó combinada com uma substância química atrativa (CO₂) para *T. infestans* foi testada em casas para controle desse vetor em uma zona endêmica na divisa da Argentina com a Bolívia. A população de insetos foi reduzida em 50% após 30 dias de intervenção (PEDRINI et al., 2009). Além disso, a transmissão horizontal de conídios foi dependente da densidade de indivíduos, demonstrando sua contribuição para a infecção da população (FORLANI; PEDRINI, JUÁREZ, 2011).

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia útil para avaliar a expressão de genes envolvidos na produção de toxinas de *B. bassiana* como tenelina, beauvericina e bassianolida, em função do tempo, durante a infecção em ninfas de *T. infestans*. Também foram investigados os níveis de expressão gênica de proteínas pertencentes à resposta imune humoral de insetos, incluindo profenoloxidase, hemolectinas e defensinas, a fim de ajudar no entendimento a nível molecular de seus papéis na interação inseto-patógeno.

2. Materiais e métodos

2.1 Origem e criação de *Triatoma infestans*

Ninfas de *T. infestans* utilizadas foram provenientes de colônia do Instituto de Investigações Bioquímicas (INIBIOLP) da Universidade Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Os indivíduos foram criados em frascos cilíndricos leitosos de plástico, com 10 cm de diâmetro, 15 cm de altura e com tiras de cartolina dentro dos frascos. Os frascos foram fechados com filó e elástico e mantidos a 30° C, 50 ± 10% de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 h. Os insetos foram alimentados em ratos de laboratório tranquilizados e anestesiados.

2.2 Origem e cultivo de *Beauveria bassiana*

B. bassiana GHA foi isolada originalmente de larva-alfinete de milho (*Diabrotica speciosa*) em milho, em Oregon, Estados Unidos e está depositada como ARSEF 201 na Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos do Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ARSEF), Ithaca, Estados Unidos. GHA (produto em pó molhável Botanigard 22 WP[®], Laveland Internacional, Butte, Estados Unidos) foi cultivada em placas com Meio Completo líquido contendo 0,4 g de KH₂PO₄, 1,4 g de Na₂HPO₄, 0,6 g de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g de KCl, 0,7 g de NH₄NO₃.7H₂O, 10 g de glicose, 5 g de extrato de levedura e 15 g de ágar em 1000 ml de água destilada (ALVES, 1998). As placas foram incubadas a 26° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h por 12 dias.

2.3 Preparo de suspensão aquosa e avaliação da viabilidade de conídios

Conídios de GHA foram coletados da superfície da cultura com o auxílio de uma espátula, suspensos em 10 ml de Tween 80 (mono-oleato de polioxietileno sorbitano) estéril a 0,01%, colocados em tubo de vidro (1 cm de diâmetro x 14 cm de altura) com ± 20 pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) e agitados em vórtex por 3 min e filtrados em algodão hidrófilo. Após diluição, o número de conídios/ml foi quantificado em câmara de Neubauer e as suspensões foram ajustadas às concentrações finais requeridas para os testes.

No início de cada teste a viabilidade dos conídios foi verificada pela inoculação de 100 µl de conídios suspensos em água (10⁶ conídios/ml) em meio SDAL (Sabouraud, Dextrose, Ágar, Extrato de levedura a 1%) em placas de Petri. Entre 6–24 h de incubação do meio a 25° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h, a germinação foi quantificada em 100 conídios em quatro diferentes áreas do meio. Conídios foram

considerados germinados quando os comprimentos dos tubos germinativos foram superiores aos diâmetros dos conídios (LUZ; FARGUES, 1998).

2.4 Produção de blastosporos

Para produção de blastosporos, *B. bassiana* GHA foi cultivada em meio líquido SDL (20g de glicose, 5 g de peptona, 5 g de triptona e 5 g de extrato de levedura) em 1000 ml de água destilada. Os frascos foram fechados com tampas de algodão hidrófobo e gaze, e autoclavados por 20 min a 121° C. Posteriormente conídios extraídos de um cultivo em BDA e suspensos em água foram inoculados no meio, na concentração final de 5×10^5 conídios/ml. Em seguida foram acrescidos 100 µl de ampicilina, e os frascos mantidos em agitador a 200 RPM e 26 °C.

Após 72 h de agitação, o meio com blastosporos foi filtrado em membrana Miracloth (Merck Milipore[®], Darmstadt, Alemanha), transferido para tubos de plástico tipo Falcon e o filtrado centrifugado a 3000 RPM por 4 min. O líquido sobrenadante no tubo foi retirado com auxílio de uma pipeta. Os blastosporos foram resuspensos em 10 ml de água destilada estéril, a suspensão centrifugada novamente como descrito anteriormente e os blastosporos resuspensos em 10 ml de NaCl a 0,9 %. Os blastosporos foram contados em câmara de Neubauer, e doses requeridas para o teste foram ajustadas.

2.5 Aplicação de suspensão aquosa de conídios em ninfas

Ninfas de quarto estágio (N4) de *T. infestans* foram mergulhadas por 6 s em 5 ml de suspensão aquosa de conídios a 10^4 ou 10^6 conídios/ml, ou em água + Tween a 0,01% (controles) com auxílio de pinça, e imediatamente colocadas sobre papel absorvente. Os indivíduos foram então mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $75\% \pm 10$ de UR, e 12 h de fotofase.

2.6 Injeção de blastosporos

Para injeção de blastosporos, 3 µl de suspensão foram injetados na hemocele do abdomen de N4, na parte mediana do primeiro segmento abdominal com uma seringa de 5 µl (Hamilton[®], Reno, Estados Unidos) nas concentrações de finais de 4×10^4 ou 4×10^6 blastosporos/ml (doses finais de 120 ou 12000 blastosporos por indivíduo, respectivamente). Para o controle, cada ninfa foi injetada da mesma maneira com 3 µl

de NaCl a 0,9%. As ninfas foram então mantidas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $75\% \pm 10 \text{ UR}$, e 12 h de fotofase. Após a morte das ninfas, um grupo foi exposto à câmara úmida ($\text{UR} > 98\%$).

2.7 Bioensaios de mortalidade

Para os ensaios de mortalidade, diferentes lotes de ninfas foram tratadas com as mesmas concentrações de suspensão de conídios como explicado anteriormente no item 2.5; ou injetadas com as mesmas doses de blastosporos, como explicado anteriormente nos itens 2.6. A mortalidade foi checada diariamente por quatro semanas para ninfas tratadas com conídios e durante uma semana para ninfas injetadas com blastosporos. As ninfas mortas foram colocadas em câmaras úmidas individuais. O tempo letal de 50% (TL_{50}) foi estimado por $\Sigma (\text{dias}_n \times \text{ninfas mortas}_n) / \text{total de ninfas mortas}$ (MOORE et al., 1995).

2.8 Extração de RNA total

Foi feita a extração de RNA total (inseto + fungo) das ninfas inteiras aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação tópica de conídios (e controles topicados com água) e 12 h, 24 h e 48 h após a injeção de blastosporos (e controles injetados com solução salina 0,9%). As ninfas foram mantidas em RNA later (Ambion[®], Austin, Estados Unidos) a -20°C até o momento das extrações.

Foi utilizado RNAeasy Mini kit (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para as extrações. Cada amostra foi macerada em homogeneizador de vidro com 600 μl de buffer RLT fornecido pelo kit. Para remoção de traços de DNA contaminantes, as amostras foram tratadas com 20 μl de DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen[®]) e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. A verificação da integridade do RNA total foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (peso/volume). O RNA foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop (Thermo[®], Wilmington, Estados Unidos) e em seguida estocado a -80°C até o momento do uso.

2.9 Análise da expressão gênica

2.9.1 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi feita reação com 1 μg de RNA total por amostra (iScript cDNA Synthesis, Bio-Rad[®]). A programação do termociclador (Veriti, Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos) foi: ciclo 1: 25°C , 5 min; ciclo 2: 42°C , 30 minutos; 85°C , 5 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

2.9.2 Desenho de iniciadores

Os iniciadores usados para os genes das toxinas de *B. bassiana* foram desenhados conforme as sequências disponíveis no Genbank para *BbtenS* AM409327, *BbbslS* FJ439897 e *BbbeaS* EU886196 (ELEY et al., 2007, XU et al., 2008, 2009) (Tabela 1). Os iniciadores para amplificação de genes envolvidos na imunidade de *T. infestans* (*TiPPO*, *TiDEF* e *TiHL*) foram selecionados de biblioteca de expressão EST obtidas de tegumento de *T. infestans* no INIBIOLP (Calderón-Fernandéz & Juárez, dados não publicados) (Tabela 1).

Para as reações de qPCR, a amplificação foi feita em Mx3000P QPCR System (Stratagene[®], California, Estados Unidos) empregando 20 ng de DNA total sintetizados para cada reação (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad[®]).

O seguinte programa de amplificação foi utilizado: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos com três segmentos de amplificação: 30 s a 95 °C para desnaturação, 30 s a 56 °C para anelamento, e 30 s a 72 °C para alongação da cadeia de DNA.

Foi usado o método ciclo limiar ($\Delta\Delta C_t$: threshold cycle - C_T) para quantificação relativa dos genes da imunidade (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). A quantificação relativa baseia-se na comparação com um gene endógeno estável e conhecido (gene de controle). Foi utilizada actina como gene de controle para o inseto (*Ti actina*). Controles negativos foram feitos com cDNA de insetos não infectados. Reações contendo pares de iniciadores sem amostras foram também incluídos como controles brancos.

Foi feita a quantificação absoluta dos genes de sintetase de toxinas *BbtenS*, *BbbeaS* e *BbbslS*. A quantificação absoluta baseia-se na comparação com um padrão cujo número de moléculas é conhecido. As curvas padrão (Figura 1) foram feitas posteriormente no INIBIOLP, de acordo com GÓMEZ-DOÑATE et al. (2012). Cada ensaio foi realizado em duplicata, com pelo menos três repetições independentes para cada amostra.

2.10 Análise estatística

Para os ensaios de mortalidade, as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste t de Student. Para análise da expressão gênica, resultados percentuais foram transformados em arcsin e examinados com análise de variância

(ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (SNK). Médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Bioensaios

Para definir os períodos de tempo que foram analisados nos experimentos de expressão gênica, a mortalidade acumulada foi previamente avaliada nas ninfas tratadas com conídios ou blastosporos. Nas ninfas tratadas com conídios (Tabela 2), as mortalidades acumuladas ao final de 4 semanas foram 57 ± 9 % (10^4 conídios/ml) e 83 ± 6 % (10^6 conídios/ml) ($P = 0,046$). Os TL_{50} foram $15,4 \pm 1$ dia (10^4 conídios/ml) e $10,3 \pm 1,4$ dias (10^6 conídios/ml) ($P = 0,017$). A mortalidade dos indivíduos do grupo controle foi de 7 ± 3 % no mesmo período. Em ninfas injetadas com blastosporos (Tabela 3), a mortalidade acumulada no 7º dia foi de 88 ± 6 % (120 blastosporos/ninfa) e 97 ± 1 % (12000 blastosporos/ninfa), e os TL_{50} foram $4,3 \pm 0,1$ % e $2,4 \pm 0,2$ % para 120 e 12000 blastosporos/ninfa, respectivamente. Não foi observada mortalidade nos indivíduos do grupo controle.

3.2 Expressão de genes de *Beauveria bassiana* que codificam para sintetases de toxinas

Em ninfas imersas em suspensão de conídios, a expressão dos genes de sintetases de toxinas foi dependente da concentração de conídios utilizada e do tempo de experimento ($F_{23,48} = 8,4$; $P < 0,0001$). A 10^6 conídios/ml, tanto *BbtenS* quanto *BbbeaS* foram expressas no 3º dia após o tratamento (a. t.) alcançando (1334 ± 440 , 1299 ± 475 GC/ng respectivamente) (Figura 2). Após essa expressão inicial, os níveis de transcritos caíram no dia 6 (*BbtenS*: $P < 0,001$, *BbbeaS*: $P < 0,01$) e 9 (*BbtenS*: $P < 0,01$, *BbbeaS*: $P < 0,001$). No 12º dia a. t. foi encontrado um segundo pico de transcrição, alcançando valores similares aos encontrados para o 3º dia (1432 ± 113 e $1313,5 \pm 459,6$ CG/ng de RNA para *BbtenS* e *BbbeaS*, respectivamente (Figura 2). Na menor concentração de conídios (10^4 conídios/ml), onde foi antecipado que o processo de infecção demoraria mais tempo para começar, os níveis de transcritos de *BbtenS* e *BbbeaS* atingiram um pico 9 dias a. t., com valores de 882 ± 104 ($P < 0,001$) e 261 ± 71 GC/ng de RNA ($P < 0,05$) respectivamente. Ao contrário dos valores encontrados para a maior concentração, um segundo pico de expressão não foi encontrado aos 12 dias a. t. (Figura 2).

Em ninfas injetadas com blastosporos foi encontrado efeito significativo da dose e do tempo sobre os níveis de transcritos ($F_{14,3} = 53,7$; $P < 0,0001$). *BbtenS* e *BbbeaS* foram significativamente mais expressos na dose de 12000 blastosporos/ninfa do que na dose de 120 blastosporos/ninfa ($P < 0,001$) (Figura 3). O número de cópias de genes de *BbtenS* atingiu o maior valor 24 h após a injeção de blastosporos em ninfas, independente da dose ($P < 0,001$), com valores de 3472 ± 230 CG/ng de RNA (120 blastosporos/ninfa) e 5028 ± 644 CG/ng de RNA (12000 blastosporos/ninfa). Em cadáveres, foi encontrado efeito significativo da exposição a UR > 98% ($F_{5,12} = 8,6$; $P = 0,0012$). Foram encontrados valores de 3745 ± 230 (*BbtenS*) e 2603 ± 780 (*BbbeaS*) CG/ng RNA para os cadáveres expostos a UR > 98%, com diferença significativa sobre os não expostos ($P < 0,01$ para *BbtenS* e $P < 0,05$ para *BbbeaS*) (Figura 3).

Foram encontrados níveis de transcritos de *BbbslS* muito baixos tanto em ninfas tratadas com conídios ou injetadas com blastosporos, independentemente do tempo ou da concentração/dose de *B. bassiana* testada.

3.3 Expressão de genes que codificam para proteínas de imunidade humoral de *T. infestans*

Em ninfas imersas em suspensão de conídios, foi encontrado efeito significativo do tempo sobre a expressão relativa de *TiPPO* nas duas concentrações de conídios testadas, com diferença significativa 9 dias a. t. na concentração de 10^4 conídios/ml ($F_{3,9} = 30$; $P < 0,01$) e diferença aos 3 e 12 dias a. t. na concentração de 10^6 conídios/ml ($F_{3,10} = 7,4$; $P < 0,01$) (Figura 4). Embora a expressão relativa de *TiDEF* e *TiHL* tenha sido maior aos 6 dias para as duas concentrações testadas, não foi encontrado efeito significativo do tempo sobre a expressão relativa desses genes ($F_{3,8;3,9} \leq 3,59$; $P \geq 0,054$) e ($F_{3,9} \leq 1,38$; $P \geq 0,31$), respectivamente, independentemente da concentração de conídios (Figura 4).

Em ninfas injetadas com blastosporos, a expressão dos três genes de imunidade variou significativamente de acordo com o tempo de infecção ($F_{3,8} \leq 531$; $P \geq 0,01$) somente com a menor dose de blastosporos (120 blastosporos/ninfa), com diferença significativa 12h a.t. para *TiPPO*, 12 h, 24 h e 48 h para *TiHL* e 12 h e 48 h para *TiDEF* (Figura 5). Em contraste, não foi observada indução sobre os controles com 12000 blastosporos/ninfa. Nessa dose, foram encontrados valores de $0,4 \pm 0,2$ (12 h) e $1,1 \pm$

0,2 (24 h) para *TiPPO*; os valores para foram $0,8 \pm 0,4$ (12 h) e $0,9 \pm 0,1$ (24 h) para *TiHL* e $1 \pm 0,3$ (12 h) e $0,5 \pm 0,2$ (24 h) para *TiDEF* (Figura 5).

4. Discussão

A biossíntese de metabólitos secundários por *B. bassiana* ocorre por reações iterativas catalisadas por enzimas codificadas por *gene clusters*, incluindo sintetases peptídicas não ribossomais (SPNR), sintetases policetílicas (SPC) e genes híbridos SPNR- SPC (SÜSSMUTH et al., 2011). Comparações entre os genomas de fungos sequenciados até o momento demonstram que eles são especialmente abundantes nesses genes, e a maioria dos produtos dessas vias permanece desconhecida (GIBSON et al., 2014). Entretanto, algumas dessas vias foram caracterizadas geneticamente e bioquimicamente em *B. bassiana*, incluindo as da síntese da tenelina, beauvericina e bassianolida (ELEY et al., 2007, XU et al., 2008, 2009). Ainda não são conhecidos os genes envolvidos na biossíntese de outros metabólitos secundários como beauverolides, oosporinas e bassiatina. Tampouco se conhece o papel preciso destes compostos nas atividades entomopatogênicas de *B. bassiana*. Pela abordagem de *knockout* de genes de sintetase, foi demonstrado que bassianolida é um fator de virulência altamente significativo contra *Galleria mellonella*, *Spodoptera exigua*, e *Helicoverpa zea* (XU et al., 2009). Em contraste, a beauvericina possui um papel importante, porém dispensável na virulência de *B. bassiana* contra os mesmos insetos hospedeiros (XU et al., 2008); já a tenelina parece não contribuir na virulência de *B. bassiana* contra *G. mellonella* (ELEY et al., 2007). Apesar destes dados, ainda não havia sido encontrada nenhuma evidência conclusiva de que esses metabólitos secundários seriam produzidos pelo fungo dentro do inseto durante a infecção. Um grande desafio a essa questão tem sido o fato de que as técnicas usuais utilizadas para a detecção falham ao tentar rastrear essas moléculas fúngicas dentro do inseto, embora cromatografia líquida (LC) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram capazes de detectar metabólitos secundários de bolos de micélio e culturas de células livres (GUPTA et al., 1995, XU et al., 2007), bem como de pools de insetos infectados com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (AMIRI-BESHELI et al., 2000, SKROBEK; SHAH; BUTT, 2008) ou *B. brongniartii* (STRASSER et al., 2000). A análise de insetos individuais infectados ao invés de amostras em pool é essencial a fim de providenciar uma indicação do padrão de expressão de metabólitos secundários durante o tempo de duração da infecção fúngica (MOLNAR; GIBSON; KRASNOFF et al., 2010). Além

disso, a sensibilidade de LC e HPLC não permite a detecção de poucas moléculas que se espera que sejam produzidas quando o fungo está crescendo na hemocele dos insetos. A respeito disso, a expressão de genes envolvidos na biossíntese desses metabólitos quando o fungo cresce dentro do inseto hospedeiro pode ajudar a entender melhor seu papel na patogênese.

A maioria dos genes centrais de metabólitos secundários é silenciada durante o cultivo em meios artificiais, e requerem situações específicas para induzir sua expressão, como as que são providas pelo ambiente natural durante a infecção (GIBSON et al., 2014). Nesse estudo, foi demonstrado que *BbtenS*, *BbbeaS* e em menor extensão *BbbslS* são expressos nos insetos infectados (*T. infestans*) independentemente da metodologia usada para inoculação fúngica. Entretanto, os três genes foram expressos diferencialmente em diferentes estágios da infecção sugerindo assim que cada um tem um discreto papel em várias fases do processo patogênico. Tanto *BbtenS* quanto *BbbeaS* foram altamente expressos em insetos tratados com conídios 3 e 12 dias a. t., o que coincide com picos de mortalidade previamente observados em *T. infestans* infectados com *B. bassiana* (LUZ et al., 1998). Os altos níveis de expressão de *BbtenS* e *BbbeaS* detectados 12 dias a. t. corrobora com os altos níveis de metabólitos secundários encontrados em insetos moribundos; SKROBEK; SHAH; BUTT (2008) reportaram que níveis de destruxina tiveram um pico no momento da morte do inseto.

Em insetos injetados com blastosporos, a expressão de *BbtenS* teve um pico 24 h a. t.; esse gene também foi altamente expresso em cadáveres, bem como o gene *BbbeaS*. Esses resultados corroboram com o papel bem conhecido de metabólitos secundários que possuem atividade antibiótica. Cadáveres micotizados aparentemente os produzem para prevenir o desenvolvimento de outros microorganismos que poderiam eventualmente competir pelo mesmo substrato. Foi reportado que cadáveres de larvas de bicho-de-seda micotizados com *M. anisopliae* continham níveis até 30 vezes maiores que aqueles detectados 5 dias a. t., quando os insetos ainda estavam vivos (SUZUKI; KAWAKAMI; TAMURA, 1971).

A expressão de genes da imunidade de insetos demonstrou um comportamento diferencial durante a infecção fúngica. Em insetos tratados com conídios, os transcritos correspondentes foram mais abundantes 6 e 9 dias a. t., coincidente com os menores níveis de expressão de genes de sintetase fúngica. Esse padrão de expressão sugere que as respostas imunes dos hospedeiros são críticas ao tentar limitar ou parar a infecção fúngica. Em insetos injetados com blastosporos, foi notada uma correlação entre a

expressão de genes da imunidade humoral de insetos e o curso da infecção com a menor dose de blastosporos. Esses dados sugerem que as respostas humorais são moduladas pela dose, e essa descoberta é uma importante conclusão desse trabalho, pois as respostas do hospedeiro podem não ser uniformes, mesmo a um patógeno em particular, e é possível que dependam do nível de exposição (inóculo) a um potencial patógeno.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a qRT-PCR é uma técnica útil para acompanhar a expressão de genes de um fungo entomopatogênico dentro de um inseto hospedeiro infectado. A metodologia é suficientemente sensível para detectar uma ampla variedade de transcritos fúngicos em uma amostra de cDNA mista (inseto e fungo). Além disso, a possibilidade de medir os níveis de expressão de genes de fungos da mesma amostra expande a habilidade de monitorar o curso de tempo do processo de infecção, e poderia potencialmente ser aplicado a outros sistemas fungo-inseto.

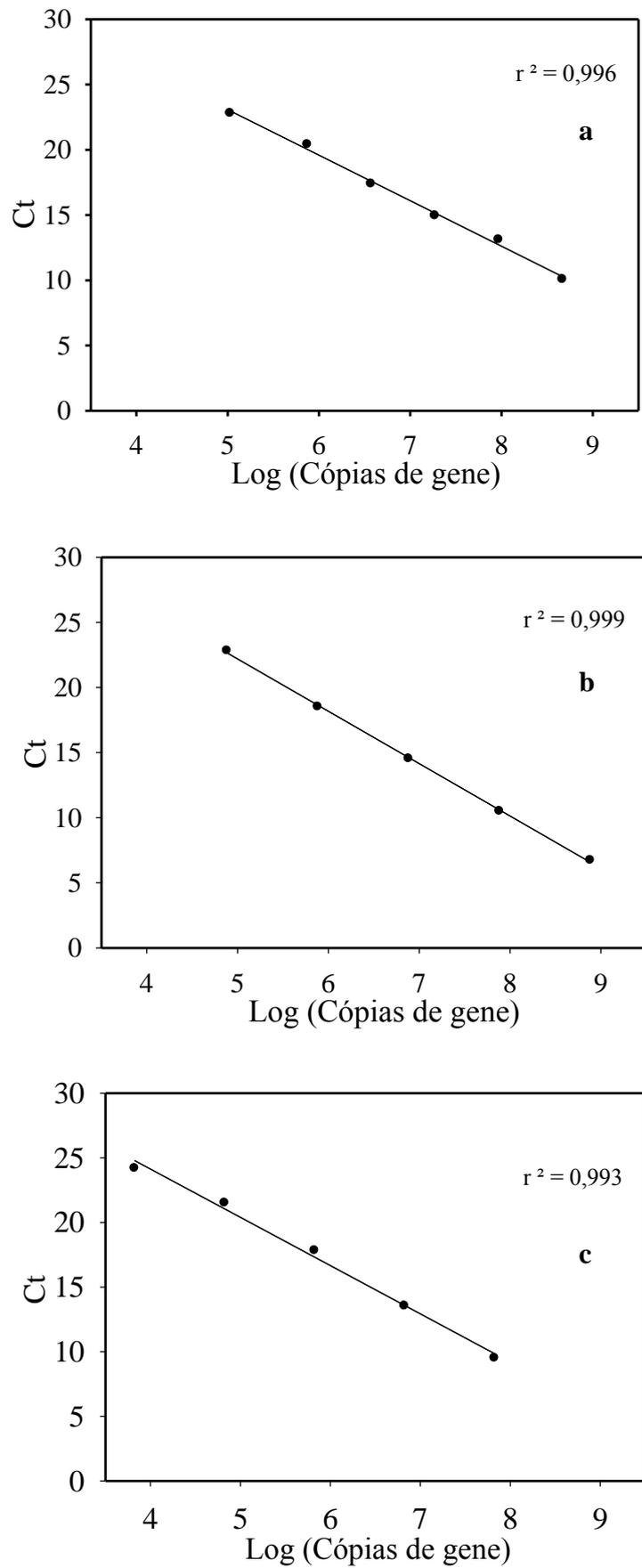


Figura 2. Curvas padrão para quantificação absoluta dos genes *BbtensS* (a), *Bbbeas* (b) e *BbbslS* (c).

Tabela 2. Mortalidade acumulada média (% \pm erro padrão da média, EP) e tempo letal de 50% (TL₅₀) (dias \pm EP) de ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans* 7–28 dias após imersão em suspensão de conídios de *Beauveria bassiana*.

Concentração (conídios/ml)	Mortalidade				TL ₅₀ (dias \pm EP)
	dia 7	dia 14	dia 21	dia 28	
10 ⁴	10 \pm 5	30 \pm 5	40 \pm 9	57 \pm 9	15,4 \pm 1
10 ⁶	29 \pm 7	67 \pm 8	81 \pm 6	83 \pm 6	10,3 \pm 1,4
Controle	3 \pm 3	3 \pm 3	7 \pm 3	7 \pm 3	-

Tabela 3. Mortalidade acumulada média (% \pm erro padrão da média, EP) e tempo letal de 50% (TL₅₀) (dias \pm EP) de ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans* 1–7 dias após injeção com suspensão de blastosporos de *Beauveria bassiana*.

Dose (bl/ninfa)	Mortalidade acumulada							TL ₅₀ (d \pm EP)
	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	
120	4 \pm 2	10 \pm 4	16 \pm 5	36 \pm 2	80 \pm 7	88 \pm 6	88 \pm 6	4,3 \pm 0,1
12000	13 \pm 5	60 \pm 10	89 \pm 5	97 \pm 1	97 \pm 1	97 \pm 1	97 \pm 1	2,4 \pm 0,2
controle	0	0	0	0	0	0	0	-

bl: blastosporos

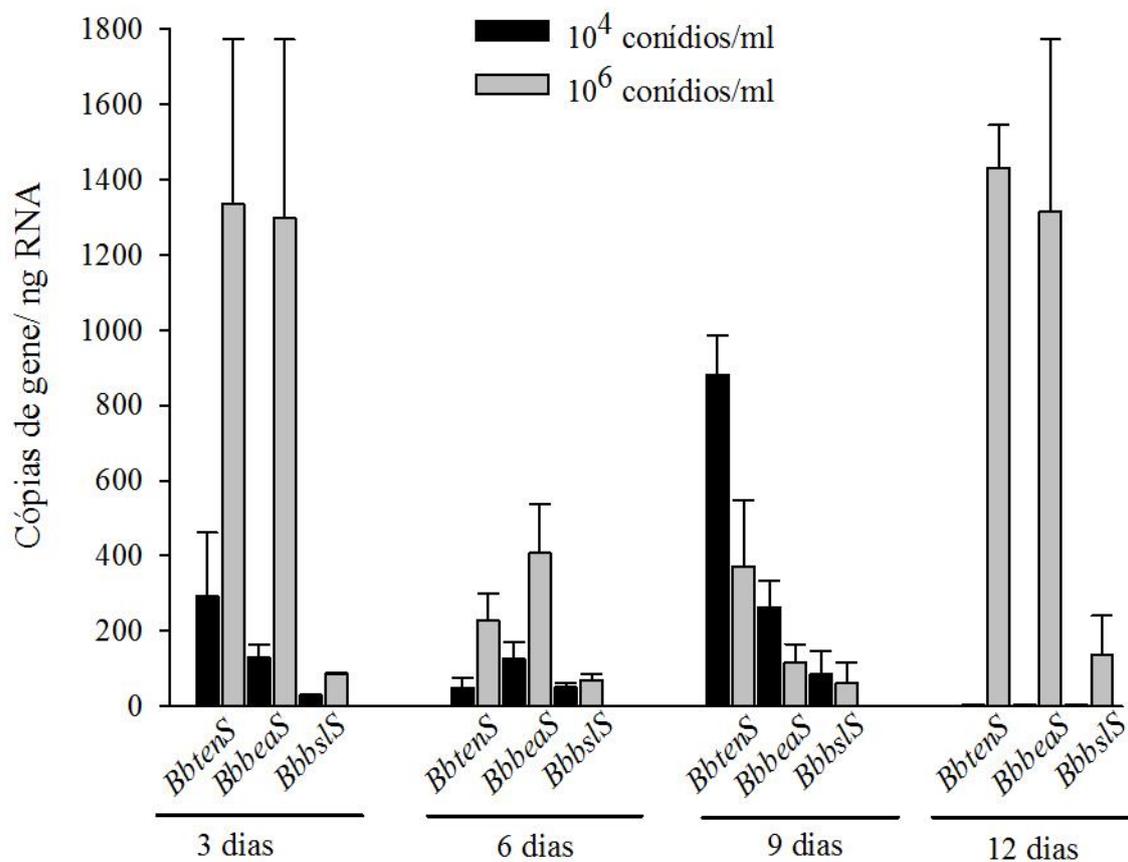


Figura 2. Quantificação absoluta de transcritos de *Beauveria bassiana* que codificam para as sintetases de tenelina (*Bbtens*), beauvericina (*BbbeaS*) e bassianolida (*BbbslS*) em ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans*, 3–12 dias após imersão em suspensão a 10^4 ou 10^6 conídios/ml.

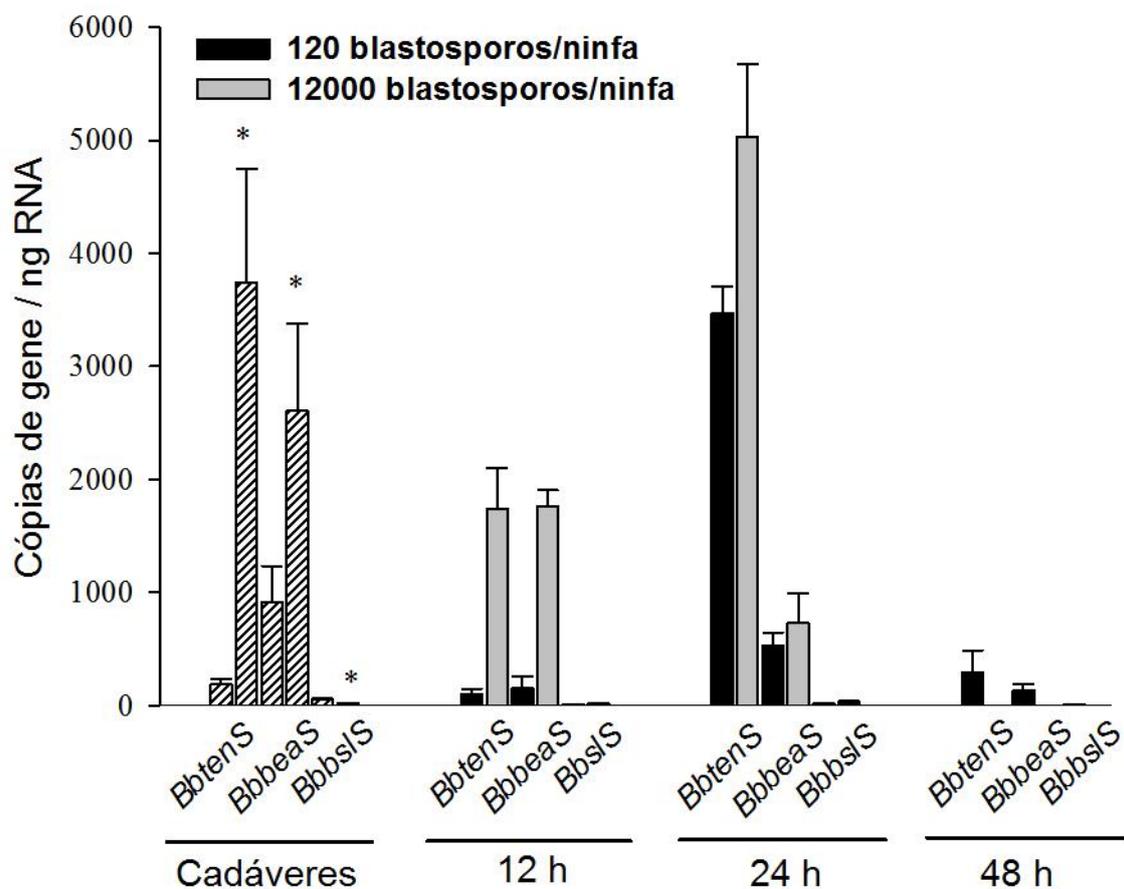


Figura 3. Quantificação absoluta de transcritos de *Beauveria bassiana* que codificam para as sintetases de tenelina (*BbtenS*), beauvericina (*BbbeaS*) e bassianolida (*BbbslS*) em ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans*, 12–48 h após injeção de blastosporos (120 ou 12000 blastosporos/ninfa) e em cadáveres de ninfas. O asterisco indica cadáveres micotizados previamente expostos a câmara úmida (UR > 98%) por até 5 dias. A ausência de asterisco indica ninfas recém mortas e não micotizadas.

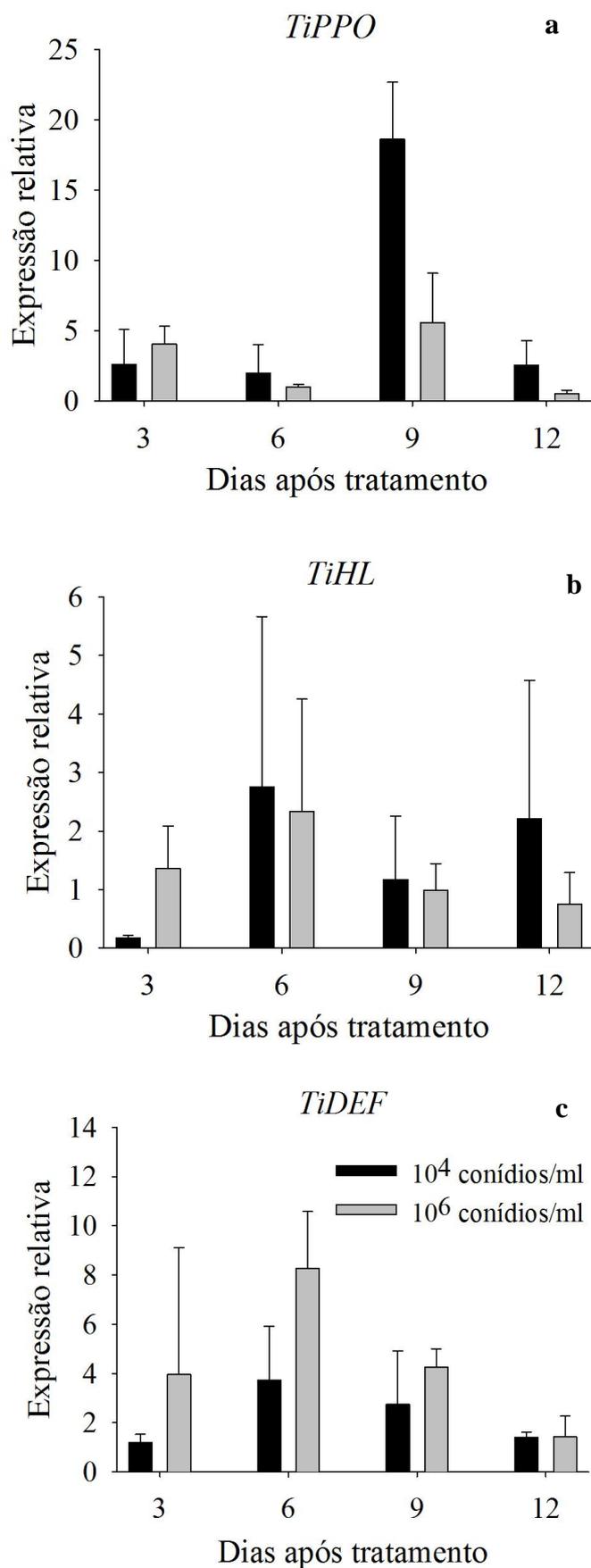


Figura 4. Expressão gênica relativa de *TiPPO* (a), *TiHL* (b) e *TiDEF* (c) em ninfas de 4^o estágio de *Triatoma infestans* 3–12 dias após imersão dos insetos em suspensão a 10⁴ ou 10⁶ conídios/ml.

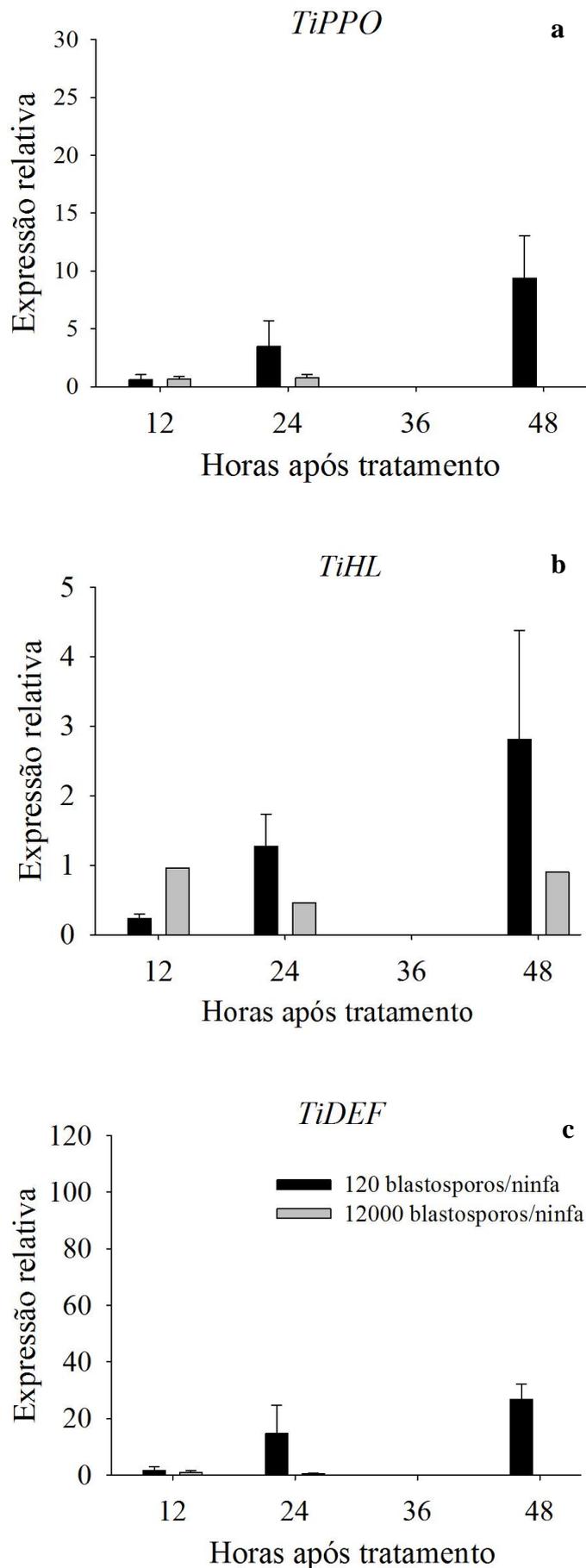


Figura 5. Expressão gênica relativa de *TiPPO* (a), *TiHL* (b) e *TiDEF* (c) em ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans*, 12–48 h após injeção de 120 ou 12000 blastosporos/ninfa.

5. Bibliografia

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Org.). **Fungos entomopatogênicos**. Piracicaba: ESALQ, 1998. p. 289–370.

AMIRI-BESHELI, B. et al. Inter and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. **Mycological Research**, v. 104, 447–452, 2000.

ELEY, K. L. Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **ChemBioChem** v. 8, 289–297, 2007.

FANG, W. et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied Environmental Microbiology** v. 71, 363–370, 2005.

FANG, W. et al. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, 155–159, 2009.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, 130, 300–305, 2012.

FERRON P. Fungal control. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. New York: Academic Press, p. 313–362, 1985.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M. P. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, 135–140, 2011.

GARCIA, E. S. et al. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. **Parasites and Vectors**, v. 2, 33, 2009.

GEORGE, J. et al. Malaria mosquitoes attracted by fatal fungus. 2013 **PLoS ONE**, 8(5), e62632. doi:10.1371/journal.pone.0062632.

GIBSON, D. M. et al. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Products Reports**, v. 31, 1287–1305, 2014.

GÓMEZ-DOÑATE, M. et al. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific Bifidobacteriaceae suitable for microbial source tracking. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, 5788–5795, 2012.

GUPTA, S. et al. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Mycopathologia**, v. 115, 185–189, 1991.

GUPTA, S.; MONTLLOR, C.; HWANG, Y-S. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Natural Products**, v. 58, 733–738, 1995.

JUÁREZ. et al. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, 198–207, 2000.

LEWIS, M. W.; ROBALINO, I. V.; KEYHANI, N. O. Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived *in vivo* hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v. 155, 3110–3120, 2009.

LOPEZ, L. et al. Isolation and characterization of a novel defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, 437–447, 2003.

LUZ, C.; FARGUES J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 72, p. 97–103, 1998.

LUZ, C. et al. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, 839–846, 1998.

LUZ, C. et al. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, 211–218, 2004.

MOLNAR, I.; GIBSON D. M.; KRASNOFF, S. B. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. **Natural Products Reports**, v. 27, 1241–1275, 2010.

MOORE, D. et al. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, 193–199, 1995.

PAL, S.; WU, L. P. Lessons from the Fly: Pattern Recognition in *Drosophila melanogaster*. In: KISHORE, U. **Target pattern recognition in innate immunity**. New York: Springer, p. 162-174, 2009.

PEDRINI, N.; CRESPO R.; JUÁREZ M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146C, 124–137, 2007.

PEDRINI, N. et al. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. **PLoS Neglected Tropical Disease** 3(5), e434, 2009.

PEDRINI, N. et al. Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v. 156, 2549–2557, 2010.

- PEDRINI, N. et al. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 24, 2013.
- PFAFFL, M. W.; HORGA, G. W.; DEMPLE L.. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 30(9), E36, 2002.
- ROBERTS, D. W.; GUPTA, S.; ST. LEGER, R. J. Metabolite production by entomopathogenic fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 325–347, 1992.
- ROHLFS, M., CHURCHILL, A.C.L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, 23–34, 2011.
- ROMAÑA, C. A.; FARGUES, J. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, 363–368, 1992.
- SKROBEK, A.; SHAH, F.A.; BUTT, T.M. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. **BioControl**, v.53, 361–373, 2008.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-432 degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**. 47, 167–177, 1986.
- ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, 85–95, 1986.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, 356–359, 1988.
- STRASSER, H. et al. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. **Mycological Research**, v. 104, 1227–1233, 2000.
- SÜSSMUTH, R. et al. Fungal cyclooligomer depsipeptides: From classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. **Natural Products Reports**, v. 28, 99–124, 2000.
- SUZUKI, A.; KAWAKAMI, K., TAMURA, S. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarhizium anisopliae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, 1641–1643, 1971.
- TRIENENS, M.; ROHLFS, M. Insect-fungus interference competition - The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxylipins. **Fungal Ecology**, v. 5, 191–199, 2012.

WANCHOO, A.; LEWIS, M.W.; KEYHANI, N.O. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in *in vitro* and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v. 155, 3121–3133, 2009.

XU, Y. et al. Cytotoxic and antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Journal of Natural Products**, v. 70, 1467–1471, 2007.

XU, Y. et al. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericine, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Chemistry and Biology**, v. 15, 898–907, 2008.

XU, Y. et al. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, 353–364, 2009.

ZHANG, S. et al. CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, 13477–13486.

5.3 MANUSCRITO 3 - Síntese e secreção de compostos voláteis orgânicos liberados por *Triatoma infestans* infectados com *Beauveria bassiana*.

Resumo: Adultos de *Triatoma infestans* fisicamente perturbados secretam compostos orgânicos voláteis (CVO) com função de alarme defesa. Ainda não são conhecidos outros fatores que estimulam ou influenciam a secreção desses CVO. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da infecção de *B. bassiana* sobre a secreção de CVO por *T. infestans* e estudar a expressão de genes potencialmente envolvidos na biossíntese dos CVO em indivíduos infectados ou não. Voláteis liberados por *T. infestans* em diferentes períodos após o tratamento com conídios de *B. bassiana* foram quantificados e identificados empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O padrão de expressão de *Ti-brnq* e *Ti-bckdc* foi analisado por PCR em tempo real, em indivíduos aos 4 e 10 dias após o tratamento (a.t.). Ácido isobutírico foi o CVO mais abundante encontrado (70–78 % do total), sem efeito significativo da infecção sobre a secreção quantitativa desse composto. Foi encontrada maior expressão de ambos *Ti-brnq* e *Ti-bckdc* em indivíduos aos 4 dias a. t. Já aos 10 dias a. t., não houve indução de ambos os genes. Os resultados ajudam a compreender melhor o impacto da infecção fúngica sobre a ecologia química de *T. infestans*.

Palavras-chave: ácidos graxo de cadeia curta, compostos voláteis orgânicos, glândulas de Brindley, fungos entomopatogênicos.

1. Introdução

Triatomíneos adultos possuem as glândulas de Brindley que estão situadas dorsolateralmente no metatorax, com abertura para o exterior através de um orifício situado na mesopleura. Essas glândulas produzem compostos voláteis orgânicos (CVO) e os liberam quando os indivíduos são perturbados fisicamente (KALIN; BARRET, 1975, SCHOFIELD; UPTON, 1978).

Os CVO liberados pelas glândulas de Brindley consistem em uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que inclui ácido isobutírico, álcoois alifáticos, ésteres e compostos aromáticos (HACK et al., 1980, JUÁREZ; BRENNER, 1981, MANRIQUE et al., 2006).

Além de feromônios de insetos, AGCC e seus derivados são incorporados a uma variedade de macromoléculas, como componentes de antibióticos e lipídios de armazenamento em plantas. Os AGCC são derivados do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (aaCR) (VAN DER HOEVER; STEFFENS, 2000). Os aaCR são translocados para a mitocôndria por um transportador específico, a proteína

transportadora do sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada. Na mitocôndria, valina e treonina, por exemplo, são incorporadas aos ácidos 2-metil e 3-metilbutírico, respectivamente. O ácido propiônico, apesar de ser ácido graxo de cadeia simples, é derivado da treonina através dos mesmos processos (VAN DER HOEVER; STEFFENS, 2000). As enzimas chave que catalisam ambos os processos fazem parte do complexo multienzimático alfa cetoácido desidrogenase mitocondrial (Figura 1).

Já foram identificadas e selecionadas de biblioteca de expressão EST obtidas de tegumento de *T. infestans* sequências parciais de um gene envolvido na captação de aminoácidos de cadeia ramificada pela mitocôndria (gene *Ti-brnq*), e de um gene envolvido na síntese de enzimas do complexo multienzimático alfa cetoácido desidrogenase mitocondrial de cadeia ramificada (gene *Ti-bckdc*) (Calderón-Fernandéz; Juárez, dados não publicados).

Além de perturbação física, não são conhecidos outros fatores que estimulam ou influenciam a secreção dos voláteis liberados pelas glândulas de Brindley. Não se sabe, por exemplo, se uma infecção por parasitos e patógenos, como fungos entomopatogênicos alteraria o perfil qualitativo e quantitativo desses voláteis durante a infecção.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar os CVO liberados por *T. infestans* adultos infectados pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana* e estudar a expressão de genes (*Ti-brnq* e *Ti-bckdc*) potencialmente envolvidos com a biossíntese desses voláteis em indivíduos infectados ou não.

2. Material e métodos

2.1 Origem e criação de *Triatoma infestans*

Adultos de *T. infestans* utilizados foram provenientes de colônia Instituto de Investigações Bioquímicas (INIBIOLP) da Universidade Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Os indivíduos foram criados em frascos cilíndricos leitosos de plástico, com 10 cm de diâmetro, 15 cm de altura e com tiras de cartolina dentro dos frascos. Os frascos foram fechados com filó e elástico e mantidos a 30° C, 50 ± 10% de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 h. Os insetos foram alimentados em ratos de laboratório tranquilizados e anestesiados.

2.2 Origem e cultivo de *Beauveria bassiana*

B. bassiana GHA foi isolada originalmente de *Diabrotica speciosa* em milho, em Oregon, Estados Unidos e está depositada como ARSEF 201 na Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos do Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ARSEF), Ithaca, Estados Unidos. GHA (produto em pó molhável Botanigard 22 WP[®], Laveland Internacional, Butte, Estados Unidos) foi cultivada em placas com Meio Completo líquido contendo 0,4 g de KH₂PO₄, 1,4 g de Na₂HPO₄, 0,6 g de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g de KCl, 0,7 g de NH₄NO₃.7H₂O, 10 g de glicose, 5 g de extrato de levedura e 15 g de ágar em 1000 ml de água destilada (ALVES, 1998). As placas foram incubadas a 26° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h por 12 dias.

2.3 Preparo de suspensão aquosa e avaliação da viabilidade de conídios

Conídios de GHA foram coletados da superfície da cultura com o auxílio de uma espátula, suspensos em 10 ml de Tween 80 (mono-oleato de polioxietileno sorbitano) estéril a 0,01%, colocados em tubo de vidro (1 cm de diâmetro x 14 cm de altura) com ± 20 pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) e agitados em vórtex por 3 min e filtrados em algodão hidrófilo. Após diluição, o número de conídios/ml foi quantificado em câmara de Neubauer e as suspensões foram ajustadas às concentrações finais requeridas para os testes.

No início de cada teste, a viabilidade dos conídios foi verificada pela inoculação de 100 µl de conídios suspensos em água (10⁶ conídios/ml) em meio SDAL (Sabouraud, Dextrose, Ágar, Extrato de levedura a 1%) em placas de Petri. Entre 6–24 h de incubação do meio a 25° C, 75 ± 5 % de UR e fotofase de 12 h, a germinação foi quantificada em 100 conídios em quatro diferentes áreas do meio. Conídios foram considerados germinados quando os comprimentos dos tubos germinativos foram superiores aos diâmetros dos conídios (LUZ; FARGUES, 1998).

2.4 Aplicação de suspensão aquosa de conídios em adultos

Entre 5–10 adultos de *T. infestans* foram colocados em placas de Petri de vidro (100 mm de diâmetro x 20 mm de altura). O movimento dos indivíduos foi reduzido por exposição da placa em gelo por 10 minutos. Os adultos foram tratados topicamente, com auxílio de micropipeta semiautomática com 20 µl suspensão de conídios nas concentrações finais de 10⁶ ou 10⁸ conídios, sendo 10 µl do inóculo no abdômen e 10 µl

no tórax, totalizando as doses de 20000 conídios/indivíduo ou 2000000 conídios/indivíduo.

2.5 Quantificação e identificação dos compostos orgânicos voláteis

Adultos tratados topicamente com conídios de GHA a 10^6 ou 10^8 conídios/ml e em diferentes períodos após o tratamento (1–4 dias, 5–10 dias e 11–16 dias) ou controles (tratados com somente água sem conídios) foram cuidadosamente transferidos individualmente para frascos de vidro de 4 ml imediatamente cobertos com tampa de borracha. Os frascos com o inseto foram agitados por 10 segundos em vórtex a 80 RPM para estimular a liberação dos voláteis das glândulas de Brindley, e em seguida aquecidos a 30° C por 20 minutos (VILLAVERDE; JUÁREZ; MIJAILOVSKY, 2007). Os voláteis foram amostrados do “headspace”, correspondente à fase gasosa em contato com o triatomíneo, por microextração em fase sólida (MEFS) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

Para encontrar as melhores condições de análise dos voláteis, foi realizado um screening com 3 fibras de diferentes polaridades: uma fibra de divinilbenzeno, carboxeno e polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), e uma fibra de PDMS/DVB, uma fibra de CAR/PDMS (Supelco[®], Bellefonte, Estados Unidos). Todas as fibras foram previamente condicionadas de acordo com as instruções dos fabricantes e sistematicamente recondicionadas antes de cada análise. Frascos sem insetos foram usados como controles.

Para a quantificação relativa, os voláteis foram dessorvidos a 250°C em um injetor operado em modo “splitless” e analisados por cromatografia gasosa capilar (CGC) (Hewlett Packard 6890, Hewlett Packard[®], Little Falla, Estados Unidos) utilizando uma coluna capilar Omegawax (Sigma Aldrich[®], St. Louis, Estados Unidos). A temperatura programada foi 40 °C por 3 min, 5 °C/min at 80 °C, 20 °C/min até 150 °C, e 30 °C/min até 250 °C, com tempo de espera de 10 min na temperatura final. O detector de ionização de chama (FID) foi programado a 280 °C (CRESPO et al., 2008).

A identificação dos voláteis foi feita por espectrofotometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (CGC-MS), utilizando o equipamento 5975C VL (Agilent[®], Santa Clara, Estados Unidos) operado a 70 eV, com uma coluna e programação de temperatura similares às descritas para cromatógrafo gasoso. Os compostos foram identificados por comparação de seus padrões de fragmentação por padrões analisados nas mesmas condições, e os espectros obtidos comparados com os espectros da

Biblioteca Digital de Espectros do Instituto de Padronização e Tecnologia (NIST/EPA/NIH).

2.6 Extração de RNA total

Aos 4 ou 10 dias após a inoculação tópica de conídios em adultos (e controles topicados com água), os indivíduos tiveram seu movimento reduzido como já descrito anteriormente no item 2.4 . Com auxílio de pinças e de NaCl a 0,9 % os adultos foram dissecados iniciando com a retirada da cabeça e das patas. Foram aproveitados somente os três primeiros segmentos abdominais para extração de RNA. A dissecação foi feita para facilitar a maceração e aumentar as chances de extração de RNA das glândulas de Brindley. Os adultos foram mantidas em RNA later (Ambion[®], Austin, Estados Unidos) a -20° C até o momento das extrações.

Foi utilizado RNAeasy Mini kit (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para as extrações. Cada amostra foi macerada em homogeneizador de vidro com 600µl de buffer RLT fornecido pelo kit. Para remoção de traços de DNA contaminantes, as amostras foram tratadas com 20 µl de DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen[®]) e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. A verificação da integridade do RNA total foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (peso/volume). O RNA foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop (Thermo[®], Wilmington, Estados Unidos) e em seguida estocado a -80 °C até o momento do uso.

2.7 Análise da expressão gênica

2.7.1 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi feita reação com 1 µg de RNA total por amostra (iScript cDNA Synthesis, Bio-Rad[®]). A programação do termociclador (Veriti, Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos) foi: ciclo 1: 25° 5 min, ciclo 2: 42° 30 min, ciclo 3: 85° 5 min. O cDNA foi estocado a -20 °C até o momento do uso.

2.7.2 Desenho de iniciadores

Os genes usados para desenho dos iniciadores do sistema transportador de aminoácidos de cadeia ramificada (*Ti-brnq*) e do complexo enzimático alfa cetoácido desidrogenase mitocondrial de cadeia ramificada (*Ti-bckdc*) foram selecionados de biblioteca de expressão EST obtidas de tegumento de *T. infestans* no INIBIOLP (CALDERÓN-FERNANDEZ; JUÁREZ, dados não publicados) (Tabela 1).

Para as reações de qPCR, a amplificação foi feita em Mx3000P QPCR System (Stratagene[®], California, Estados Unidos) empregando 20 ng de DNA total sintetizados para cada reação (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad[®]).

O seguinte programa de amplificação foi utilizado: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos com três segmentos de amplificação: 30 s a 95 °C para desnaturação, 30 s a 56 °C para anelamento, e 30 s a 72 °C para elongação da cadeia de DNA.

Foi usado o método ciclo limiar ($\Delta\Delta C_t$: threshold cycle - C_T) para quantificação relativa dos genes (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002), utilizado actina como gene de controle para o inseto (*Ti actina*). Controles negativos foram feitos com cDNA de insetos não infectados. Reações contendo pares de iniciadores sem amostras foram também incluídos como controles brancos.

2.8 Análise estatística

Resultados percentuais foram transformados em arcsin e examinados com análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (SNK). Médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Quantificação e identificação dos compostos orgânicos voláteis

Dentre as diferentes fibras testadas para captação de voláteis por SPME, a que melhor definiu os picos dos CVO liberados por *T. infestans* fisicamente perturbados foi a de DVB/CAR/PDMS (Figura 2).

Os picos identificados e quantificados por CGC-EM corresponderam aos compostos: ácido isobutírico (IK 1579), ácido propiônico (IK 1569), 2-metil-1-butanol (IK 1209), isobutirato isobutírico (IK 1093) e também traços da mistura de 2- e 3-metil-1 butil isobutirato (IK 1200), da mistura de 2- e 3-metil-1 butil propionato (IK 1195), e da mistura de isobutil propionato e isobutanol (IK 1079) (Figura 3). Não foi encontrada qualquer diferença qualitativa ou quantitativa entre triatomíneos machos ou fêmeas.

A quantificação relativa de cada pico mostrou que em adultos infectados, o ácido isobutírico foi o volátil mais abundante (70–78% do total), sem efeito significativo do progresso da infecção na sua secreção quantitativa ($F_{5,53} = 0,35$; $P = 0,9$) (Tabela 2). O

único composto que apresentou efeito significativo do tempo na secreção quantitativa foi o ácido propiônico. A secreção desse composto foi maior com 1–3 dias após a inoculação ($18,6 \pm 5,8$) e decresceu distintamente com o progresso da infecção ($F_{5,53} = 2,8$; $P = 0,03$), e nesse momento não diferenciou dos valores encontrados para o controle ($8,2 \pm 3,8$ % após 4–9 dias e $5,3 \pm 1,8$ % após 10–15 dias após o tratamento) (Tabela 2).

Não houve diferença significativa para nenhum dos compostos para insetos controle ao longo das duas semanas de teste.

3.2 Expressão de genes relacionados com a síntese e secreção de compostos voláteis orgânicos liberados por *Triatoma infestans*

O gene *Ti-brnq* foi significativamente mais expresso aos 4 dias após o tratamento (a.t.), independentemente da concentração ($F_{1,6} = 6,9$; $P = 0,04$). Os valores de indução sobre os controles encontrados para esse dia foram $1,3 \pm 0,5$ e $3,0 \pm 0,4$ para ninfas tratadas com suspensão a 10^6 e 10^8 conídios/ml, respectivamente. No mesmo período, resultados similares foram encontrados para a expressão de *Ti-bckdc*, mas não foi encontrada diferença significativa aos 4 dias a.t. ($F_{1,6} \leq 0,83$; $P = 0,04$ (Figura 4). Foi encontrado efeito da concentração sobre a expressão de ambos os genes aos 4 dias a.t. ($F_{1,6}$ $P = 0,04$).

Em contraste, não foi observada indução sobre os controles aos 10 dias a.t. para nenhum dos genes testados: a expressão de *Ti-brnq* foi $0,4 \pm 0,2$ (10^6 conídios/ml) e $1,1 \pm 0,2$ (10^8 conídios/ml), e os valores encontrados para *Ti-bckdc* foram $0,8 \pm 0,4$ (10^6 conídios /ml) e $0,9 \pm 0,1$ (10^8 conídios/ml) (Figura 4).

4. Discussão

No presente estudo, a infecção por *B. bassiana* não alterou o perfil qualitativo dos CVO liberados por *T. infestans* perturbados. Os compostos aqui identificados incluem a maioria dos compostos encontrados em estudo prévio com *T. infestans* não infectados, utilizando a mesma técnica, mas utilizando outra fibra na SPME, uma fibra de CAR/PDMS (MANRIQUE et al., 2006). O ácido propiônico como CVO de triatomíneos foi reportado previamente em apenas um trabalho, em *Triatoma dimidiata* (MAY-CONCHA et al. 2015).

No trabalho aqui reportado, ácido isobutírico foi o composto majoritário liberado por *T. infestans* infectados ou não, e a infecção fúngica não influenciou a sua liberação quantitativa em todo o tempo de experimento. O ácido isobutírico testado isoladamente em altas concentrações tem claro efeito repelente sobre adultos e ninfas de triatomíneos de diferentes espécies (CRUZ-LÓPEZ; MORGAN; ONDARZA, 1995, GONZÁLEZ AUDINO et al., 2006, MANRIQUE et al. 2006, MINOLI et al. 2013).

A secreção quantitativa do ácido propiônico foi alterada pela infecção fúngica após uma infecção recente (1–3 dias). O ácido propiônico é um repelente para insetos de armazenamento de grão e gorgulhos e é secretada por Coleoptera e alguns pulgões (GERMINARA; DE CRISTOFARO; ROTUNDO, 2008), mas a ação isolada desse composto sobre o comportamento de triatomíneos ainda não é conhecida. É importante ressaltar que nenhum composto químico é responsável por sinalizar o desencadeamento de uma resposta comportamental de forma isolada. Apesar de animais serem capazes de produzir e emitir compostos químicos em grande quantidade, em geral são aqueles encontrados em menor quantidade que provocam o comportamento de repelência em artrópodes parasitos (EISNER; GRANT, 1980, BERENBAUM, 1995).

Não existe informações sobre o mecanismo bioquímico envolvido na síntese de AGCC tanto lineares quanto ramificados. Utilizando a informação disponível para plantas e mamíferos, foi detectado em *T. infestans* sequências homólogas aos genes *brnq* e *bckdc*. Em uma tentativa de compreender seu papel na síntese de compostos voláteis, foi avaliado no presente estudo seus níveis de expressão em triatomíneos infectados por *B. bassiana*.

O gene *Ti-brnq* em adultos de *T. infestans* foi mais expresso aos 4 dias a.t. nas duas concentrações de conídios testadas. No início de uma infecção fúngica, com o inseto sendo perturbado pela infecção, é notável que possa haver maior produção dos AGCC que constituem os CVO liberados pelas glândulas de Brindley. Apesar disso, *Ti-bckdc* não teve a expressão relativa influenciada pela infecção fúngica. Aos 10 dias, quando há um grande comprometimento dos indivíduos com infecção fúngica, não houve indução de ambos os genes sobre o controle. Isto pode ser explicado pelo fato de que apesar da infecção, o inseto pôde recompor os níveis de expressão para normalizar a síntese de voláteis, correlacionando bem com os níveis detectados por SPME aos 10 dias de a. t. Apesar disso, pode ser que esses indivíduos que sobreviveram até os 10 dias, por alguma razão, não estiveram seriamente comprometidos pela infecção fúngica, encontrando neles níveis de expressão similares aos detectados em indivíduos saudáveis

O papel desses genes (*Ti-brnq* e *Ti-bckdc*) na síntese de AGCC em adultos de *T. infestans* se confirmará mediante o silenciamento dos mesmos através de experimentos com RNA de interferência (iRNA), planejados para realizar-se futuramente. No caso de encontrar (em indivíduos *knock down*) um fenótipo alterado na síntese de voláteis, será interessante avaliar sua suscetibilidade a infecção fúngica.

De forma geral, é possível afirmar que uma infecção por *B. bassiana* não alterou os componentes dos CVO, mas a redução de um composto em adultos infectados a tempos curtos de infecção, o ácido propiônico, pode ser capaz de modificar o feromônio de alarme e defesa de *T. infestans*. Consequentemente o comportamento de ninfas e adultos saudáveis que estejam nas proximidades de um inseto infectado poderá ser influenciado pela presença do fungo em um micoinseticida.

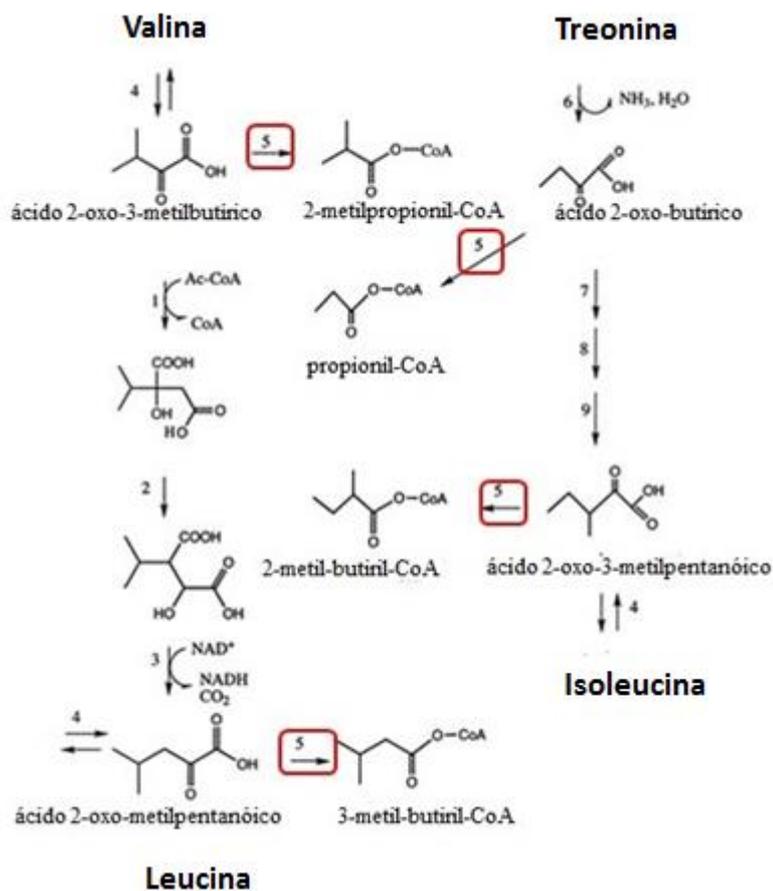
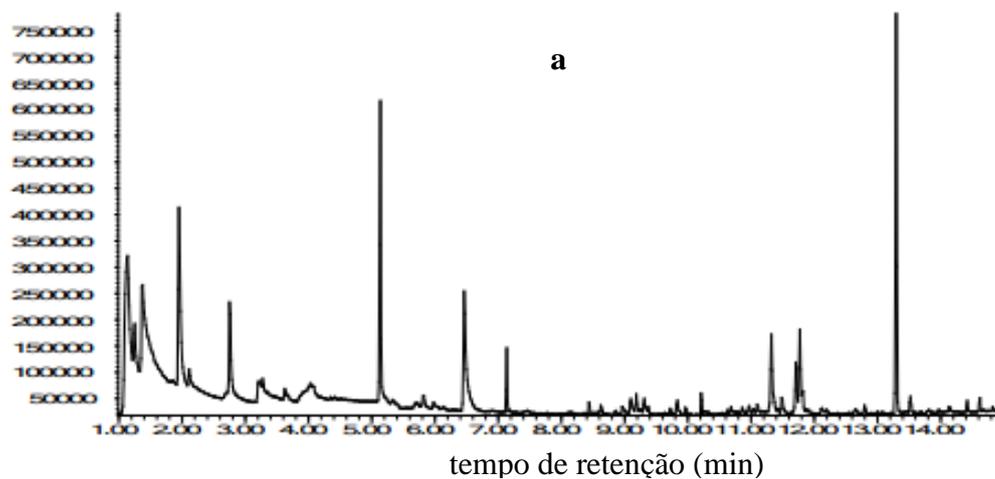
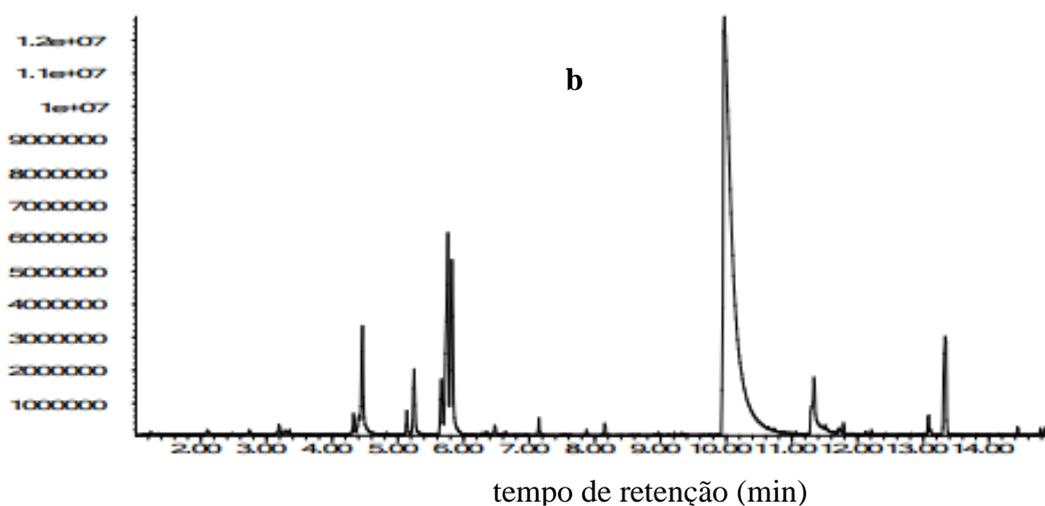


Figura 1. Representação esquemática da biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta a partir de aminoácidos de cadeia ramificada. O passo 5 (em destaque) refere-se a participação enzima-chave alfacetoácido desidrogenase. Modificado de VAN DER HOEVER; STEFFENS, 2000.

resposta do detector



resposta do detector



resposta do detector

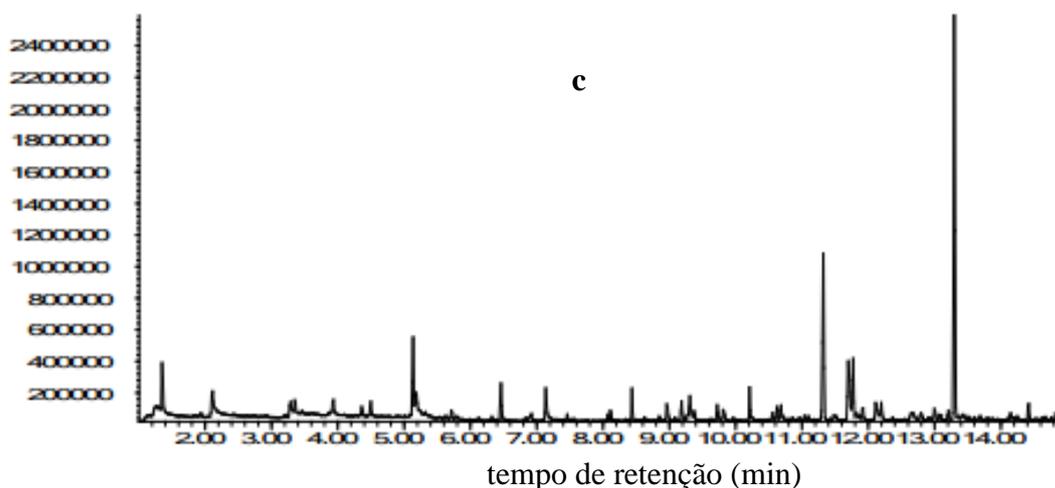


Figura 2. Cromatograma de compostos voláteis orgânicos majoritários liberados por *Triatoma infestans* adultos infectados por *Beauveria bassiana* após agitação do indivíduo em vórtex e extração dos voláteis por microextração em fase sólida, empregando diferentes fibras: CAR/PDMS (a) DVB/CAR/PDMS (b) e PDMS/DVB (c).

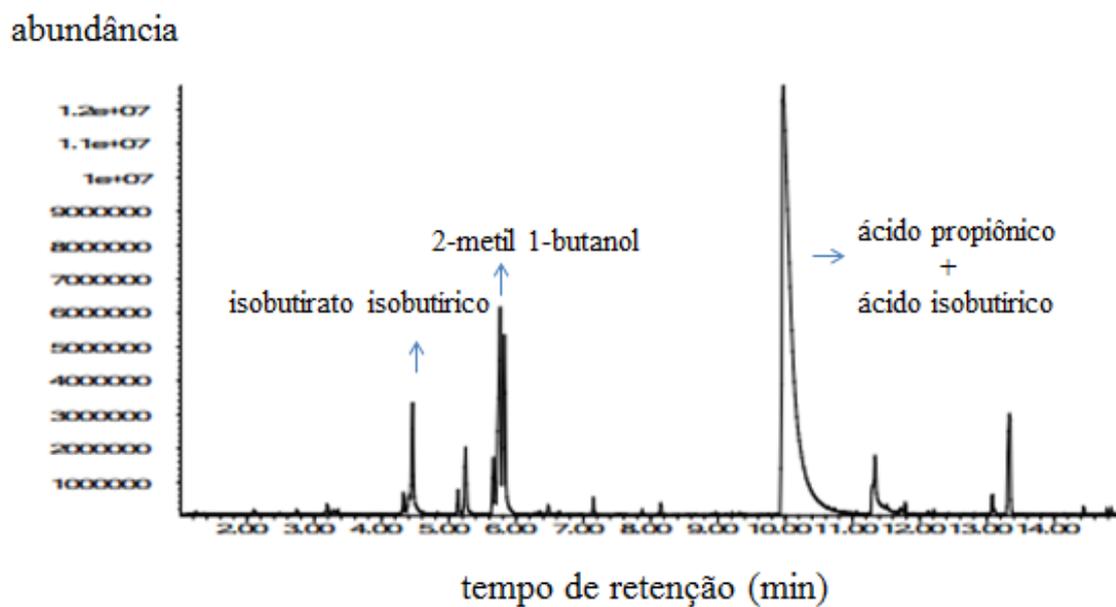


Figura 3. Cromatograma identificando os compostos voláteis orgânicos majoritários liberados por *Triatoma infestans* adulto infectado por *Beauveria bassiana* após agitação do indivíduo em vórtex e extração dos voláteis por microextração em fase sólida, empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados nas PCR em tempo real.

Nome dadogene	Codifica para	Sequências nucleotídicas (forward/reverse)
<i>Ti-bckdc</i>	sistema transportador de aminoácidos de cadeia ramificada	ACGCCAGCTGTACGCAGAATAG/ TCGCCCATCCTTTCCAGTTC
<i>Ti-bnrq</i>	alfa cetoácido desidrogenase mitocondrial	TGTTAATGCTGCCCGTTCACG/ AGGTCGCCGCTAATTCTCACC
<i>Ti actina</i>	actina	CACCCCAGCAATGTTATGTAG/ ACCATCAGGAAGTTCGTAAG

Tabela 2. Composição relativa (% \pm erro padrão da média, EP) dos compostos orgânicos voláteis (CVO) majoritários secretados pelas glândulas de Brindley de *Triatoma infestans* não infectados (controles) ou infectados por *Beauveria bassiana*, em diferentes períodos após o tratamento (a.t.).

CVO	Dias a. t.	Composição relativa	
		Controles	Infectados
isobutirato isobutírico	1-3	5,7 \pm 2,6	2,1 \pm 0,2
	4-9	5,0 \pm 0,8	5,8 \pm 2,4
	10-15	5,3 \pm 1,3	5,4 \pm 1,3
2-metil-1- butanol	1-3	10,4 \pm 3,1	7,2 \pm 1,6
	4-9	9,9 \pm 0,9	14,8 \pm 5,1
	10-15	15,2 \pm 2,6	13,7 \pm 3,1
ácido propiônico	1-3	6,0 \pm 1,7 ^a	18,6 \pm 5,8 ^b
	4-9	6,0 \pm 4,9	8,2 \pm 3,8
	10-15	8,2 \pm 3,8	5,3 \pm 1,8
ácido isobutírico	1-3	77,1 \pm 5,2	70,8 \pm 4,5
	4-9	78,1 \pm 3,3	73,7 \pm 7,0
	10-15	69,8 \pm 4,4	74,1 \pm 3,9

Adultos foram tratados topicamente com 20 μ l de suspensão aquosa de conídios de *B. bassiana* na concentração final de 10^8 conídios/ml, e mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $75\% \pm 10$ UR, e 12 h de fotofase. Médias seguidas por letras diferentes (a - b) foram significativamente diferentes entre elas (ANOVA e teste SNK com $P < 0,05$).

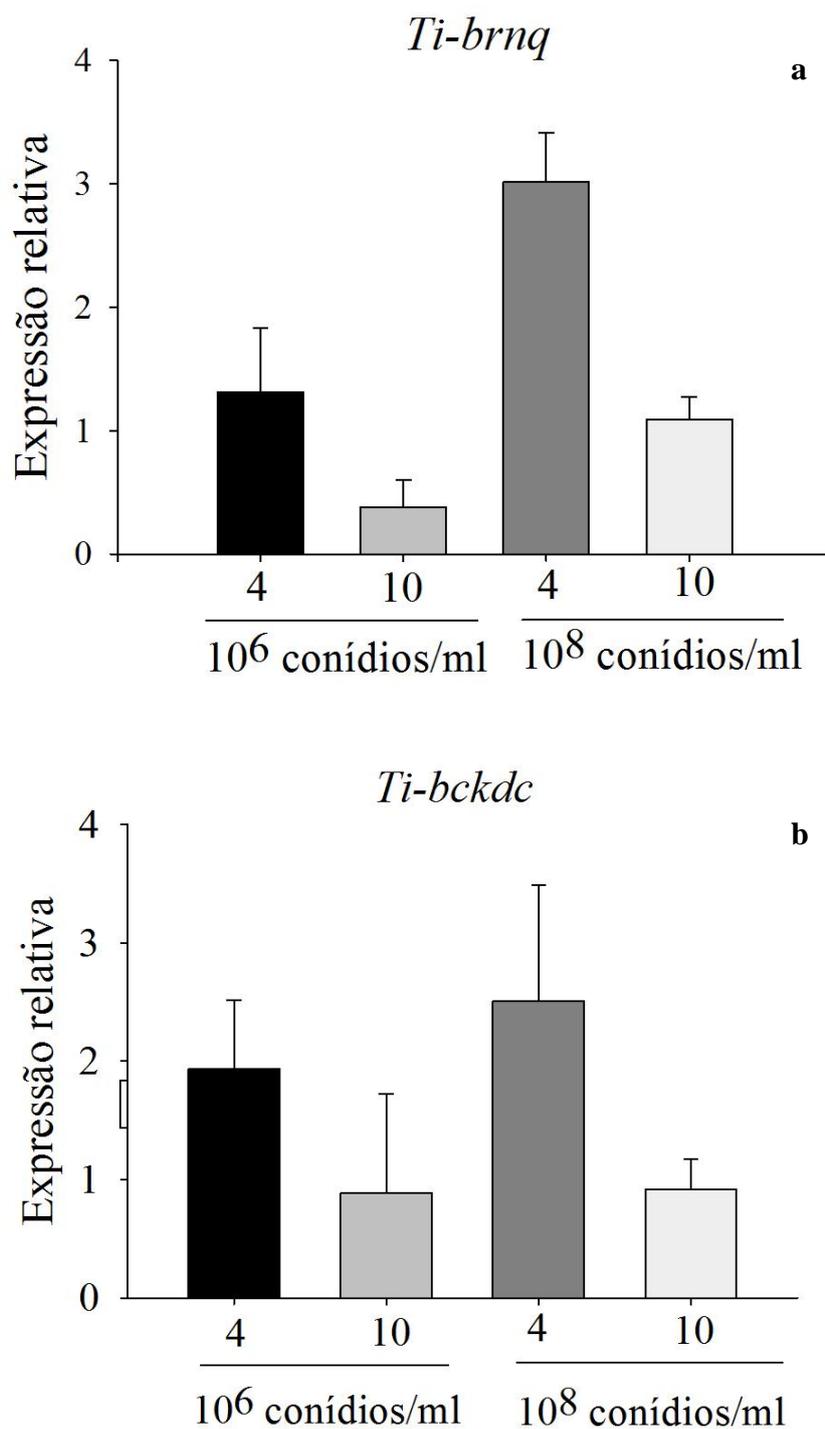


Figura 2. Expressão relativa dos genes *Ti-brnq* (a) e *Ti-bckdc* (b) aos 4 e 10 dias após tratamento tópico de adultos de *Triatoma infestans* com suspensão aquosa de conídios de *Beauveria bassiana* a 10^6 ou 10^8 conídios/ml.

6. Bibliografía

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Org.). **Fungos entomopatogênicos**. Piracicaba: ESALQ, 1998. p. 289–370.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

BERENBAUM, M. R. The chemistry of defense: Theory and practice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 92, p. 1–8, 1995.

CRUZ-LÓPEZ, L.; MORGAN, E. D.; ONDARZA, R. N. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 9, p. 403–406, 1995.

EISNER, T.; GRANT, R. P. Toxicity, Odor Aversion, and "Olfactory Aposematism". **Science**, v. 213, p. 476, 1980.

GERMINARA, G. S.; DE CRISTOFARO A.; ROTUNDO, G. Behavioral responses of adult *Sitophilus granarius* to individual cereal volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 523–529, 2008.

GONZÁLEZ AUDINO, G. P. et al. Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. **Journal of Vector Ecology**, v. 32:75–82, 2006.

HACK, W. H. et al. Composition of the secretion of Brindley's gland in Triatominae. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 40, p. 178–180, 1980.

JUÁREZ M. P.; BRENNER, R. R. Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*. V. Emisión de ácidos grasos volátiles. **Acta Physiologica Latino Americana**, v. 31, p. 1131–17, 1981.

KALIN, M.; BARRET, F. M. Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Annual Entomological Society of America**, v. 68, p. 126–134, 1975.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 97–103, 1998.

MANRIQUE, G. et al. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 2035–2052, 2006.

MAY-CONCHA, I. et al. Volatiles compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: Chemical identification and behavioral analysis. **Medical Veterinary Entomology** 2; v. 27, p. 165–174, 2013.

MINOLI, S. et al. Dislodgement effect of natural semiochemicals released by disturbed triatomines: a possible alternative monitoring tool. *Journal of Vector Ecology*, v. **38**, p. 353–360, 2013.

PFAFFL, M. W.; HORGA, G. W.; DEMPLE L.. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), E36, 2002.

SCHOFIELD, C. J.; UPTON, C. P. Brindley's scent-glands and the metasternal scent glands of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 38, p. 665–678, 1978.

VAN DER HOEVEN, R. S.; STEFFENS, J. C. Biosynthesis and elongation of short- and medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiology*, v. 122, p. 275–282, 2000.

VILLAVERDE, L.; JUÁREZ, M. P.; MIJAILOVSKY, S. Detection of *Tribolium castaneum* (Herbst) volatile defensive secretions by solid phase microextraction–capillary gas chromatography. *Journal of Stored Products Research*, v. 43, p. 540–545, 2007.

6 DISCUSSÃO GERAL

O comportamento de ninfas de *T. infestans* não foi influenciado pela presença de conídios de *B. bassiana*, tanto sobre área tratada quanto em ninfas mortas e micotizadas. A importância de ninfas permanecerem em áreas tratadas se deve ao fato de que métodos indiretos de aplicação de micoinseticidas. O tratamento de uma área onde o inseto entrará em contato posteriormente parece ser mais indicado para triatomíneos, os quais são difíceis de serem tratados diretamente em condições de campo. Um indivíduo morto e micotizado é uma importante fonte de disseminação da infecção em um habitat como o de *T. infestans*, que vivem juntos em grande número e em intenso contato uns com os outros (FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011). Após a morte por infecção e em condições favoráveis e umidade, ocorrerá a extrusão de micélio e conídios na superfície do cadáver (ALVES, 1998). Uma parte desses conídios podem ser disseminados pelo ar, mas uma maior contaminação quantitativa ocorrerá com o contato de um indivíduo que esteja nas proximidades com o cadáver. É importante salientar que fungos entomopatogênicos são geralmente aplicados em formulações (LUZ et al., 2004, FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011, RODRIGUES et al., 2015), que incluem aditivos que devem ser testados quanto ao comportamento dos triatomíneos.

Os testes aqui reportados foram os primeiros a utilizar um método baseado em qRT-PCR para seguir a expressão de genes que codificam para toxinas produzidas por um fungo entomopatogênico e para proteínas da imunidade em um inseto durante o curso da infecção. Esse método poderia potencialmente ser aplicado a outros sistemas fungo-inseto. Dados do presente estudo sugerem que as respostas humorais são moduladas pela dose de propágulos. Genes envolvidos na síntese de toxinas de *B. bassiana* foram expressos diferencialmente em diferentes fases da infecção sugerindo assim que cada toxina tem um papel diferente em cada fase da patogênese, incluindo em cadáveres micotizados.

A infecção fúngica por *B. bassiana* não foi capaz de afetar a emissão qualitativa de VCO com função de alarme e defesa liberados por *T. infestans*. Não houve diferença na secreção do composto majoritário em ninfas infectadas com *B. bassiana*, mas a expressão de genes que participam na síntese dos VCO estão sendo modificados a tempos curtos após o tratamento (4 dias), o que pode ter um impacto no comportamento de defesa desses insetos.

7 CONCLUSÕES

- o comportamento de ninfas de não evitar áreas tratadas ou cadáveres micotizados é uma vantagem para estratégias de controle de *T. infestans* com *B. bassiana*;
 - o ácido isobutírico não foi secretado diferencialmente em indivíduos infectados;
 - a expressão dos genes relacionados com a síntese de CVO está sendo modificados a tempos curtos após o tratamento;
 - *BbtenS* e *BbbeaS* são importantes fatores de virulência na infecção nas condições testadas e têm papel antimicrobiano em indivíduos mortos por infecção fúngica;
 - genes da imunidade são induzidos durante todo o tempo de infecção de *T. infestans* por *B. bassiana*, no tratamento com conídios e com dose de blastosporos mimetizando uma infecção real.
 - maior expressão de *TiHL* e *TiDEF* coincide com a menor expressão de *BbtenS* e *BbbeaS* em tratamento com conídios.
-

8 BIBLIOGRAFIA

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Org.). **Fungos entomopatogênicos**. Piracicaba: ESALQ, 1998. p. 289–370.

ARGOLO et al. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1335550477_Doen%C3%A7a%20de%20Chagas%20e%20seus%20principais%20Vetores%20no%20Brasil.pdf. Acesso em 07 de Março de 2016.

ASHIDA, M. The prophenoloxidase cascade in insect immunity. **Immunologic Research**, v. 141, p. 908–910, 1990.

BARROZO, R. B.; MANRIQUE, G.; LAZZARI, C. R. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, 315–321, 2003.

BARROZO, R. B.; LAZZARI, C. R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. **Chemical Senses**, v. 29, p. 319–329, 2004a.

BARROZO, R. B.; LAZZARI, C. R. Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. **Chemical Senses**, v. 29, p. 833–841, 2004b.

BAVERSTOCK, J.; ROY, H. E.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi and insect behavior: from unsuspecting hosts to target vectors. **Biocontrol**, v. 55, p. 89–102, 2010.

BENZ, G. Environment. In: FUXA J. R., TANADA, Y. **Epizootology of Insect Diseases**. Nova York: John Wiley, 1987, p. 177–214.

BERMÚDEZ, H.; VALDERRAMA, F.; TORRICO, F. Identification and characterization of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygien**, v. 49, p. 371, 1993.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845–859, 2004.

BORGES, L. R.; NOVA, M. X. V. Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no manejo integrado de pragas – uma revisão. **Ambiência Guarapuava**, v. 7, p. 179–190, 2011.

BURGES, H. D. Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. In: BURGES, H. D. **Formulation of mycoinsecticides**. New York: Springer, 1988, 131–185.

CARDOZO, R. M. et al. Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 1174–1178, 2010.

CEBALLOS, L. A. et al. First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1195–1202.

CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunology Review**, v. 198, p. 116–126, 2004.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998, pp. 770.

CORY, J.; HOOVER, K. Plant mediated effects in insect-pathogen interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, p. 278–286, 2006.

COSTA, J. H. B.; HAIDA, K. S. Segurança de fungos entomopatogênicos para vertebrados. **Revista do Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 2, p. 129–138, 2009.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31–40, 2009.

CRUZ LÓPEZ, L.; MORGAN, E. D.; ONDARZA, R. N. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 9, p. 403–406, 1995.

DE BRITO SANCHÉZ, M. G.; MANRIQUE, G.; LAZZARI, C. R. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) II. Electrophysiological correlates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 649–651, 1995.

DIAS J. C. P. **A vida do barbeiro. Generalidades e distribuição geográfica**. Ministério da Saúde. Superintendência de campanhas de saúde pública. Doença de Chagas: Brasília. Sucam, 152 pp, 1989.

DIAS, J. C. P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 41–45, 2009.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 603–612, 2002.

DIOTAIUTI, L. G. Triatomíneos. In: TEIXEIRA, A. **Doença de Chagas e evolução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2007, 309 p.

DIMARCQ, J. L. Treatment of I(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 877–886, 1997.

- ELEY, K. L. et al. Biosynthesis of the 2-piridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **ChemBioChem**, v. 8, p. 289–297, 2007.
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, p. 18–22, 2001.
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237–256, 2007.
- FERNANDES, P. M.; ALVES, S. B. Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) Isoptera: Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 20, p. 45–49, 1991.
- FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 71–93, 2008.
- FERRANDON, D. et al. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 862–874, 2007.
- FIGUEIRA, A. N. L.; LAZZARI, C. R. Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 889–892, 2000.
- FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 265–299, 1980.
- FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, P. Contribution of the horizontal transmission on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Journal of Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, p. 135–140, 2011.
- FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 74–79, 2004.
- FRIEND, W. G.; SMITH, J. J. B. Factores ecologicos y biologicos en la enfermedad de Chagas. **Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud**, v. 1, p. 149–208, 1985.
- GEETHA, I. et al. Oviposition response of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolites of the fungus, *Trichoderma viride*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 223–226, 2003.
- GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 611–643, 1997.
- GRIPENBERG, S. et al. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. **Ecology Letters**, v. 13, p. 383–393, 2010.

- GUARNERI, A. A. et al. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. **Physiological Entomology**, v. 27, p. 142–147, 2002.
- GUERESTEIN, P.; GUERIN, P. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. **The Journal of Experimental Biology**, v: 204, p. 585–597, 2001.
- GUERESTEIN P.; HIDELBRAND, J. G. Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p.161–178, 2008.
- GUHL, F.; PINTO, N.; AGUILERA, G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 71–75, 2009.
- HACK, W. H. et al. Composition of the secretion of Brindley's gland in Triatominae. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 40, p. 178–180, 1980.
- HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insects host. **Annual Reviews of Entomology**, v. 39, p. 293–322, 1994.
- HAMIL, R. L. et al. The structure of beauverecin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. **Tetrahedron Letters**, v. 10, p. 4255–4258, 1969.
- HOFFMAN, J. A.; HETRU, C.; REICHHART, J. M. The humoral antibacterial response of *Drosophila*. **FEBS Letters**, v. 325, p. 63–66, 1993.
- HUSSAIN, A. et al. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 166–171, 2010.
- INGLIS, G. D. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CABI, p. 23–69, 2001.
- JESTOY, M. Emerging *Fusarium* - Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin - A Review. **Critical Reviews on Food Science and nutrition**, v. 48, p. 21–49, 2008.
- JOW, G. M. et al. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. **Cancer Letters**, v. 216, p. 165–173, 2004.
- JUÁREZ M. P.; BRENNER, R. R. Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*. V. Emisión de ácidos grasos volátiles. **Acta Physiologica Latino Americana**, v. 31, p. 1131–17, 1981.
- JUÁREZ, M. P. et al. Trap for hematophagous insects, control method and method of detection of these insects (*Triatoma infestans*). Patent pending, Argentina. AR068790 INPI. Boletín 568:5. Spanish, 2008.

JUÁREZ, M. P. et al. Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: the case of *Triatoma infestans* cuticle. **Resistant Pest Management Newsletter**, v. 19, p. 59–61, 2010.

KALIN, M.; BARRET, F. M. Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Annual Entomological Society of America**, v. 68, p. 126–134, 1975.

KANZOK, S. M.; JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 49–51, 2006.

KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. **The Mycota, vol VI: Human and Animal Relationships**. Berlin: Springer, 1998, p. 331-363.

KWON, A. C. et al. Cytotoxic cyclodipeptides of *Bombycis corpus* 101 A. **Yakhak Hoechi**, v. 44, p. 115–118, 2000.

LAVOIEPIERRE, M. M. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 53, p. 235–250, 1959.

LAZZARI, C. R. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, p. 273–276, 1991.

LAZZARI, C. R. Circadian organization of locomotion activity in the hematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, p. 895–903, 1992.

LAZZARI, C. R.; MANRIQUE, G.; SCHILMAN, P. E. Vibrational communication in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). In: DRUMOND, J. A.; CLARIDGE, M. **Insect sounds and communication. Physiology, behaviour, ecology and evolution**, Boca Raton: CRC Press, 2006, p. 297–304.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 34–47, 2013.

LELAND, J. E. et al. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (Lygusspp.)(Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, v. 35, p. 104–114, 2005.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123–520, 1979.

LOBO, L. S.; RODRIGUES, J.; LUZ, C. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 386–401, 2016.

- LOPEZ, L. et al. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 439–447, 2003.
- LORENZO, M. G.; LAZZARI, C. R. The spatial pattern of defaecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 903–907, 1996.
- LORENZO, M. G.; LAZZARI, C. R. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 70, p. 163–170, 1998.
- LORENZO FIGUEIRAS, N. A.; KENIGSTEN A.; LAZZARI, C. R. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Chemical signs and temporal pattern. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 311–316, 1994.
- LORENZO FIGUEIRAS, N. A.; LAZZARI, C. R. Aggregation behaviour and Interspecific responses in three species of triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 133–137, 1998.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 219–229, 2001.
- LUZ, C. et al. Potential of entomopathogenic Hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. In: Proc. 6th Int. Colloqu. Invertebr. Pathol. Microb. Contr., Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France 1, 272–276, 1994.
- LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 97–103, 1998.
- LUZ, C. et al. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 9, p. 839–846, 1998.
- LUZ, C. et al. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 211–218, 2004.
- LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; NERY G. V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatominae-infested areas in Central Brazil and fungal activities against *Triatoma infestans*. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 189–191, 2004.
- LUZ, C.; RODRIGUES, J.; ROCHA, L. F. N. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, v. 122, p. 29–35, 2012.
- MANRIQUE, G.; LAZZARI, C. R. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 629–633, 1994.

MANRIQUE, G.; LAZZARI, C. R. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans*. I. Behavioral evidence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 645–648, 1995.

MANRIQUE, G.; SCHILMAN, P. E. Two different vibratory signals in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 77, p. 271–278, 2000.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; DE PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Org.). Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. 1ª ed. Viçosa: U.R. EPAMIG ZM, 2010, v.4, p. 169–195.

MBURU, D. M. et al. Comparison of volatile blends and gene sequences of two isolates of *Metarhizium anisopliae* of different virulence and repellency toward the termite *Macrotermes michaelseni*. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, p. 956–962, 2011.

MBURU, D. M.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A. Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michealseni*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 101–108, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz, Agência FIOCRUZ de Notícias, Saúde e ciência para todos. Acesso em: <http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>, 07 de Março de 2016.

MNYONE, L. L. et al. Anopheline and culicine mosquitoes are not repelled by surfaces treated with entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Parasite and Vectors**, v. 3, p. 80, 2010.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 401–404, 1999.

MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 46, p. 205–210, 2003.

MUTA, T.; IWANAGA, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 41–47, 1996.

NAJAR-RODRIGUEZ, A. et al. Behavioral and neurophysiological responses of an insect to changing ratios of constituents in host plant-derived volatile mixtures. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 3388–3397, 2010.

NAKAMURA, A.; RUBIÃO, E. C. N.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Principais espécies de triatomíneos implicados na transmissão da moléstia de Chagas. In: SIQUEIRA-BATISTA, R., GOMES, A.P.; CORRÊA, A.D. **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007, p. 248.

NATION, J. L. **Insect Physiology and Biochemistry**. Florida: CRC Press, 2002, pp. 485.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 211–220, 1976.

NÚÑEZ, J. A. Behavior of triatomine bugs. In: BRENNER, R.R; STOKA A.M. **Chagas' Disease Vectors**. Boca Raton: CRC Press, 1987, p. 1–28.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Susceptibility of non-target invertebrates to Brazilian microbial pest control agents. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 354–1360, 2011

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Insect vectors and human health**. Report of the Scientific Working Group meeting. Geneva, 80 pp, 2013.

ORIHUELA, P. L. S. et al. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, p. 298–306, 2008.

PAL, S.; ST. LEGER, R. J.; WU, L. P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 8969–8977, 2007.

PANZERA, F. et al. Cambios genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma infestans*. In: ROJAS CORTEZ, M. **Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas**. Ministério de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas, Bolívia, 2007, 352 pp.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 124-137, 2007.

PEDRINI, N. et al. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p. 434, 2009.

PICOLLO, M. et al. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 637–642, 2005.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 115, p. 279–283, 2007.

REISENMAN, C. E.; LAZZARI, C. R.; GIURFA, M. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **Journal of Comparative Physiology A**, v, 183, p. 533–541, 1988.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.32, p. 463–478, 1987.

- ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. A. Stability of entomopathogenic fungi. In: GINOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L. **Environmental Stability of Microbial Insecticides**. Lanham: Miscellaneous Publications, 1977, p. 19–76.
- ROCA, M. J.; LAZZARI, C. R. Effects of relative humidity on the hematophagous bug *Triatoma infestans*: hygropreference and eclosion success. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 901–907, 1994.
- ROCES, F.; MANRIQUE, G. Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 231–238, 1996.
- ROCHA, L. F. N.; SILVA, I.; LUZ, C. Activity of some hypocrealean fungi collected in a Cerrado ecosystem against *Rhodnius* spp. (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. **Acta Tropica**, v. 118, p. 63–66, 2011.
- ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 417–419, 2011.
- ROCHA E SILVA, E. O. Profilaxia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1979, 463 pp.
- ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. Fungal secondary metabolites modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetic Biology**, v. 48, p. 23–34, 2011.
- ROLÓN, M. et al. First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. 1026, 2011.
- ROMAÑA, C. A.; FARGUES, J. F. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 363–368, 1992.
- ROY, H. E. et al. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 331–357, 2006.
- SCHOFIELD, C. J. Sound production in some triatominae bugs. **Physiological Entomology**, v. 2, p. 43–52, 1977.
- SCHOFIELD, C. J.; PATTERSON, J. W. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs. **Journal of Medical Entomology**, v. 13, p. 727–734, 1977.
- SCHOFIELD, C. J.; UPTON, C. P. Brindley's scent-glands and the metasternal scent glands of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, p. 665–678, 1978.

SCHOFIELD, C. J. **Triatominae: biología y control**. West Sussex: Eurocommunica Publications, 1994.77 pp.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 12, p. 583–588, 2006.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88–100, 2009.

SCHOLTE, E. J. et al. An entomopathogenic fungus for control of adult African malarian mosquitoes. **Science**, v. 308, p. 1641–1642, 2005.

SILVEIRA, A. C. **O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001**. Organização Pan-americana da Saúde, Brasília, p.1543, 2002.

SOUSA, N. A. et al. New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 193–199, 2013.

ST. LEGER, R.J. et al. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168–179, 1991.

STAPLES, J. A.; MILNER, R. J. A laboratory evaluation of the repellency of the *Metarhizium anisopliae* conidia to the *Coptotermes lacteus*. **Sociobiology**, v. 36, p. 133–148, 2000.

SUN, J. Z. et al. Interaction of *Metarhizium anisopliae* and tree-based mulches in and repellence and mycose against *Coptotermes formosanus*. **Environmental Entomology**, v. 37, p. 755–763, 2008.

TANEJA, J.; GUERIN, P. M. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 18, 21–34, 1997.

TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. **Microbes Infection**, v. 4, p. 883–886, 2002.

THOMPSON, S. R.; BRADENBURG, R. L. Tunneling responses of mole crickets to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology**, v. 37, p. 755–763, 2005.

THUNGRABEAB, M.; TONGMA, S. Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on non target insects. **KMITL Science Technology**, v.7, p. 8–12, 2007.

TURCOTTE, M. T.; CORRIN, C. S. M.; JOHNSON, J. T. M. Adaptive evolution in ecological communities. **PLoS Biology** v. 10, e1001332, 2012.

VAN DER HOEVEN, R. S.; STEFFENS, J. C. Biosynthesis and elongation of short- and medium-chain-length fatty acids. **Plant Physiology**, v. 122, p. 275–282, 2000.

VILLANI, M. G. et al. Soil application effects of *Metarhizium anisopliae* on Japanese-beetle behavior and survival in turfgrass microcosms. **Environmental Entomology**, v. 23, p. 502–513, 1994.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Brasil**. Cadernos de Saúde Pública 16. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 7–12, 2000.

VITTA, C. R. et al. Aggregation mediated by feces and footprints in *Triatoma pseudomaculata*, a Chagas disease vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 865–867, 2002.

WARD, J. P. A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug, *Triatoma infestans*, to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n. and iso-butyric acid). **Physiological Entomology**, v. 6, p. 325–329, 1981.

XU, Y. et al. Biosynthesis of the cyclo-oligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Chemistry and Biology**, v. 15, p. 898–907, 2008.

XU, Y. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 353–364, 2009.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brogniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553–596, 2007.

9. ANEXOS

1 – Primeiras páginas do artigo científico publicado.

Journal of Invertebrate Pathology xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*

Luciana S. Lobo^{a,b}, Christian Luz^b, Éverton K.K. Fernandes^b, M. Patricia Juárez^a, Nicolás Pedrini^{a,*}^a Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), (CCT La Plata CONICET-UNLP), Facultad de Ciencias Médicas, Calles 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina^b Instituto de Patología Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2015

Revised 10 April 2015

Accepted 13 April 2015

Available online xxxxx

Keyword:

Secondary metabolites
 Nonribosomal peptides
 Chagas disease vector
 Humoral immunity
 Fungus–insect interaction

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi secrete toxic secondary metabolites during the invasion of the insect hemocoel as part of the infection process. Although these compounds have been frequently mentioned as virulence factors, the roles of many of them remain poorly understood, including the question of whether they are expressed during the infection process. A major hurdle to this issue remains the low sensitivity of biochemical detection techniques (e.g., HPLC) within the complex samples that may contain trace quantities of fungal molecules inside the insect. In this study, quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR) was used to measure the transcript levels within the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*, that encode for the synthetase enzymes of the secondary metabolites tenellin (*BbtenS*), beauvericin (*BbbeaS*) and bassianolide (*BbbslS*) during the infection of *Triatoma infestans*, a Chagas disease insect vector. Absolute quantification was performed at different time periods after insect treatment with various concentrations of propagules, either by immersing the insects in conidial suspensions or by injecting them with blastospores. Both *BbtenS* and *BbbeaS* were highly expressed in conidia-treated insects at days 3 and 12 post-treatment. In blastospore-injected insects, *BbtenS* and *BbbeaS* expression peaked at 24 h post-injection and were also highly expressed in insect cadavers. The levels of *BbbslS* transcripts were much lower in all conditions tested. The expression patterns of insect genes encoding proteins that belong to the *T. infestans* humoral immune system were also evaluated with the same technique. This qPCR-based methodology can contribute to deciphering the dynamics of entomopathogenic fungal infection at the molecular level.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

51

1. Introduction

Beauveria bassiana s.l. is a generalist entomopathogenic fungus used in microbial control programs worldwide. It represents a promising tool to control blood-sucking arthropods (Fernandes et al., 2012; George et al., 2013; Juárez et al., 2000; Luz et al., 1998, 2004; Pedrini et al., 2009; Romaña and Fargues, 1992) because, similar to other hypocrealean fungi, it does not need to be ingested to initiate the disease, and can invade insect hosts by penetrating through their cuticle. There is abundant biochemical information about the ability of *B. bassiana* to degrade insect cuticular proteins, chitin, and lipids (mostly hydrocarbons) (Fang et al., 2005, 2009; Pedrini et al., 2007, 2010, 2013; St. Leger et al.,

1986a,b, 1988; Zhang et al., 2012). Fungal hyphae penetrate into the hemocoel where the fungus colonizes and proliferates throughout the host by replicating as hyphal bodies (Lewis et al., 2009; Wanchoo et al., 2009).

During the invasive process, many strains secrete toxic or immunosuppressive compounds, often considered as secondary metabolites that facilitate and/or protect the fungal invasion process or confer resistance against host defense compounds, respectively (Ferron, 1985; Roberts et al., 1992; Trienens and Rohlf, 2012). These compounds have been well characterized in a variety of filamentous fungi, and particularly include polyketide and non-ribosomal peptides (Gupta et al., 1991; Molnar et al., 2010). *B. bassiana* s.l. produces the cyclooligomer nonribosomal peptides beauvericin and bassianolide, the diketomorpholine bassiatin, the cyclic peptides beauverolides, the dibenzoquinone oosporein, and the 2-pyridone tenellin (Gibson et al., 2014; Molnar et al., 2010).

* Corresponding author. Tel.: +54 221 4241596x383.

E-mail address: nicopedrini@yahoo.com (N. Pedrini).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.004>

0022-2011/© 2015 Published by Elsevier Inc.

Please cite this article in press as: Lobo, L.S., et al. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. J. Invertebr. Pathol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.004>

The biosynthesis of tenellin, beauvericin and bassianolide are mechanistically well known, and the genes encoding for tenellin synthetase (*BbtenS*), beauvericin synthetase (*BbbeaS*) and bassianolide synthetase (*BbbsIS*) have been characterized (Eley et al., 2007; Xu et al., 2009, 2008). Although the importance of these toxins has been frequently mentioned as an important step for fungal infection, their roles remain poorly understood, and many details including whether they are even expressed during the infection process remain obscure. Although some of these compounds may not be required for infection, it is likely that non-lethal secondary metabolites contribute to the disease process in various subtle ways, e.g., by perturbing biochemical and physiological processes that have the potential to exert effects on the overall fungal infection; by weakening host defense systems; and/or by limiting competing microbes. Molecular approaches with high sensitivity in complex biological samples are needed to help better understand where and how these compounds act during various phases of the pathogenic process (Rohlfis and Churchill, 2011).

After microbial invasion, insects trigger two types of innate immune reactions: the cellular and the humoral responses. The former involves phagocytosis, hemocyte aggregation and pathogen encapsulation. The latter includes the induction of several antimicrobial peptides (AMPs), lectins, and the prophenoloxidase cascade. Transcription of AMPs is regulated mainly by the Toll signal transduction pathway; the resulting peptides are then secreted into the hemocoel to prevent microbial proliferation (Pal and Wu, 2009). *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), a Chagas disease vector, induces AMPs such as defensin in both the hemolymph and the midgut after bacterial infection (Lopez et al., 2003). However, infection with the unicellular parasitic protozoa *Trypanosoma rangeli* does not modify defensin expression but activates lectins, affecting parasite motility and survival, and the prophenoloxidase cascade (Garcia et al., 2009).

B. bassiana is effective against all stages of the Chagas disease vector *Triatoma infestans*, in laboratory as well as in the field (Luz et al., 1998; Pedrini et al., 2009). Using a powder formulation containing *B. bassiana* conidia and diatomaceous earth, nymphs' mortalities ranged from 80% to 100% with median lethal time between 5 and 9 days; whereas 90% of adults were killed in 10–11 days (Forlani et al., 2011). An attraction–infection trap based on this

(Forlani et al., 2011). An attraction–infection trap based on this powder formulation combined with a chemical cue has already been tested for indoor *T. infestans* control in an endemic zone of the Argentina–Bolivia border, diminishing in 50% the insect population after a 30-d intervention (Pedrini et al., 2009). Also, the horizontal transmission of fungal conidia was dependant of bug density, showing to contribute significantly to the overall infection of the insect population (Forlani et al., 2011).

The aim of this study was to develop a methodology useful to measure the time course expression of *B. bassiana* genes toxins including tenellin, bassianolide, and beauvericin biosynthesis (i.e., *BbtenS*, *BbbeaS* and *BbbsIS*) during fungal infection of a target host, namely nymphs of *T. infestans*. We also investigated the gene expression levels of insect proteins belonging to the humoral immune response, including prophenoloxidase, hemolectin and defensin, in order to help understand, at the molecular level, their roles in the host–pathogen interaction that are triggered by the invasion of the fungus into the insect hemocoel.

2. Materials and methods

2.1. Fungal cultures

B. bassiana strain GHA (Laverlam International, Butte, MT) was grown on complete medium agar (CMA) plates containing 0.4 g KH_2PO_4 , 1.4 g Na_2HPO_4 , 0.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g KCl, 0.7 g

$\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g glucose, 5 g yeast extract, and 15 g agar in 1000 ml of distilled water. Plates were incubated at 26 °C for 12 days. Suspensions of conidia were prepared by rinsing fungal cultures with sterile distilled water and rubbing the sporulating surface with a bent needle. After filtering debris, the liquid was diluted in sterile distilled water containing 0.01% Tween 80. Blastospores were produced in Sabouraud dextrose +1% yeast extract liquid broth cultures (SDY), using conidia harvested from CMA plates to final concentration of 5×10^5 conidia ml^{-1} as the inoculum. Cultures were grown for 3 days at 26 °C under shaking (200 rpm), and filtered (twice) through glass wool to remove mycelia. Blastospores were obtained by centrifugation and the pellet resuspended in sterile saline solution (0.9% w/v of NaCl). Final conidial and blastospore concentrations were determined by direct counts using a hemocytometer.

2.2. Insects inoculation with conidia and blastospores

Fourth nymphal instar *T. infestans* came from a colony regularly maintained and reared at 30 °C, 50–60% relative humidity, under a 12 h photophase, and fed on chickens, at the INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, La Plata, Argentina. For all the bioassays, 2-week-old nymphs were used, one week after a blood meal. Individual insects were either immersed for 6 s in conidial suspensions (concentrations of 0, 10^4 , or 10^6 conidia ml^{-1}) or injected with 3 μl of fungal blastospore suspensions (0, 4×10^4 , or 4×10^6 blastospores ml^{-1}) to yield a final dose of 0, 120 or 12,000 blastospores/insect. After treatment, insects were returned and maintained at the rearing conditions described above. At different time periods (3, 6, 9, and 12 days for conidia-immersed insects and 12, 24, and 48 h for blastospore-injected insects), three live insects for each treatment were separated, and their total RNA was extracted as described in Section 2.4. Mortality bioassays were performed with other batches of insects treated with the same concentrations of conidia (five replicates, ten insects per replicate) and blastospores (ten replicates, ten insects per replicate). Mortality was checked either weekly during four weeks (conidia) or daily during one week (blastospores). Dead insects were placed in individual humid chambers (relative humidity (RH) $\geq 98\%$) to confirm fungal infection. Median lethal time (MLT) was estimated

confirm fungal infection. Median lethal time (MLT) was estimated as $\Sigma (\text{days}_n \times \text{dead nymphs}_n) / \text{total dead nymphs}$ (Moore et al., 1995).

2.3. Quantification of hyphal bodies in insect hemolymph

Hemolymph samples from live individuals previously treated with conidia or blastospores (as detailed in Section 2.2) were obtained as follows: each insect was surface-sterilized by completely dipping in 70% ethanol during 3 s and subsequently twice in sterile water for 3 s. The nymphs head was cut at the base with fine scissors, 10 μl of the leaking hemolymph were collected with a micropipette, immediately diluted tenfold in sterile saline solution and spread (using a Drigalski loop) onto SDY agar medium (SDYA) added with chloramphenicol (0.5 g/l) in a Petri dish (60 mm diameter) and incubated at 26 ± 1 °C, 75% ± 10 RH and 12 h photophase. The development and number of colony-forming units (CFU) on the medium were assessed up to 72 h of incubation. At least three replicates were done for each treatment.

2.4. Gene expression analysis

Total RNA (insect + fungus) was extracted from both fungus-treated and control insects by employing the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an on-column DNA digestion step (DNase I, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was quantified by a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington,

Please cite this article in press as: Lobo, L.S., et al. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. J. Invertebr. Pathol. (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.004>

Table 1
Beauveria bassiana and *Triatoma infestans* real-time quantitative primer sequences.

Name	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')	Amplicon (bp)	Target
<i>BbtenS</i>	ACTGTCCGATGGCAGCTAAG	TGTCCTTGGTGGTGGTATGG	113	Fungus
<i>BbbeaS</i>	GTTCTTCCTCCGATTCGGTTC	TAGAGCGCAACGCTTTCGGTTC	97	Fungus
<i>BbbsIS</i>	CAATCGACTGAGACGCCATTCC	TTTGACTCGGAATCCATACGG	156	Fungus
<i>TIPPO</i>	CACGGGTATTGATATCTTGGG	GATCATGACAGAGCGCAATGG	117	Insect
<i>TIHL</i>	TCCCACAAACTTCCACTCC	GGCAAAGATGAACCGCTACC	107	Insect
<i>TIDEF</i>	CGCCCTGGCTTACTCATATC	CACAGGTGGCTCTCTCAGAC	122	Insect
<i>Ti actin</i>	CACCCAGCAATGTATGATG	ACCATCAGGAAGTTCGTAAG	352	Insect

DE), and its integrity was assessed on a 1% (w/v) agarose gel. Two-step real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out with iScript cDNA Synthesis kit and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Amplification was performed in an Mx3000P qPCR System (Stratagene, La Jolla, CA) employing 40 ng reverse-transcribed total RNA for each sample. The primers used are listed in Table 1. The fungal sequences used for primer design were obtained from Genbank (*BbtenS*: AM409327, *BbbeaS*: EU886196, *BbbsIS*: FJ439897), the insect sequences (*TIPPO*, *TIHL*, and *TIDEF*) were selected from an EST expression library obtained from the integument of *T. infestans* nymphs (G.M. Calderón-Fernández and M.P. Juárez, unpublished data). Additional information about insect sequences is shown in Fig. S1. The following amplification program was used: denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with three-segment amplification (30 s at 95 °C for denaturation, 30 s at 55 °C for annealing, and 30 s at 72 °C for DNA chain elongation). In order to confirm that only single products were amplified, a temperature-melting step was then performed. Negative controls were performed by using 'cDNA' generated without reverse transcriptase as templates. Reactions containing primer pairs without template were also included as blank controls. The assay was performed in duplicate, and three independent biological replicates were done. The $\Delta\Delta Ct$ method was used to perform a relative quantification of the insect genes (Pfaffl et al., 2002). Because no fungal genes are present in control insects, the $\Delta\Delta Ct$ method is not useful to evaluate them, thus, an absolute quantification was performed

by using a calibration curve (see Section 2.5) for the genes of interest.

2.5. Standard curves for fungal gene quantification

The amplicons corresponding to *BbtenS*, *BbbeaS*, and *BbbsIS* were ligated and cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI). The gene fragments sizes were 113, 97, and 156 bp for *BbtenS*, *BbbeaS*, and *BbbsIS*, respectively. The constructs were transformed into *Escherichia coli* JM109, ampicillin-resistant colonies were isolated, and their plasmid purified (Qiagen, Hilden, Germany). The inserts were sequenced to confirm their identity. To calculate the number of construct gene copies (GC), the following formula was used: n° molecules pGEM T-Easy::insert/ μ l = [concentration of the pGEM-T-Easy::insert (ng/ μ l)]/molecular weight (ng/mol) \times 6.022×10^{23} molecules/mol (Gómez-Doñate et al., 2012), employing serial dilutions of the stocks. Each point was amplified by quadruplicate, and the average of Ct results was used to plot the curves.

2.6. Statistical analysis

For mortality bioassays, differences between the mean values were determined by the Student's *t* test ($p < 0.05$). For gene expression experiments, differences among the mean values obtained for each dose and time period were determined by analysis of variance (ANOVA) and by using Student–Newman–Keuls test to separate

treatment means ($p < 0.05$). Instat 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used for all statistical analyses.

3. Results

3.1. Bioassays

In order to define the time frame for the gene expression experiments, cumulative mortality was previously evaluated in both conidia- and blastospore-treated insects. In conidia-treated insects (Table 2), cumulative mortalities obtained at the end of the assay (four weeks) were $57 \pm 9\%$ (10^4 conidia ml^{-1}) and $83 \pm 6\%$ (10^6 - conidia ml^{-1}) ($p = 0.046$); the MLT values were 15.4 ± 1.0 days (10^4 conidia ml^{-1}) and 10.3 ± 1.4 days (10^6 conidia ml^{-1}) ($p = 0.017$). Mortality of the control insects at the same period was $7 \pm 3\%$. In blastospore-injected nymphs (Table 3), mortalities at day 7 were $88 \pm 6\%$ (120 blastospores/nymph) and $97 \pm 1\%$ (12,000 blastospores/nymph) ($p = 0.171$), and MLTs were 4.3 ± 0.1 days and 2.4 ± 0.2 days ($p < 0.0001$) for 120 and 12,000 blastospores per nymph, respectively. No mortality was observed in control insects.

Hyphal bodies were quantified in hemolymph extracted at the same time periods than those assayed for gene expression. An increment in CFU/ μ l with time post fungal inoculation was observed either in insects immersed in conidia suspensions (Table 4) or injected with blastospore suspensions (Table 5).

3.2. Standard curves

The cloned gene fragments were serially diluted and used as templates for qRT-PCR. The Ct values obtained were plotted against the logarithm of gene copies. Fig. 1 shows the curves obtained for the three fungal genes, the coefficients determined (r^2) were 0.996 (*BbtenS*), 0.999 (*BbbeaS*), and 0.993 (*BbbsIS*).

3.3. Expression of *B. bassiana* genes encoding non-ribosomal peptides

In nymphs immersed in conidial suspensions, the expression levels of fungal genes were dependent on both the original conidial concentration used and the time period assayed ($F = 8.4$;

Table 2
Mortality and median lethal time of 4th nymphal instar *Triatoma infestans* immersed in conidial suspensions of *Beauveria bassiana*.

Concentration (con ml^{-1})	Cumulative mortality (% \pm SEM)				MLT (days \pm SEM)
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
1×10^4	10 \pm 5	30 \pm 5*	40 \pm 9*	57 \pm 9*	15.4 \pm 1.0*
1×10^6	29 \pm 7	67 \pm 8*	81 \pm 6*	83 \pm 6*	10.3 \pm 1.4*
Control	3 \pm 3	3 \pm 3	7 \pm 3	7 \pm 3	n.d.

con: conidia, MLT: median lethal time, n.d.: non determined.

* Differences between treatments are significant ($p < 0.05$) after Student's *t* test.

Please cite this article in press as: Lobo, L.S., et al. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. J. Invertebr. Pathol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.004>