

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Juliana Marzari Rossato

**AVALIAÇÃO DA BARATA *NAUPHOETA CINEREA* COMO
ORGANISMO MODELO PARA O ESTUDO DE SEPSE.**

**Santa Maria, RS
2020**

Juliana Marzari Rossato

**AVALIAÇÃO DA BARATA *NAUPHOETA CINEREA* COMO ORGANISMO MODELO
PARA O ESTUDO DE SEPSE.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rossato, Juliana Marzari
AVALIAÇÃO DA BARATA NAUPHOETA CINEREA COMO ORGANISMO
MODELO PARA O ESTUDO DE SEPSE / Juliana Marzari Rossato.
2020.
165 p.; 30 cm

Orientador: João Batista Teixeira da Rocha
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2020

1. Imunologia 2. Insetos 3. Sepse 4. Hemolinfa 5.
Corpo gorduroso I. Teixeira da Rocha, João Batista II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(s). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JULIANA MARZARI ROSSATO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Juliana Marzari Rossato

**AVALIAÇÃO DA BARATA *NAUPHOETA CINEREA* COMO ORGANISMO MODELO
PARA O ESTUDO DE SEPSE.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

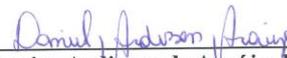
Aprovado em 05 de novembro de 2020:



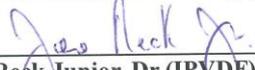
João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)



Andressa Paladini, Dra. (UFSM) - Parecer



Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo, Dr. (UFSM) - Videoconferência



José Reck Junior, Dr (IPVDF) - Videoconferência



Letícia Beatriz Matter, Dra. (PUCRS) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho envolve a colaboração de várias pessoas, as quais gostaria de agradecer. Ao longo desta etapa enfrentei diferentes desafios que me proporcionaram oportunidade de aprender, trocar experiências, errar, acertar e progredir. Portanto, agradeço:

- à minha família e amigos, em nome do meu marido Samuel Vizzotto. Minha família é a base de valores, suporte e exemplo.*
- ao meu orientador João Batista Teixeira da Rocha, pela oportunidade de realizar este estudo, me dando liberdade de escolha do tema, condução do trabalho e confiança, o que contribuiu para estimular a minha autonomia.*
- aos professores e técnicos da UFSM de Palmeira das Missões, em nome da Terimar Ruoso Moresco e Elaine Lucas Gonzales, profissionais e pessoas que foram sempre muito atenciosas comigo e dispostas a me auxiliar em todos os momentos.*
- à UFSM, campus Santa Maria e Palmeira das Missões, pelo espaço de aprendizado e convivência.*
- à CAPES, pelo auxílio concedido.*
- aos colegas de laboratório de bioquímica, alunos do laboratório CEMICRO (UFSM Palmeira das Missões), e alunos das disciplinas que lecionei no período de professora substituta, pela oportunidade de troca de conhecimento, experiências e aprendizado.*
- aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSM.*

RESUMO

AVALIAÇÃO DA BARATA *NAUPHOETA CINEREA* COMO ORGANISMO MODELO PARA O ESTUDO DE SEPSE.

AUTORA: Juliana Marzari Rossato
ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

Estudos utilizando organismos-modelo, como os insetos, são crescentes e têm buscado investigar, de maneira preliminar, os mecanismos envolvidos na progressão das doenças infecciosas, examinar potenciais alvos farmacológicos e acessar fatores de virulência bacterianos. Os insetos possuem órgãos e sistemas análogos aos de mamíferos, vias metabólicas conservadas, tempo de vida curtos e, em geral, são de fácil criação e manipulação. No entanto, poucas espécies de insetos têm sido utilizadas em estudos para compreensão das reações imunes. Assim, este trabalho teve por objetivo investigar as bases da defesa imunológica da barata *Nauphoeta cinerea* e avaliar seu potencial como animal alternativo para o estudo de infecção bacteriana. Diferentes quantidades de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* foram injetadas no tórax de ninfas, em último estágio juvenil. Foi verificada a sobrevivência, número de ninfas que chegaram ao estágio adulto, alterações em parâmetros bioquímicos na hemolinfa, corpo gorduroso e foram contabilizadas UFC na hemolinfa, após inoculação do microrganismo. Foi avaliada a potencial memória imunológica (*priming*) frente a desafios bacterianos repetidos, alterações comportamentais associadas à infecção e a atividade da enzima fenoloxidase (FO) na hemolinfa. O transcriptoma disponível de *N. cinerea*, da cabeça e corpo gorduroso, foi utilizado para investigação da expressão relativa basal de genes envolvidos na cascata da FO e para análise de comparação filogenética dos aminoácidos de outros insetos. A infecção causou a diminuição de metabólitos na hemolinfa (glicose, aminoácidos, proteínas e colesterol) e inibição da atividade da FO após 24 h pós injeção. Ninfas infectadas com as maiores concentrações de *S. aureus* (2×10^8 e 2×10^{10} UFC/barata), quando comparadas às ninfas controle, apresentaram um aumento na mortalidade, alterações morfológicas permanentes nos adultos, aumento de UFC na hemolinfa, ao longo do tempo, diminuição dos níveis de proteína no corpo gorduroso, diminuição no comportamento de agregação e *grooming* de antenas.

Ninfas inoculadas com 2×10^7 UFC/barata apresentaram diminuição de UFC na hemolinfa ao longo do tempo, aumento dos níveis de proteína no corpo gorduroso, aumento na atividade locomotora e exploração. Não houve mudança na atividade da FO na fase aguda da infecção (até 4 h). A pré-imunização com 2×10^7 UFC/barata, ou salina, não promoveu aumento da atividade da FO após segundo desafio com 2×10^{10} UFC/barata. A sobrevivência e a proteção de baratas que receberam imunização com concentração subletal de *S. aureus* variou de acordo com a condição metabólica bacteriana. A sequência da FO compartilha alta identidade com insetos da infraclasse Neoptera, especialmente para o sítio de ligação B do cobre. Os resultados da expressão relativa mostraram que as serino proteases e FO são mais expressas na cabeça do que no corpo gorduroso das ninfas de *N. cinerea*. Com base nos resultados, *N. cinerea* demonstrou ser um organismo-modelo promissor para utilização em estudos relacionados à infecção bacteriana.

Palavras-chave: Imunologia. Insetos. Sepses. Metabolismo. Hemolinfa. Corpo gorduroso.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE COCKROACH *NAUPHOETA CINEREA* AS A MODEL ORGANISM FOR THE SEPSIS STUDY

Studies using model organisms, such as insects, are growing and have sought to investigate, in a preliminary way, the mechanisms involved in the progression of infectious diseases, examine potential pharmacological targets and access bacterial virulence factors. Insects have organs and systems analogous to mammals, conserved metabolic pathways, short lifetimes and, in general, are easy to create and manipulate. However, few insect species have been used in studies to understand immune reactions. Thus, this work aimed to investigate the bases of the immune defense of the cockroach *Nauphoeta cinerea* and evaluate its potential as an alternative animal for the study of bacterial infection. Different amounts of colony-forming units (CFU) of *Staphylococcus aureus* were injected into the nymphs' thorax in the last juvenile stage. Survival, number of nymphs that reached the adult stage, changes in biochemical parameters in the hemolymph and fat body were verified and CFU was counted in the hemolymph, after inoculation of the microorganism. The potential immunological memory (priming) was evaluated in the face of repeated bacterial challenges, as well as behavioral changes associated with infection and the phenoloxidase (FO) enzyme activity in the hemolymph. The available transcriptome of *N. cinerea*, of the head and fat body, was used to investigate the relative basal expression of genes involved in the FO cascade and to analyze phylogenetic comparison of amino acids from other insects. The infection caused a decrease in metabolites in the hemolymph (glucose, amino acids, proteins and cholesterol) and inhibition of FO activity after 24 h post injection. Nymphs infected with the highest concentrations of *S. aureus* (2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach), when compared to control nymphs, showed an increase in mortality, permanent morphological changes in adults, an increase in CFU in hemolymph over time, decreased levels of protein in the fat body, decreased aggregation behavior and antenna grooming. Nymphs inoculated with 2×10^7 CFU/cockroach showed a decrease in CFU in the hemolymph over time, increased levels of protein in the fat body, increased locomotor activity and exploration. There was no change in FO activity in the acute phase of infection (up to 4 h). Priming with 2×10^7 CFU / cockroach, or saline, did not promote an increase in FO activity after the second challenge with 2×10^{10} CFU/cockroach. The survival and protection of cockroaches primed with sublethal

concentration of *S. aureus* varied according to the bacterial metabolic condition. The FO sequence shares a high identity with insects of the Neoptera infraclass, especially for the copper B binding site. The results of the relative expression showed that the serine proteases and FO are more expressed in the head than in the fat body of *N. cinerea* nymphs. Based on the results, *N. cinerea* proved to be a promising model organism for use in studies related to bacterial infection.

Keywords: Immunology. Insects. Sepsis. Metabolism. Hemolymph. Fat body.

LISTA DE FIGURAS

Figuras

- Figura 1. Indivíduos adultos de *N. cinerea*.21
- Figura 2. Último instar de *N. cinerea*. Barra representa 1 cm.21
- Figura 3. Cutícula da ninfa da barata *Nauphoeta cinerea*. Epiderme (Epid), Endocutícula (Endo), Exocutícula (Exo), Epicutícula (Epi). Imagens em imersão. Barra representa 20 micrômetros.24
- Figura 4. Células de ninfas da barata *Nauphoeta cinerea*, coradas pelo kit Instant Prov. Imagens em imersão e barra representa 10 micrômetros. PR: pró-hemócitos, PL: plasmatócitos, GR: granulócitos, ES: esferulócitos, OE: oenócitos.26
- Figura 5. Corpo gorduroso de ninfas de *N. cinerea*. (A) Arranjo em lóbulos (setas vermelhas); (B-D) Detalhes do corpo gorduroso (50 μ m), CN: tecido conectivo composto pela hemolinfa; A: adipócitos ou trofócitos; M: micetócitos, U: urócitos; setas pretas: túbulos traqueais; seta verde: delimitação do corpo gorduroso pela hemolinfa.28
- Figura 6. Papel da fenoloxidase (FO) na síntese da melanina. FO participa na formação de DOPA a partir da tirosina. FO também converte DOPA em dopaquinona, e 5,6-dihidroindol (DHI) para indol-5,6-quinona. Alternativamente, pode-se obter DHI a partir da dopamina, processo que também envolve a participação da FO.33
- Figura 7. Ativação do sistema pró-fenoloxidase/fenoloxidase e produção de melanina em insetos. PAMPs, como B-1,3 glucanos, LPS e PGN se ligam aos receptores de reconhecimento (proteína de ligação ao glucano, BG-bp; proteína de ligação a lipopolissacarídeo, LPD-BP; e proteína de ligação ao peptídeoglicano, PG-BP). Isso resulta na cascata de ativação de serino proteases (PAP), que realizam a conversão de pró-fenoloxidase (proFO) em fenoloxidase (FO). FO em combinação com fenóis e O₂ resulta na formação de quinonas, que polimerizam para formar melanina. De maneira semelhante, a via alternativa do complemento gera C3b, pela C3 convertase, que com outras proteínas forma C5 convertase. Esta enzima cliva C5 em C5a e C5b. C5b recruta C6, C7, C8 e moléculas C9 para formar o complexo de ataque à membrana, que vai atuar sobre a superfície do patógeno causando a lise da célula.35
- Figura 8. Similaridades entre a via Toll em invertebrados e a via de sinalização Toll-like em vertebrados. Após ativação do receptor toll e do homólogo toll-like, a cascata induz a ativação o fator de transcrição homólogo Nf-kB e Dif, em vertebrados e invertebrados, respectivamente. A translocação desses fatores para o núcleo, estimula a produção de AMP,

em invertebrados, citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, em vertebrados. PGRP: proteínas de reconhecimento de peptidoglicano; GGBP1: proteína de ligação a bactéria gram-negativa 1; SPE: enzima que processa Spätzle. 38

Figura 9. Comparação da via IMD em insetos e TNF-alpha em mamíferos. Em insetos, a via IMD é ativada pela ligação de peptidoglicanos (PGN) aos receptores de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), que recrutam a formação do complexo IMD, dFADD e DREED, resultando na clivagem e ativação de TAB2/TAK1. Em mamíferos, TNF-alpha é reconhecido pelo receptor 1 fator de necrose tumoral, que recruta as proteínas RIPP, FADD e caspase 8. Esse complexo ativa TAK1, que ativa o complexo IKK, resultando na fosforilação e degradação do inibidor IκB. NF-κB é liberado para se translocar ao núcleo. 40

Figura 10. Comparação esquemática do sistema de coagulação na hemolinfa de insetos e no sangue de mamíferos. A coagulação em insetos envolve plasmatócitos, ativação de hemolectina mediada por transglutimase, eig71Ee e fondue, assim como ativação de pró-fenoloxidase em fenoloxidase (proFO/FO). Durante a coagulação do sangue humano, uma série de reações enzimáticas resultam na formação de trombina e conversão de fibrinogênio em fibrina. A ativação do sistema complemento também contribui com a coagulação em mamíferos, assim como a ativação da FO contribui com a coagulação dos insetos. A transglutaminase é homóloga ao fator XIIIa e ambos participam da formação da rede de coagulação. 43

Figura 11. Situações hipotéticas para imunização por *priming*. (A) Após o *priming*, os mecanismos de defesa permanecem ativos, o que garante um benefício na sobrevivência quando frente a um segundo desafio. Defesas ativadas pelo *priming* podem combinadas com defesas ativadas pelo desafio (linha descontínua). (B) Após o *priming*, a resposta inicial pode diminuir com o tempo, com o desafio ocorre uma reação mais forte e rápida. Esta situação implica na existência de alguma forma de memória, onde informações do contato prévio com o patógeno são rapidamente acessadas no desafio. (C) Em contraste às situações (A) e (B), o *priming* pode alternativamente montar uma resposta imune qualitativamente diferente daquela que segue um desafio simples (A). 46

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Fisiologia comparada de insetos e mamíferos..... | 22 |
| Tabela 2. Elementos da resposta imune celular e humoral dos insetos..... | 29 |
| Tabela 3. Alguns dos fatores de virulência produzidos por <i>Staphylococcus aureus</i> e seus efeitos sobre mamíferos. | 54 |
| Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos desenhados para avaliação da expressão gênica em <i>N. cinerea</i> | 135 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| DAMP | Padrões moleculares associados a danos |
| DDC | Dopa descarboxilase |
| DOPA | Dopamina |
| FO/PO | Fenoloxidase |
| GNBP | Proteína de ligação a bactéria gram-negativa |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade |
| NET | Armadilha de rede de DNA |
| PAMP | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PGRPG | Proteína de reconhecimento de peptidoglicano |
| proFO/proPO | Pró-fenoloxidase |
| PRR | Receptores de reconhecimento de padrões |
| RI | Resposta imune |
| UFC/CFU | Unidades formadoras de colônias |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| APRESENTAÇÃO | 16 |
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO | 17 |
| 1.2 <i>NAUPHOETA CINEREA</i> | 20 |
| 1.3 FISIOLOGIA COMPARADA: INSETOS E MAMÍFEROS | 22 |
| 1.4 RESPOSTA IMUNE | 28 |
| 1.4.1 Resposta celular | 30 |
| 1.4.2 Resposta humoral | 32 |
| 1.4.3 Resposta imune adquirida..... | 44 |
| 1.4.4 Alterações comportamentais associadas à infecção..... | 47 |
| 1.5 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> | 53 |
| 3 OBJETIVOS | 60 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 60 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 60 |
| 3. METODOLOGIA | 61 |
| 3.1 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS | 61 |
| 3.2 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICAS | 61 |
| 3.3 FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DA HEMOLINFA | 62 |
| 4. RESULTADOS | 63 |
| 4.1 ARTIGO 1 | 63 |
| 4.1.1 Objetivos específicos..... | 63 |
| 4.2 ARTIGO 2 | 77 |
| 4.2.1 Objetivos específicos..... | 77 |
| 4.3 ARTIGO 3 | 109 |

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 4.3.1 Objetivos específicos | 109 |
| 4.4 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS..... | 135 |
| 5. DISCUSSÃO | 137 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 146 |
| 7. PERSPECTIVAS | 147 |
| 8. REFERÊNCIAS | 148 |

APRESENTAÇÃO

Na **introdução**, consta uma revisão bibliográfica sobre a relação parasita-hospedeiro, bem como uma apresentação do inseto utilizado neste estudo, a barata *Nauphoeta cinerea*. Disserta-se um pouco sobre a fisiologia e imunidade comparada entre mamíferos e insetos, e aspectos sobre estudos de infecção já realizados com insetos e a bactéria escolhida, *Staphylococcus aureus*. A maior parte da metodologia aplicada para o desenvolvimento do trabalho, bem como os resultados obtidos, serão apresentados na forma de **artigo científico** publicado e/ou submetido. Na sessão **discussão geral** é apresentada uma reflexão relativa aos dados gerais do trabalho e dados da literatura. As interpretações gerais sobre os resultados dos artigos científicos desenvolvidos são apresentadas na **conclusão**. Nas **referências** constam as citações presentes apenas na introdução e discussão geral da tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

A evolução dos organismos também é o resultado das interações entre hospedeiros, parasitas e o ambiente (PANAYIDOU et al., 2014; WOJDA, 2017). Portanto, compreender os mecanismos que medeiam as doenças infecciosas inclui compreender a coevolução e a ecologia de dois organismos, os parasitas e os hospedeiros, sob influências de condições ambientais (HEDRICK, 2017; WOJDA, 2017). Parasitas ou patógenos, transposons, vírus, príons, bactérias, os diversos eucariotos unicelulares coletivamente referidos como protistas, fungos, helmintos e ectoparasitas impuseram e impõem pressão sobre a evolução de mecanismos imunológicos nos seus hospedeiros (HEDRICK, 2017). Da mesma forma, parasitas codificam proteínas envolvidas na adesão celular, colonização, evasão e supressão do sistema imune do hospedeiro, chamadas de fatores de virulência, que são evolutivamente selecionados para garantir o acesso às atrativas fontes de nutrientes, calor e umidade dos hospedeiros (ROHMER et al., 2011). A virulência é uma propriedade do parasita, revelada em hospedeiros específicos (ROHMER et al., 2011). Assim como, o sistema imunológico é uma propriedade do hospedeiro, mas sua eficácia depende do agente infeccioso (HEDRICK, 2017).

Para desvendar os mecanismos que regulam as interações entre parasitas e hospedeiros, modelos animais, como roedores e primatas não humanos, são frequentemente utilizados em estudos, devido à similaridade genética e fisiológica com humanos, ao conhecimento acumulado e à versatilidade para manipulação genética (TREVIANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2019). No entanto, esses resultados não têm gerado contribuições farmacológicas significativas (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008; FINK, 2014). Além disso, questões éticas e econômicas vêm impulsionando pesquisas que priorizem os 3Rs (*reduce, refine and replace*) em experimentos que envolvam o uso de animais vertebrados (KENDALL, 2019). Dentre esses preceitos estão reduzir (*reduce*) o número de animais, refinar (*refine*) os protocolos para aumentar o conforto dos animais e reduzir a dor, e

substituir (*replace*) animais por outros modelos que não possuem questões bioéticas associadas (KENDALL, 2019; TREVIJANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2019).

Modelos animais alternativos e de plantas já foram desenvolvidos, com base em suas vantagens experimentais, como baixo custo, facilidade de manutenção, criação, recursos de alto rendimento, semelhança com hospedeiros naturais, dentre outros (TREVIJANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2019). A utilização de invertebrados, principalmente insetos, como animais alternativos para estudar o sistema imunológico e a fisiopatologia das doenças, incluindo as humanas, aumentou amplamente nas últimas décadas (TREVIJANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2019). Esses estudos também impulsionam o desenvolvimento de novas metodologias aplicadas a organismos não-vertebrados, aprimorando técnicas para serem trabalhadas com modelos menos complexos e que possam ser informativos (HERNÁNDEZ et al., 2015; KENDALL, 2019).

Nesse sentido, o uso de insetos pode contribuir para o entendimento dos princípios básicos dos processos patológicos, dos mecanismos envolvidos na progressão das doenças infecciosas, para examinar possíveis alvos farmacológicos, medicamentos para o tratamento de doenças e acessar os fatores de virulência bacterianos (KAITO e SEKIMIZU, 2007; MIYAZAKI et al., 2012; ISHII et al., 2014; KOCHI et al., 2016; DE ROODE e LEFÈVRE, 2012; KENDALL et al., 2019).

Apesar das diferenças morfológicas entre mamíferos e insetos, os avanços da biotecnologia nas últimas décadas revelam fatores genéticos e moleculares conservados entre esses organismos (GARCÍA-LARA et al., 2005). A mosca *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) (Diptera; Drosophilidae) é o inseto modelo mais estudado no mundo, o que demonstra a validade, confiabilidade e reprodutibilidade desse modelo na realização de pesquisas (MEIGEN, 1830; DIONNE e SCHNEIDER, 2008; PANAYIDOU et al., 2014; KENDALL et al., 2019). A revisão de Panayidou e colaboradores (2014) demonstra 68 estudos avaliando infecções humanas (bacterianas, fúngicas e virais) utilizando a mosca como modelo.

Microrganismos patogênicos para humanos também foram estudados utilizando a bicho-da-seda, *Bombyx mori* (SCOPOLI, 1777) (Lepidoptera, Bombycidae) (KAITO e SEKIMIZU, 2007; KAITO et al., 2011), a traça da cera, *Galleria mellonella* (FABRICIUS, 1798) (Lepidoptera, Pyralidae) (TSAI et al., 2016), a larva do besouro da farinha, *Tenebrio*

molitor (LINNAEUS, 1758) (Coleoptera, Tenebrionidae) (HAINE et al., 2008), a abelha do oeste ou europeia, *Apis mellifera* (LINNAEUS, 1758) (Hymenoptera, Apidae) (ISHII; HAMAMOTO; SEKIMIZU, 2014), a traça do tabaco, *Manduca sexta* (LINNAEUS, 1763) (Lepidoptera, Sphingidae) (FLEMING et al., 2006), além do verme *Caenorhabditis elegans* (MAUPAS, 1900) (Rhabditida, Rhabditidae) (SIFRI et al., 2003).

As principais formas de infecção nos insetos, utilizadas nesses estudos, incluem inoculação do microrganismo no tórax e no abdômen. A injeção no tórax causa lesão no epitélio cuticular e músculo subjacente. Após a inoculação do microrganismo, a bactéria se prolifera localmente e tende a se disseminar de forma sistêmica para o corpo do organismo (PANAYIDOU et al., 2014). A injeção no abdômen simula uma infecção sistêmica, pois ultrapassa as barreiras primárias de defesa do organismo, possibilitando que a bactéria entre diretamente no interior do hospedeiro (PANAYIDOU et al., 2014). Esse tipo de infecção não é ideal para microrganismos com grande poder invasivo, como a bactéria *Staphylococcus aureus*, que apresenta muitos fatores de virulência, causando rapidamente a morte do hospedeiro (PANAYIDOU et al., 2014). Outra forma de infecção também utilizada é via oral, através da alimentação, para simular doenças intestinais e interações com a microbiota do hospedeiro (PANAYIDOU et al., 2014).

A atual compreensão da imunidade dos insetos vem principalmente de estudos conduzidos em Diptera e Lepidoptera, que são ordens de insetos holometábolos filogeneticamente relacionados (HILLYER, 2016). Além disso, poucas espécies dentro dessas ordens são utilizadas nas pesquisas. O sistema imunológico dos insetos hemimetábolos, com exceção de alguns membros de Hemiptera, ainda não foi amplamente explorado (HILLYER, 2016). Visto que os insetos representam um dos grupos evolutivos de maior sucesso, com ampla colonização de diferentes ambientes (KENDALL et al., 2019), a ecologia de uma espécie de inseto muitas vezes varia dramaticamente entre os estágios da vida (por exemplo, do aquático para o aéreo, ou do subterrâneo para acima do solo), e essas mudanças, combinadas às mudanças do estágio de desenvolvimento, devem impactar nas respostas imunes associadas a patógenos (HILLYER, 2016). No caso de Diptera e Lepidoptera, esses insetos apresentam ciclos de vida curtos (poucas semanas), quando comparados a outros insetos, como as baratas, que podem viver por anos (BELL et al., 2007).

1.2 NAUPHOETA CINEREA

No presente estudo, foi utilizada a barata *Nauphoeta cinerea* (OLIVER, 1789) (Blattodea, Blaberidae) como organismo alternativo aos modelos tradicionalmente utilizados para o estudo de infecções. *N. cinerea* é um inseto ovovivíparo e de comportamento sub-social (BOUCHEBTI et al., 2016). Apesar de ser originária da África, atualmente, é amplamente encontrada pelo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ROTH e WILLIS, 1960). As baratas normalmente se alimentam de plantas mortas e material animal (ROTH e WILLIS, 1960).

A média de vida destes organismos, com fornecimento de água e comida, é cerca de 150-200 dias para fêmeas (MOORE e MOORE, 2001) e 94 dias para machos (BELL et al., 2007) (Figura 1). O período de gestação das fêmeas é em torno de 35 – 50 dias e as fêmeas também podem se reproduzir por partenogênese (CORLEY et al., 2001). A reprodução assexuada, no entanto, resulta em uma aptidão significativamente reduzida, com redução no número de filhotes, menor viabilidade dos indivíduos, maior tempo de desenvolvimento e vida adulta mais curta, quando comparado com filhotes de fêmeas acasaladas (CORLEY e MOORE, 1999).

Semelhante a outros insetos hemimetábolos (não realizam metamorfose completa), após a eclosão, as ninfas são morfologicamente similares aos adultos (Figura 2), exceto pela ausência de asas e órgãos reprodutivos maduros (BELL et al., 2007). As ninfas crescem gradativamente e passam por cerca de 8 a 10 mudas até atingirem o estágio adulto (SANTOS, 2019). Indivíduos adultos medem em média 2.5 – 2.9 cm de comprimento e pesam cerca de 0.5 g (SANTOS et al., 2016). Machos e fêmeas interagem sob influência de feromônios para o acasalamento (MOORE et al., 2003). Os machos frequentemente são agressivos com outros machos, especialmente quando envolve o acasalamento (KOU e HSU, 2013).

Dentre as vantagens do uso deste organismo estão a facilidade de criação; ciclo de vida mais longo do que de mosca ou mosquitos; o tamanho dos indivíduos permite melhor manipulação, especialmente ninfas de último instar (1.5 a 2.5 cm de comprimento) e adultos. Os adultos não voam e a reprodução das baratas é mais rápida do que a dos vertebrados. O transcriptoma do corpo gorduroso e da cabeça foi recentemente publicado (SEGATTO et al., 2018), fornecendo informações genéticas para futuras investigações moleculares.

N. cinerea tem sido instrumental em estudos toxicológicos e farmacológicos, incluindo avaliação de parâmetros bioquímicos e comportamentais após exposição ao vinilciclohexano (WACZUK et al., 2020), exposição por ração com o pesticida clorpirifós (ADEDARA et al., 2016), metilmercúrio (ADEDARA et al., 2015), cafeína (DA SILVA et al., 2018), co-exposição ao glutamato monossódico e metilmercúrio (AFOLABI et al., 2018). Perturbações comportamentais também foram verificadas após a injeção dos extratos de inseticidas derivados de *Araucaria angustifolia* (Pinales, Araucariaceae) (CARRAZONI et al., 2017), a secreção de anura *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae) (LEAL et al., 2018), extratos de Jaburetox derivados de *Canavalia ensiformis* (Fabales, Fabaceae) (DOS SANTOS et al., 2019b), extrato de cianobactéria contendo anatoxina-a (s) (DOS SANTOS et al., 2019a) e algas *Prasiola crispa* (Prasiolales, Prasiolaceae) (LORENSI et al., 2019). A partir dos trabalhos já publicados com a barata *N. cinerea*, nós sugerimos que este organismo pode ser promissor em estudos voltados ao entendimento dos complexos mecanismos envolvidos na progressão das doenças infecciosas.

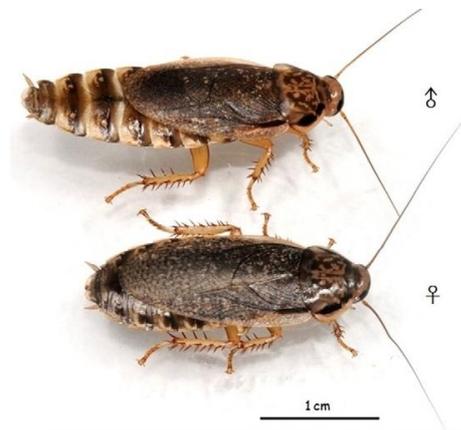


Figura 1. Indivíduos adultos de *N. cinerea*.

Fonte: Kou e Hso, 2013.

Figura 2. Último instar de *N. cinerea*. Barra representa 1 cm.



Fonte: O Autor

Os tópicos a seguir apresentam os conhecimentos a cerca da fisiologia dos insetos, bem como os elementos que compõem a resposta imune destes organismos. As informações são apresentadas de maneira comparativa à fisiologia e imunologia dos mamíferos. Os dados existentes sobre a barata *N. cinerea* e outras baratas são integrados e destacados no texto.

1.3 FISILOGIA COMPARADA: INSETOS E MAMÍFEROS

Apesar de aparentemente muito distintos, mamíferos e insetos apresentam órgãos e sistemas análogos, bem como homologia em várias vias metabólicas (BUCHON et al., 2014). A Tabela 1 demonstra a fisiologia comparada destes organismos, destacando algumas estruturas corporais e as funções correspondentes nos insetos.

Tabela 1. Fisiologia comparada de insetos e mamíferos.

| Mamíferos | Insetos | Função nos insetos |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| Pele | Cutícula | Barreira física e proteção mecânica |
| Ossos/esqueleto | Exoesqueleto | Estrutura e forma |
| Intestino | Intestino | Digestão e absorção de nutrientes |
| Fígado | Corpo gorduroso | Catabolismo e anabolismo de proteínas e carboidratos |
| Rins | Túbulos de Malpighi | Filtração e excreção |
| Tecido adiposo | Corpo gorduroso | Armazenamento de nutrientes |
| Sistema circulatório fechado, | Sistema circulatório aberto, coração | Distribuição de nutrientes e circulação de |

| | | |
|--------------------------------------|--|---|
| coração e sangue | dorsal e hemolinfa | células do sistema imune |
| Células sanguíneas | Hemócitos | Fagocitose, coagulação, melanização, produção e secreção de citocinas |
| Sistema nervoso central e periférico | Sistema nervoso central e cordão nervoso ventral | Transmissão de impulso nervoso, sensibilidade |
| Vias aéreas, pulmões e hemácias | Túbulos traqueais | Trocas gasosas; o oxigênio é diretamente disponibilizado aos tecidos |

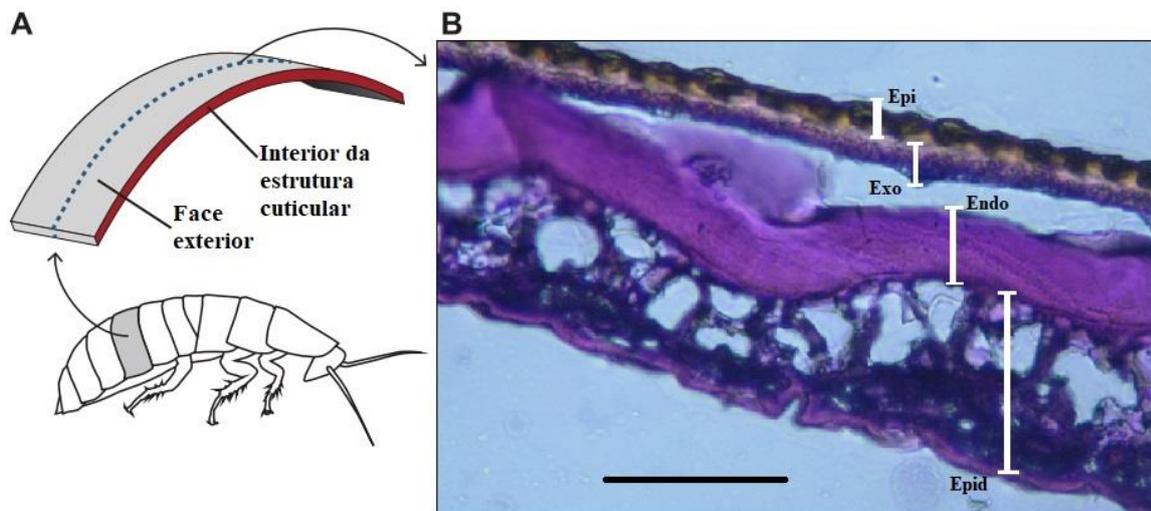
Fonte: Bell et al., 2007; Clark et al., 2014; Dubovskiy 2016

O exoesqueleto ou cutícula dos insetos é uma importante barreira primária contra patógenos, revestindo e protegendo todo o corpo do animal, da mesma forma que a pele, em vertebrados (CLARK et al., 2014). Ela também desempenha suporte estrutural do organismo, evita perda de água, apresenta muitos receptores sensoriais e protege contra estresse mecânico (predação, locomoção, camuflagem ou coloração críptica) (CLARK et al., 2014). A Figura 3 demonstra um corte transversal do exoesqueleto da barata *N. cinerea*, que é secretado pela epiderme. A epicutícula, ou camada mais externa, é composta de proteínas e cera (hidrocarbonetos). A exocutícula, logo abaixo da epicutícula, está ausente nas articulações e é o local onde ocorre o rompimento do exoesqueleto durante o período de muda ou ecdise (CLARK et al., 2014). Na endocutícula, há quitina e proteínas conjugadas formando glicoproteínas (CLARK et al., 2014). A espessura da cutícula fornece indícios sobre o comportamento do organismo, hábitos e ecologia (CLARK et al., 2014). No caso das baratas, a cutícula mais fina permite rápida locomoção, em resposta ao escape, como observado em *Periplaneta americana* (CLARK et al., 2014). Por outro lado, as baratas *Blaberus craniifer* (BURMEISTER, 1838) e *Gromphadorhina portentosa* (SCHAUM, 1853) possuem uma cutícula espessa e resistente, indicando que são mais expostas a ataques de predadores, ou mordidas, batidas, perfurações e esmagamentos (CLARK et al., 2014).

Na barata *Blattella germanica*, os principais lipídeos da cutícula são hidrocarbonetos, sintetizados pelos oenócitos (célula ou hemócito) e transportados até a superfície da cutícula (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). Além da importante função na impermeabilização e prevenção da dissecação, esses hidrocarbonetos auxiliam na comunicação entre os indivíduos, modulando o comportamento, como a agregação, o reconhecimento, a

discriminação do sexo, os membros da mesma família e o período de acasalamento (WADAKATSUMATA e SCHAL, 2019). Everaerts e Brossut (2003) verificaram que os hidrocarbonetos cuticulares de *N. cinerea* são espécie-específicos, quando os indivíduos são mantidos em grupo com a mesma espécie. No entanto, quando em grupo heterogêneo, com a barata *Leucophaea maderae*, os autores observaram uma mudança na composição da cutícula, incluindo hidrocarbonetos da espécie de convívio. Esse padrão foi revertido após a separação das espécies (EVERAERTS e BROSSUT, 2003).

Figura 3. Cutícula da ninfa da barata *Nauphoeta cinerea*. Epiderme (Epid), Endocutícula (Endo), Exocutícula (Exo), Epicutícula (Epi). Imagens em imersão. Barra representa 20 micrômetros.



Fonte: O autor.

A hemolinfa é um fluido intersticial que circula na hemocele, análoga ao sangue, composta por hemócitos (células sanguíneas), nutrientes, produtos do metabolismo celular,

proteínas e outras moléculas (DUBOVSKIY, 2016). Os hemócitos, assim como os leucócitos, atuam diretamente na resposta imune como fagócitos, alterando sua densidade de acordo com a demanda fisiológica (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). A classificação dos hemócitos é controversa e não há um consenso na denominação das células dos insetos e nem dos artrópodes (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Apesar de algumas células apresentarem o mesmo nome, não significa que apresentam a mesma forma e nem a mesma função (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006).

Em *D. melanogaster* existem três tipos celulares circulantes na hemolinfa, amplamente aceitos pela literatura, os lamelócitos, plasmatócitos e células cristal (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Em *G. mellonella*, pelo menos cinco tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa foram descritos, incluindo os pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenócitos (PEREIRA et al., 2018). Na larva de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae), seis tipos foram identificados, incluindo hemócitos vermiformes, além dos listados anteriormente para *G. mellonella* (NEGREIRO et al., 2009). Em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae), quatro tipos celulares foram identificados na hemolinfa, os pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenócitos (AMARAL et al., 2010).

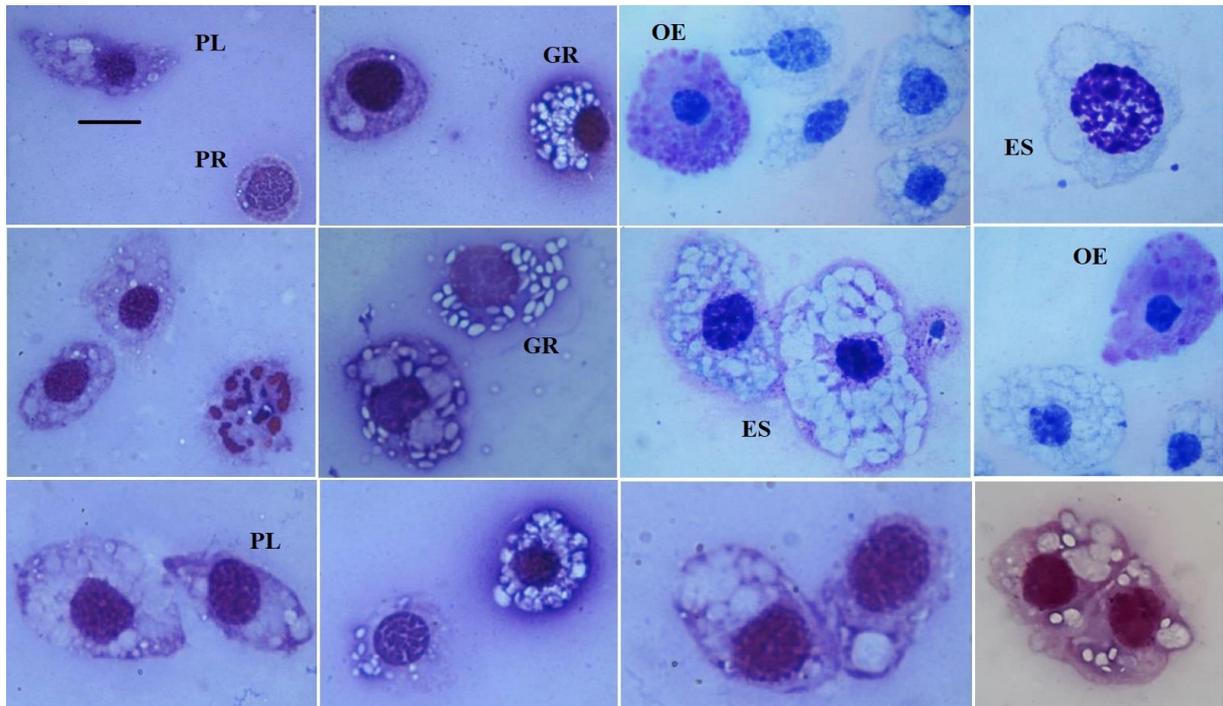
Pró-hemócitos são consideradas células progenitoras em *G. mellonella* e *M. scutellaris*, apresentam um núcleo grande, que ocupa quase toda célula (AMARAL et al., 2010). Os plasmatócitos de *G. mellonella* participam diretamente da fagocitose e da nodulação/encapsulação, e possuem enzimas lisossomais no seu citoplasma (PEREIRA et al., 2018). Em *Drosophila*, os lamelócitos são os responsáveis pela fagocitose (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Os granulócitos de *G. mellonella* também participam do processo de fagocitose e nodulação/encapsulação; possuem grânulos em seu citoplasma, com moléculas atrativas para outros hemócitos, que serão liberadas por exocitose (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Em *Drosophila*, os plasmatócitos apresentam função semelhante aos granulócitos (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Os oenócitos de *G. mellonella* são células grandes, esféricas, produzem e armazenam propenoxidase (proFO) (esta enzima será discutida mais adiante) (PEREIRA et al., 2018). As células cristal de *Drosophila* parecem ser similares aos oenócitos na forma e função (RIBEIRO e BREHÉLIN, 2006). Os esferulócitos transportam e secretam componentes cuticulares; possuem inclusões esféricas no citoplasma (PEREIRA et al., 2018). A Figura 4 demonstra algumas das células observadas na hemolinfa da barata *N. cinerea*, após

coleta, fixação e coloração. As ninfas de *N. cinerea* apresentam hemócitos semelhantes aos de *G. mellonella*.

O coração dorsal dos insetos auxilia na circulação da hemolinfa e seus componentes (DUBOVSKIY, 2016). Por terem o sistema circulatório aberto, o oxigênio é diretamente disponibilizado aos tecidos, através do sistema de túbulos traqueais. Essa condição favorece que ocorra a neutralização de invasores de forma rápida, e que a atuação dos hemócitos e de imunomediadores possa ser amplamente distribuída. No entanto, esse sistema também facilita a invasão mais rápida por agentes infecciosos em todo o hospedeiro (DUBOVSKIY, 2016).

O intestino é o principal órgão responsável pela absorção de nutrientes, assim como em mamíferos (BELL et al., 2007). Os túbulos de Malpighi desempenham funções semelhantes aos rins, filtrando metabólitos da hemolinfa, que são excretados diretamente no intestino, para posterior eliminação ou reabsorção (BELL et al., 2007).

Figura 4. Células de ninfas da barata *Nauphoeta cinerea*, coradas pelo kit Instant Prov. Imagens em imersão e barra representa 10 micrômetros. PR: pró-hemócitos, PL: plasmatócitos, GR: granulócitos, ES: esferulócitos, OE: oenócitos.



Fonte: O autor.

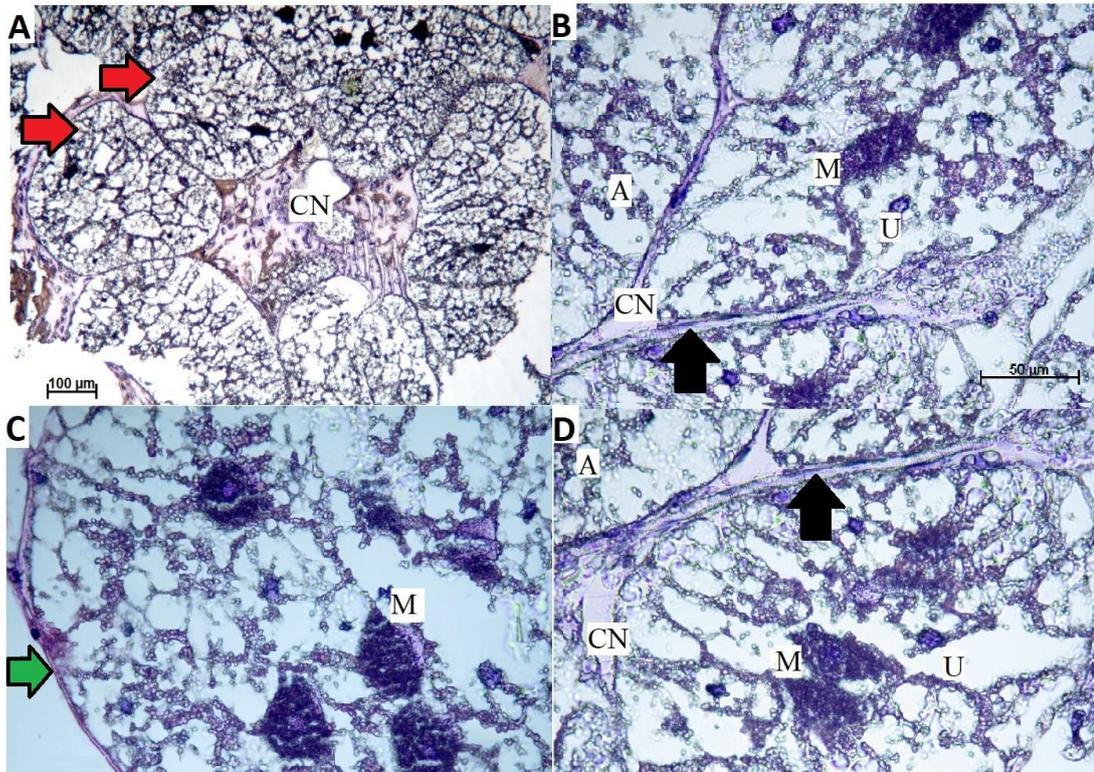
O corpo gorduroso é um órgão análogo ao tecido adiposo e ao fígado nos vertebrados, está envolvido no metabolismo energético, sendo o principal local de produção e armazenamento de glicogênio, lipídios, proteínas e uratos nos insetos (AZEEZ et al., 2014). Esse órgão funciona na detecção da disponibilidade de energia e nutrientes e coordena as funções metabólicas apropriadas e respostas de sobrevivência (COSTA-LEONARDO et al., 2013). As células do corpo gorduroso não apenas controlam a síntese e utilização das reservas de energia (lipídeos e glicogênio), mas também sintetizam a maioria das proteínas da hemolinfa e dos metabólitos circulantes (ARRESE e SOULGAS, 2010). Este órgão também está envolvido na hematopoiese, produção e secreção de componentes imunológicos, como peptídeos antimicrobianos, proteínas envolvidas na coagulação e realiza a integração da resposta aos patógenos com status metabólico do organismo (ARRESE e SOULGAS 2010; AZEEZ et al., 2014).

Nos isópteros, subordem que compreende cupins, o corpo gorduroso é organizado em lóbulos, que são delimitados pela hemolinfa, o que favorece ajuste rápido às mudanças na concentração de metabólitos em circulação (COSTA-LEONARDO et al., 2013). Esta

organização pode ser observada nas imagens histológicas da barata *N. cinerea*, demonstradas na Figura 5, com identificação baseada na referência de Costa-Leonardo et al., 2013. As principais células observadas no corpo gorduroso são os adipócitos (trofócitos), urócitos e bacteriócitos (micetócitos) (WÜEST, 1978; COSTA-LEONARDO et al., 2013).

O adipócito é a célula básica deste tecido, caracterizado pela presença de numerosas gotículas lipídicas, armazenando principalmente triglicerídeos em gotículas lipídicas no espaço intracelular, junto com grânulos de glicogênio e proteína (WÜEST, 1978; COSTA-LEONARDO et al., 2013). O urócito é uma célula menos comum, especializada no armazenamento de urato (WÜEST, 1978; COSTA-LEONARDO et al., 2013). O terceiro tipo de célula presente no corpo gorduroso é o bacteriócito ou micetócito, encontrado em baratas, pulgões e alguns hemípteros (COSTA-LEONARDO et al., 2013). Essas células contêm microrganismos simbiotes, que produzem componentes essenciais que não são incorporados pela dieta (COSTA-LEONARDO et al., 2013), além de áreas com armazenamento de glicogênio (WÜEST, 1978). Sob estímulos endócrinos, o corpo adiposo de cupins controla os ciclos de muda e reprodução (COSTA-LEONARDO et al., 2013).

Figura 5. Corpo gorduroso de ninfas de *N. cinerea*. (A) Arranjo em lóbulos (setas vermelhas); (B-D) Detalhes do corpo gorduroso (50 µm), CN: tecido conectivo composto pela hemolinfa; A: adipócitos ou trofócitos; M: micetócitos, U: urócitos; setas pretas: túbulos traqueais; seta verde: delimitação do corpo gorduroso pela hemolinfa.



Fonte: O autor.

1.4 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune (RI) compreende um conjunto complexo de interações moleculares, metabólicas, celulares, humorais e comportamentais (SHEEHAN et al., 2018). A RI dos insetos é comparada à imunidade inata dos mamíferos, por causa dos mecanismos primários (barreiras físicas, químicas e biológicas) e por não ser específica, desempenhando o mesmo padrão contra uma variedade de desafios (SHEEHAN et al., 2018). A RI dos insetos é comumente dividida em imunidade celular e humoral (DHINAUT et al., 2018). Na resposta celular, ocorre a fagocitose, a nodulação e a encapsulação (DUBOVSKIY et al., 2016). Na resposta humoral, ocorre a melanização, coagulação, produção de peptídeos antimicrobianos e

ação de lisozimas (KAVANAGH e REEVES, 2004). Na Tabela 2 estão listados os principais elementos que compõem essas respostas, e que serão explorados nos tópicos seguintes.

Tabela 2. Elementos da resposta imune celular e humoral dos insetos.

| Resposta imune | Ação | Função |
|----------------|--|--|
| Celular | Fagocitose | Hemócitos (plasmócitos e granulócitos) internalizam e digerem partículas. Mediada por opsonização |
| | Nodulação (bactérias, fungos e protozoários) | Recrutamento de hemócitos e deposição de camadas de células ao redor do patógeno. Extravasamento de conteúdo citoplasmático sobre o patógeno (degranulação, liberação de proFO, DNA e histonas). |
| | Encapsulação (parasitoides, vermes e seus ovos) | |
| Humoral | Coagulação | Formação de coágulo (hemócitos, proteínas e melanina) na região lesada. |
| | Proteínas que danificam a parede celular dos patógenos | Peptídeos antimicrobianos; lisozimas |
| | Melanização | Formação e deposição de melanina para o isolamento do patógeno na hemolinfa. |

Fonte: Hillyer 2016; Dhinaut et al., 2017; Jung et al., 2019.

A infecção ocorre em insetos de forma natural ou artificial, por meio de danos na cutícula (tegumento), via sistema traqueal (respiração), via oral ou sistema gastrointestinal (VALLET-GELY et al., 2008). O sistema imune dos insetos reconhece uma variedade de moléculas conservadas constituintes de patógenos, chamadas de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicóico (LTA), β -1,3-glucano, e outros tipos de açúcares, (JUNG et al., 2019). Essas moléculas são reconhecidas por famílias de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR), presentes no meio extracelular e nas membranas celulares, que ativam o sistema imune efetor (DHINAUT et al., 2017). Moléculas do próprio hospedeiro, denominadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como fragmentos de colágeno, glicolipídios, glicoproteínas, espécies reativas de oxigênio, cálcio, rompimento da membrana

basal de células por apoptose ou necrose, também são reconhecidas por PRRs (CERENIUS et al., 2008; DUBOVSKIY et al., 2016).

Os PRRs são divididos em famílias de proteínas conservadas evolutivamente, que se expandiram ou se contraíram entre os diferentes taxos (HILLYER, 2016). Entre as diferentes famílias estão proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PGRP), proteínas com domínio imunoglobulina, proteínas contendo motivo tioéster, proteínas de reconhecimento de β -1,3 glucano, galectinas, lectinas do tipo-C, proteínas contendo repetições ricas em leucinas (LRR), molécula de adesão celular down syndrome (*Dscam*) (HILLYER, 2016; DHINAUT et al., 2017; JUNG et al., 2019). Esses receptores são responsáveis pelo reconhecimento e consequente ativação de vias imunes efetoras, como fagocitose, melanização, vias de sinalização intracelular, que ativam a transcrição de genes e produção de proteínas (DUBOVSKIY et al., 2016; HILLYER 2016; JUNG et al., 2019).

1.4.1 Resposta celular

1.4.1.1 Fagocitose

Dentre as principais reações rápidas da defesa celular dos insetos estão a fagocitose, nodulação e encapsulamento (DUBOVSKIY, 2016). A fagocitose é um processo celular evolutivamente conservado entre vertebrados e invertebrados para destruição de patógenos (HILLYER, 2016). As partículas estranhas são reconhecidas por PRR da membrana celular do fagócito, ou por PRR humorais (proteínas contendo motivo tioéster, *Dscam*, PGRPs) (HILLYER, 2016). A associação do PAMP ou RRP às proteínas da membrana plasmática do fagócito permitem a internalização da partícula reconhecida para o meio intracelular, ficando delimitada dentro do fagossomo (HILLYER, 2016). O fagossomo se funde ao lisossomo e ocorre a digestão da partícula por enzimas hidrolíticas (HILLYER, 2016; DUBOVSKIY, 2016).

1.4.1.2 Nodulação e encapsulação

Na nodulação e na encapsulação, os hemócitos formam agregados celulares, isolando o corpo estranho do resto do organismo (DUBOVSKIY, 2016). A nodulação é associada a microrganismos, como bactérias, vírus e fungos, enquanto a encapsulação é associada a invasores maiores, como protozoários, nematoides e parasitoides (ovos e larvas), que não podem ser fagocitados por uma única célula (DUBOVSKIY, 2016).

Na primeira parte da nodulação/encapsulação, células granulares e coagulócitos liberam seu conteúdo citoplasmático (degranulam) sobre as partículas estranhas, liberando fatores que desencadeiam a coagulação e, posteriormente, a produção de melanina (RAHMET-ALLA e ROWLEY, 1989). Na segunda parte da nodulação/encapsulação, cerca de 2 h a 4 h após invasão, ocorre o depósito de várias camadas de plasmatócitos e melanina, consolidando a barreira de isolamento ao redor do invasor (RAHMET-ALLA e ROWLEY, 1989).

Em humanos, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegarem ao local da infecção (NASCIMENTO et al., 2018). Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na depuração de patógenos por fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas extracelulares (NET, 'neutrophil extracellular traps') (NASCIMENTO et al., 2018). Nas NETs, a cromatina descondensada dos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, associadas a algumas moléculas encontradas em seus grânulos e citoplasma, são liberadas para o meio extracelular e podem prender e matar o microrganismo (NASCIMENTO et al., 2018). Este fenômeno também foi identificado em outros vertebrados e em células de invertebrados, incluindo a barata *Periplaneta americana* (NASCIMENTO et al., 2018).

Baratas *L. maderae* infectadas com três linhagens de *Bacillus cereus* e uma de *Escherichia coli* apresentaram maior formação de nódulos após 1 h do que após 24 h da infecção (RAHMET-ALLA e ROWLEY, 1989). A injeção de bactérias mortas promoveu pouca formação de nódulos. O aumento na formação de nódulos foi associado à inoculação de bactérias mais virulentas (RAHMET-ALLA e ROWLEY, 1989). Larvas de *G. mellonella* e *Pieris brassicae* (Lepidoptera, Pieridae) infectadas com *B. cereus* (morto ou vivo) e *E. coli* (viva) apresentaram formação de nódulos após 1 h da infecção (RATCKIFFE e GAGEN, 1976). Decorrido 24 h pós-infecção, esses nódulos estavam maiores e altamente melanizados (RATCKIFFE e GAGEN, 1976).

Na larva de *M. sexta* e do besouro *Zophobas atratus* (Coleoptera, Tenebrionidae), observou-se um aumento na formação nódulos quanto maior foi a quantidade de bactéria injetada (HOWARD et al., 1998). No entanto, a capacidade de formação dos nódulos variou entre os insetos, enquanto *Z. atratus* foi capaz de formar 30 nódulos/larva após inoculação de 10^8 células de bactéria, *M. sexta* formou 300 nódulos/larva. Os autores associaram as diferenças observadas a propriedades específicas de cada hospedeiro, do patógeno e a interação entre os dois, como fatores particulares que medeiam a resposta imune ou a sua inibição (HOWARD et al., 1998).

1.4.2 Resposta humoral

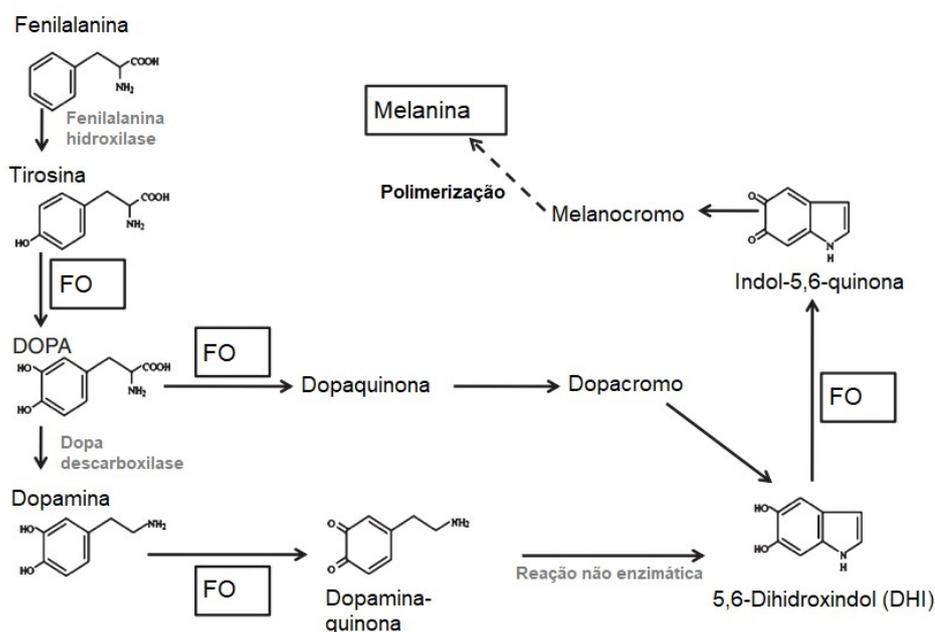
1.4.2.1 Melanização

A melanização é um processo enzimático para endurecer e colorir a cutícula dos insetos, cicatrizar feridas após algum dano, para evitar a perda de hemolinfa e participa da resposta imune humoral (CERENIUS et al., 2008; HILLYER, 2016; DUVOSKY et al., 2016). Na resposta humoral, a melanização consiste na deposição de melanina durante a nodulação/encapsulação dos patógenos, contribuindo para o isolamento físico dos micróbios, impedindo a sua propagação no interior do hospedeiro (AYRES e SCHNEIDER, 2008) e bloqueando a absorção de nutrientes pelo parasita, matando-o por inanição (BINGGELI et al. 2014). A melanização compõe a R.I dos artrópodes, mas não a dos vertebrados (KAVANAGH e REEVES, 2004). Nos mamíferos, a produção de melanina é realizada pelos melanócitos, em tecidos específicos como o cérebro, pele, cabelos e olhos, contribuindo na pigmentação, proteção contra radiação solar e produção de vitamina D (SHEEHAN et al., 2018). Nos insetos, a produção da melanina é desencadeada após reconhecimento de PAMPs, enquanto que em mamíferos esse processo não envolve a ativação desses receptores (SHEEHAN et al., 2018).

As melaninas são biopolímeros pigmentados derivados de compostos fenólicos como a tirosina (GONZÁLEZ-SANTOYO e CÓRDOBA-AGUILAR, 2011). Nos insetos, a

fenoloxidase (FO) é a principal enzima responsável pela quebra de substratos derivados de tirosina (Figura 6), contribuindo na biossíntese da melanina, que será depositada sobre o local ou organismo responsável pela lesão (BINGGELI et al. 2014; SUGUMARAN e BAREK, 2016). A FO realiza a hidroxilação de monofenóis e a oxidação de fenóis (catecolaminas) em quinonas (AYRES e SCHNEIDER, 2008). As quinonas são moléculas instáveis, que podem ser citotóxicas e reativas aos micróbios, porém, também podem ser danosas ao próprio inseto hospedeiro (AYRES e SCHNEIDER, 2008). Durante o processo de melanização, há formação de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO_x), que contribuem na eliminação do patógeno (BUCHON et al., 2014).

Figura 6. Papel da fenoloxidase (FO) na síntese da melanina. FO participa na formação de DOPA a partir da tirosina. FO também converte DOPA em dopaquinona, e 5,6-dihidroindol (DHI) para indol-5,6-quinona. Alternativamente, pode-se obter DHI a partir da dopamina, processo que também envolve a participação da FO.



Fonte: Adaptado de González-Santoyo e Córdoba-Aguilar (2011).

A FO é sintetizada como zimogênio, pro-fenoloxidase (proFO), sendo armazenada principalmente nos hemócitos e liberada na hemolinfa após uma lesão. A proFO está presente

na hemolinfa em níveis baixos, mesmo em condições normais, na superfície de hemócitos, cutícula e em células epiteliais do intestino médio (GILLESPIE et al., 1997; ZIBAE, et al. 2011). ProFOs isoladas de invertebrados e purificadas, foram caracterizadas como monômeros inativos, com massa de cerca de 70-80 kDa e, após a ativação proteolítica, a enzima tem uma massa de 60-70 kDa (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1998).

Desconsiderando a etapa final da produção de melanina, o sistema de ativação da proFO apresenta similaridades com o sistema complemento de vertebrados (Figura 7) (SHEEHAN et al., 2018). Em ambos os processos, no sistema complemento humano e na ativação de proFO, há produção de moléculas citotóxicas e de componentes opsonizantes (SHOKAL e ELEFThERIANOS, 2017; SHEEHAN et al., 2020).

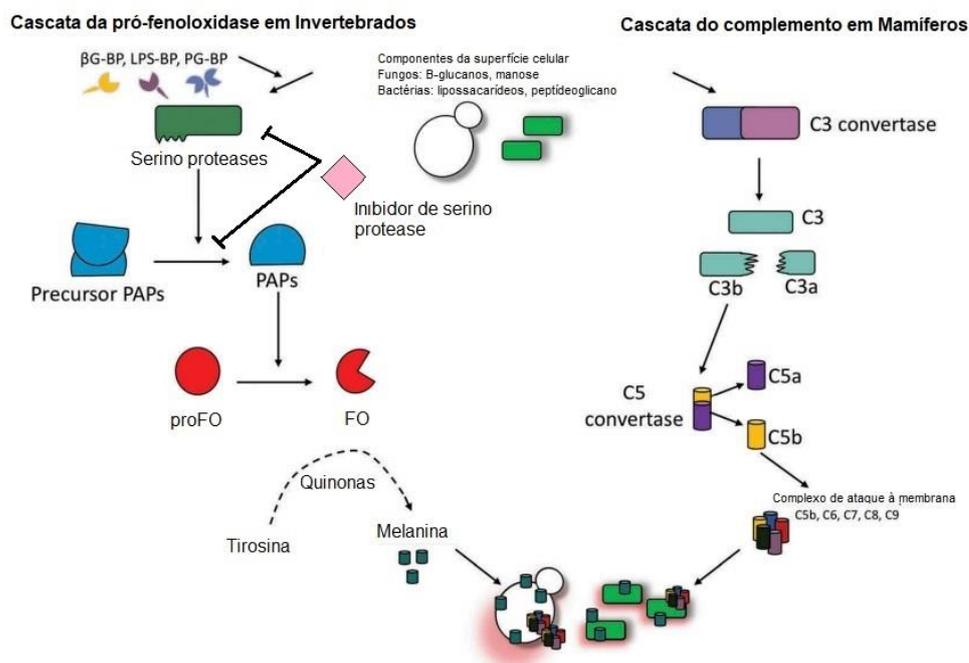
A ativação de proFO é desencadeada diretamente pela interação com PAMPs, DAMPs (GONZÁLEZ-SANTOYO e CÓRDOBA-AGUILAR, 2011) ou pela cascata proteolítica de proteínas serinas, que apresentam domínio CLIP (JIANG e KANOST, 2000). Na região amino terminal de muitas serino proteases de artrópodes, há um ou dois domínios de grampo conectados ao domínio catalítico do carboxi-terminal, através de uma região ligante e uma ligação dissulfeto (JIANG e KANOST, 2000). Os CLIPs são específicos para invertebrados e atuam em cascata para modular várias respostas imunológicas, incluindo coagulação, melanização e síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (MAVROULI et al., 2005; KANOST e JIANG, 2015). Nem todos os CLIPs são catalíticos. As proteínas que não possuem um ou mais dos três resíduos Histidina (His), Aspartato (Asp) e Serina (Ser), que formam a tríade catalítica, não são catalíticas, e são chamadas de proteína serina homóloga (SPH), e parecem atuar como cofatores no processamento da proFO (KANOST e JIANG, 2015).

Um complexo formado por PRR, PAMPs e serino proteases, desencadeia uma cascata de ativação de serino proteases (BINGGELI et al. 2014). Evidências indicam que esta cascata participa da ativação da proFO e da citocina Spätzle, levando ao processo de melanização e formação de AMPs (via Toll), respectivamente (KANOST e JIANG, 2015; NAKHLEH et al., 2017). Apolipoproteínas também demonstraram ativar proFO, causando alterações conformacionais para expor o sítio ativo da proFO (SUGUMARAN, 2002).

Um importante mecanismo regulador endógeno, para evitar a grande ativação da FO, e a consequente produção de compostos tóxicos (quinonas), que também podem ser perigosos

para o hospedeiro, consiste em inibidores das serino proteases (serpins, do inglês ‘serine protease inhibitors’) (GONZÁLEZ-SANTOYO e CÓRDOBA-AGUILAR, 2011). As serpins contêm um loop central reativo que se liga especificamente ao local ativo das serino proteases alvo (ligação covalente), de uma maneira semelhante ao substrato (KANOST e JIANG, 2015).

Figura 7. Ativação do sistema pró-fenoloxidase/fenoloxidase e produção de melanina em insetos. PAMPs, como B-1,3 glucanos, LPS e PGN se ligam aos receptores de reconhecimento (proteína de ligação ao glucano, BG-bp; proteína de ligação a lipopolissacarídeo, LPD-BP; e proteína de ligação ao peptídeoglicano, PG-BP). Isso resulta na cascata de ativação de serino proteases (PAP), que realizam a conversão de pró-fenoloxidase (proFO) em fenoloxidase (FO). FO em combinação com fenóis e O₂ resulta na formação de quinonas, que polimerizam para formar melanina. De maneira semelhante, a via alternativa do complemento gera C3b, pela C3 convertase, que com outras proteínas forma C5 convertase. Esta enzima cliva C5 em C5a e C5b. C5b recruta C6, C7, C8 e moléculas C9 para formar o complexo de ataque à membrana, que vai atuar sobre a superfície do patógeno causando a lise da célula.



Fonte: Adaptado de Sheehan et al. (2018).

Vários fatores de origem microbiana têm a capacidade de interferir na atividade da FO (CERENIUS et al., 2008). Fatores não proteicos (derivados de polifenóis) também atuam como inibidores potentes da FO (CERENIUS et al., 2008). Portanto, organismos patogênicos

capazes de produzir tais fatores, podem aumentar sua sobrevivência nos hospedeiros (CERENIUS et al., 2008). Um grupo de vírus, polidnavírus (PDVs), causa supressão em várias vias associadas à resposta imune dos insetos, incluindo a atividade da FO (SHELBY e WEBB, 1999). Estes vírus vivem em mutualismo com as vespas Hymenoptera, que endoparasitam larvas de lagartas (SHELBY e WEBB, 1999). Ao depositarem seus ovos nas lagartas, as vespas também injetam PDV (SHELBY e WEBB, 1999). A infecção por *Campoletis sonorensis* PDV (CsPDV) reduz os níveis de atividade da FO no plasma das larvas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera) parasitadas. Também ocorre redução dos níveis de proFO plasmático circulante, dopacromo isomerase (DI), redução da atividade Dopa descarboxilase (DDC). Os autores sugerem que a síntese de DDC seja alterada em nível pós-transcricional, visto que os níveis de mRNA não foram alterados (SHELBY e WEBB, 1999). Níveis reduzidos dessas enzimas foram acompanhados por quantidades reduzidas de substratos derivados da tirosina (Shelby e Webb, 1999). Essas deficiências levam a severas restrições na quantidade de Dopa e outras catecolaminas necessárias para a melanização (SHELBY et al., 2000).

Algumas vespas também produzem um veneno que, além de seus efeitos sinérgicos com PDVs, na ausência do vírus, as proteínas do veneno também comprometem o sistema imune do hospedeiro, para permitir o desenvolvimento dos ovos do inseto parasita (ASGARI et al., 2003). Asgari e colaboradores (2003) identificaram que a proteína presente no veneno (Vn50) é homóloga à proteína serina homóloga (SPH), sem atividade catalítica.

A bactéria *Photorhabdhus* (bacilo gram-negativo) é simbiote de vermes nematódeos entomopatogênicos (ELEFATHERIANOS et al., 2007). A bactéria produz a molécula (E)-1,3-dihidroxi-2-(isopropil)-5-(2-feniletetil)benzeno (ST), que inibe as principais defesas imunológicas do inseto *M. sexta*: produção de AMP, atividade da FO e formação de nódulos melanóticos (ELEFATHERIANOS et al., 2007).

1.4.2.2 Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs possuem 12-50 aminoácidos, carga positiva e uma estrutura anfipática (SHEEHAN et al., 2018). Os AMPs possuem ação microbicida e matam os patógenos

induzindo a ruptura da superfície da membrana, interferindo com alvos intracelulares (DNA e RNA), atividade anti-biofilme, inibição da síntese de proteínas ou inibição de proteases microbianas (SHEEHAN et al., 2018). AMP também tem papel quimiotático em mamíferos, ligando as respostas inata e adaptativa, ativando e recrutando células imunes, incluindo célula T, células dendríticas e monócitos (SHEEHAN et al., 2018).

Em mamíferos, os AMP são produzidos por vários tecidos (mucosa oral, trato gastrointestinal, pulmões, olhos, trato reprodutivo), mas nos insetos, eles são predominantemente sintetizados no corpo gorduroso, e em pequenas quantidades nos hemócitos e trato gastrointestinal (SHEEHAN et al., 2018). Esses peptídeos são produzidos pela ativação de vias de sinalização intracelular através da via do toll, a via da deficiência imune (Immune deficiency pathway, IMD) e Janus quinase / transdutor de sinal (Jak/Stat) (SHEEHAN et al., 2018).

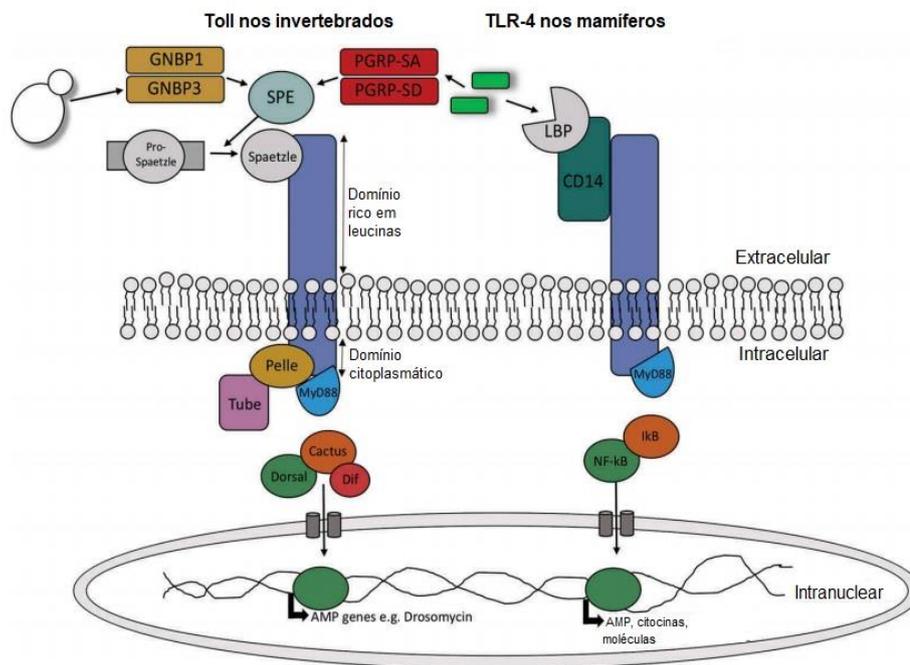
Famílias de genes e proteínas, como a dos receptores toll são um grande exemplo de família de proteínas conservadas entre vertebrados, invertebrados e plantas (GARCÍA-LARA et al., 2005; SHEEHAN et al., 2018). A mosca *D. melanogaster* teve um papel crucial na descoberta dos receptores toll-like (TLR), que são os principais receptores de PAMPs das células de mamíferos (BUCHON et al., 2014). Homologias entre os receptores toll e toll-like podem ser observadas no domínio citoplasmático e no domínio extracelular, contendo repetições ricas em leucina (SHEEHAN et al., 2018). O receptor toll-like de mamíferos contém múltiplos clusters de cisteínas tanto nos domínios C-terminal quanto N-terminal (SHEEHAN et al., 2018).

Nos mamíferos, os receptores toll interagem diretamente com os PAMPs, mas nos insetos, a ativação do toll depende da ligação da citocina Spätzle (BUCHON et al., 2014). Nos insetos, o complexo formado por receptores extracelulares e patógenos, principalmente bactérias Gram (+), vírus, fungos e, no caso dos mosquitos, alguns plasmódios (*Plasmodium berghei*), ativa a proteína serina modular modSP, a qual induzirá a ativação da enzima que processa Spätzle (SPE) a clivar e maturar a proteína Spätzle (BUCHON et al., 2014; HILLYER, 2016). Outra forma de ativação da SPE é por intermédio da proteína serina Persephone (Psh), que interage com proteases liberadas pelos patógenos (BUCHON et al., 2014).

Spätzle é uma citocina de cistina, estruturalmente semelhante à interleucina-17 de mamíferos (IL-17) (BUCHON et al., 2014). Essa citocina é capaz de se ligar ao toll, ativando as vias de sinalização intracelulares, que conduzirão ao deslocamento do fator NF-kB até o núcleo e, conseqüente, regular a expressão de diferentes genes associados à resposta imune e ao desenvolvimento (BUCHON et al., 2014). Nos mamíferos, após reconhecimento de um patógeno, ocorre a ativação de genes, produção de citocinas inflamatórias e moléculas estimuladoras (SHEEHAN et al., 2018). Moléculas estimuladoras ativam os linfócitos T, realizando a ponte para ativação da resposta imune adaptativa (SHEEHAN et al., 2018).

A Figura 8 mostra os mecanismos de ativação da via do toll, comparando insetos (*Drosophila*) e mamíferos, destacando as estruturas conservadas (SHEEHAN et al., 2018). Em insetos, após ligação da citocina sSpätzle ao toll, a proteína MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein*) é recrutada pelo domínio rico em leucinas (BUCHON et al., 2014; SHEEHAN et al., 2018). Um complexo é formado com as proteínas Pelle e Tube. Como resultado da ativação de Pelle, o inibidor Cactus é fosforilado e degradado (BUCHON et al., 2014; SHEEHAN et al., 2018). Na forma ativa, Cactus está associado aos fatores de transcrição Dif e Dorsal (BUCHON et al., 2014; SHEEHAN et al., 2018). Após degradação do inibidor, os fatores de transcrição podem se translocar ao núcleo e ativar a produção de AMPs (BUCHON et al., 2014; SHEEHAN et al., 2018). O processo é muito semelhante em mamíferos. I-kB é um inibidor, homólogo ao Cactus, e quando fosforilado e degradado libera a translocação do fator de transcrição NF-kB ao núcleo (BUCHON et al., 2014; SHEEHAN et al., 2018).

Figura 8. Similaridades entre a via Toll em invertebrados e a via de sinalização Toll-like em vertebrados. Após ativação do receptor toll e do homólogo toll-like, a cascata induz a ativação o fator de transcrição homólogo Nf-kB e Dif, em vertebrados e invertebrados, respectivamente. A translocação desses fatores para o núcleo, estimula a produção de AMP, em invertebrados, citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, em vertebrados. PGRP: proteínas de reconhecimento de peptídoglicano; GNBPI: proteína de ligação a bactéria gram-negativa 1; SPE: enzima que processa Spätzle.



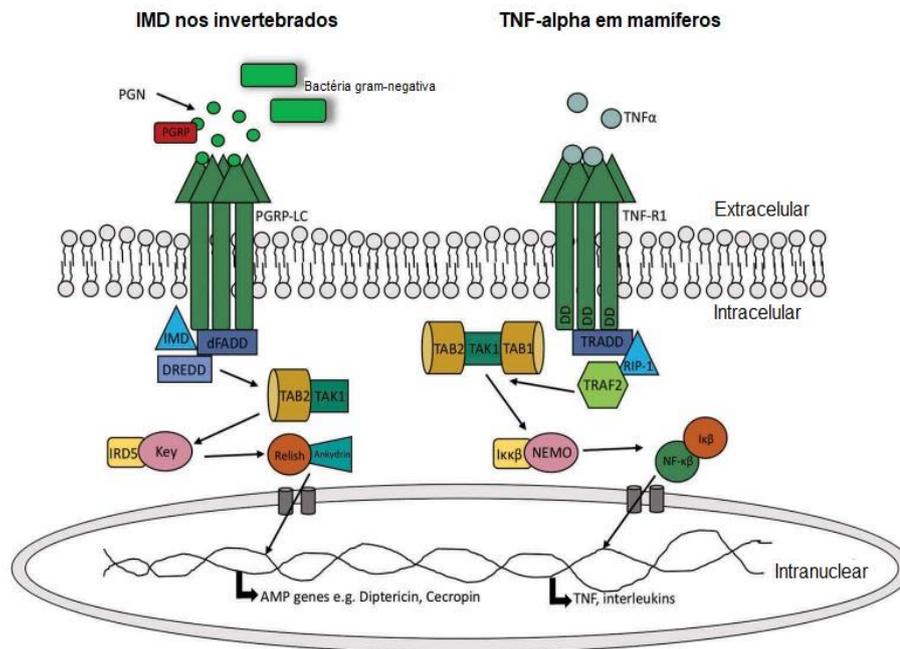
Fonte: Adaptado de Sheehan et al., 2018.

A via da deficiência imune (Immune deficiency pathway, IMD), nos insetos, é similar à via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF- α R) dos mamíferos, e também resulta na participação dos fatores de transcrição NF- κ B e produção de AMPs (SHEEHAN et al., 2018) (Figura 9). Essa via inicia pela ligação de patógenos, principalmente bactérias Gram (-), vírus e, no caso dos mosquitos, alguns plasmódios (*Plasmodium falciparum*), ao receptor de reconhecimento de peptídeoglicano (PGRPs) e recrutamento de IMD, da proteína dFADD e DREDD, formando um complexo (HILLYER, 2016; SHEEHAN et al., 2018). A ativação desse complexo promove a ativação de TAB2/TAK1 (SHEEHAN et al., 2018). Como resultado, o complexo IKK é ativado e fosforila Relish, que pode se translocar ao núcleo e desencadear a produção de AMPs (SHEEHAN et al., 2018). Nos mamíferos, TNF- α é reconhecido pelo receptor 1 fator de necrose tumoral, que recruta as proteínas RIPP, FADD e Caspase 8 (homólogas a IMD, dFADD e DREDD, respectivamente) (SHEEHAN et al., 2018). A formação desse complexo ativa TAK1 e, conseqüentemente, ativa o complexo IKK

(também homólogos em *Drosophila*), fosforilando e degradando o inibidor I κ B, permitindo a translocação do fator NF- κ B ao núcleo (SHEEHAN et al., 2018).

Janus quinase / transdutor de sinal e ativador de vias de transcrição (JAK / STAT) também atua modulando a atividade dos genes efetores do sistema imunológico e do desenvolvimento (SHOKAL e ELEFThERIANOS, 2017). Em *Drosophila*, três proteínas semelhantes a citocinas chamadas *unpaired* (*upd*) ativam a via Janus-quinase (JAK)/STAT, através da ligação com o receptor Domeless (MYLLYMÄKI e RÄMET, 2014). A liberação de *upd* dos hemócitos, após lesão séptica, ativa a via JAK/STAT nas células do corpo gorduroso e estimula a expressão de várias proteínas relacionadas à imunidade (MYLLYMÄKI e RÄMET, 2014). Nos mamíferos, a via JAK/STAT também é ativada por citocinas (interferons, IFNs, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e outras) e ativa vários processos biológicos, incluindo imunidade (IMADA e LEONARD, 2000; MYLLYMÄKI e RÄMET, 2014).

Figura 9. Comparação da via IMD em insetos e TNF- α em mamíferos. Em insetos, a via IMD é ativada pela ligação de peptidoglicanos (PGN) aos receptores de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs), que recrutam a formação do complexo IMD, dFADD e DREED, resultando na clivagem e ativação de TAB2/TAK1. Em mamíferos, TNF- α é reconhecido pelo receptor 1 fator de necrose tumoral, que recruta as proteínas RIPP, FADD e caspase 8. Esse complexo ativa TAK1, que ativa o complexo IKK, resultando na fosforilação e degradação do inibidor I κ B. NF- κ B é liberado para se translocar ao núcleo.



Fonte: Adaptado de Sheehan et al. (2018).

1.4.2.3 Coagulação

A condição de um sistema circulatório aberto exige dos insetos um eficiente mecanismo de coagulação, para evitar a perda excessiva de hemolinfa, quando ocorre uma lesão em seu tegumento (THEOPOLD et al., 2004). O sistema de coagulação dos insetos é ativado a partir de uma lesão, para evitar perda de fluido corporal, mesmo na ausência de partículas estranhas (THEOPOLD et al., 2004). Estudo *in vivo* com a barata *P. americana* mostrou maior coagulação nos indivíduos injetados com LPS do que com solução de Ringer (HAINE e SIVA-JOTHY, 2007). Essa constatação foi possível pela observação da retenção do corante vermelho (amaranth) nos coágulos. A retenção do corante aumentou significativamente após 30 min da injeção com LPS e corante. A coagulação reduziu a

dispersão das partículas dentro da cavidade corporal, mantendo o conteúdo aprisionado no local da lesão (HAINE e SIVA-JOTHY, 2007).

A interação entre as respostas celular e humoral pró-coagulantes são elementos essenciais para coagulação da hemolinfa (DUSHAY, 2009). A coagulação no gafanhoto *Locusta migratoria* foi bloqueada quando os hemócitos foram separados do plasma, assim como observado na barata *L. maderae* (DUSHAY, 2009). Essas observações sugerem o envolvimento dos hemócitos e de fatores presentes no plasma como elementos fundamentais na coagulação (DUSHAY, 2009). No entanto, a rápida coagulação da hemolinfa dos insetos dificulta os estudos dos fatores envolvidos neste processo (DUSHAY, 2009). Além disso, divergências na classificação dos tipos celulares dos insetos atrapalham os estudos associados à hemolinfa (DUSHAY, 2009).

Algumas proteínas foram identificadas nos insetos possuindo domínios conservados aos fatores de coagulação do sangue humano, como as hemolectinas de *Drosophila*, homóloga a hemocitina de *B. mori* (THEOPOLD et al., 2004). Essas proteínas são ortólogas ao fator de von Willebrand (vWF), presente em mamíferos, e são ativadas após lesão. Mutantes para essas proteínas demonstraram defeitos na coagulação (THEOPOLD et al., 2004). As hemolectinas são estocadas em vesículas nos plasmatócitos de *B. mori* e células cristal de *Drosophila*, enquanto as hemocitinas são produzidas e armazenadas nos grânulos das células granulócitos, em *B. mori* (ARAI et al., 2013). Granulócitos e oenócitos parecem ser as principais células envolvidas na formação dos agregados em *B. mori* (ARAI et al., 2013)

As lipoforinas, proteínas transportadoras de lipídeos, foram identificadas como pró-coagulantes em vários insetos, provavelmente mediadas pela oxidação dos lipídeos e das apoproteínas (THEOPOLD et al., 2004). As lipoforinas contêm domínios similares com vWF, assim como as hemolectinas e hemocitinas, o que deve contribuir na polimerização durante a formação do coágulo (THEOPOLD et al., 2004). Lipoforinas incorporadas aos coágulos foram observadas nas baratas *P. americana* e *L. maderaea*. Em *T. molitor*, lipoforinas demonstraram estar envolvidas na coagulação e consequente melanização (DUSHAY, 2009). Anticorpos produzidos contra precipitados da hemolinfa de *Galleria* reconheceram além da presença de lipoforina, as proteínas FO, hexamerina, alfa-cristalina (família das proteínas de choque térmico - *heat shock proteins*), proteínas tipo mucina, glutathione-S-transferase.

(SCHERFER et al., 2002). Em *Drosophila*, as proteínas fondue e hemolectina (homóloga ao fator vWF) demonstraram ser substratos para transglutaminase (DUSHAY, 2009).

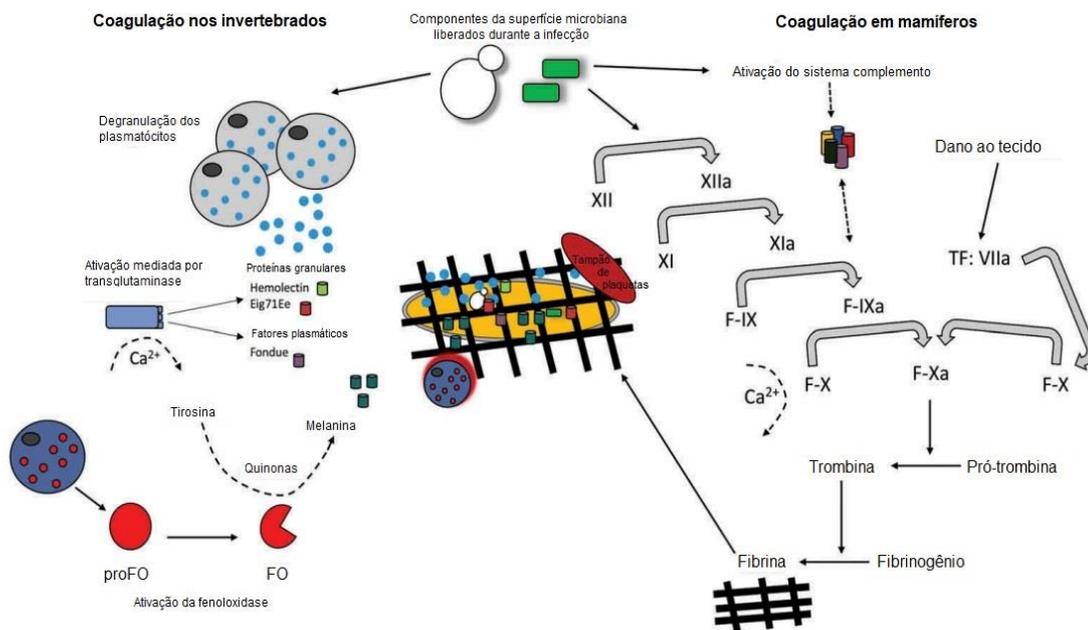
A proteína transglutaminase é homóloga ao fator XIIIa, de humanos (SHEEHAN et al., 2018). A diferença, aparentemente verificada, é que em mamíferos o fator XIIIa atua no endurecimento do coágulo, enquanto que a transglutaminase dos insetos parece atuar no início da cascata de coagulação (SHEEHAN et al., 2018). O processo de coagulação dependente de cálcio é observado em insetos e vertebrados (DUSHAY, 2009). Quelante de cálcio bloqueou a coagulação em vários insetos, incluindo baratas, moscas e lepidópteros (DUSHAY, 2009).

A coagulação também está associada à ativação da proFO e proteínas serinas. Durante a coagulação, a FO contribui para endurecer o coágulo (produção de melanina), enquanto as moléculas intermediárias (quinonas) atuam como citotóxicas ao patógeno (SHEEHAN et al., 2018) (Figura 10). A melanização do coágulo pode ser desencadeada por sinais endógenos, como fosfolipídeos de membrana (fosfatidilserina), GTPases (via JNK) e a proteína Eiger (homóloga a TNF), induzindo a ruptura das células cristais de *Drosophila*. (DUSHAY, 2009).

A formação do coágulo em Lepidoptera apresenta etapas semelhantes ao processo de nodulação e encapsulação (THEOPOLD et al., 2004). Em *G. mellonella*, interações entre plasmatócitos, células granulares, oenócitos, esferulócitos e fatores solúveis contribuem nas reações de coagulação (THEOPOLD et al., 2004). Células granulares (coagulócitos) e plasmatócitos degranulam sobre o local da lesão formando agregados extracelulares e selam o ferimento. Em seguida, ocorre a ativação de proFO para produção de melanina, que contribuirá com o endurecimento do coágulo. Plasmatócitos são atraídos para o local, formando camadas. Por último, ocorre a regeneração da epiderme (THEOPOLD et al., 2004).

Nos mamíferos, a cascata de coagulação visa garantir a homeostasia. Inicialmente, as plaquetas selam o ferimento, para evitar sangramento. Posteriormente há conversão de fibrinogênio em fibrina. Além dos mediadores de coagulação, os vertebrados possuem eficiente sistema anticoagulante e fibrinolítico, para evitar trombozes (THEOPOLD et al., 2004). Nos insetos, a remoção dos coágulos não parece ser tão importante, devido ao baixo risco de obstrução da hemolinfa. Os nódulos e cápsulas formados contra corpos estranhos tendem a permanecer no inseto por longo período (THEOPOLD et al., 2004).

Figura 10. Comparação esquemática do sistema de coagulação na hemolinfa de insetos e no sangue de mamíferos. A coagulação em insetos envolve plasmatócitos, ativação de hemolectina mediada por transglutaminase, eig71Ee e fondue, assim como ativação de pró-fenoloxidase em fenoloxidase (proFO/FO). Durante a coagulação do sangue humano, uma série de reações enzimáticas resultam na formação de trombina e conversão de fibrinogênio em fibrina. A ativação do sistema complemento também contribui com a coagulação em mamíferos, assim como a ativação da FO contribui com a coagulação dos insetos. A transglutaminase é homóloga ao fator XIIIa e ambos participam da formação da rede de coagulação.



Fonte: Adaptado de Sheehan et al. (2018).

1.4.3 Resposta imune adquirida

Os insetos não desempenham uma RI adquirida, como nos mamíferos, a qual envolve especificidade (anticorpos), diversidade no reconhecimento (Complexo de Histocompatibilidade - MHC I e II, linfócitos B e T), memória e especialização na resposta (expansão e diferenciação de clones dos linfócitos B e T com receptores específicos) (KINDT et al., 2008). Apesar da falta de uma resposta adaptativa mediada por anticorpo, alguns insetos demonstram memória imunológica, uma resposta parecida com o fenômeno de memória ou uma resposta de longa duração (DHINAUT et al., 2017; SHEEHAN et al., 2020). O

“*priming*” ou pré-imunização consiste em expor os insetos a níveis subletais de um patógeno (morto, vivo ou componentes celulares) para ativar o sistema imunológico do hospedeiro, seguido por um segundo e mais forte desafio (COOPER e ELEFThERIANOS, 2017). Esta exposição seria capaz de promover maior tolerância e/ou resistência ao contato com a dose letal do mesmo elicitador (COOPER e ELEFThERIANOS, 2017).

Estudos relacionados a essa resposta adaptativa nos insetos começaram antes da década de 90 (RHEINS e KARP, 1985). Testes para o reconhecimento de transplantes utilizaram a barata *P. americana* e o gafanhoto *Schistocerca gregaria*, como receptores e doadores de tecidos de diversos insetos (LACKIE, 1979). Os transplantes de cutículas de aloenxertos, em geral, não provocaram a resposta imune, mas *S. gregaria* reagiu mais fortemente contra os xeno enxertos do que *P. americana* (LACKIE, 1979). A imunização com o toxoide produzido por abelhas aumentou a sobrevivência de *P. americana* após o segundo desafio aplicado depois duas semanas, quando comparado com as baratas que não tinham sido previamente imunizadas (RHEINS e KARP, 1985). A imunidade de longa duração foi maior nas ninfas do que nos adultos (RHEINS e KARP, 1985).

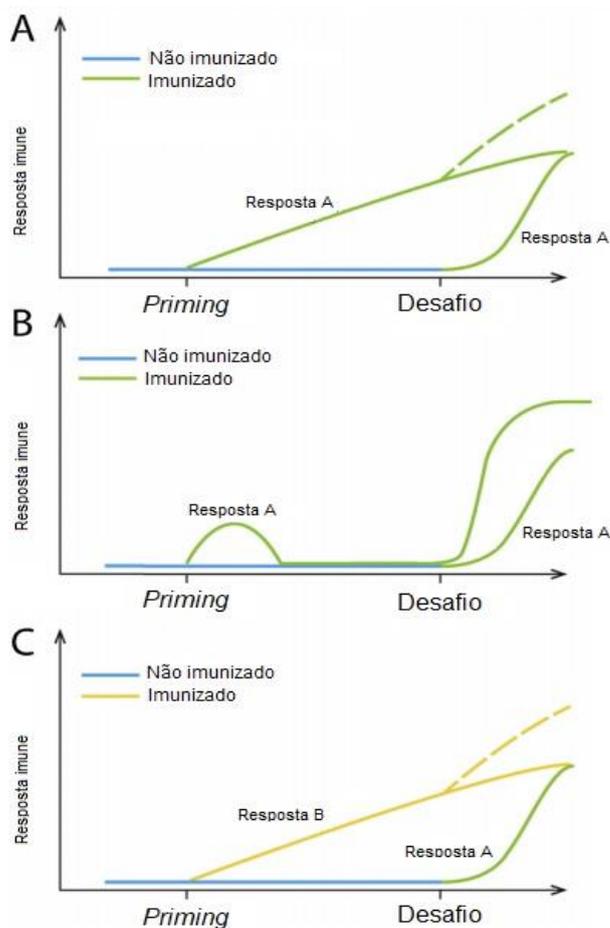
Dhinaut e colaboradores observaram uma proteção no inseto *T. molitor* pré-imunizado com qualquer bactéria em relação ao controle (imunizado com salina), sendo que quando a pré-imunização ocorreu pela injeção de bactérias gram-positivas a proteção foi maior em relação às gram-negativas (DHINAUT et al., 2017). Os autores atribuíram a sobrevivência ao aumento de peptídeos antimicrobianos e de hemócitos na hemolinfa (DHINAUT et al., 2017). A proteção dos coleópteros contra um segundo desafio também foi observado na prole de fêmeas que tiveram contato prévio com o mesmo patógeno, demonstrando possível passagem transversal de imunidade (DHINAUT et al., 2017). Outros estudos também demonstraram a transferência passiva de moléculas da geração parental à prole (Cooper and Eleftheriano, 2017), e uma transferência ativa pelo contato com indivíduos da mesma espécie (imunização social), principalmente nos insetos que vivem em sociedade, como as abelhas e formigas (MASRI e CREMER, 2014).

Os níveis de especificidade e a duração do efeito protetor variam conforme as espécies (COOPER e ELEFThERIANOS, 2017). Milutinovic e colaboradores (2016) propuseram três hipóteses para explicar o *priming* em insetos, demonstradas na Figura 11: (1) a produção de fatores de defesa do hospedeiro (hemócitos específicos, PRRs, integrinas, Dscam) seria capaz

de permanecer ativa por longo período no organismo, possibilitando a mobilização rápida desses fatores durante o desafio secundário; (2) moléculas de reconhecimento do hospedeiro, ativadas durante o primeiro contato, diminuiriam até níveis basais, mas rapidamente aumentariam após o segundo contato, promovendo uma resposta mais rápida e mais forte; (3) organismos pré-imunizados podem combinar primeiro e segundo cenário ou desenvolver uma resposta imune qualitativamente diferente daquela que segue um desafio simples (MILUTINOVIĆ et al., 2016). No caso da primeira hipótese, a manutenção da produção de imunofatores de longa duração não caracterizaria memória imunológica (MELILLO et al., 2018).

De acordo com a hipótese apoiada por Dhinaut e colegas (2017), a resposta de *priming* deve ser mais eficiente e menos custosa para o hospedeiro quando a probabilidade de reinfecção com o mesmo patógeno é alta. Da mesma forma, Shehann e colegas (2020) sugeriram que, quando o inseto pode ser exposto ao mesmo patógeno várias vezes ao longo de sua vida, a memória específica de um patógeno seria vantajosa. Evidências de características associadas a uma resposta imune adaptativa nos insetos, apontam que o futuro da imunologia de invertebrados requer desvendar os mecanismos envolvidos neste processo (COOPER e ELEFATHERIANOS, 2017).

Figura 11. Situações hipotéticas para imunização por *priming*. (A) Após o *priming*, os mecanismos de defesa permanecem ativos, o que garante um benefício na sobrevivência quando frente a um segundo desafio. Defesas ativadas pelo *priming* podem combinadas com defesas ativadas pelo desafio (linha descontínua). (B) Após o *priming*, a resposta inicial pode diminuir com o tempo, com o desafio ocorre uma reação mais forte e rápida. Esta situação implica na existência de alguma forma de memória, onde informações do contato prévio com o patógeno são rapidamente acessadas no desafio. (C) Em contraste às situações (A) e (B), o *priming* pode alternativamente montar uma resposta imune qualitativamente diferente daquela que segue um desafio simples (A).



Fonte: Adaptado de Milutinović et al. (2016).

1.4.4 Alterações comportamentais associadas à infecção

Além da compreensão dos mecanismos moleculares e metabólicos durante uma infecção, alterações comportamentais também são parâmetros importantes (KENDALL et al., 2019). Vários comportamentos podem ser avaliados, incluindo a atividade geral, higiene, postura, interações sociais, comportamentos reprodutivos, comportamento de nidificação, alimentação e consumo de água (KENDALL et al., 2019). Muita informação pode ser obtida pela observação do comportamento individual e coletivo, incluindo atividades diárias básicas e de autopreservação. A observação dessas interações, ou a falta delas, pode fornecer indícios de que existem anormalidades (KENDALL et al., 2019). Mudanças comportamentais

implicam no balanço entre benefícios (evitar ou combater o patógeno) e custos (metabólicos, energéticos, perdas de oportunidades) de desempenhar determinado comportamento (SCHALLER e PARK, 2011).

A resposta imune comportamental é uma interação entre o sistema imune e o sistema nervoso (SALZET, 2000). Alterações comportamentais associadas às doenças são manifestações altamente conservadas entre os animais, e parte de uma estratégia comportamental organizada para auxiliar no combate a vários agentes patogênicos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos etc.)(HART, 1988; ADELMAN e MARTIN, 2009; GELLMAN e TURNER, 2013; KAZLAUSKAS et al., 2016).

As citocinas, principalmente a interleucina 1 (IL-1 α e IL-1 β), IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) - α , regulam os comportamentos de doença em mamíferos (TIZARD, 2008; ISHII, 2015; GELLMAN e TURNER, 2013). Essas moléculas são produzidas e liberadas pelas células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), após o reconhecimento dos PAMPs pelos receptores do tipo Toll (TLRs) (SHAKHAR e SHAKHAR, 2015). Nos mamíferos, os patógenos raramente infectam o cérebro (como nas encefalites ou meningites), mas os neurônios apresentam vários receptores de citocinas (SHAKHAR e SHAKHAR, 2015). As citocinas que são liberadas na região da infecção podem chegar ao cérebro por vias neurais (aférentes vagais) e circulatórias, ligando-se aos receptores neuronais de IL-1 em várias áreas do cérebro (KONSMAN et al., 2002). As prostaglandinas são os principais mediadores da febre induzida por citocinas e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (KONSMAN et al., 2002; SHAKHAR e SHAKHAR, 2015). Os neurotransmissores e diversas moléculas endócrinas (glicocorticóides, hormônio adrenocorticotrofina, catecolaminas), liberadas após a estimulação das citocinas, são reconhecidas por vários receptores expressos nas células imunes (TAUB, 2008).

O conhecimento sobre a bioquímica envolvida na regulação dos comportamentos associados às doenças em insetos ainda são incipientes (VANHA-AHO; VALANNE e RÄMET, 2016; ROEDER, 2005). Semelhante aos mamíferos, a barreira hemato encefálica dos insetos demonstrou ser uma barreira física importante para prevenir a entrada de bactérias circulantes ou grandes moléculas (GOLDWORTHY e KHAN, 2007). Gafanhotos infectados por *E. coli* causadora de meningite em humanos (K1 strain RS218, O18:K1:H7) tiveram mais de 90% de mortalidade, em 72 h, quando comparados aos gafanhotos infectados com *E. coli*

(K12 strain HB101, não invasiva), que causou 5% de mortalidade no mesmo período (GOLDWORTHY e KHAN, 2007). Alguns estudos identificaram citocinas envolvidas na ativação da resposta imune, como Spätzle (VANHA-AHO et al., 2016; BUCHON; SILVERMAN e Cherry, 2014), *unpaired (upd)* (MYLLYMÄKI e RÄMET, 2014; VANHA-AHO et al., 2016), *paralytic peptide* (ISHII et al., 2010; ISHII et al., 2015) e *growth-blocking peptide* (VANHA-AHO et al., 2016) (ADAMO, 2008). Além dessas citocinas, outros compostos, como eicosanoides e catecolaminas (serotonina, octopamina e dopamina) têm demonstrado contribuir para manifestação de comportamentos associados às doenças (ROEDER, 2005; ADAMO, 2006; ADAMO, 2008).

Os sintomas comportamentais observados em mamíferos após a injeção de citocinas pró-inflamatórias e LPS são similares aos sintomas causados pela infecção (DANTZER, 2001; DANTZER, 2004). Os sintomas incluem a diminuição nas atividades gerais, como o comportamento exploratório (letargia), comportamentos sociais e sexuais (depressão), ingestão de alimentos e água (anorexia e adipsia), atividades de cuidado corporal (higiene), comprometimento da estimulação cerebral, memória e aprendizagem (HART, 1988; DANTZER, 2001; GELLMAN e TURNER, 2013). Esses sintomas comportamentais, acompanhados de febre e outras alterações fisiológicas (hipoferremia, catabolismo, transpiração, anemia e fraqueza), são as principais estratégias dos mamíferos para combater uma infecção (HART, 1990; SHAKHAR e SHAKHAR, 2015). As principais hipóteses para explicar o desenvolvimento adaptativo dos comportamentos de doença são a conservação de energia para manter a febre, evitar predadores (HART, 1988; SULLIVAN et al., 2016) e evitar transmissão de patógenos (HART, 1990; SHAKHAR e SHAKHAR, 2015; SULLIVAN; FAIRN e ADAMO, 2016).

Evidências crescentes sugerem que os insetos desempenham interações imuno-comportamentais mediadas por conexões bidirecionais entre os sistemas imunológico e nervoso (ADAMO, 2006; ADAMO, 2008; VANHA-AHO et al., 2016). Os comportamentos de doença foram avaliados em grilos (*Gryllus texensis*) desafiados com *Serratia marcescens* morta por calor (SULLIVAN et al., 2016). Os autores esperavam observar uma redução na alimentação, higiene (*grooming*), locomoção e um aumento no uso do abrigo, de acordo com as hipóteses de conservação de energia e prevenção de predadores (HART, 1988; SULLIVAN et al., 2016). No entanto, os resultados não corroboraram com todas as hipóteses previstas. Os

grilos não apresentaram alteração na locomoção, nem no uso do abrigo, e tiveram um aumento na atividade de higiene. Uma possível explicação é que, na falta de comportamento da febre, a conservação de energia para sustentar a demanda metabólica não seria necessária (redução da locomoção e aumento do uso de abrigos) (SULLIVAN et al., 2016).

Os insetos são organismos ectotérmicos, portanto, a febre comportamental pode ser medida colocando o inseto em um gradiente térmico e observando sua preferência por temperaturas mais quentes (BRONSTEIN e CONNER 1984). Quando grilos foram injetados com *Rickettsiella grylli*, eles se mudaram para temperaturas mais quentes (ADAMO, 1998). As baratas de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) injetadas com *E. coli* (morta por calor) e LPS mostraram febre comportamental por sua preferência à temperatura mais alta do que as baratas injetadas com solução salina, após 19 horas da infecção (BRONSTEIN e CONNER 1984). O eicosanoide prostaglandina pode ser responsável por induzir febre comportamental em insetos, assim como ocorre em mamíferos (ADAMO, 2008).

Outros resultados que não corroboram com as hipóteses previstas para mamíferos foram observadas em cupins (*Reticulitermes flavipes*), que tiveram um aumento no *grooming*, após a exposição ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (DAVIS et al., 2018). A abelha *Bombus terrestris* não apresentou alteração significativa na atividade e no consumo de alimentos após injeção de LPS (TYLE et al., 2006). Moscas da fruta (macho e fêmea de *D. melanogaster*) foram pouco afetadas na atividade locomotora e de agregação social após infecção pelo vírus C de *Drosophila* (DCV) (SIVA-JOTHY e VALE, 2019).

Ao contrário dos resultados anteriores, as abelhas *Apis mellifera* injetadas com LPS exibiram comportamentos de doença semelhantes aos comportamentos desenvolvidos por mamíferos, ou seja, redução na higiene, alimentação e na interação entre os indivíduos da mesma espécie (KAZLAUSKAS et al., 2016; ALAUX et al., 2012). De maneira similar, formigas (*Camponotus aethiops*) expostas ao fungo (*Metarhizium brunneum*) deixaram de interagir na sociedade (BOS et al., 2011).

Devido à diversidade ecológica dos insetos, outros comportamentos foram observados e associados ao parasitismo. Comportamentos antiparasitários dos insetos foram conjugados por Parker et al. (2011) e Roode e Lefèvre (2012). Os insetos podem apresentar imunização individual e coletiva (social), para evitar, resistir e tolerar patógenos (MASRI e CREMER 2014). Os insetos sociais (formigas, abelhas e cupins) costumam ser os organismos mais

estudados, pois as colônias possuem alta densidade populacional e o contato frequente entre os indivíduos aumenta o risco de transmissão do patógeno (MURZAGULOV et al., 2013). Apesar disso, as respostas imunológicas individuais e coletivas contribuem fortemente para adquirir resistência e tolerância, mesmo em densidades mais elevadas (MASRI e CREMER, 2014). Os comportamentos associados à resistência visam reduzir o crescimento do parasita ou eliminar a infecção (AYRES e SCHNEIDER, 2012). Tolerância é a capacidade de um hospedeiro coexistir com o parasita, sem afetar de forma significativa a sua saúde (AYRES e SCHNEIDER, 2012).

1.4.4.1 Comportamentos de agregação e grooming

As baratas são organismos sub-sociais e vivem agregadas, apoiadas por vários benefícios (BOUCHEBTI et al., 2016). O comportamento gregário resulta de interações sociais entre indivíduos da mesma espécie, sustentado por mecanismos de atração e benefícios, como o favorecimento no desenvolvimento, na comunicação, regulação da temperatura, umidade, coprofagia e reprodução (BELL et al., 2007). Fatores ambientais adversos ou individuais, como as infecções, podem afetar os padrões comportamentais de um indivíduo ou de todo o grupo (DE ROODE e LEFÈVRE, 2012).

Em vários blaberídeos ovovíparos, como *N. cinerea* e *Blaberus craniifer*, é comum o agrupamento de ninfas jovens abaixo e ao redor da fêmea por diferentes períodos de tempo após a eclosão dos filhotes (BELL et al., 2007). *N. cinerea* apresenta semelhança ao comportamento da barata alemã (*B. germanica*), que vive em aglomerações, contendo ambos os sexos e vários estágios de desenvolvimento próximos, frequentemente tocando as antenas uns dos outros, para manter a coesão do grupo (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019).

Os estímulos táteis, percebidos por meio do contato com coespecíficos, são os principais estímulos responsáveis pelos efeitos de grupo nas espécies de baratas *B. germanica*, *B. lituricollis*, *B. biligata* e *Symploce pallens*, que vivem em agregações sociais (LIHOREAU e RIVAULT, 2008). Em experimento realizado com ninfas de *B. germanica*, os autores demonstraram que o isolamento social diminuiu a taxa de desenvolvimento ninfal (LIHOREAU e RIVAULT, 2007). Outro resultado curioso demonstrou que as ninfas criadas

com estímulos táteis de uma pena em rotação ou de insetos de outras espécies, também cresceram mais rapidamente do que ninfas isoladas (LIHOREAU e RIVAULT, 2007).

Durante as atividades de rotina das baratas, como forrageamento, interações com predadores e presas, manipulação de objetos no ambiente (solo, folhas) e interações sociais com indivíduos da mesma espécie, uma vasta gama de produtos químicos ambientais podem contaminar o sistema quimossensorial (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). Essas substâncias químicas de origens diversas podem se acumular nos apêndices quimiossensoriais e causar um declínio no desempenho de comportamentos, por causa da adaptação sensorial e habituação do sistema nervoso (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). Os mecanismos que mantêm a camada lipídica cuticular são especialmente importantes em insetos sociais, pois semioquímicos que transmitem informações sobre sexo, estágio, parentesco e status de fertilidade precisam ser claramente detectados, reconhecidos e conduzir comportamentos específicos e apropriados com o mínimo interferência e ambiguidade (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019).

O estilo de vida em grupo, de muitos insetos sociais e sub-sociais, pode causar elevada troca de lipídios cuticulares entre os indivíduos, possivelmente comprometendo a eficácia do sistema sensorial, que torna possível o reconhecimento e a discriminação do sexo (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). Uma vez que sua superfície corporal é prontamente contaminada com lipídios cuticulares de indivíduos da mesma espécie, por meio de interação física, os insetos gregários, como as baratas, que não desempenham *grooming* coletivo, devem manter seus lipídios cuticulares por autolimpeza, para aumentar a relação sinal / ruído químico entre os membros do grupo e manter a comunicação química baseada no indivíduo (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). O *grooming* demonstrou efetivamente remover hormônios femininos das antenas dos machos *B. germanica* e manter a acuidade quimiossensorial e a identificação sexual entre os membros do grupo (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019).

Vários neurotransmissores podem modular a expressão do *grooming*, mas dopamina é o principal envolvido na atividade de limpeza das antenas (MUSTARD et al., 2010). Dopamina foi o mais potente indutor de *grooming* após injeção de várias monoaminas na hemolinfa de insetos (LIBERSAT e PFLUEGER, 2004). O estresse pode induzir mudanças drásticas nos níveis de monoaminas (octopamina, dopamina e tiramina) nos insetos,

desencadeando também alterações comportamentais (ZHUKOVSKAYA, 2013). Em *B. germanica*, a supressão do *grooming* foi atribuída à diminuição da sobrevivência, devido aos danos gerados nos órgãos sensoriais, incluindo quimio-mecano receptores das pernas e mecano-higro-termo receptores das antenas (ROBINSON, 1996).

1.5 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

S. aureus é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e pode colonizar a pele, cavidade nasal, mucosas (incluindo trato gastrointestinal), presente em cerca de 30% dos indivíduos saudáveis (HANADA et al., 2011; SHEEHAN et al., 2019). No entanto, essa bactéria continua sendo uma das causas mais comuns de infecções no mundo industrializado e o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos representam graves ameaças à saúde de hospitais e comunidades (LEE et al., 2004; POUDEL et al., 2019). *S. aureus* causa várias doenças, incluindo infecções de pele, endocardite, artrite, osteomielite, sepse, choque tóxico, pneumonia necrosante (LEE et al., 2004; SALGADO-PABÓN e SCHLIEVERT, 2014). Em estudo realizado em 75 Unidades de Terapia Intensiva, abrangendo todas as regiões do Brasil, os cocos gram-positivos, principalmente *S. aureus*, foram identificados como agentes etiológicos em 32,8% dos casos (SALES JUNIOR et al., 2008).

A capacidade de colonizar uma variedade de tecidos dos hospedeiros ocorre devido a expressão dos fatores de virulência, como adesinas, exotoxinas e fatores de distúrbio imunológico, que promovem evasão das células imunes do hospedeiro e indução de danos aos tecidos (LEE et al., 2004; HANADA et al., 2011; WOLCOTT et al., 2011; SHEEHAN et al., 2019). A Tabela 3 apresenta alguns fatores de virulência envolvidos na patogênese de *S. aureus*, em mamíferos.

Desde o início dos anos 1960, coelhos, ratos e camundongos têm sido utilizados para determinar vários aspectos das características fisiopatológicas, respostas imunológicas e eficiência terapêutica em vários órgãos e sistemas, durante infecções estafilocócicas (GARCÍA-LARA et al. 2005). Para validar invertebrados como modelos adequados de infecções estafilocócicas humanas, há necessidade de examinar se *S. aureus* é patogênico nos

diferentes modelos e se os fatores de virulência são determinantes para a patogenicidade nesses modelos (GARCÍA-LARA et al. 2005). Além disso, os insetos podem ser ferramentas úteis, como animal experimental preliminar, para avaliar a eficácia *in vivo* de candidatos a agentes antiestafilocócicos, antes de prosseguir para estudos em mamíferos, o que pode reduzir a experimentação e despesas com animais vertebrados (DESBOIS e COOTE, 2011).

Tabela 3. Alguns dos fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus aureus* e seus efeitos sobre mamíferos.

| Fatores de virulência | Atividade no tecido do hospedeiro |
|---|--|
| Componentes da parede celular | |
| Polissacarídeos capsulares | Evitar a fagocitose |
| Proteínas da superfície celular | |
| Proteína A | Interage com a região Fc do anticorpo IgG |
| Fibrinogênio, fibronectina, proteína de ligação ao colágeno | Facilita a adesão celular |
| Toxinas extracelulares e enzimas | |
| Hemolisinas (α , β , δ , γ) | Citotóxicas para células dos tecidos e leucócitos |
| Leucocidina P-V | Destrói leucócitos |
| Toxina da síndrome de choque tóxico | Superantígenos induzem inflamação |
| Enterotoxinas | |
| Coagulase | Catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina |
| Proteases | Degradação de proteínas |
| Nucleases | Clivagem de DNA e RNA |
| Stafiloquinases | Converte plasminogênio em plasmina fibrinolítica |
| Hialuronidase | Degrada ácido hialurônico |
| Sideróforos | Captura ferro do hospedeiro |
| Urease | Manutenção do pH |
| Arginina deiminase | Usa arginina em condições anaeróbias como fonte de energia |

Fonte: Adaptado de Wolcott et al. (2011).

Alguns estudos avaliando interações de *S. aureus* em insetos, *in vivo* e *in vitro*, já foram realizados. Estudo *in vitro* demonstrou que *S. aureus* é capaz de formar agregados

bacterianos no plasma da larva do bicho-da-seda (*B. mori*), o que é a primeira indicação de que os agregados bacterianos de *S. aureus* no plasma animal não são específicos para mamíferos, mas são conservados também em insetos (RYUNO et al., 2019). Em mamíferos, a reação da coagulase e da proteína de ligação ao fator de von Willebrand ativam a formação de coágulos de fibrina, estimulando a formação de agregados estafilocócicos no sangue (RYUNO et al., 2019). Essa agregação facilita o escape bacteriano dos efetores imunológicos do hospedeiro e contribui para multiplicação e virulência de *S. aureus* (RYUNO et al., 2019).

No entanto, várias características diferentes foram observadas entre a formação de nódulos (nodulação) e a agregação de *S. aureus* no plasma do bicho-da-seda (RYUNO et al., 2019). Primeiro, o processo de nodulação requer participação dos hemócitos circulantes na hemolinfa (conforme descrito no item 1.4.1.2 *Nodulação e encapsulação*), no entanto, a agregação de *S. aureus* ocorreu no plasma da larva sem a presença dos hemócitos (RYUNO et al., 2019). Em segundo lugar, a agregação de *S. aureus* requer multiplicação bacteriana, mas a formação de nódulos não requer necessariamente multiplicação, pois o objetivo desta resposta celular é limitar a disseminação do patógeno (RYUNO et al., 2019). Terceiro, a formação de nódulos é uma reação rápida, que ocorre minutos após a invasão bacteriana (RYUNO et al., 2019). Por outro lado, a agregação de *S. aureus* no plasma do bicho-da-seda não foi observada antes de cinco horas pós-infecção. Considerando essas diferenças, os autores sugerem que a nodulação e a agregação de *S. aureus* no plasma do bicho-da-seda são formados por mecanismos moleculares diferentes (RYUNO et al., 2019).

No estudo de Ratckiffe e Gagen (1976), as larvas de *G. mellonella* infectadas com *S. aureus* vivos não apresentaram formação de nódulos 1 hora após a infecção. Além disso, poucos nódulos e poucas células agregadas foram observados 24 h pós-infecção (RATCKIFFE e GAGEN, 1976). Segundo os autores, *S. aureus* foi capaz de evitar a formação dos nódulos e causar uma septicemia (RATCKIFFE e GAGEN, 1976).

A parede celular de *S. aureus* consiste em uma série de cadeias de glicanos reticuladas por peptídeos curtos chamados peptidoglicanos (PGN; um importante alvo para o reconhecimento do hospedeiro em uma variedade de animais), covalentemente ligados a proteínas de superfície e glicopolímeros, incluindo ácido teicoico de parede (WTA) (ATILANO et al., 2011). Em *B. mori*, WTA demonstrou ser necessário para agregação no plasma da larva, e os genes *ypfP* e *ltaA* (que codificam enzimas envolvidas na síntese de WTA

de *S. aureus*) também foram identificados como indispensáveis neste processo invasivo (RYUNO et al., 2019). *S. aureus* mutante para o gene *tagO* (envolvido na síntese de WTA) permitiu maior reconhecimento bacteriano e aumentou a sobrevivência de *D. melanogaster* (ATILANO et al., 2011).

WTA também é modificado por outras moléculas, como a D-alanina (D-alanilação) (DORLING et al., 2014). Tanto o nível de expressão de WTA quanto sua D-alanilação foram considerados importantes na mediação da interação parasita-hospedeiro no besouro *T. molitor* (DORLING et al., 2014). Especificamente, a D-alanilação de WTA aumentou a persistência de *S. aureus* em *T. molitor* (DORLING et al., 2014). WTA é aniônico e a D-anilação torna esta estrutura mais catiônica, evitando o ataque catiônico dos AMPs do hospedeiro (DORLING et al., 2014).

No estudo de Hanada e colaboradores (2011), os autores demonstraram que apolipoproteínas (ApoLp), proteínas transportadoras de lipídeos, presentes na hemolinfa do bicho-da-seda (*B. mori*) foram capazes de se ligar à superfície de *S. aureus* e suprimir a expressão de hemolisinas e genes reguladores de virulência (*saeRS* e *RNAIII*) (HANADA et al., 2011). Mais tarde, Omae e colaboradores (2013), demonstraram que ApoLp se associa aos ácidos lipoteicoicos (LTA). Assim como WTA, LTA também sofre D-alanilação, para impedir adesão dos AMPs à superfície de *S. aureus* (OMAE et al., 2013).

Em *D. melanogaster*, dois receptores transmembranares reconhecem estruturas celulares distintas de *S. aureus*, o receptor Draper se liga ao LTA, enquanto o receptor integrina se liga ao PGN (SHIRATSUCHI et al., 2012). Os autores sugerem que a presença de um sistema duplo de reconhecimento por hemócitos favorecem a remoção eficiente de *S. aureus* por fagocitose (SHIRATSUCHI et al., 2012). Needham e colaboradores (2004) utilizaram *S. aureus* mutantes para verificar fatores de virulência essenciais para patogênese em *D. melanogaster*. *S. aureus* mutante para vários genes (*acnA*, *agr*, *arlR*, *fur*, *katA*, *mntA*, *mntAH*, *mntAR*, *mntH*, *mntR*, *saeR*, *saeS*, *sar*, *sarA*, *sarA agr*, *sigB*, *sodA*, *sodAM*, *sodM*) demonstraram mortalidade semelhante em *D. melanogaster*. Os genes atenuados *pheP* (permease envolvida na absorção de fenilalanina) e *perR* (envolvido na resistência ao estresse oxidativo e armazenamento de ferro) reduziram a mortalidade das moscas. A mutação desses genes também resultou em atenuação de abscessos subcutâneos em ratos (NEEDHAN et al., 2004).

Estudos avaliando alguns fatores de virulência de *S. aureus* envolvidos no sucesso da infecção em larvas *B. mori* mostraram que a injeção de α -hemolisina e β -hemolisina foi letal para as larvas (HOSSAIN et al., 2006). As proteínas ancoradas na parede celular de *S. aureus* (*ClfB*, *FnbB* e *SdrC*) contribuíram para virulência no bicho-da-seda (MIYAZAKI et al., 2011). Em mamíferos, *ClfB* se liga a citoqueratinas das células epiteliais, enquanto *SdrC* é necessário para a aderência nestas células, e *FnbB* se liga à fibronectina (MIYAZAKI et al., 2011). A expressão dos genes *agr*, *arlS*, *srtA* e *saeS* demonstrou ser necessária para virulência de *S. aureus* no bicho-da-seda (MIYAZAKI et al., 2011). A proteína A e *spa* parecem não contribuir na virulência de *S. aureus* neste invertebrado, visto que estas proteínas se associam às imunoglobulinas em mamíferos (MIYAZAKI et al., 2011).

Grilos foram injetados com *S. aureus* (9.8×10^7 UFC/grilo) mutantes para os genes *cvfA* (regula a degradação de RNA; necessário para produção de hemolisina), *agr* (expressão de proteínas envolvidas no *quorum sensing* e exotoxinas) e *srtA* (ancoragem de proteínas na parede celular) e tiveram a mortalidade atenuada (KOCHI et al., 2016).

Bactérias viáveis de *S. aureus* foram recuperadas da hemolinfa de *T. molitor*, após 14 e 28 dias de infecção subletal (HAINE et al., 2008a, 2008b). Estes resultados demonstram a persistência de longo prazo de *S. aureus*, mesmo sendo um patógeno não natural, em baixos níveis na hemolinfa do besouro (HAINE et al., 2008a, 2008b). Em outro estudo, *T. molitor* infectado com cerca de 2×10^7 UFC, teve a hemolinfa coletada após 2 h, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 14, e 21 dias pós-infecção, e bactérias viáveis foram recuperadas de amostras extracelulares (hemolinfa) e intracelulares (dentro dos hemócitos) em todos os tempos avaliados (MCGONIGLE et al., 2016). A recuperação bem-sucedida de *S. aureus* 21 dias após a infecção, em 40% dos besouros, indica que a persistência, a longo prazo, de baixos níveis da bactéria é uma estratégia viável e uma fonte potencial para estudos de infecções crônicas (MCGONIGLE et al., 2016).

G. mellonella inoculada com 2×10^6 de *S. aureus*/larva apresentou diminuição da viabilidade em 24 h ($80 \pm 5,77\%$), 48 h ($55,93 \pm 5,55\%$) e 72 h ($10,23 \pm 2,97\%$), aumentou significativamente a proliferação e disseminação de *S. aureus* entre 6 e 48 h e a formação de nódulos (SHEEHAN et al., 2019). A densidade de hemócitos também aumentou entre 4 e 24 h (SHEEHAN et al., 2019). Alterações na resposta imune humoral das larvas foram determinadas por proteômica quantitativa (*shotgun*), 6 e 24 h pós-infecção. O proteoma das

larvas infectadas, após 6 h, foi enriquecido com proteínas antimicrobianas, proteínas da cascata da proFO e uma gama de proteínas de reconhecimento de peptidoglicano. Após 24 h, houve um aumento significativo na abundância de AMPs com atividade antiestafilocócica e proteínas associadas à formação de nódulos (SHEEHAN et al., 2019). Besouros (*T. molitor*) infectados por *S. aureus*, morto por calor, mantiveram os níveis de AMPs abundantes na hemolinfa até 21 dias depois da infecção (MAKAROVA et al., 2016). Os autores sugeriram que o *pool* de AMPs pode ter fornecido uma atuação sinérgica, favorecendo a manutenção de uma resposta imune ampla, mas não específica (MAKAROVA et al., 2016).

Kaito e colaboradores (2002) injetaram 2×10^7 UFC de *S. aureus* na larva de *B. mori*, observaram o crescimento de *S. aureus* na hemolinfa e combateram a infecção tratando as larvas com ampicilina, oxacilina e vancomicina. Os antibióticos foram injetados no tórax das larvas (KAITO et al., 2002). Grupos de larvas inoculados com *S. aureus* vivo (2.5×10^6 UFC; Newman ou BB270) que receberam antibióticos (daptomicina, penicilina ou vancomicina) após 2 h, 24 h e 48 h, tiveram um aumento na sobrevivência com relação às larvas que não receberam tratamento (DESBOIS e COOTE, 2011). Esse foi o primeiro trabalho que demonstrou que os antibióticos são eficazes na larva de *G. mellonella*, para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas (DESBOIS e COOTE, 2011). A inoculação apenas de toxinas estafilocócicas, produzidas na fase pós-exponencial ou antes da fase estacionária, foram capazes de causar a morte de larvas do bicho-da-seda (HOSSAIN et al., 2006).

S. aureus não é considerada uma bactéria entomopatogênica (DHINAUT et al., 2017), mas por ser ubíqua, amplamente presente no ambiente (SALGADO-PABÓN e SCHLIEVERT, 2014), também é encontrada na superfície corporal dos insetos (OLIVEIRA et al., 2013; POUDEL et al., 2019). Os insetos podem servir como portadores de microrganismos patogênicos e certas bactérias podem se multiplicar em seus corpos ou ninhos (OLIVEIRA et al., 2013; POUDEL et al., 2019). As baratas são um dos insetos mais importantes e frequentemente responsáveis por abrigar, transmitir e disseminar patógenos humanos no ambiente hospitalar, por exemplo (ABDOLMALEKI et al., 2019). No trabalho de Abdolmaleki e colaboradores (2019), *P. americana* e *B. germanica* foram coletadas em um hospital e *S. aureus* foi isolado da superfície corporal e do conteúdo intestinal. Os autores verificaram a presença de resistência a vários antibióticos, nas cepas de *S. aureus* resistentes à

meticilina (ABDOLMALEKI et al., 2019). Nesse sentido, os insetos também podem ser susceptíveis a processos infecciosos, liderados pelos patógenos que carregam.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os mecanismos de defesa imunológica da barata *N. cinerea*, visando contribuir no conhecimento da biologia da resposta imune neste inseto, bem como avaliar seu potencial como organismo experimental alternativo ao uso vertebrados em estudos que envolvam infecção bacteriana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a patogenicidade de *S. aureus* em *N. cinerea* após inoculação da bactéria no inseto.
- Avaliar alterações em parâmetros bioquímicos na hemolinfa e no corpo gorduroso de *N. cinerea* causadas por *S. aureus*.
- Verificar a ocorrência de *priming* em *N. cinerea*.
- Avaliar alterações de parâmetros comportamentais em *N. cinerea* induzidas por *S. aureus*.
- Avaliar a atividade da enzima fenoloxidase na hemolinfa de *N. cinera* após inoculação de *S. aureus*.
- Comparar dados moleculares de *N. cinerea* e outros insetos.

3. METODOLOGIA

A maior parte das metodologias utilizadas para desenvolver esta tese estão descritas nos artigos apresentados na próxima sessão. As metodologias descritas a seguir não foram incluídas nos artigos submetidos e/ou publicados.

3.1 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Buscas de nucleotídeos, nas plataformas NCBI e FlyBase, foram realizadas para genes que codificam proteínas envolvidas na via do Toll, enzimas antioxidantes, marcadores do metabolismo e apoptose. Estas sequências foram procuradas no transcriptoma da barata *N. cinerea*. Após obtenção da sequência de interesse, elas foram analisadas quanto à homologia, no BLASTx, no banco de dados NCBI. O alinhamento das sequências cds foi efetuado utilizando software Mega Alignment Explorer, versão 6, para escolha dos éxons. O desenho dos primers foi realizado utilizando a plataforma on-line Primer3 (v.0.4) e a qualidade das sequências testada na plataforma on-line OligoAnalyzer 3.1.

3.2 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICAS

As baratas foram congeladas (fixação física) e após imersas em formaldeído 4% (fixação química) por 24 h. O processamento do tecido foi realizado através de banhos de álcool, com concentração crescente, para desidratação. Os corpos das baratas desidratados foram clarificados, para remoção do álcool, utilizando xilol. Os cassetes com os tecidos foram mantidos por uma hora em cada banho. Na infiltração utilizamos parafina líquida (60 °C), para saturação dos tecidos. Os tecidos foram colocados num molde, com parafina, e posteriormente refrigerados. Após resfriados, os blocos de parafina foram ajustados no micrótomo rotativo,

para serem seccionados em fatias finas, com navalhas descartáveis. Lâminas de vidro foram previamente lavadas com água corrente e detergente. Pedacos do bloco foram cortados e dispostos em água morna (35 °C) para serem pescados diretamente com a lâmina. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em estufa por 3 h. Após secagem, as lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina, intercalados com banhos de água. Desparafinização com xilol, seguida por banho de álcool absoluto até o álcool 70% (FIOCRUZ, 2009). As lâminas foram imersas em soluções do Kit Instant Prov (New Prov, Brasil).

3.3 FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DA HEMOLINFA

As baratas foram anestesiadas em gelo por 10 min, lavadas com água destilada e o terceiro par de perna foi retirado. A hemolinfa que extravasava sobre a lesão foi recolhida com micropipeta e disposta em lâminas previamente limpas. Após secar em temperatura ambiente, as lâmina foram coradas utilizando o kit de corante rápido de hematologia Instant Prov, conforme orientação do fabricante. As células foram observadas utilizando microscópio óptico e as fotos foram tiradas sob visualização da objetiva de 100 x, em óleo de imersão, para uma ampliação total de 1000.

4. RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

Artigo publicado em *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.

4.1.1 Objetivos específicos

- Verificar a patogenicidade de *S. aureus* em *N. cinerea* após inoculação da bactéria no inseto.
- Avaliar alterações em parâmetros bioquímicos na hemolinfa e no corpo gorduroso de *N. cinerea* causadas por *S. aureus*.
- Verificar a ocorrência de *priming* em *N. cinerea*.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

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

Staphylococcus aureus-induced sepsis in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*

Juliana Marzari Rossato^a, Terimar Ruoso Moresco^b, Juliano Uczay^b,
João Batista Teixeira da Rocha^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Programa de Pós-graduação Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil

^b Departamento de Ciências da Saúde, Laboratório de Microbiologia CEMICRO, UFSM, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Immune response
Nauphoeta cinerea
Staphylococcus aureus
Sepsis
Metabolism
Hemolymph
Fat body
Insect

ABSTRACT

Invertebrates have been instrumental in understanding the mechanisms involved in infectious diseases, considering the idea to replace, reduce and refine the use of mammals as well as to understand the basic principles of immune response in insect. We evaluated the consequences of *Staphylococcus aureus*-induced sepsis in the last instar nymphs of *Nauphoeta cinerea* injected with different concentrations of bacteria preserved in two culture media. Infected groups had a decrease in hemolymph metabolites (glucose, amino acids, total proteins, and cholesterol), in contrast to the proteins in the fat body. Higher concentrations of *S. aureus* caused permanent morphological alterations in adults, decrease in food consumption, increase in isolation, and increase in CFU until death of the cockroaches. Survival and protection of nymphs against a repeated and stronger challenge with the same bacteria varied according to the medium they were conserved. *N. cinerea* proves to be a suitable and promising model for studies related to bacterial infections.

1. Introduction

The utilization of invertebrates, mainly insects, as models to study the immune system and pathophysiology of human diseases broadly increased in the last decades. The ethical concerns about the use of vertebrate models that involves pain and extreme suffering (as in the case of sepsis) are certainly one important motivator to adhere to the recent idea to replace, reduce and refine (3RS) the use of mammals in exploratory scientific studies [1]. Consequently, the development of new techniques designed to study the immune system in non-vertebrate organisms is needed not only to avoid the use of vertebrates but also to work with simple models that can be very informative to understand basic principles [1,2].

In this direction, the nematode *Caenorhabditis elegans* [3,4], the fruit fly *Drosophila melanogaster* [5,6], the silkworm larvae *Bombyx mori* [7–10], the wax moth *Galleria mellonella* [11,12], the beetle *Tenebrio molitor* [13], the honeybee *Apis mellifera* [14], and the tobacco hornworm *Manduca sexta* [15] have been used to study the immunological responses after the infection with human pathogens. Of particular significance, the insect models have been instrumental in understanding the complex molecular mechanisms involved in response to infectious

diseases, and in studying bacterial virulence factors [2,9,10,14,16].

Immune response in insects is thought to be innate, broad, non-specific, and similar against different types of challenges [17]. Insect cellular response involves phagocytosis, nodulation, and encapsulation, whereas humoral responses can involve the production of antimicrobial peptides, melanization, and clotting [18,19]. However, the study of adaptive immunity of insects started many decades ago. Accordingly, works of literature have indicated the adaptive immune response in the cockroach *Periplaneta americana* after the injection of venom from honeybee [20,21]. In other studies, *P. americana* did not recognize the cuticle of other insects as foreign, whereas *Schistocerca gregaria* encapsulated the cuticle transplants from the other insects (xenografts) [22]. However, both species did not recognize the allografts as foreign tissues, which refers to the implantation of the cuticle from the same species [22].

Recently, studies demonstrated acquisition of immunization through a passive transference of molecules from the parental generation to the offspring [17,23], and an active transference by the contact with the relatives [24]. According to Masri and Cremer [24], the individual level of immunization can be explained in two possible ways, (1) the host can sustain an upregulation of the genes involved in

* Corresponding author.

E-mail addresses: julianamrossato@gmail.com (J.M. Rossato), terimarm@gmail.com (T.R. Moresco), uczay@ufsm.br (J. Uczay), jtrocha@pesquisador.cnpq.br (J.B.T. da Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101343>

Received 14 March 2019; Received in revised form 30 July 2019; Accepted 6 August 2019
0147-9571/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

immune response or slow down the rate of degradation of the proteins after the first exposure to a pathogen, (2) the immune effectors [specific hemocytes, peptidoglycan recognition proteins (PPRs), integrins, down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)] of the host can decline to baseline levels shortly after an exposure to a pathogen, but the host acquired memory. In any case, the mechanisms are not well elucidated [25,26].

Because of the importance to adhere to the 3Rs prerogatives and to find substitutes for the mice and rats models, we focused on the use of lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. The *N. cinerea* is easy to handle and has been instrumental in toxicological and pharmacological studies [27–33]. Some advantages of *N. cinerea* include the size, life cycle, inability to fly, and ease of maintenance. We examined the appropriateness of *N. cinerea* as a model of infection using the human pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*. The effects of different concentrations of bacteria solutions preserved in two culture media on host survival, physiological consequences, alterations in the homeostasis of metabolism and immunization of nymphs against a second challenge with the same bacteria were evaluated.

2. Material and methods

2.1. Cockroach husbandry

The last instar nymphs of *N. cinerea* with 2.0 to 2.5 cm of length (from Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, Brasil) were separated in groups of 15–30 individuals. They were kept in plastic boxes (19 × 19 × 7 cm) containing a yellow plastic part from an egg-holder (Supplementary Fig. 1), water and food ad libitum

(the dog diet composition is provided in the supplementary Table 1). Nymphs were maintained under natural lighting conditions, temperature and humidity, written at a later part of this study.

Nymphs were injected with 20 μ L of saline or *S. aureus* suspensions (with a 1 ml syringe; Shandong Weigao Group Medical Polymer CO, China) at the base of the leg, in the second thoracic segment, close to the junction of the ventral and dorsal cuticles (Supplementary Fig. 2). The cockroaches were anesthetized on ice for about 6–10 minutes before injecting with saline or bacterial solution.

2.2. Bacterial preparation

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (ATCC[®] 25923[™]; USA) was utilized in this study. The strain was routinely preserved on Nutrient Agar (NA; peptic digest of animal tissue 5 g/L, beef extract 1.5 g/L, sodium chloride 5 g/L, yeast extract 1.5 g/L, agar 15 g/L; Himedia Laboratories, India) or Brain Heart Infusion (BHI) broth (calf brain infusion 200 g/L, beef heart infusion 250 g/L, proteose peptone 10 g/L, dextrose 2 g/L, sodium chloride 5 g/L, disodium phosphate 2.5 g/L; Himedia Laboratories, India), and stored at -2°C . After overnight growth on NA plate at 37°C , the colonies were used to prepare bacterial suspensions diluted in 1% sterile saline. The concentrations of the bacterial suspensions were determined by measuring optical density at 600 nm (OD600). The bacterial suspensions were diluted with 1% saline to give adequate bacteria concentrations (colony forming units/mL-CFU/mL).

2.3. Survival assay

Nymphs were inoculated with 20 μ L of saline (sham) or the indicated bacterial solutions. A not injected group was included as an

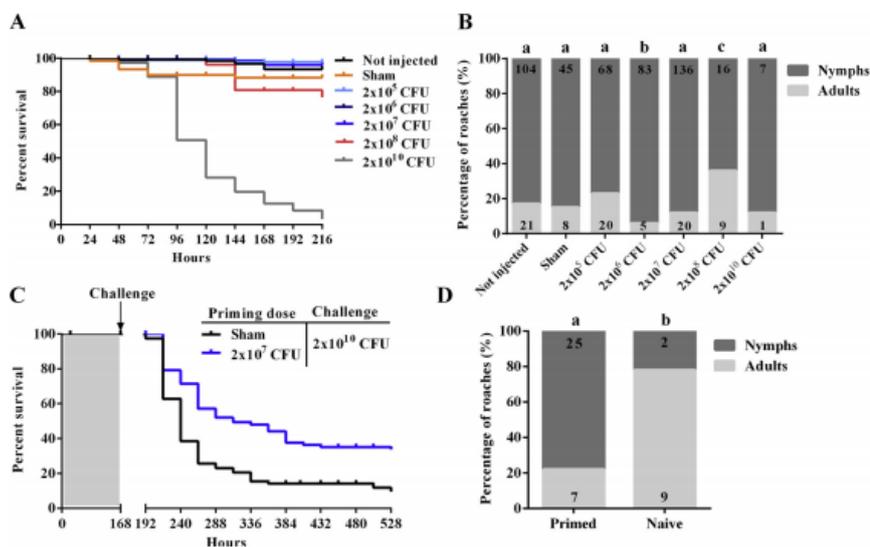


Fig. 1. Sensitivity of *N. cinerea* injected with *S. aureus* stored on NA. (A) Survival of nymphs infected with 2×10^5 CFU/cockroach ($N = 90$ nymphs), 2×10^6 CFU/cockroach ($N = 90$ nymphs), 2×10^7 CFU/cockroach ($N = 163$ nymphs), 2×10^8 CFU/cockroach ($N = 30$ nymphs), 2×10^{10} CFU/cockroach ($N = 73$ nymphs), sham ($N = 60$ nymphs) or not injected ($N = 133$ nymphs). The Log-rank (Mantel-Cox) test indicates significant differences in the survival of groups infected with higher concentrated doses ($p < 0.05$). (B) Percentage of nymphs and adults after 216 h (9 days) post-infection. The absolute number of cockroaches alive is inside the bars. A significant difference in the percentages of adults by Fisher's exact test (letters). (C) Survival of nymphs primed with 2×10^7 CFU/cockroach of *S. aureus* solution ($N = 80$ nymphs) to induce sepsis, or sham (saline) ($N = 80$ nymphs). Primed nymphs with bacteria were protected when challenged with a higher concentration of the same bacteria (2×10^{10} CFU/cockroach) after one week. The Log-rank (Mantel-Cox) test indicates that concentrations tested varied significantly in the survival of groups ($p < 0.05$). (D) Percentage of nymphs and adults after 528 h (22 days) post-infection. The absolute number of survived cockroaches is inside the bars. Statistical differences ($p < 0.05$) were determined by Fisher's exact test (letters).

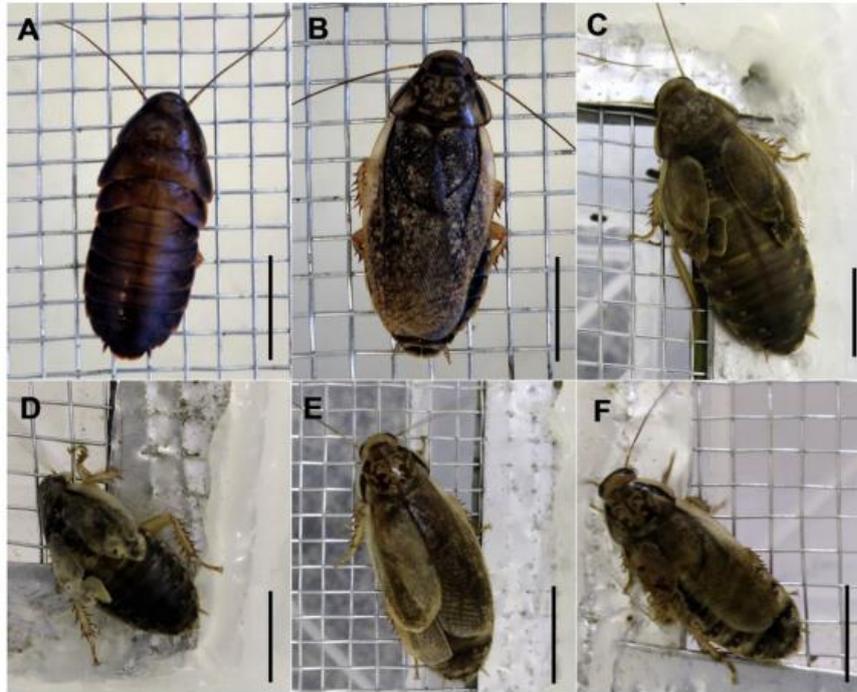


Fig. 2. Alteration in the phenotype of newly formed adults after molting of nymphs infected with higher concentrations of *S. aureus* (2×10^8 CFU/cockroach and 2×10^{10} CFU/cockroach) preserved in NA. (A) Normal nymph. (B) Normal adult. (C–F) Morphological alterations in adults from infected groups. Black lines represent 1 cm.

additional control group. A minimum of 30 nymphs was injected for each condition, and the experiments were performed at least two times.

2.3.1. Survival of nymphs injected with bacteria preserved on Nutrient agar

S. aureus, grown in NA plate at 37 °C for 24 h, were collected and diluted with sterile saline to give five different suspensions. The first solution (which contained the highest concentration of bacteria (10^{12} CFU/mL or 2×10^{10} CFU/cockroach) was diluted 20 times to obtain an OD_{600} 0.8, and the second solution (10^{10} CFU/mL or 2×10^8 CFU/cockroach) was diluted ten times to obtain an OD_{600} 0.8. The dilutions of the first and the second solutions were done to standardize the optical density to obtain 0.8, but the nymphs were injected with the concentrated solutions before being diluted. The third solution was diluted to obtain an OD_{600} 0.8 (10^9 CFU/mL or 2×10^7 CFU/cockroach), the fourth solution was diluted to obtain an OD_{600} 0.2 (10^9 CFU/mL or 2×10^6 CFU/cockroach), and the fifth solution was diluted to obtain an OD_{600} 0.1 (10^7 CFU/mL or 2×10^5 CFU/cockroach).

Test and control nymphs were maintained at a minimum temperature of $19.3^\circ\text{C} \pm 1.5$ and a maximum temperature of $24.8^\circ\text{C} \pm 1.4$ while minimum and maximum humidity were maintained at $42.8\% \pm 9.7$ and $59.9\% \pm 12.9$, respectively. The survival and molts (number of adults formed) were recorded daily for 216 h post-injection. Three independent tests were performed between July and August 2017.

2.3.2. Survival of nymphs injected with bacteria preserved on BHI

For the second set of survival tests, the same protocol for bacteria preserved and maintained in NA was utilized. The test and control

nymphs were maintained at a minimum temperature of $21.4^\circ\text{C} \pm 1.2$ and a maximum temperature of $25.0^\circ\text{C} \pm 1.6$ and a minimum and maximum humidity of $54.7\% \pm 5.4$ and $77.5\% \pm 6.1$ respectively. The survival and molts (number of adults formed) were noted daily for 168 h post-injection and three independent tests were performed between August and October 2018.

2.4. Priming of cockroaches with *S. aureus*

Two priming suspensions of *S. aureus* were prepared: one preserved on NA and the other on BHI broth. They were grown on NA plate at 37 °C for 24 h. The solutions were prepared according to the same protocol described above. In the first week, two groups of nymphs of 15–30 nymphs were primed with 20 μL of saline or a bacterial suspension (corresponding to OD_{600} 0.8, i.e., 10^9 CFU/ml or 2×10^7 CFU/cockroach). The sham nymphs (not infected) were called naive. Although, after the first week, both groups (sham and infected) were injected with 20 μL of a more concentrated bacterial suspension (containing 10^{12} CFU/ml or a total of 2×10^{10} CFU/cockroach).

Nymphs primed and challenged with the bacteria stored on NA were maintained at a minimum temperature of $20.9^\circ\text{C} \pm 1.0$ and a maximum temperature of $25.4^\circ\text{C} \pm 1.9$, and a minimum and maximum humidity of $45.6\% \pm 10$ and $65.9\% \pm 11.78$ respectively. The survival and the number of adults formed were observed daily, until 528 h post-injection. The test and replicates were performed in September 2017.

Nymphs primed and challenged with the bacteria stored on BHI broth were maintained at a minimum temperature of $21.3^\circ\text{C} \pm 0.6$, and a maximum temperature of $23.8^\circ\text{C} \pm 0.5$ and the minimum and

maximum humidity were maintained at $57.2\% \pm 5.0$ and $77.6\% \pm 4.0$ respectively. The survival and the number of adults were observed daily, until 312 h post-injection. The test and replicates were performed between September and October 2018.

2.5. Biochemical parameters

Biochemical tests were performed with nymphs injected with 10^{10} CFU/cockroach and 10^7 CFU/cockroach as described above. The *S. aureus* used in the biochemical tests were stored on NA. Intact nymphs, and those injected with sterile saline represented the negative controls. The hemolymph and fat body were collected after 24 h, 48 h, and 72 h post-injection. The replicates at each of these periods ($N = 7$) represent a pool of tissues from three nymphs. We did the collections of tissues in August 2017.

The nymphs were anesthetized on ice for about 10 min, cleaned with distilled water and the hemolymph was collected after removing only one of the back legs. The hemolymph was collected in a microtube and immediately stored at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. The abdomen was cut open with a pair of surgical scissors, and a part of the fat body was carefully collected, using a pair of forceps and stored at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Glucose, cholesterol, and protein levels were measured with Labtest kits, according to the manufacturer's protocol, using $10\text{ }\mu\text{L}$ of hemolymph. Free amino acids were measured according to Spies [34], using $10\text{ }\mu\text{L}$ of hemolymph that was incubated with 1.5 mL of Ninhydrin 0.5% (diluted in isopropyl alcohol) and $490\text{ }\mu\text{L}$ of distilled water, for 15 min at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The system was centrifuged at 1372 g for 10 min. After centrifuge, the supernatant was measured spectrophotometrically at 570 nm . The protein concentration of the fat body was determined by the method of Bradford [35], using $10\text{ }\mu\text{L}$ of the sample mixed with $40\text{ }\mu\text{L}$ distilled H_2O and 2.5 mL Coomassie Brilliant Blue reagent. The system was centrifuged at 1372 g for 10 min, and the supernatant obtained was measured at 595 nm .

Lipid peroxidation (TBARS) was measured according to Buege and Aust [36]. The tissue samples were obtained by homogenizing the fat body of the cockroaches in 20 mM phosphate buffer ($\text{pH } 7.5$) in a ratio 1:2 (mg fat body: ml buffer), 0.5 g of the fat body sample was homogenized in 1 mL phosphate buffer (20 mM , $\text{pH } 7.5$). $500\text{ }\mu\text{L}$ of homogenate was mixed with trichloroacetic acid (TCA 10%) and thiobarbituric acid (TBA 0.67%) prepared in a water solvent. Samples were heated at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, cooled and then centrifuged at 1372 g for 10 min, and the supernatant was measured at 535 nm . Data are expressed as nmol of malondialdehyde formed/mg of the fat body.

2.6. Measurement of bacterial burden in the hemolymph

For quantification of bacteria in the hemolymph, nymphs were injected with $20\text{ }\mu\text{L}$ of 10^{10} CFU/cockroach or 10^7 CFU/cockroach. Bacteria were preserved on BHI broth and grown in NA as described previously in this study. The hemolymph of each nymph was collected after 24 h, 48 h, 72 h, and one-week post-injection. Here, $10\text{ }\mu\text{L}$ of the hemolymph was serially diluted in 1% sterile saline and spread on NA for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterility of the hemolymph from the control groups was confirmed by spreading them on the plate without dilution, and no growth was observed. The results are expressed in CFU/mL. The tests were performed between March and May 2018.

2.7. Data analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism 6. The survival data were analyzed using the Kaplan–Meier method, and comparisons between groups were made using the log-rank test. Fisher's exact probability test was applied to compare the percentages of adults between intact, sham, and the other injected groups. Biochemical tests and CFU determination with the hemolymph were tested for normality D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, and Kolmogorov-Smirnov. Since the

data had no normal distribution, Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple post hoc comparisons were used. In all cases, $p < 0.05$ was considered significant. The data are expressed as mean \pm standard error of the mean.

3. Results

3.1. *N. cinerea* is sensitive to bacterial conditions

Nymphs infected with different concentrations of *S. aureus* (2×10^5 , 2×10^6 and 2×10^7 CFU/cockroach) maintained in NA did not present significant changes in survival when compared to the sham and control groups after one-week post-infection (Fig. 1A). In contrast, the treatment with 2×10^{10} CFU/cockroach caused a significant decrease in survival, which was evident from 96 to 216 h post-infection (Fig. 1A). Fig. 1B shows the percentage of nymphs that became adults at the end of the period of observation. New adults from the groups of nymphs infected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach presented different phenotype after molting, which encompassed morphological alteration in the wings and variation in pigmentation (Fig. 2). The adults of control, sham, and other lower bacterial concentrations groups did not present any abnormal phenotypes.

The survival curves of the second set of nymphs injected with bacterial solutions (2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach), preserved on BHI broth, showed an increase in mortality when compared to the nymphs injected with bacterial solutions preserved on NA (Fig. 3A). The infection with 2×10^8 CFU/cockroach killed 60% of the nymphs after 72 h post-infection (Fig. 3A). In this group, there were only nymphs at the end of one week (Fig. 3B). The concentration 2×10^{10} CFU/cockroach killed 80% of nymphs after 48 h, and after 96 h post-infection, there was no survival (Fig. 3A-B). Here, one of the nymphs molted to an adult; however, this adult did not survive.

It was possible to observe that the nymphs injected with the highest concentration of bacteria (2×10^{10} CFU/cockroach), stored on both culture mediums, displayed alterations in their behavior. The cockroaches avoided contact with each other, consumed less food, and remained isolated until their death. Consequently, they did not aggregate as the control and cockroaches injected with lower concentrations of bacteria (authors observations).

3.2. Immunization of *N. cinerea* is affected by bacterial conditions

Priming test showed that the nymphs immunized with the 2×10^7 CFU/cockroach of *S. aureus* preserved on NA were able to tolerate a second and stronger challenge (2×10^{10} CFU/cockroach) when compared to the naive group (Fig. 1C). The sham group had a 60% decrease in survival at 72 h post-infection, whereas in the primed group with a low quantity of bacteria the mortality decreased to 30%. After 15 days of the second challenge, the survival of primed nymphs was higher (40%, $n = 32$) than the naive group (11%, $n = 9$). At the end of this experiment, the number of newly formed adults after molting was significantly lower for the primed cockroaches, but the naive group had more newly formed adults (Fig. 1D).

This protection did not occur in the nymphs primed with bacteria preserved on BHI broth. It was possible to observe a delay in the mortality of the primed group, although all the cockroaches died in one week post-infection (Fig. 3C).

3.3. Changes in the metabolites of nymphs infected with *S. aureus* stored on NA

The analysis done with hemolymph of the nymphs indicated that all biochemical parameters tended to decrease in the nymphs infected with the concentrations 2×10^7 and 2×10^{10} CFU/cockroach when compared to the control nymphs. Free amino acid levels significantly decreased after 24 h and 72 h post-infection in the nymphs infected with

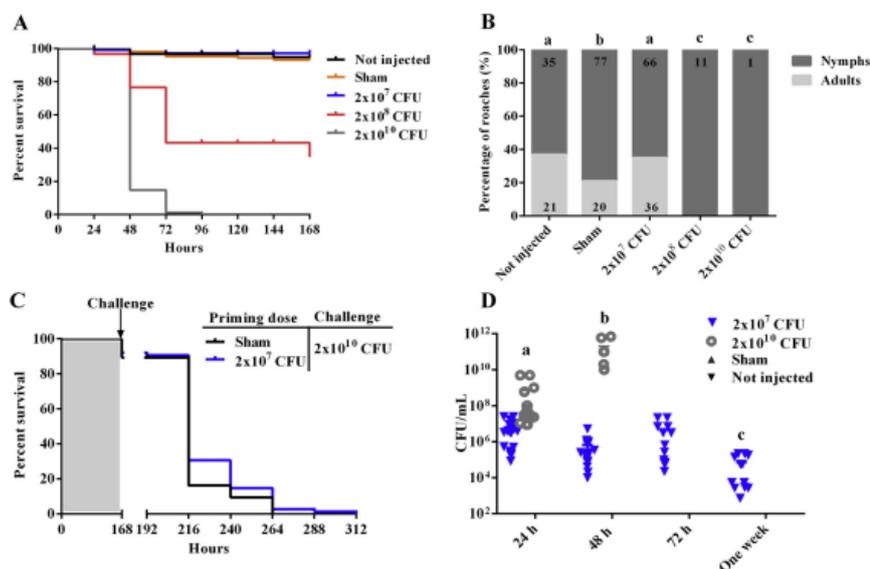


Fig. 3. The sensitivity of *N. cinerea* after infection with *S. aureus* preserved on BHI broth. (A) Survival curves of nymphs infected with 2×10^7 CFU/cockroach (N = 105 nymphs), 2×10^8 CFU/cockroach (N = 30 nymphs), 2×10^{10} CFU/cockroach (N = 75 nymphs), sham (N = 105 nymphs) or not injected (N = 60 nymphs). The Log-rank (Mantel-Cox) test indicates significant differences in the survival of groups infected with higher concentrations ($p < 0.05$). (B) Percentage of nymphs and adults after 168 h (7 days) post-infection. The absolute number of cockroaches alive is inside the bars. Statistical differences ($p < 0.05$) were determined by Fisher's exact test (letters). (C) Survival curves of *N. cinerea* primed with 2×10^7 CFU/cockroach (N = 75 nymphs) or sham (N = 75 nymphs). Primed nymphs with bacteria were not protected when challenged with a higher concentration of the same bacteria (2×10^{10} CFU/cockroach) after one week. The Log-rank (Mantel-Cox) test indicates that concentrations tested varied significantly in the survival of groups ($p < 0.05$). (D) Viable *S. aureus* in the hemolymph of nymphs infected with 2×10^7 CFU/cockroach or 2×10^{10} CFU/cockroach was assessed by serial dilution and spread on the plate. The bacteria load was verified within the first three days and on the 7th day post-infection. The sterility of the hemolymph of the sham and nymphs that were not injected were confirmed. Statistical differences ($p < 0.05$) were determined by Kruskal-Wallis test (< 0.0001) and Dunn's multiple comparisons post hoc test (letters). Data represent mean and standard error of mean of nymphs infected with 2×10^7 : 24 h (N = 19 nymphs), 48 h (N = 20 nymphs), 72 h (N = 14 nymphs), and one week (N = 12 nymphs); Bacterial solution 2×10^{10} : 24 h (N = 17 nymphs), and 48 h (N = 8 nymphs).

2×10^{10} CFU/cockroach, while the nymphs injected with 2×10^7 (Fig. 4A) showed a decrease in free amino acids only after 48 h post-injection. The cholesterol and glucose levels decreased significantly in the nymphs infected with 2×10^{10} CFU/cockroach along the time (Fig. 4B-C). The total proteins in hemolymph were also considerably reduced in the infected nymphs until 48 h post-infection (Fig. 4D). The levels of proteins in the fat body significantly increased in the infected groups when compared to the control during the first 24 h, and still increased at 72 h post-infection for the nymphs infected with 2×10^7 (Fig. 5A). The malondialdehyde levels in the fat body were higher in the infected groups until 48 h, when compared to control; however, this was not statistically significant (Fig. 5B). There was no significant difference in the biochemical parameters assayed for using the hemolymph and the fat body between the control and sham groups (data not shown).

3.4. Determination of CFU in the hemolymph of nymphs infected with *S. aureus* stored on BHI broth

The nymphs injected with 2×10^7 CFU/cockroach displayed a significant decrease in the microbial content along the time. However, those injected with 2×10^{10} CFU/cockroach had a significant increase in CFU until death (Fig. 3D). After 48 h, some nymphs infected with the highest concentration of bacteria started the decomposition of tissues (with a bad smell), and the collection of hemolymph was compromised due to decay.

4. Discussion

The present study demonstrated that thoracic injection of *S. aureus* killed nymphs of *N. cinerea* depending on the bacteria culture medium preservation, caused morphological abnormalities in newly formed adults, decreased the levels of metabolites in the hemolymph, altered the locomotion and social behaviors. The bacterial load in the hemolymph of infected nymphs increased which could have resulted in the mortality of the cockroaches that received the highest concentration (2×10^{10} CFU/cockroach), or decreased in the cockroaches that received 2×10^7 CFU/cockroach. Similar results were reported in silkworm larvae infected with *S. aureus* [7] and *D. melanogaster* infected with *S. pneumoniae* [37]. According to literature, living *S. aureus* can multiply locally and then gradually spread to the entire body of the organism [6]. However, no significant alterations in survival were observed in insect models that received dead *S. aureus* orally (1.9×10^9 CFU) [38], injected into the thorax (10^8 and 10^{5-7} CFU) [7,39], abdomen (8×10^6 CFU) [14] and injected with exoproteins formed in the log phase of growth [40] (Supplementary Table 2).

Nymphs primed with a sublethal concentration of bacteria (2×10^7 CFU/cockroach), preserved on NA, were protected against a second and stronger challenge with the same bacteria (2×10^{10} CFU/cockroach) administered one week later (Fig. 1C). Some plausible explanations on how *S. aureus*-primed nymphs were protected from a stronger challenge are: 1) primed nymphs acquired the ability to recognize and kill the bacteria faster than sham, increasing the survival; 2) primed

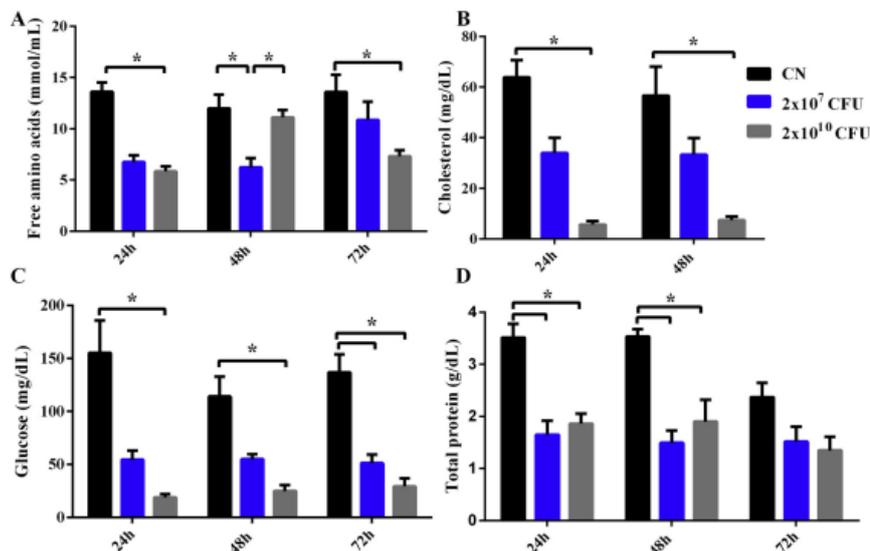


Fig. 4. Levels of metabolites in the hemolymph of nymphs injected with two concentrations of *S. aureus*, stored on NA, 2×10^7 CFU/cockroach (N = 63 nymphs) and 2×10^{10} CFU/cockroach (N = 63 nymphs), or not injected (control or CN) (N = 63 nymphs). (A) Free amino acids, (B) Cholesterol, (C) Glucose, and (D) Total proteins were measured after 24 h, 48 h, and 72 h post-infection. Statistical differences ($p < 0.05$) were determined by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test (*). Data are representative of 7 samples (pool of 3 nymphs) for each time and treatment.

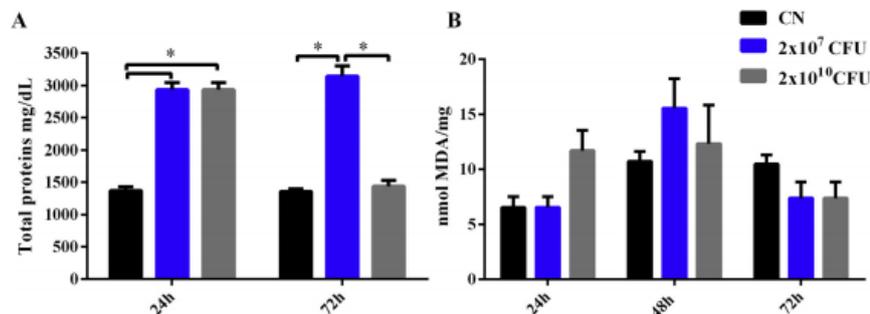


Fig. 5. Levels of metabolites in the fat body of nymphs injected with two concentrations of *S. aureus*, stored on NA, 2×10^7 CFU/cockroach (N = 63 nymphs) and 2×10^{10} CFU/cockroach (N = 63 nymphs), or not injected (control or CN) (N = 63 nymphs). (A) Total proteins and (B) Malondialdehyde (MDA) were measured after 24 h, 48 h, and 72 h post-infection. Statistical differences ($p < 0.05$) were determined by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test (*). Data are representative of 7 samples (pool of 3 nymphs) for each time and treatment.

nymphs could be able to tolerate a higher load of *S. aureus* after a second injection that was highly lethal to sham nymphs [41]; and, 3) the presence of CFU in the hemolymph of nymphs, one week after the injection of 2×10^7 CFU/cockroach (Fig. 3D), may indicate a persistent production of immune effectors to combat the infection, contributing to enhancing their survival. However, nymphs primed with *S. aureus*, preserved on BHI broth (2×10^7 CFU/cockroach) or saline, and challenged with a second and stronger concentration (2×10^{10} CFU/cockroach) after one week were not protected. We suggest that the variation in the composition of bacterial preservation media could have affected the metabolism of *S. aureus*, contributing to the up-regulation or suppression of virulence genes expression, as observed in other studies [42–46]. In this case, immune molecules produced by nymphs after priming were not able to increase the tolerance. Further, the

combination of high quantities of bacteria and the virulence of *S. aureus* led to a decrease in resistance, the ability to reduce the parasite load, and consequently a reduction in the tolerance. Since the only difference in the *S. aureus*-induced sepsis was the bacterial preservation medium, *N. cinerea* appears to be sensitive to the variations in the bacteria metabolism in both medium utilized.

The decrease in the metabolites (glucose, cholesterol, amino acids, and proteins) in the hemolymph were similar in the infected groups until 72 h post-infection. In opposite, *Drosophila* infected with *S. aureus* had no alteration in glucose levels, and a significant increase in the protein levels after 18 h, measured in the body [47]. The protein levels in the hemolymph were also high for the *B. mori* between 6 h and 24 h after the infection with *S. aureus* [48]. Although, the immune-metabolic demand usually increases the catabolism of glucose, amino acid, and

protein [49], which might lead to the depletion of the metabolites in the hemolymph of the cockroaches. The fat body is the primary producer of proteins [50], so the high levels of proteins in this tissue indicate intensive protein synthesis, which could be essential to guarantee the survival of the nymphs injected with the sublethal concentration of bacteria. Of note, the catabolism of amino acids and proteins are essential sources of substrates for carbohydrate synthesis and antimicrobial peptides production, in the fat body [50,51].

The considerable decrease in cholesterol levels in the hemolymph of infected groups can be related to cholesterol utilization by the host and the bacteria. Insects do not synthesize cholesterol but obtain it from the diet [52–55]. Several bacteria and pathogenic microorganisms also lack cholesterol synthesis, and they are cholesterol-host-dependent [56]. Besides, the nymphs infected with the highest concentration of *S. aureus* had a reduction in food consumption (personal observation), which could have contributed to the decrease in glucose and cholesterol availability.

Cholesterol is involved in the synthesis of several hormones, especially those involved in the molting process, maintenance of the integrity of cell membranes and tissues of the entire organism [55]. The malformation of newly formed adults may also be a consequence of the decrease in cholesterol levels, deprivation of food and the metabolic dysregulation, food deprivation led to reduced immune response and lower activity of phenoloxidase (PO), in *T. molitor* [57]. The enzyme PO participates in the production of melanin, a pigment substance used in the immune response (encapsulation of pathogens), wound healing, hardening of the cuticle, and exoskeletal pigmentation [58]. The injection of high quantities of bacteria in the cockroaches, as well as the possible production of virulence molecules by bacteria, could inhibit PO activity, preventing the melanization [59], which might compromise the integrity of the new cuticle synthesis.

The advance in ecdysis was observed in the crustacean *Daphnia magna* [60] and *Gammarus pulex* [61], in response to the high risk of infection caused by wounding, as an adaptation to different environmental conditions. Here, we could not conclude a clear relation between infection and the number of new adults formed in the groups of infected nymphs when compared to sham or not injected nymphs.

Immune response in insects against gram-positive bacteria involves the classical signaling Toll pathway and NF- κ B-induced systemic production of antimicrobial peptides [19,47,62]. Humoral and cellular mechanisms need to be explored in the cockroach *N. cinerea*. Genes related to stress and detoxification in the head and the fat body of cockroaches *N. cinerea* specimens were evaluated using a Transcriptomic analysis developed by Segatto *et al.* [63]. The molecular information about the transcriptome can be a powerful tool to identify the expression of the immune elements in the cockroach.

5. Conclusion

Several issues about the immune response in insects remain unknown. Most studies were conducted using holometabolous insects (Diptera and Lepidoptera), but we try to explore the immune response of the hemimetabolous cockroach *Nauphoeta cinerea*. In essence, we demonstrated that this cockroach is an attractive alternative for researches in immunology. The characterization of molecular and cellular mechanisms are necessary to underlie the mechanisms of host-pathogen interaction, involved in bacterial infection.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil, CAPES-PROEX (23038.004173/2019-93;0493/2019;88882.182126/2018-01), FINEP (CTINFRA), FAPERGS-CAPES (082018 DOCFIX), FAPERGS-CNPQ (12/2014) PRONEX (16/255100044994), CNPQ (INCT 465671/20144).

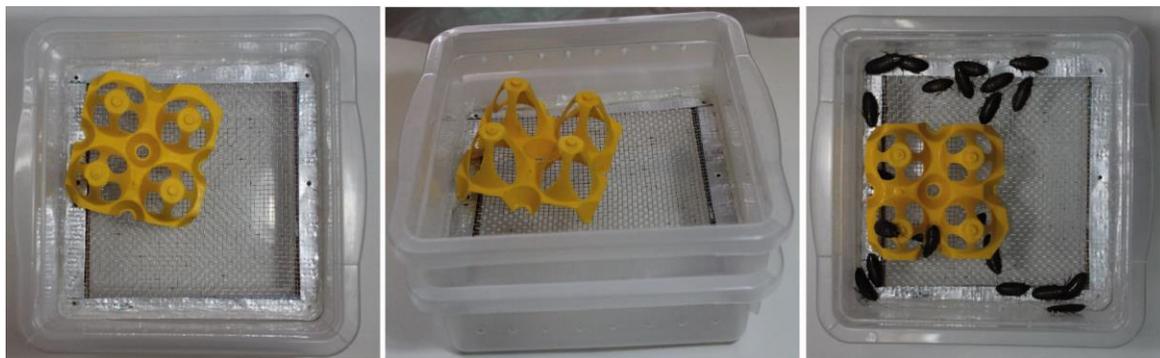
Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101343>.

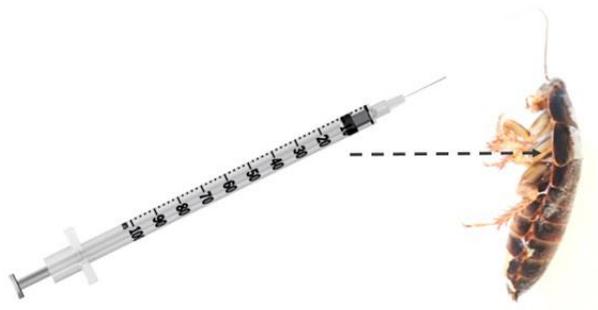
References

- [1] L.V. Kendall, J.R. Owin, E.D. Dohm, K.J. Knapke, E.S. Lee, J.H. Kopanke, M. Fink, S.A. Hansen, J.D. Ayers, Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents, (2019), pp. 1–18, <https://doi.org/10.1093/ilar/ily021>.
- [2] Y.L. Hernández, D. Yero, J.M. Pinos-rodríguez, I. Gibert, R. Zahorec, Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens, *Alternative Methods* 6 (2015) 1–19, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00038>.
- [3] D.A. Garsin, C.D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K.V. Singh, B.E. Murray, S.B. Calderwood, F.M. Ausubel, A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2002) 10892–10897, <https://doi.org/10.1073/pnas.191378698>.
- [4] C.D. Sifri, J. Begun, F.M. Ausubel, S.B. Calderwood, *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus*, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2208–2217, <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2208>.
- [5] M.S. Dionne, D.S. Schneider, Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, *Dis. Model. Mech.* 1 (2008) 43–49, <https://doi.org/10.1242/dmm.000307>.
- [6] S. Panayidou, E. Ioannidou, Y. Apidianakis, Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*, *Virulence* 5 (2014) 253–269, <https://doi.org/10.4161/viru.27524>.
- [7] C. Kaito, N. Akimitsu, H. Watanabe, K. Sekimizu, Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans, *Microb. Pathog.* 32 (2002) 183–190, <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0494>.
- [8] C. Kaito, K. Kurokawa, Y. Matsumoto, Y. Terao, S. Kawabata, S. Hamada, K. Sekimizu, Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 934–944, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04596.x>.
- [9] C. Kaito, K. Sekimizu, A silkworm model of pathogenic bacterial infection, *Drug Discov. Ther.* 1 (2007) 89–93 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504393>.
- [10] S. Miyazaki, Y. Matsumoto, K. Sekimizu, C. Kaito, Evaluation of *Staphylococcus aureus* virulence factors using a silkworm model, *FEMS Microbiol. Lett.* 326 (2012) 116–124, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02439.x>.
- [11] C.J.Y. Tsai, J.M.S. Loh, T. Proft, *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing, *Virulence* 7 (2016) 214–229, <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.
- [12] T. Pereira, P. de Barros, L. Fugisaki, R. Rossini, F. Ribeiro, R. de Menezes, J. Junqueira, L. Scorzon, Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens, *J. Fungi* 4 (2018) 128, <https://doi.org/10.3390/jof4040128>.
- [13] E.R. Haine, L.C. Pollitt, Y. Moret, M.T. Siva-Jothy, J. Rolff, Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*), *J. Insect Physiol.* 54 (2008) 1090–1097, <https://doi.org/10.1016/j.jinphys.2008.04.013>.
- [14] K. Ishii, H. Hamamoto, K. Sekimizu, Establishment of a bacterial infection model using the European honeybee, *Apis mellifera* L., *PLoS One* 9 (2014) 1–6, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089917>.
- [15] V. Fleming, E. Feil, A.K. Sewell, N. Day, A. Buckling, R.C. Massey, Agr interference between clinical *Staphylococcus aureus* strains in an insect model of virulence, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 7686–7688, <https://doi.org/10.1128/JB.00700-06>.
- [16] Y. Kochi, A. Miyashita, K. Tsuchiya, M. Mitsuyama, K. Sekimizu, C. Kaito, A human pathogenic bacterial infection model using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, *FEMS Microbiol. Lett.* 363 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw163>.
- [17] J. Dhinaut, M. Chogne, Y. Moret, Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect, *J. Anim. Ecol.* 87 (2018) 448–463, <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661>.
- [18] K. Kavanagh, E.P. Reeves, Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, *FEMS Microbiol. Rev.* 28 (2004) 101–112, <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>.
- [19] I.M. Dubovskiy, N.A. Kryukova, V.V. Glupov, N.A. Ratcliffe, Encapsulation and nodulation in insects, *Inf. Syst. J.* 13 (2016) 229–246.
- [20] R.D. Karp, L.A. Rheins, Pergamon press Ltd. All rights reserved, *Dev. Comp. Immunol.* 4 (1980) (1980) 629–639.
- [21] L.A. Rheins, R.D. Karp, Effect of gender on the inducible humoral immune response to honeybee venom in the American cockroach (*Periplaneta americana*), *Dev.*

- Comp. Immunol. 9 (1985) 41–49, [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(85\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0145-305X(85)90058-8).
- [22] A.M. Lackie, Cellular recognition of foreignness in 2 insect species, the american cockroach and the Desert Locust, *Immunology* 36 (1979) 909–914.
- [23] D. Cooper, I. Eleftherianos, Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges, *Front. Immunol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539>.
- [24] L. Masri, S. Cremer, Individual and social immunisation in insects, *Trends Immunol.* 35 (2014) 471–482, <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.005>.
- [25] J.F. Hillyer, HHS Public Access, (2017), pp. 102–118, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>.
- [26] D. Melillo, R. Marino, P. Italiani, D. Boraschi, Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal, *Front. Immunol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915>.
- [27] N.R. Rodrigues, D.G.C. Silva, A.P.P. Zemolin, D.F. Meinerz, L.C. Cruz, A.B. Pereira, M.E.M. Nunes, J.B.T. Rocha, T. Posser, J.L. Franco, Is the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress? *Chemosphere* 92 (2013) 1177–1182, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.084>.
- [28] I.A. Adedara, D.B. Rosenberg, D.O. Souza, E.O. Farombi, M. Aschner, J.B.T. Rocha, Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42 (2016) 243–251, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.02.001>.
- [29] I.A. Adedara, D.B. Rosenberg, D. de Souza, E.O. Farombi, M. Aschner, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinerea* following dietary exposure to chlorpyrifos, *Pestic. Biochem. Physiol.* 130 (2016) 22–30, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.12.004>.
- [30] C.A. Dal Belo, F.D.M. dos Santos, A.P. Zanatta, M. de Avila Heberle, R. Vaz Breda, P.M. Pinto, D.S. dos Santos, T. Carrazoni, A.P.A. Perin, P.V. Rodrigues, C.G.M. de Almeida, C.R. Carlini, J.C. da Costa, Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches, *Toxicology* 368–369 (2016) 162–171, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.09.007>.
- [31] F.D. Avila, P.A. Noguera, M.M. Braga, B.C. Piccoli, J.B.T. da Rocha, Molecular docking analysis of acetylcholinesterase corroborates the protective effect of pralidoxime against chlorpyrifos-induced behavioral and neurochemical impairments in *Nauphoeta cinerea*, *Comput. Toxicol.* 8 (2018) 25–33, <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2018.07.003>.
- [32] C. Simoni, R. De Cássia, G. De Lima, O. Olalekan, Y. Ogunbolude, A. Elieni, J. Batista, T. Rocha, I. Rose, A. De Menezes, L. Marivando, A. Tsopmo, K. Eriqie, J. Paul, Chemical-Biological Interactions Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*, *Chem. Biol. Interact.* 282 (2018) 77–84, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.011>.
- [33] B.A. Afolabi, I.A. Adedara, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Dietary co-exposure to methylmercury and monosodium glutamate disrupts cellular and behavioral responses in the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* model, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 64 (2018) 70–77, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.09.003>.
- [34] J.R. Spies, Colorimetric procedures for amino acids, *Methods Enzymol.* 3 (1957) 467–477, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03417-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03417-5).
- [35] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [36] J.A. Buege, Steven D. Aust, Thiobarbituric acid assay, *Methods* 78 (1981) 369–373.
- [37] L.N. Pham, M.S. Dionne, M. Shirasu-Hiza, D.S. Schneider, A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes, *PLoS Pathog.* 3 (2007), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>.
- [38] A.J. Needham, M. Kibart, H. Crossley, P.W. Ingham, S.J. Foster, *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection, *Microbiology* 150 (2004) 2347–2355, <https://doi.org/10.1099/mic.0.27116-0>.
- [39] A.P. Desbois, P.J. Coote, Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antimicrobial agents, *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 1785–1790, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr198>.
- [40] M.S. Hossain, H. Hamamoto, Y. Matsumoto, I.M. Razanajatovo, J. Larranaga, C. Kaito, H. Kasuga, K. Sekimizu, Use of silkworm larvae to study pathogenic bacterial toxins, *J. Biochem.* 140 (2006) 439–444, <https://doi.org/10.1093/jb/mvj171>.
- [41] J.S. Ayres, D.S. Schneider, Tolerance of Infections, (2012), pp. 271–296, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075030> [s.d.].
- [42] M. Liebke, M. Lalk, *Staphylococcus aureus* metabolic response to changing environmental conditions - A metabolomics perspective, *Int. J. Med. Microbiol.* 304 (2014) 222–229, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.017>.
- [43] L. Rohmer, D. Hocquet, S.I. Miller, Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis, *Nat. Protoc.* 10 (2011) 168–170, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.
- [44] S. Weiss, Z. Sun, E. Hammer, K. Surmann, M. Gutjahr, M. Depke, F. Schmidt, R.L. Moritz, T.C. Meyer, L.M. Palma Medina, S. Michalik, T. Pribyl, M. Hecker, S.L. Bader, D. Becher, H. Pfortner, U. Mäder, U. Völker, U. Kusebauch, P. Hildebrandt, A. Murr, M. Gesell Salazar, E.W. Deutsch, S. Hammerschmidt, A global *Staphylococcus aureus* proteome resource applied to the in vivo characterization of host-pathogen interactions, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10059-w>.
- [45] T. Ketola, L. Mikonranta, J. Laakso, J. Mappes, Different food sources elicit fast changes to bacterial virulence, *Biol. Lett.* 12 (2016) 2–5, <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0660>.
- [46] G.A. Somerville, R.A. Proctor, At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73 (2009) 233–248, <https://doi.org/10.1128/mmr.00005-09>.
- [47] A.M. Kaynar, V. Bakalov, S.M. Laverde, A.L.F. Cambriel, B.-H. Lee, A. Towheed, A.D. Gregory, S.A.R. Webb, M.J. Palladino, F.A. Bozza, S.D. Shapiro, D.C. Angus, Cost of surviving sepsis: a novel model of recovery from sepsis in *Drosophila melanogaster*, *Intensive Care Med. Exp.* 4 (2016), <https://doi.org/10.1186/s40635-016-0075-4>.
- [48] Harinatha Reddy A, B. Venkatappa, Effect of *Staphylococcus aureus* infection on biochemical and antioxidant activities of fifth instar silkworm larvae (*Bombyx mori* L.), *J. Bacteriol. Parasitol.* 07 (2016), <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000286>.
- [49] S. Penkov, I. Mitroulis, G. Hajishengallis, T. Chavakis, Immunometabolic crosstalk: an ancestral principle of trained immunity? *Trends Immunol.* 40 (2019) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.002>.
- [50] E.L. Arrese, J.L. Soulages, Insect fat body: energy, metabolism, and regulation, *NIH public access, Annu. Rev. Entomol.* (2011) 207–225, <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356> INSECT.
- [51] S.P. Schmidt, E.G. Platzer, Changes in body tissues and hemolymph composition of *Culex pipiens* in response to infection by *Romanomermis culicivorax*, *J. Invertebr. Pathol.* 36 (1980) 204–254, [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90030-0).
- [52] A.J. Clark, K. Block, The absence of sterol synthesis in insects, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 2578–2582.
- [53] R.B. Clayton, The Utilization of sterols by insects, *J. Lipid Res.* 15 (1964) 3–19 <http://www.jlr.org/content/5/1/3.short%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14173327>.
- [54] S.T. Behmer, W. David Nes, Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview, (2003), [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(03\)31001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31001-X).
- [55] F. Igarashi, M.H. Ogihara, M. Iga, H. Kataoka, Cholesterol internalization and metabolism in insect prothoracic gland, a steroidogenic organ, via lipoproteins, *Steroids* 134 (2018) 110–116, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.01.012>.
- [56] E.P. Caragata, E. Rancès, L.M. Hedges, A.W. Gofton, K.N. Johnson, S.L. O'Neill, E.A. McGraw, Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by wolbachia, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003459, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459>.
- [57] M.T. Siva-Jothy, J.J.W. Thompson, Short-term nutrient deprivation affects immune function, *Physiol. Entomol.* 27 (2002) 206–212, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x>.
- [58] J.P. Dudziec, S. Kondo, R. Ueda, C.M. Bergman, B. Lemaitre, *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases, *BMC Biol.* (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>.
- [59] L. Cerenius, B.L. Lee, K. So, The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, *Trends Immunol.* (2008) 263–271, <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>.
- [60] D. Duneau, D. Ebert, The role of moulting in parasite defence, *Proc. Biol. Sci.* 2012 (2012) 3049–3054, <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0407>.
- [61] S.J. Plautow, Y. Outreman, Y. Moret, T. Rigaud, Variation in the risk of being wounded: an overlooked factor in studies of invertebrate immune function? *Ecol. Lett.* 6 (2003) 489–494.
- [62] N. Buchon, N. Silverman, S. Cherry, Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 796–810, <https://doi.org/10.1038/nri3763>.
- [63] A.L.A. Segatto, J.F. Diesel, E.L.S. Loreto, J.B.T. da Rocha, De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae), *Genet. Mol. Biol.* 41 (2018) 713–721.



Supplementary Figure 1: Home cages (19 x19 x7 cm) with small holes to facilitate air exchange (central image), and containing a yellow plastic part from an egg-holder. The distribution of nymphs inside the cages (right image).



Supplementary Figure 2: Detail of local application of the injection into the thorax of nymphs.

Supplementary Table 1: A table showing the composition of the dog feed given to the cockroaches during rearing and/or adaptation.

| NUTRIENT | COMPOSITION | NUTRIENT | COMPOSITION (%) |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Vitamin A Acetate | 5.000 I.U | Crude Protein (min) | 18 |
| Vitamin B12 | 22 mcg | Crude Fat (min) | 7 |
| Cholecalciferol | 500 I.U | Crude Fiber (max) | 6 |
| α -Tocopherol Acetate | 50 I.U | Moisture (max) | 12 |
| Sodium Selenite | 0.1 mg | Ash (max) | 10 |
| Folic Acid | 0.1mg | Calcium (max) | 2.4 |
| Calcium Pantothenate | 10 mg | Calcium (min) | 1 |
| Copper Sulfate | 7 mg | Phosphorous (min) | 1 |
| Ferrous Sulphate | 40 mg | Sodium (min) | 0.3 |
| Calcium Iodate | 1 mg | BASIC COMPOSITION | |
| Manganese Oxide | 5 mg | Poultry by-product meal | Powder hemoglobin |
| Thiamine Mononitrate | 1 mg | Meat and bone meal | Salt |
| Riboflavin Supplement | 2 mg | Ground yellow corn | Choline Chloride |
| Pyridoxine HCL | 1 mg | Defatted corn germ | Di-calcium phosphate |
| Biotin | 0.2 mg | Corn gluten meal | Calcium propionate |
| Menadione Sodium Bisulfite | 1mg | Rice Meal | Hydrolyzed deboned chicken, |
| Niacin Supplement | 11 mg | Wheat mill run | vitamin mineral premix |
| Zinc Oxide | 120 mg | Poultry fat (preserved with BHA, BHT) | |

Supplementary 2: A review of *S. aureus*-induced sepsis in insects.

| INSECT MODEL | STAGE OF DEVELOPMENT | MAINTENANCE | INJECTED | MEDIUM OF GROWTH | TYPE OF INFECTION | RESULTS | REFERENCE |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Adults females (2-5 days old) | 30°C | 4.5x10 ⁴ (25 nL) alive | BHI overnight, washed and diluted | Thorax | 100 % mortality 16 h p.i | Needhan <i>et al.</i> 2004 |
| | | | 4.5x10 ³ (25 nL) alive | | | 100 % mortality until 24 h | |
| | | | 4.5x10 ⁴ (25 nL) autoclaved | | Orally | No alteration in survival | |
| | | | 1.9x10 ⁹ CFU/mL dead (not specifically) | | | No alteration in survival | |
| Adults females (2-3 days old) | 23°C/60 % humidity | 10 ⁶ CFU (pricked) alive | LB 4-5h, washed and diluted | Thorax | 83 % of mortality 72 h p.i | Kaynar <i>et al.</i> 2016 | |
| <i>Bombyx mori</i> | Fifth instar | 27°C/75 % humidity | 5x10 ⁵⁻⁸ CFU/mL (not specifically) alive | LB overnight, washed and diluted | Abdominal | 8% of mortality 24 h p.i | Reddy and Venkatappa 2016 |
| | Fifth instar | Room temperature | 10 ⁷ CFU alive (50 µL) 10 ⁸ CFU dead (50 µL) | Manitol agar overnight | Thorax | 90% of mortality 48h p.i No alteration in survival | Kaito <i>et al.</i> 2002 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------|---|--|--|-----------|------------------------------|------------------------------|
| | | | 10 ⁷ CFU RN4220 (50 μL) alive | | | 70 % of mortality 24 h p.i | |
| | | | 10 ⁷ CFU MSSA,MRSA (50 μL) alive | | | 90 % of mortality 24 h p.i | |
| | Fifth instar | Not specific | Exoproteins of log phase (200 μL) | LB or TSB | Abdominal | No alteration in survival | Hossain <i>et al.</i> , 2006 |
| | | | Exoproteins of early-stationary phase (200 μL) | | | 100 % of mortality 100 h p.i | |
| <i>Gryllus bimaculatus</i> | Adult one week old | 27°C | 2.1±0.5x10 ⁸ CFU (50 μL) alive | LB agar overnight and LB broth overnight, washed and diluted | Abdominal | 100 % of mortality 20 h p.i | Kochi <i>et al.</i> 2016 |
| | | | 1.1±0.3x10 ⁸ CFU (50 μL) alive | | | 80 % of mortality 80 h p.i | |
| | | 0.26±0.06x10 ⁸ CFU (50 μL) alive | 20 % of mortality 120 h p.i | | | | |
| | | 37°C | 7.8x10 ⁷ CFU (50 μL) alive | | | 50 % of mortality | |
| <i>Galleria mellonella</i> | Larvae | 37°C | 10 ⁷ CFU (10 μL) alive | End of exponential phase, filtered and washed with PBS | Thorax | 100 % of mortality 24 h p.i | Desboes and Coot 2011 |
| | | | 5x10 ⁶ CFU (10 μL) alive | | | 100 % of mortality 72 h p.i | |
| | | | 5x10 ⁵ CFU (10 μL) alive | | | 25 % of mortality 120 h p.i | |

| | | | | | | | |
|-----------------------|--------|------|--|------------------------------------|-----------|-------------------------------|--------------------------|
| | | | 5x10 ⁶⁻⁷ (10 µL) heat killed | | | No alteration in survival | |
| | | 25°C | | | | 60 % of mortality 120 h p.i | |
| | | 30°C | 2.5x10 ⁶ CFU (10 µL) alive | | | 75 % of mortality 120 h p.i | |
| | | 37°C | | | | 95 % of mortality 120 h p.i | |
| | | 25°C | | | | 100 % of mortality 48 h p.i | |
| | | 37°C | OD ₆₀₀ 0.05~0.1 (25 µl) alive | | | 100 % of mortality after 20 h | |
| <i>Apis mellifera</i> | Adults | 25°C | 5x10 ⁵ CFU (25 µl) alive | LB10 overnight, washed and diluted | Abdominal | | Ishii <i>et al.</i> 2014 |
| | | 31°C | 2x10 ⁵ CFU (25 µl) alive | | | 50 % of mortality 24 h p.i | |
| | | 37°C | 5x10 ⁴ CFU (25 µl) alive | | | | |
| | | 15°C | 8x10 ⁶ CFU (25 µl) dead | | | No alteration in survival | |

BHI: Brain Heart Infusion, LB: Luria-Bertani, TS: Tryptic Soy, TSB: Tryptic soy broth, THY: Todd-Hewitt Broth Agar supplemented with 0.5 % yeast; p.i: post-infection

4.2 ARTIGO 2

4.2.1 Objetivos específicos

- Verificar a patogenicidade de *S. aureus* em *N. cinerea* após injeção local da bactéria no inseto.
- Avaliar alterações de parâmetros comportamentais em *N. cinerea* induzidas por *S. aureus*.

Sickness-related behaviors of *Nauphoeta cinerea* (Blattodea: Blaberidae) against *Staphylococcus aureus* infection

Juliana Marzari Rossato^A, Blessing Ariyo Afolabi^{AB}, Terimar Ruoso Moresco^C, Letícia Rodrigues Ferreira^C, Mauren Larangeira Ramos^C, João Batista Teixeira da Rocha^A

^ADepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. julianamrossato@gmail.com; blessingafolabi7@gmail.com; jbtrocha@yahoo.com.br;

^BDepartment of Biochemistry, Bowen University, Iwo, Osun State, Nigeria.

^CDepartamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 98300-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil. terimarm@gmail.com; leticiarodfer22@gmail.com; maurenlarangeira8@gmail.com.

Declaration of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: jbtrocha@yahoo.com.br

Departamento de Bioquímica Toxicológica, UFSM, Av. Roraima nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, CEP: 97105-900, +55 (55) 3220-8000.

Abstract

Sickness behaviors are adaptation defenses in response to several pathogens and considered highly conserved in animals. We aimed investigate the sickness-related behaviors of the cockroach *Nauphoeta cinerea* against *Staphylococcus aureus* at 24 h, 48 h, and 72 h post-infection. Last instar nymphs were maintained in groups of 10 individuals per box and each cockroach was evaluated independently using the images and the software X-PloRat, for five minutes. Results were compared with the hypotheses suggested to explain the sickness behaviors in mammals. Immune challenges differently affected the sickness-related behaviors in *N. cinerea* nymphs. Reduction in locomotion, exploratory behaviors, and risk-taking behaviors induced by infection were not observed in the nymphs, as predicted the energy conservation and predator avoidance hypotheses. Reduction in aggregation and grooming behavior were the signs that partially agreed with energy conservation and reduction of pathogen transmission hypotheses, in the groups infected with higher concentrations of *S. aureus*. Higher concentrations of bacteria or differential virulence expression of *S. aureus* may be caused the variability in the central nervous and the immune systems responses. Furthermore, the differences observed between cockroaches and mammals may indicate the divergent strategies to combat an infection, probably due to the particular immune systems and physiological characteristics of these organisms, mediated by evolutionary pressures imposed by pathogens.

Keywords: Aggregation; Avoidance; Grooming; Insect; Locomotion; Pathogen, Risk-taking;

1. Introduction

Sickness behaviors are adaptation defenses that can occur in response to several pathogens (viruses, bacteria, fungi, protozoans, helminths), and are highly conserved in animals (Hart, 1988) (Adelman and Martin, 2009) (Kazlauskas et al., 2016) (). The behaviors displayed by a sick individual are not maladaptive, but an organized behavioral strategy that could be critical to survival (Hart, 1988) (Hart, 1990) (). The cross-talk between the central nervous and the immune systems plays an important role in the manifestation of sickness behavior (Salzet, 2000) (Salzet et al., 2000) ().

Cytokines, mainly interleukin 1 (IL-1 α and IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α , are the main mediators of sickness behaviors in mammals (Dantzer, 2004) (Tizard,

2008) (Gellman and Turner, 2013) (Shakhar, 2019) and upon cytokines stimulation, the neuronal (neurotransmitters) and endocrine molecules (glucocorticoids, adrenocorticotropin hormone, catecholamines) are released and recognized by several receptors expressed in the immune cells (Dantzer, 2004) (Taub, 2008) (Aubert and Richard, 2008).

In insects, however, the knowledge about the biochemistry involved in the regulation of sickness behavior is still incipient (Vanha-aho et al., 2016) (Roeder, 2005). Some studies have identified cytokines involved in insect immune response, for instance, the Spätzle (Vanha-aho et al., 2016) (Buchon et al., 2014), unpaired (upd) (Myllymäki and Rämetsä, 2014) (Vanha-aho et al., 2016), paralytic peptide (Ishii et al., 2008) (Ishii et al., 2010) (Ishii et al., 2014) and growth-blocking peptide (Adamo, 2008) (Vanha-aho et al., 2016). Furthermore, other compounds as eicosanoids and catecholamines (serotonin, octopamine, and dopamine) have been demonstrated to play a role in sickness behaviors in insects (Roeder, 2005) (Adamo, 2008) (Adamo, 2006).

The sickness behaviors observed in mammals after injection of pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharides (LPS) are similar to those after pathogen infection (Dantzer, 2001) (Dantzer, 2004). The behavioral symptoms include decrease in general activities (such as exploratory behavior or lethargy, social and sexual behaviors, food and water intake or anorexia and adipsia), body care activities and grooming (Hart, 1988) (Dantzer, 2001) (Gellman and Turner, 2013). These behavioral symptoms, together with fever and other physiological changes (hypoferremia, catabolism, perspiration, anemia, and weakness), are important strategies of the mammals to combat infection (Shakhar and Shakhar, 2015). The most accepted hypotheses about the adaptive development of sickness behaviors are the energy conservation (EC) to maintain fever, predator avoidance (PA) and reduction of pathogen transmission (RPT) (Shakhar and Shakhar, 2015) (Sullivan et al., 2016).

Increasingly evidence suggest that insects play immune-behavioral interactions, which are mediated by bidirectional connections between the immune and nervous systems (Adamo, 2006) (Adamo, 2008) (Vanha-aho et al., 2016). Behavioral alterations in response to chemical agents have been investigated in the cockroach *Nauphoeta cinerea* to evaluate

neurotoxicity after exposure to chlorpyrifos (Adedara et al., 2016a)□□□, methylmercury (Adedara et al., 2016b)□□, caffeine (da Silva et al., 2018)□□□, monosodium glutamate and methylmercury co-exposure (Afolabi et al., 2018)□□□. In our previous study we investigated sepsis-induced by *S. aureus* in *N. cinerea*, but no specific attention has been given to the sickness related behaviors (Rossato et al., 2019)□.

Since there has been little investigation about sickness-related behaviors of insects and contradictory results have been reported (Shakhar, 2019)□(Bronstein and Conner, 1984)□(Sullivan et al., 2016)□(Adamo, 1998)□(Kazlauskas et al., 2016)□(Alaux et al., 2012)□(Davis et al., 2018)□(Tyler et al., 2006)□(Siva-Jothy and Vale, 2019)□, we herein explore the behavioral analysis of *S. aureus* infected *N. cinerea*. Sickness-related behaviors of *N. cinerea* were accessed in small groups of infected or control nymphs, since *N. cinerea* is a subsocial insect, living aggregated (particularly juvenile individuals) (Bouchebti et al., 2016)□□. Considering the presence of analogs of the vertebrate chemical messengers of sickness-related behaviors (pro-inflammatory cytokines) in insects (Vanha-aho et al., 2016)□(Ishii et al., 2015)□(Myllymäki and Rämetsä, 2014)□(Lemaitre et al., 1996)□(Adamo, 2008)□□, we can postulate that some behavioral manifestations mediated by inflammatory cytokines could also be found in *N. cinerea*. We herein determined the signs of sickness-related behaviors in *N. cinerea* after injecting with three different concentrations of *S. aureus*, and compared with they are in agreement of mammals's hypotheses.

2. Material and Methods

2.1 Cockroach husbandry

The nymphs were procured from Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Last instar nymphs of the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* were utilized for the present study. Nymphs with length measuring between 2-2.5 cm were selected randomly from the insect vivarium and divided into five groups: not injected, sham (injected with 1% sterile saline), injected with three concentrations of bacteria (2×10^7 CFU/nymph, 2×10^8 CFU/nymph, 2×10^{10} CFU/nymph). Each group had 30 nymphs per group. For each treatment, there were three replicates (three boxes with 10 nymphs) making a total of 150 nymphs utilized during the course of the study.

Selected nymphs were transferred to a small plastic box (size 19 x 19 x 7 cm) containing a plastic egg-holder which serves as environmental enrichment (Supplementary Figure 1). The bottom of the first box was replaced by wire mesh to avoid accumulation of faeces while a second plastic box was placed below to collect the faeces. Experimental cockroaches were acclimatized in the new environment for two days in groups of at least 30 nymphs per box. After injection, the insects were maintained in groups of 10 nymphs per box. The animals were reared with water and food ad libitum and kept under 12-hour light/dark cycles. The temperature ranged from $22.9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ to $25.6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; and the humidity ranged from $44.2\% \pm 10$ to $65.3\% \pm 11.7$. At the end of the experiment, all the treated cockroaches were frozen and discarded as contaminated biological waste.

2.2 Bacterial preparation

Staphylococcus aureus subsp. aureus (ATCC® 25923™; USA) was utilized in this study. The bacteria were left to grow overnight on Nutrient Agar (NA; peptic digest of animal tissue 5 g/L, beef extract 1.5 g/L, sodium chloride 5 g/L, yeast extract 1.5 g/L, agar 15 g/L; Himedia Laboratories, India) at 37°C and the colonies were used to prepare bacterial suspensions diluted in 1% sterile saline. The concentrations of the bacterial suspensions were determined by measuring optical density at 600 nm (OD₆₀₀). The bacterial suspensions were diluted with 1% saline to give adequate bacteria concentrations (colony forming units/mL-CFU/mL).

The first solution (which contained the highest concentration of bacteria (10^{12} CFU/mL or 2×10^{10} CFU/cockroach) was diluted 20 times to obtain an OD₆₀₀ 0.8, and the second solution (10^{10} CFU/mL or 2×10^8 CFU/cockroach) was diluted ten times to obtain an OD₆₀₀ 0.8. The dilutions of the first and the second solutions were done to standardize the optical density to obtain 0.8, but the nymphs were injected with the concentrated solutions before being diluted. The third solution was diluted to obtain an OD₆₀₀ 0.8 (10^9 CFU/mL or 2×10^7 CFU/cockroach).

2.3 Experimental analysis

The nymphs were anesthetized on ice before injection by putting about 5-10 nymphs in a glass gently placed on ice for a maximum of 10 min. This time was enough for the nymphs to stop moving, so as to clean the insect body with distilled water and carry out the injection. Nymphs were injected with 20 μ L of saline (sham) or the indicated bacterial solutions. Survival and the molts were observed daily.

2.4 Behavioral analysis

The behavioral parameters of the control insects (treated with saline or intact controls, i.e., not injected) and *S. aureus*-treated individuals were measured at 24 h, 48 h, and 72 h after infection. Nymphs were maintained in the same home boxes. The plastic egg-holder, food and water were removed to avoid interference while recording the behavior of the nymphs for five minutes. Videos were recorded between 2:00 pm and 4:00 pm. The images were analyzed using X-PloRat (Tejada et al., 2017)□□□, which builds a computer maze over the boxes (Figure 5F). The measurement of behaviors was performed by analyzing each cockroach independently. Data represent mean \pm standard error of the mean (S.E.M) of an absolute number of occurrences and the percentage of the time.

2.4.1 Measurement of the locomotor activity

The locomotor activity of nymphs was assessed measuring total immobile time (time in which the animal stopped its walking path during the whole experiment); and the episodes of immobility. Exploratory behavior was measured by the crossings maze activity (total number of crossings in the computer maze during five minutes). The escape speed (the spontaneous reaction) was observed during the manipulation of the boxes.

2.4.2 Interaction between conspecifics

We evaluated the interactions between conspecifics by the aggregation time (the total time spent by a nymph either overlapping or in contact with the antennae and / or some part of

the body with at least one conspecific), and the frequency that they entered in contact with each other (number of occurrences).

2.4.3 Grooming and time spent in the central area of the box

Individual cleaning behaviors were measured by antennae grooming (time spent developing the cleaning of antennae). We also evaluated the time spent in the central area (central quadrant of the maze) and the total number of entries into the central area (number of occurrences).

2.5 Statistical analysis

Data were tested for variance-homogeneity and normal distribution using Shapiro-Wilk test. In our case, we applied Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post hoc test for non parametric data. Log-rank (Mantel-Cox) was used for survival analysis. The differences in the number of adults and nymphs were analyzed by Fisher's exact test (Confidence interval 95%). The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 and 8.0 for heat maps (Software, San Diego, CA, USA). The values were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Survival

Log-rank (Mantel-Cox) test indicates an overall difference between the treatments (Log-rank $H_4 = 145.2$ $P < 0.0005$), and differences in the nymphs injected with 2×10^8 CFU/cockroach (Log-rank $H_1 = 26.71$ $P < 0.0001$, when compared to control) and 2×10^{10} CFU/cockroach (Log-rank $H_1 = 62.28$ $P < 0.0001$, when compared to control) (Figure 1A). A low concentration of *S. aureus* (2×10^7 CFU/cockroach) did not cause significant change in mortality after one-week of infection. During the experimental period some nymphs became adults (Figure 1B), and Fisher's exact test indicates significant reduction tendency in the adults for the group injected with 2×10^8 CFU/cockroach (two-tailed $P < 0.0005$). New adults

molted from nymphs injected with 2×10^8 CFU (n=3) and 2×10^{10} CFU/cockroach (n=1) did not survive until the end of one-week.

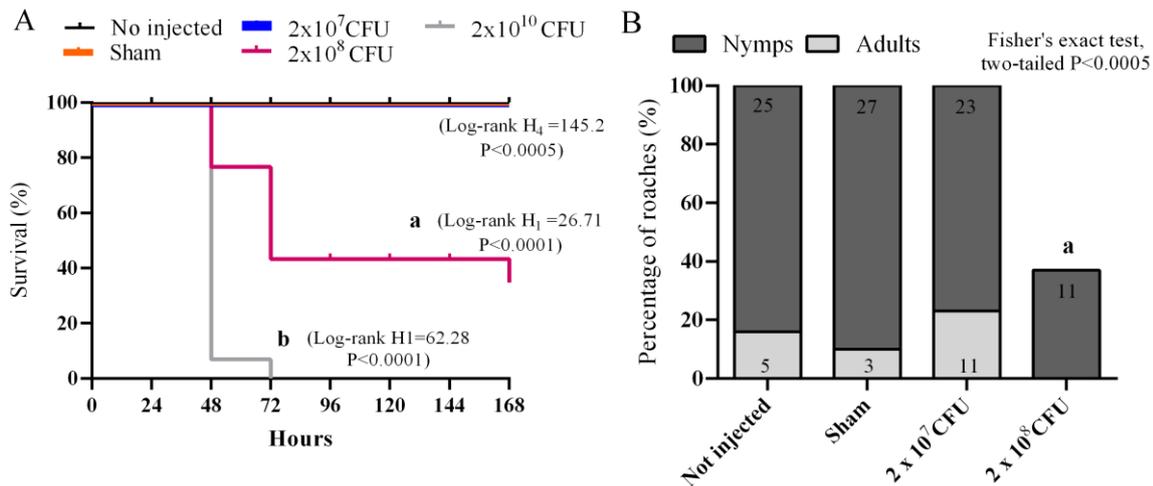


Figure 1. Survival and molts of *N. cinerea* after infection with *S. aureus*. (A) Survival curves of not injected, sham, 2×10^7 CFU, of 2×10^8 CFU and 2×10^{10} CFU/cockroach. (B) Percentage of nymphs and adults after one week of infection (the number of live cockroaches is inside the bars). Percent survival was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) for trend and percentage of nymphs and adults were analyzed by Fisher's exact test. Different letters mean statistical difference ($P < 0.05$).

3.2 Locomotor activity

The number of crossings between quadrants presented statistical difference 24 h ($H_4 = 38.85$ $P < 0.0001$), 48 h ($H_3 = 21.30$ $P < 0.0001$) and 72 h ($H_3 = 30.70$ $P < 0.0001$) post-infection. Kruskal-Wallis also revealed statistical difference between treatment when comparing immobile time 24 h ($H_4 = 27.60$ $P < 0.0001$) and 72 h ($H_3 = 30.86$ $P < 0.0001$) post-infection. Episodes of immobility were statistically different between groups at 72 h ($H_3 = 9.36$ $P = 0.0248$) post-infection (Figure 3B). Nymphs injected with 2×10^7 CFU/cockroach of *S. aureus* or saline (sham) showed an increase in locomotor activity when compared with not

injected nymphs (Figure 2A-B). The groups infected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach spent similar time in locomotion and immobility as the non-injected nymphs (Figure 2A-B).

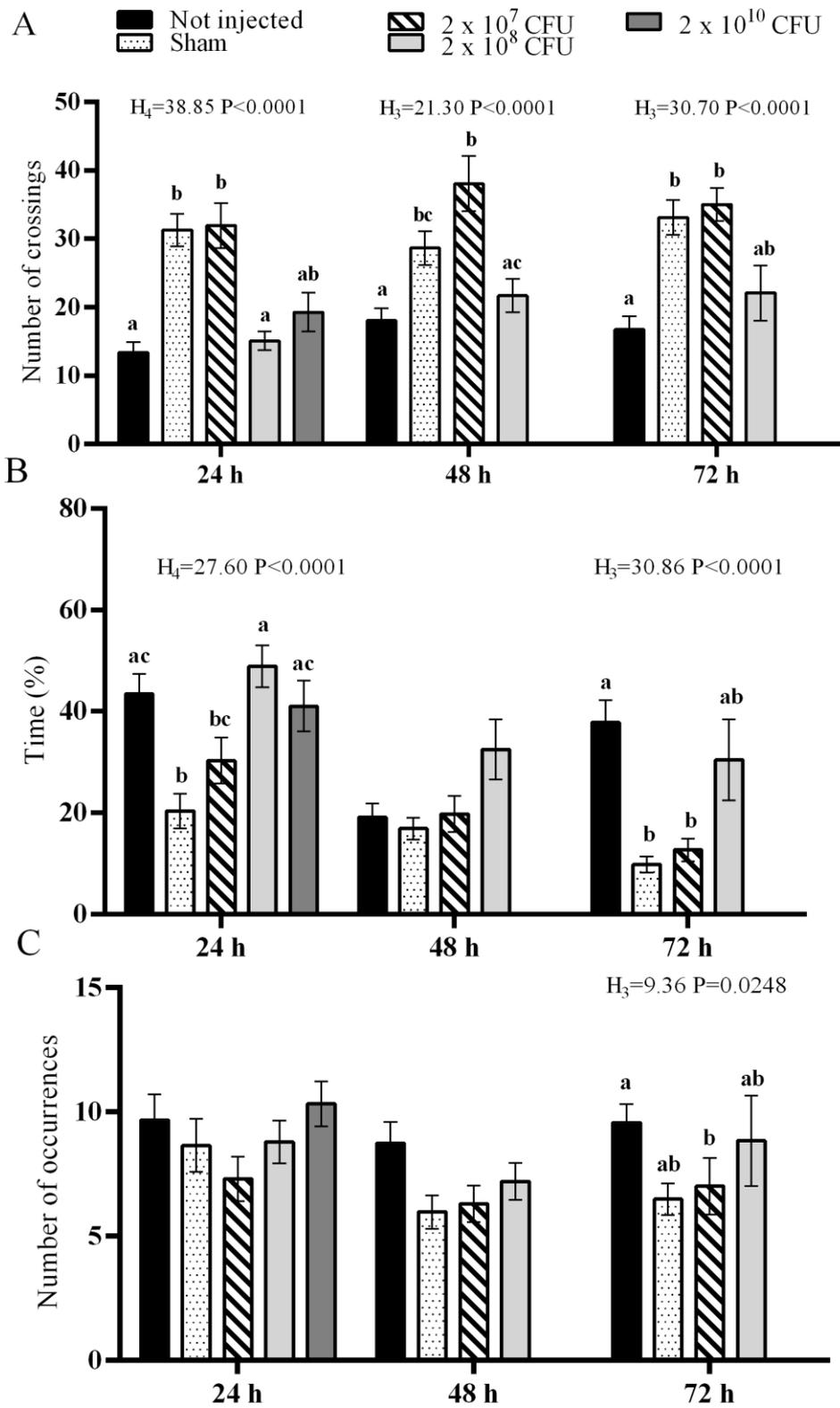


Figure 2. Locomotion of *N. cinerea* after injection with *S. aureus*. (A) Number of crossings between quadrants. (B) Immobile time (%). (C) Episodes of immobility. Results represent mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test (letters). Different letters mean statistical difference ($P < 0.05$). Not injected, sham and 2×10^7 CFU/cockroach at 24 h, 48 h and 72 h ($n = 30$ nymphs); bacterial solution 2×10^8 CFU at 24 h ($n=29$), 48 h ($n = 20$), and 72 h ($n = 12$); bacterial solution 2×10^{10} CFU at 24 h ($n = 29$).

3.3 Interaction between conspecifics

Aggregation behavior was significantly different between treatments 24 h ($H_4=62.17$ $P < 0.0001$), 48 h ($H_3=44.12$ $P < 0.0001$) and 72 h ($H_3=29.35$ $P < 0.0001$) post-infection. Decreased aggregation was observed in the groups injected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach 24 h post-infection and remained lower in the nymphs infected with 2×10^8 CFU/cockroach (Figure 3A). In contrast, the lower concentration of bacteria did not alter aggregation behavior. Kruskal-Wallis also revealed statistical difference between treatment when comparing frequency of contacts with conspecifics 24 h ($H_4=22.07$ $P=0.0002$), 48 h ($H_3=17.98$ $P=0.0004$) and 72 h ($H_3=25.69$ $P < 0.0001$) post-infection. Injected groups depicted an increase in the contact frequency (Figure 3B), which means that they had contact with the antennae and / or some part of the body of each other, however, the nymphs that received 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach avoided staying in contact for longer time (Figure 3A).

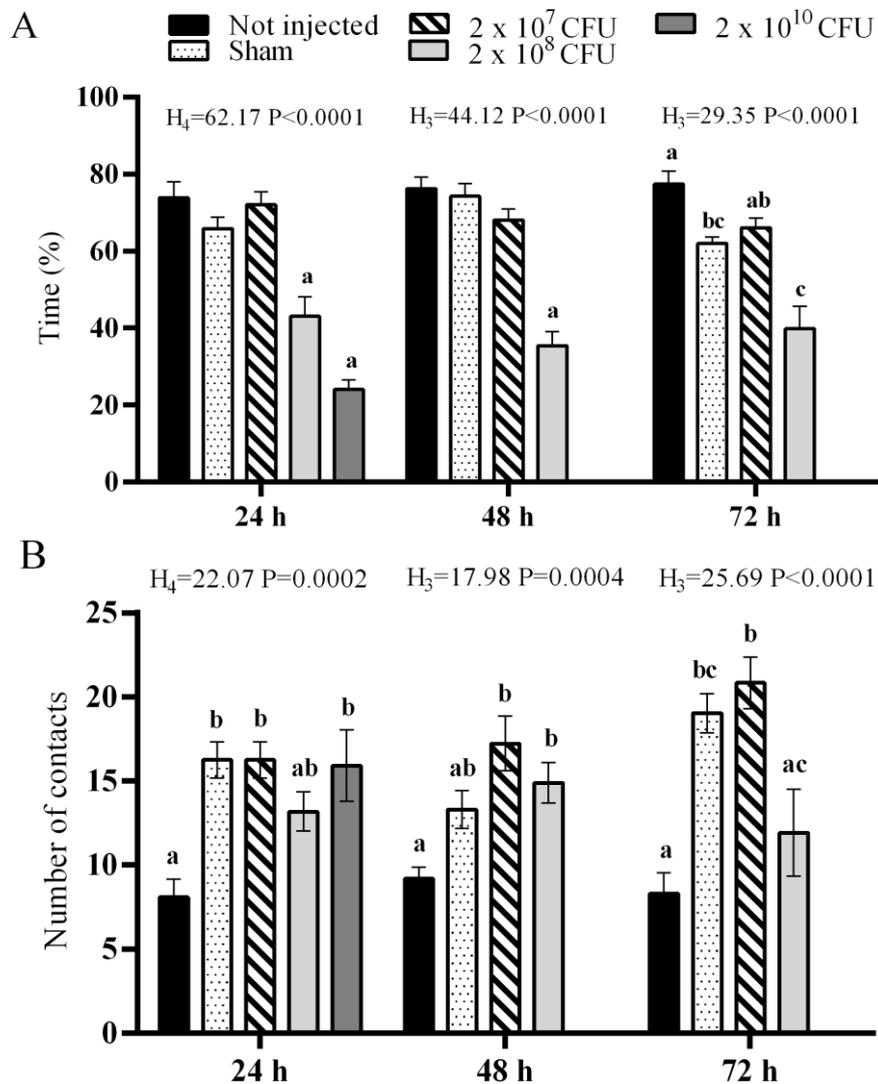


Figure 3. Interaction between conspecifics. (A) Aggregation behavior (%). (B) Frequency of contacts with the antennae and / or some part of the body with each other. Results represent mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test (letters). Different letters mean statistical difference ($P < 0.05$).

3.4 Grooming and time spent in the central area of the box

Grooming behavior was significantly different between treatments 24 h ($H_4=37.22$ $P<0.0001$), 48 h ($H_3=24.65$ $P<0.0001$) and 72 h ($H_3=11.05$ $P=0.0115$) post-infection. Nymphs injected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach had a significant decrease in grooming activity (Figure 4A). Kruskal-Wallis also revealed statistical difference between treatment when comparing time spent in the central area of the boxes at 24 h ($H_4=22.07$ $P=0.0002$) and 48 h ($H_3=21.76$ $P<0.0001$) post-injection. Nymphs injected with the highest concentration of bacteria (2×10^{10} CFU/cockroach) spent more time in the central area of the boxes at 24 h post-injection (Figure 4B). Frequency of entries into the central area was significantly different between treatments 24 h ($H_4=29.94$ $P<0.0001$), 48 h ($H_3=26.21$ $P<0.0001$) and 72 h ($H_3=23.93$ $P<0.0001$) post-infection. Nymphs injected with 2×10^7 CFU/cockroach or saline (sham) increased the number of entries into the central area at all times, when compare to intact nymphs (Figure 4C).

The distribution of control nymphs and those injected with 2×10^7 CFU/cockroach of *S. aureus* was predominantly in the periphery of the treatment boxes and were more aggregated (Figure 5). In contrast, the nymphs injected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach depicted a different pattern, they were sparsely distributed in the boxes, and avoided contact with each other. The mean percentage time of each nymph in the quadrants during the period of filming are demonstrated by heat maps in supplemental material (Supplementary Figures 2-6).

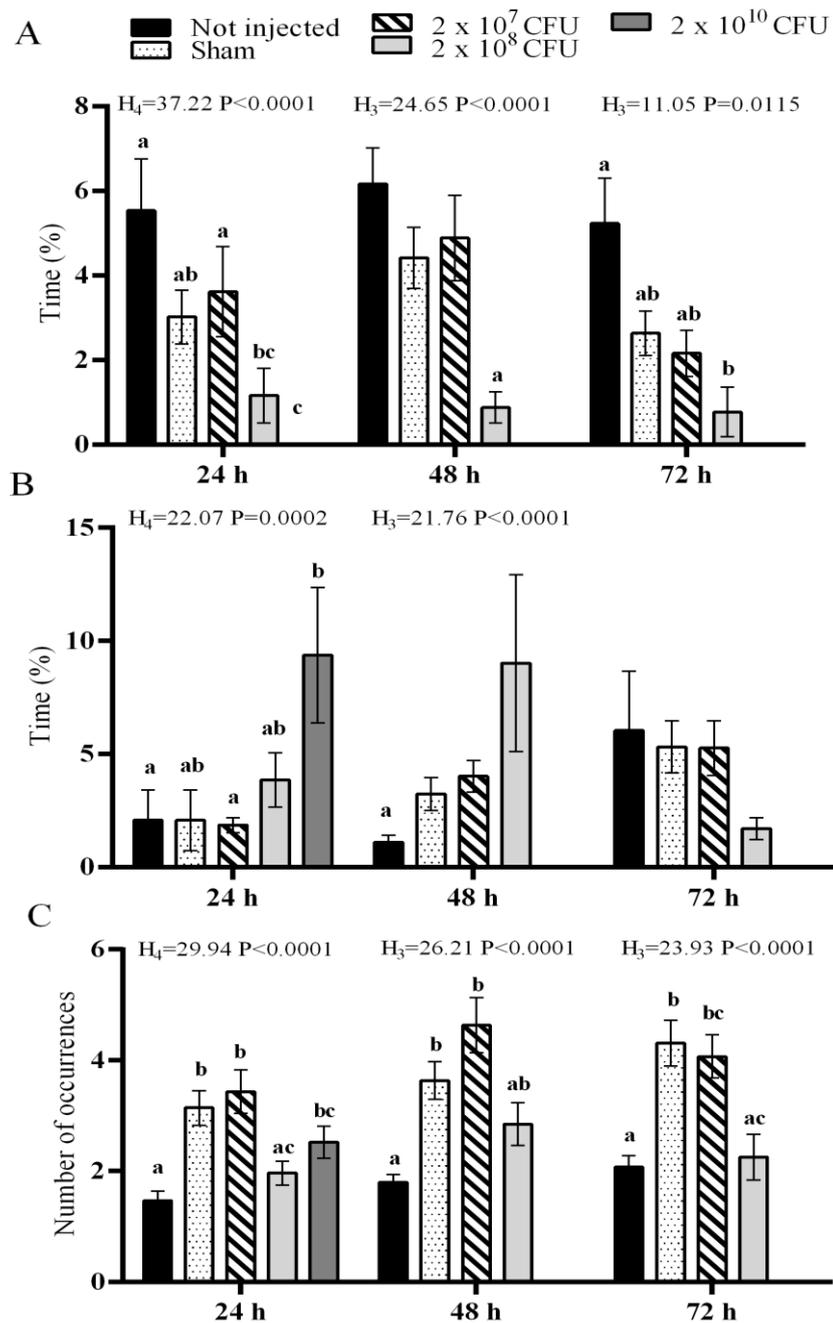


Figure 4. Cleaning and risk-taking behaviors of *N. cinerea* after infection with *S. aureus*. (A) Grooming (%). (B) Time spent in central area (%). (C) Number of entries into the central area. Results represent mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test (letters). Different letters mean statistical difference ($P<0.05$).

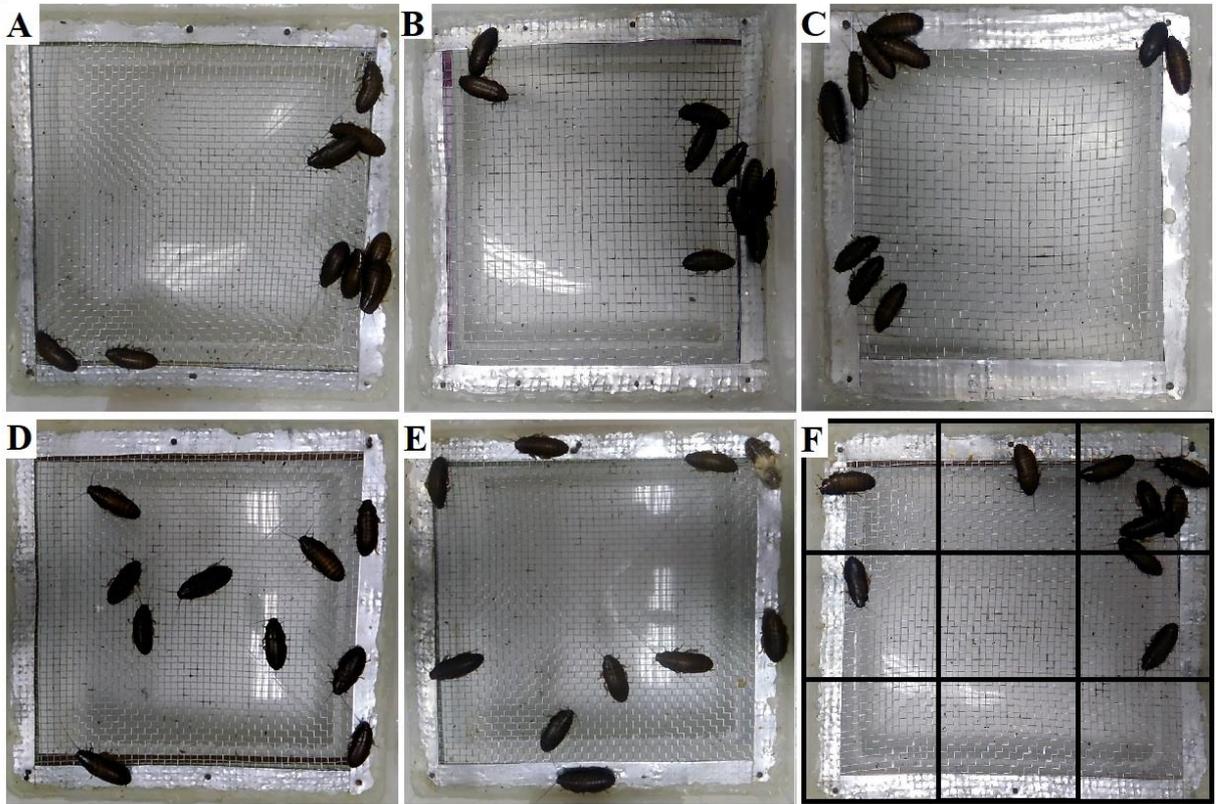


Figure 5. Typical pattern of distribution of individuals of *N. cinerea* nymphs observed after 24 h post-injection with *S. aureus*. The nymphs were kept in the same treatment boxes for filming. The images represent filming at 2 minutes. (A) Not injected, (B) Sham, (C) infected with 2×10^7 CFU/cockroach, (D) infected with 2×10^8 CFU/cockroach, (E) infected with 2×10^{10} CFU/cockroach, and (F) Computer maze over the box of sham group.

4. Discussion

The results obtained from the study after the infection of the nymphs with *S. aureus* partially corroborated the hypotheses proposed about sickness behaviors in mammals (Table 1). The energy conservation hypothesis states that a reduction in the general mammal activities is to maintain fever (Hart, 1990) (Dantzer, 2004) (Shakhar and Shakhar, 2015). Reduction in locomotion and exploratory behaviors induced by infection were not

observed in *N. cinerea* nymphs. Reduction in grooming and aggregation behaviors were the parameters that partially agreed with EC and RPT hypotheses in the groups infected with higher concentrations of *S. aureus* (2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach).

Here, we have worked with an ectotherm specie and the temperature in our experimental conditions was controlled ($22.9 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.0$ to $25.6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.5$), so fever could not be evaluated in *N. cinerea* nymphs. Thermoregulation behavior was observed in crickets (*Gryllus texensis*) (Adamo, 1998) and Madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) (Bronstein and Conner, 1984), that changed for hotter areas when infected. Furthermore, fever can also be generated by the interaction between conspecifics, as demonstrated by bees (*Apis mellifera*), which generated fever in the nest combs in response to inoculation of fungus (Starks et al., 2000). In this sense, the groups injected with 2×10^7 CFU of *S. aureus* maintained levels of aggregation similar to the controls and also demonstrated a significant increase in locomotor activity, which in the case of insects could be contributed to increase the body temperature.

The general motor activity of the two groups injected with the highest concentrations of bacteria (2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach) was similar to that of intact control nymphs. Similar to our results, bumblebees (*Bombus terrestris*) had no significant change in activity after LPS injection (Tyler et al., 2006). However, high immobile time in healthy cockroaches is usually associated with the increase in social interactions (Bell et al., 2007), as the intact nymphs exhibited a strong grouping tendency, which did not occurred in the infected nymphs.

Reduction of aggregation observed in the groups infected with higher concentrations of *S. aureus* (2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach) corroborate with the RPT hypothesis (Adamo, 2006)(Shakhar and Shakhar, 2015). In opposite, the lower concentration of *S. aureus* (2×10^7 CFU/cockroach) did not alter this parameter, and the number of contact with conspecifics increased in all injected groups. We suggest that the decrease in aggregation of nymphs infected with 2×10^8 and 2×10^{10} CFU/cockroach are associated with the decline in grooming activity, because the lack of this behavior was demonstrated to accumulate an excess of cuticular lipids on the antennae of cockroaches, and compromise their olfactory acuity for responsiveness to the environment (Zhukovskaya, 2014)(Bell et al.,

2007) (Lihoreau and Rivault, 2008) (Wada-Katsumata and Schal, 2019). Similar to our results, honey bees (*Apis mellifera*) injected with LPS reduced grooming and the interaction between conspecifics (Alaux et al., 2012) (Kazlauskas et al., 2016).

The suppression of grooming was also associated with a decrease in survival of *B. germanica*, as a consequence of the injury in the sensory organs, including the chemo- and mechano-receptors on the legs and mechano-, hygro-, and thermo-receptors on the antennae (Robinson, 1996). Similarly, we could observe that an increased mortality occurred in the groups that displayed lower grooming behavior (2×10^8 and 10^{10} CFU/cockroach) (Figure 1A). Furthermore, the mortality of new adults in these groups were similar to the results found in our previous work (Rossato et al., 2019).

Several neurotransmitters can modulate the expression of grooming, but dopamine is the main neurotransmitter involved in antennae grooming activity in insects (Mustard et al., 2010) (Libersat and Pflueger, 2004) (Zhukovskaya et al., 2013). Stressful conditions induced drastic changes in insect monoamine levels (octopamine, dopamine, and tyramine) and triggered alterations in behaviors (Libersat and Pflueger, 2004) (Zhukovskaya et al., 2013). The control of locomotion and the perception of sensory information of central and periphery stimuli of insects are strongly associated with the monoaminergic system (Leal et al., 2018) (dos Santos et al., 2019b) (dos Santos et al., 2019a). It is possible that *S. aureus* caused sepsis-associated stress responses, which impaired grooming and altered locomotion via disruption of monoamine levels.

Sham group demonstrated similar behaviors to the nymphs that received the lower concentration of bacteria (2×10^7 CFU), with an increase in locomotion, exploratory behaviors (Figure 2), no alteration in the interaction between conspecifics, grooming and shelter use, when compared to non-injected nymphs. We propose that the rupture of the exoskeleton of sham nymphs caused the exposure of hemolymph to a low level of infection and a weak activation of the immune response. Similar to our findings, sham treated crickets also displayed changes in behaviors, and infected crickets had no alteration in shelter use, but an increase in locomotor and in grooming activities (Sullivan et al., 2016).

Increased number of entries into the central area of the box by nymphs injected with 2×10^7 CFU/cockroach or saline (sham), when compared to intact nymphs (Figure 4C) is not in

agreement with PA hypothesis. In contrast to the increased risk-taking behavior, these groups spent more time aggregated in the periphery than in the central area (a phenomenon observed in intact nymphs; Figure 5 and Supplementary Figures 2-6). According to Adedara and colleagues (Adedara et al., 2015) (Adedara et al., 2016a) (Adedara et al., 2016b), healthy cockroaches usually establish a defensive and preservative behavior and/or home base formation. This phenomenon is also observed in several vertebrate models (rodents and fish), being possibly complex and phylogenetically innate fear-related reactions to avoid predators that could be in an unknown open, and potentially dangerous place (Adedara et al., 2015) (Adedara et al., 2016a) (Adedara et al., 2016b).

The increased risk-taking behavior was also observed in the nymphs infected with 2×10^{10} CFU/cockroach, which spent more time in the central area 24 h post-infection (which was also observed in the group 2×10^8 CFU, though not statistically different from the control groups; Figure 4B, 5D-E and Supplementary Figures 5-6). The increased risk-taking behavior can negatively influence insect orientation and may pose ecological consequences, for instance, exposing them to predators (Adedara et al., 2015) (Adedara et al., 2016a) (Adedara et al., 2016b). The increased time in the central area of the cage also refutes the PA hypothesis (Sullivan et al., 2016) (Shakhar and Shakhar, 2015) (Shakhar et al., 2016).

In summary, sickness-related behaviors of *N. cinerea* nymphs infected with *S. aureus* were different between treatments. Higher concentrations of bacteria or differential virulence expression of *S. aureus* may be caused the variability in the central nervous and the immune systems responses. Since the sickness behavior is an evolutionary strategy to protect hosts, they would increase following the pathogen's virulence increase (Shakhar, 2019) (Shakhar et al., 2016). Sickness-related behaviors in *N. cinerea* can not be explained in the view of mammals hypotheses. Immune challenge did not reduce the locomotor activity, exploratory behavior, and the risk-taking behaviors as predicted by EC and PA hypotheses. Immune challenge differently affected the aggregation and grooming, which partially agreed with RPT and EC.

Table 1: Energy conservation (EC), predator avoidance (PA), and avoidance of pathogen transmission (APT) hypotheses tested in *N. cinerea* nymphs based on sickness-related behaviors.

| Hypotheses | Comparison | 2×10^7 CFU | 2×10^8 CFU | 2×10^{10} CFU | Hypotheses supported? |
|---|--------------|------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Immune challenge reduces locomotion (immobile time) (EC) | Not injected | Increased | No change | No change | No |
| | Sham | No change | Decreased | Decreased | Partially |
| Immune challenge reduces exploratory behavior (number of crossings) (EC and APT) | Not injected | Increased | No change | No change | No |
| | Sham | No change | Decreased | No change | Partially |
| Immune challenge reduces interaction between conspecifics (time aggregated) (APT) | Not injected | No change | Decreased | Decreased | Partially |
| | Sham | No change | Decreased | Decreased | Partially |
| Immune challenge reduces contact with conspecifics (APT) | Not injected | Increased | No change | Increased | No |
| | Sham | No change | No change | No change | No |
| Immune challenge reduces grooming (grooming activity) (EC and APT) | Not injected | No change | Decreased | Decreased | Partially |
| | Sham | No change | No change | Decreased | Partially |
| Immune challenge increases shelter use (time in central area) (PA) | Not injected | No change | No change | Decreased | Partially |
| | Sham | No change | No change | No change | No |
| Immune challenge reduces risk-taking behavior (occurrences central area) (PA) | Not injected | Increased | No change | Increased | No |
| | Sham | No change | Decreased | No change | Partially |
| Immune challenge reduces escape speed (personal observation during manipulation) (PA) | Not injected | No change | Decreased | Decreased | Partially |
| | Sham | No change | Decreased | Decreased | Partially |

5. Conclusion

The sickness-related behaviors caused by *S. aureus* in *N. cinerea* partially corroborate with the mammal's hypotheses. The infection probably causes relevant alterations in the

chemistry of the insect nervous system and more studies are needed to better explore the underlying mechanisms. Determination of sickness-related behaviors in insects (cockroaches as utilized in our study) improves the knowledge of new candidates as alternative animals to study host-pathogen interactions. Nevertheless, challenges of studying sickness behavioral responses in cockroaches were evident, therefore the differences observed between cockroaches and mammals may indicate divergent strategies to combat an infection. These strategies are probably due to the specific immune systems and physiological characteristics of these organisms, mediated by evolutionary pressures imposed by pathogens.

Acknowledgments

This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil; CAPES-PROEX (23038.004173/2019- 93;0493/2019;88882.182126/2018-01); FINEP (CTINFRA); FAPERGSCAPES (082018 DOCFIX); FAPERGS-CNPQ (12/2014); PRONEX (16/ 255100044994); CNPQ (INCT 465671/20144).

References

- Adamo, S.A., 2008. Bidirectional Connections Between the Immune System and the Nervous System in Insects, in: Beckage, N.E. (Ed.), *Insect Immunology*. Elsevier Inc., pp. 129–149. <https://doi.org/10.1016/B978-012373976-6.50008-2>
- Adamo, S.A., 2006. Comparative psychoneuroimmunology: Evidence from the insects. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 5, 128–140. <https://doi.org/10.1177/1534582306289580>
- Adamo, S.A., 1998. The Specificity of Behavioral Fever in the Cricket *Acheta domesticus*. *J. Parasitol.* 84, 529–533.
- Adedara, I.A., Rosemberg, D.B., de Souza, D., Farombi, E.O., Aschner, M., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2016a. Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinerea* following dietary exposure to chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 130, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.12.004>
- Adedara, I.A., Rosemberg, D.B., Souza, D.O., Farombi, E.O., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2016b. Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.02.001>

- Adedara, I.A., Rosemberg, D.B., Souza, D.O., Kamdem, J.P., Farombi, E.O., Ashner, M., Rocha, J.B.T., 2015. Biochemical and behavioral deficits in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicol. Res. (Camb)*. 250, 699. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(47\)90733-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(47)90733-2)
- Adelman, J.S., Martin, L.B., 2009. Vertebrate sickness behaviors: Adaptive and integrated neuroendocrine immune responses. *Integr. Comp. Biol.* 49, 202–214. <https://doi.org/10.1093/icb/icp028>
- Afolabi, B.A., Adedara, I.A., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2018. Dietary co-exposure to methylmercury and monosodium glutamate disrupts cellular and behavioral responses in the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 64, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.09.003>
- Alaux, C., Kemper, N., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., 2012. Brain, physiological and behavioral modulation induced by immune stimulation in honeybees (*Apis mellifera*): A potential mediator of social immunity? *Brain. Behav. Immun.* 26, 1057–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.04.004>
- Aubert, A., Richard, F.J., 2008. Social management of LPS-induced inflammation in *Formica polyctena* ants. *Brain. Behav. Immun.* 22, 833–837. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.01.010>
- Bell, W.J., Roth, L.M., Nalepa, C.A., Wilson, E.O., 2007. *Cockroaches - Ecology, Behavior, and Natural History*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Bouchebti, S., Durier, V., Pasquaretta, C., Rivault, C., Lihoreau, M., 2016. Subsocial Cockroaches *nauphoeta cinerea* mate indiscriminately with kin despite high costs of inbreeding. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162548>
- Bronstein, S.M., Conner, W.E., 1984. Endotoxin-induced behavioural fever in the Madagascar cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *J. Insect Physiol.* 30, 327–330. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(84\)90134-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(84)90134-3)
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- da Silva, C.S., Lima, R.C.G., Elekofehinti, O., Ogunbolude, Y., Duarte, E.A., Rocha, J.B.T., Menezes, I.R.A., Barros, L.M., Tsopmo, A., Lukong, K.E., Kamdem, P.J., 2018. Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Chem. Biol. Interact.* 282, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.011>
- Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.040>
- Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain. Behav. Immun.* 15, 7–24. <https://doi.org/10.1006/brbi.2000.0613>

- Davis, H.E., Meconcelli, S., Radek, R., McMahon, D.P., 2018. Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection. *Sci. Rep.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32721-7>
- dos Santos, D.S., Rosa, M.E., Zanatta, A.P., Oliveira, R.S., Almeida, C.G.M., Pinto, P.L., Sanz, M., Fernandes, K.A., Souza, V.Q., Assis, D.R., Pinto, E., Dal Belo, C.A., 2019a. Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches.
- dos Santos, D.S., Zanatta, A.P., Martinelli, A.H.S., Rosa, M.E., Oliveira, R.S., Pinto, P.M., Peigneur, S., Tytgat, J., Orchard, I., Lange, A.B., Carlini, C.R., Dal Belo, C.A., 2019b. Jaburetox, a natural insecticide derived from Jack Bean Urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior.
- Gellman, M.D., Turner, J.R., 2013. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*, Encyclopedia of Behavioral Medicine. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6439-6>
- Hart, B.L., 1990. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 273–294. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80038-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80038-7)
- Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–127. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(88\)80004-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(88)80004-6)
- Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Nakamura, Y., Noda, H., Imamura, K., Mita, K., Sekimizu, K., 2010. Insect cytokine Paralytic Peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 285, 28635–28642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138446>
- Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Sekimizu, K., 2008. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 2185–2191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705480200>
- Ishii, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., 2015. Paralytic peptide: an insect cytokine that mediates innate immunity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 88, 18–30. <https://doi.org/10.1002/arch.21215>
- Ishii, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., 2014. Establishment of a bacterial infection model using the European honeybee, *Apis mellifera* L. *PLoS One* 9, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089917>
- Kazlauskas, N., Klappenbach, M., Depino, A.M., Locatelli, F.F., 2016. Sickness Behavior in Honey Bees. *Front. Physiol.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00261>
- Leal, A.P., Oliveira, R.S., Perin, A.P.A., Borges, B.T., Vieira, P.B., Santos, T.G., Vinadé, L., Valsecchi, C., Dal Belo, C.A., 2018. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 148, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.016>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal

- response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Libersat, F., Pflueger, H.J., 2004. Monoamines and the Orchestration of Behavior. *Bioscience* 54, 17. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0017:matoob\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0017:matoob]2.0.co;2)
- Lihoreau, M., Rivault, C., 2008. Tactile stimuli trigger group effects in cockroach aggregations. *Anim. Behav.* 75, 1965–1972. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.12.006>
- Mustard, J.A., Pham, P.M., Smith, B.H., 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 56, 422–430.
- Myllymäki, H., Rämet, M., 2014. JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scand. J. Immunol.* 79, 377–385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
- Robinson, W.H., 1996. Antennal Grooming and Movement Behaviour in the German Cockroach, *Blattella Germanica* (L.). *Proc. Second Int. Conf. Urban Pests* 361–369.
- Roeder, T., 2005. TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 447–477. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130404>
- Rossato, J., Moresco, T., Uczay, J., Rocha, J.B., 2019. *Staphylococcus aureus* -induced sepsis in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 66. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101343>
- Salzet, M., 2000. Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res. Rev.* 34, 69–79. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00041-2)
- Salzet, M., Vieau, D., Day, R., 2000. Crosstalk between nervous and immune systems through the animal kingdom: Focus on opioids. *Trends Neurosci.* 23, 550–555. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01642-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01642-8)
- Shakhar, K., 2019. The inclusive behavioral immune system. *Front. Psychol.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.01004>
- Shakhar, K., Shakhar, G., 2015. Why Do We Feel Sick When Infected—Can Altruism Play a Role? *PLoS Biol.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002276>
- Siva-Jothy, J.A., Vale, P.F., 2019. Viral infection causes sex-specific changes in fruit fly social aggregation behaviour. *Biol. Lett.* 15. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0344>
- Starks, P.T., Blackie, C.A., Thomas D Seeley, P.T., 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87, 229–231. <https://doi.org/10.1007/s001140050709>
- Sullivan, K., Fairn, E., Adamo, S.A., 2016. Sickness behaviour in the cricket *Gryllus texensis*: Comparison with animals across phyla. *Behav. Processes* 128, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.05.004>
- Taub, D., 2008. Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunol.* 252, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.05.006>

- Tejada, J., Chaim, K.T., Morato, S., 2017. X-PloRat: A software for scoring animal behavior in enclosed spaces. *Psicol. Teor. e Pesqui.* 33, 1–4. <https://doi.org/10.1590/0102.3772e3322>
- Tizard, I., 2008. Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Anim. Heal. Res. Rev.* 9, 87–99. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001448>
- Tyler, E.R., Adams, S., Mallon, E.B., 2006. An immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* leads to increased food consumption. *BMC Physiol.* 6, 4–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-6-6>
- Vanha-aho, L.M., Valanne, S., Rämet, M., 2016. Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunol. Lett.* 170, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.12.005>
- Wada-Katsumata, A., Schal, C., 2019. Antennal grooming facilitates courtship performance in a group-living insect, the German cockroach *Blattella germanica*. *Sci. Rep.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39868-x>
- Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., Forschler, B., 2013. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects* 4, 609–630. <https://doi.org/10.3390/insects4040609>
- Zhukovskaya, M.I., 2014. Grooming behavior in American cockroach is affected by novelty and odor. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/329514>

Highlights

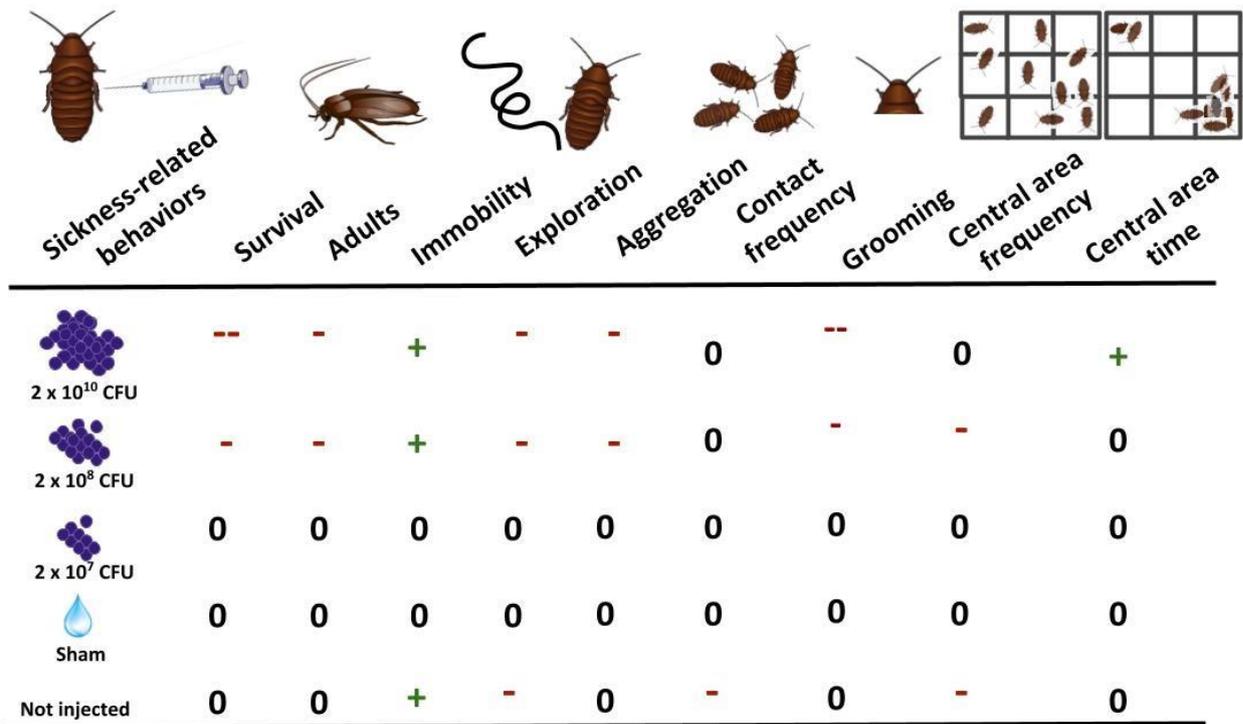
Immune challenges differently affected the sickness-related behaviors in *N. cinerea* nymphs.

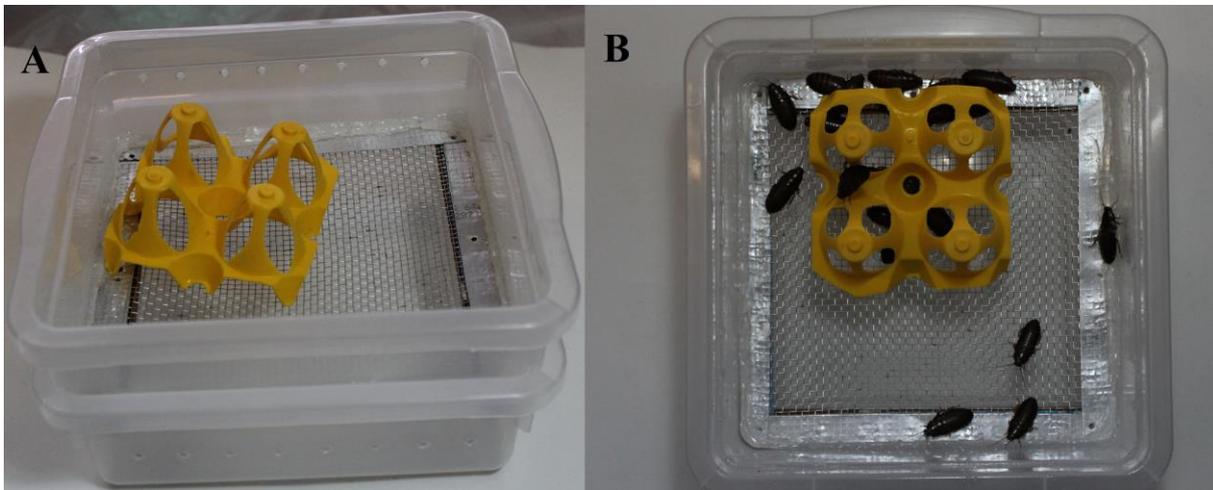
The infection did not reduce the locomotor activity, exploratory, and risk-taking behaviors.

Higher concentrations of bacteria decreased grooming and aggregation behaviors.

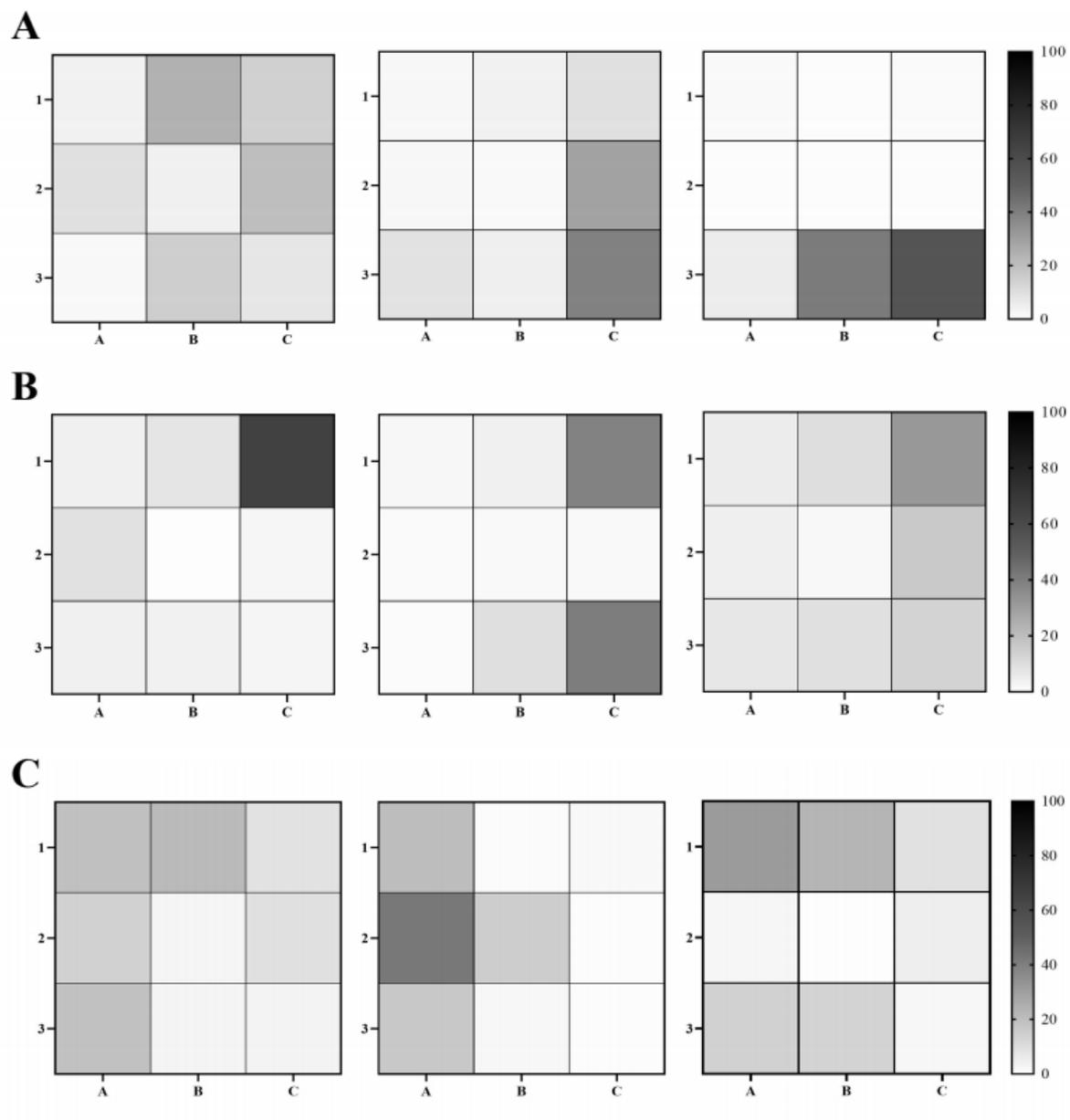
Sickness-related behaviors in *N. cinerea* partially agreed with mammals' hypotheses.

Graphical Abstracts

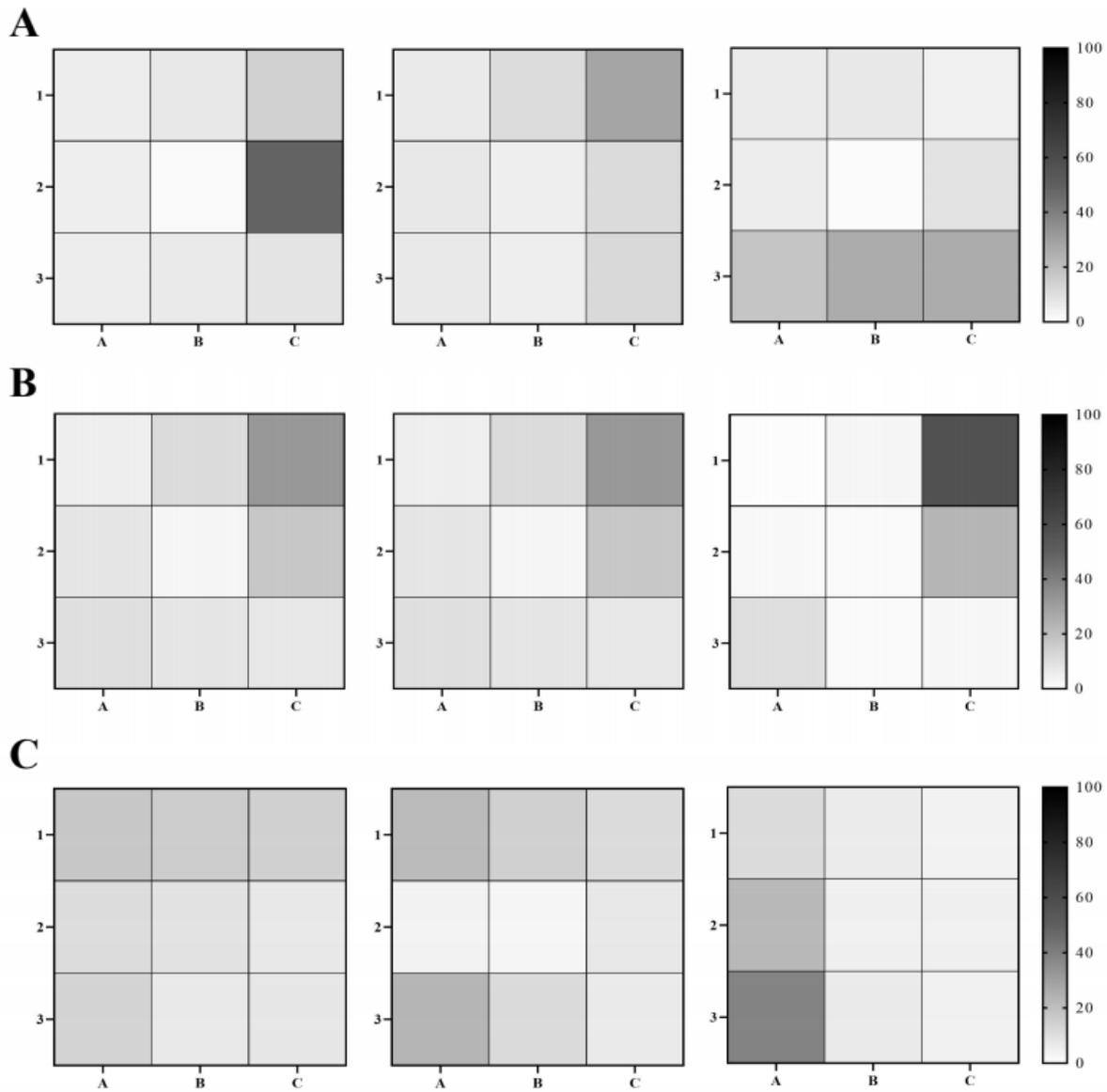


Supplementary material

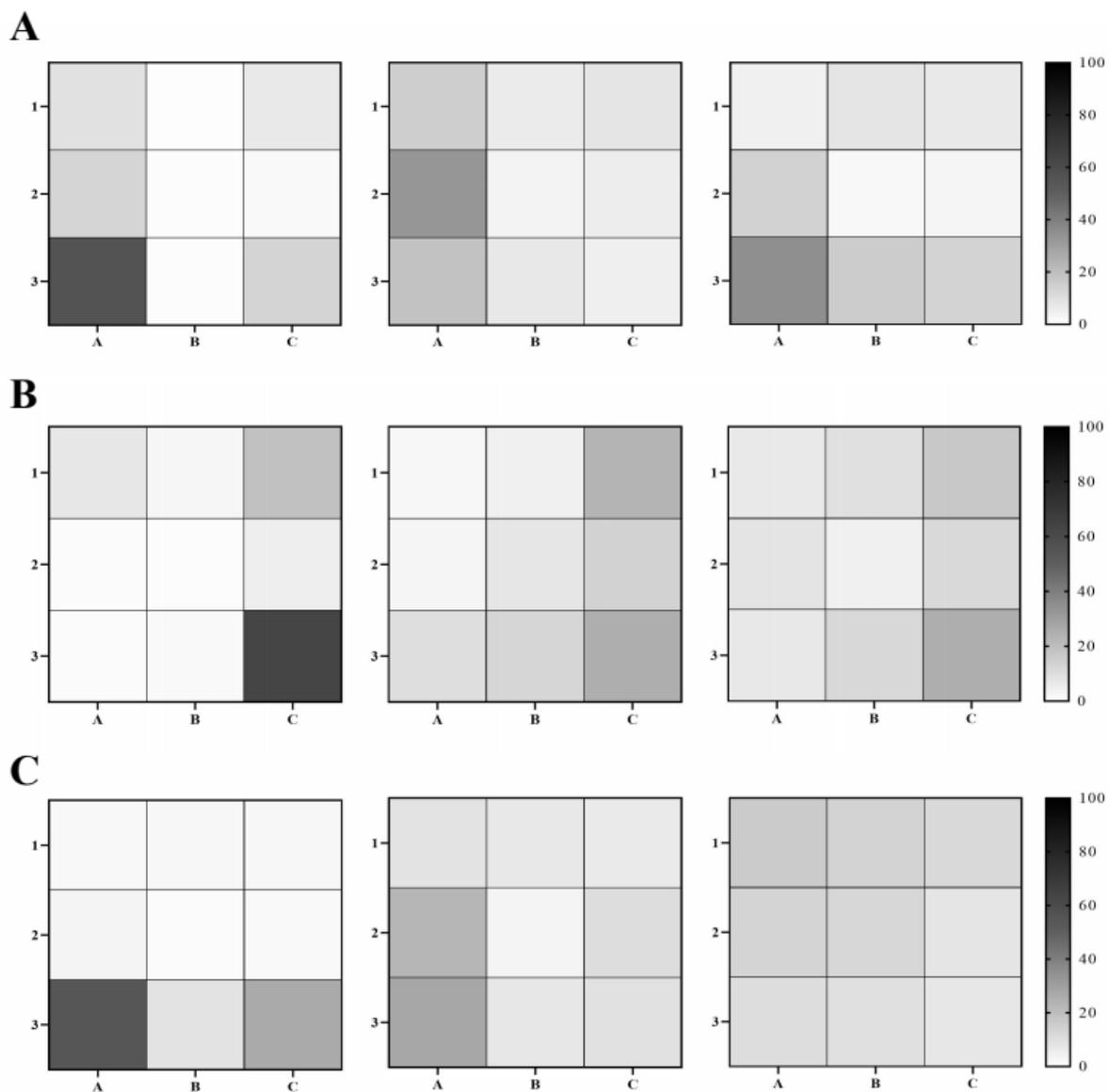
Supplementary Figure 1: Home boxes (sizes 19 x 19 x7 cm) with small holes to facilitate air exchange (A), and containing a yellow plastic part from an egg-holder. The distribution of nymphs inside the box (B).



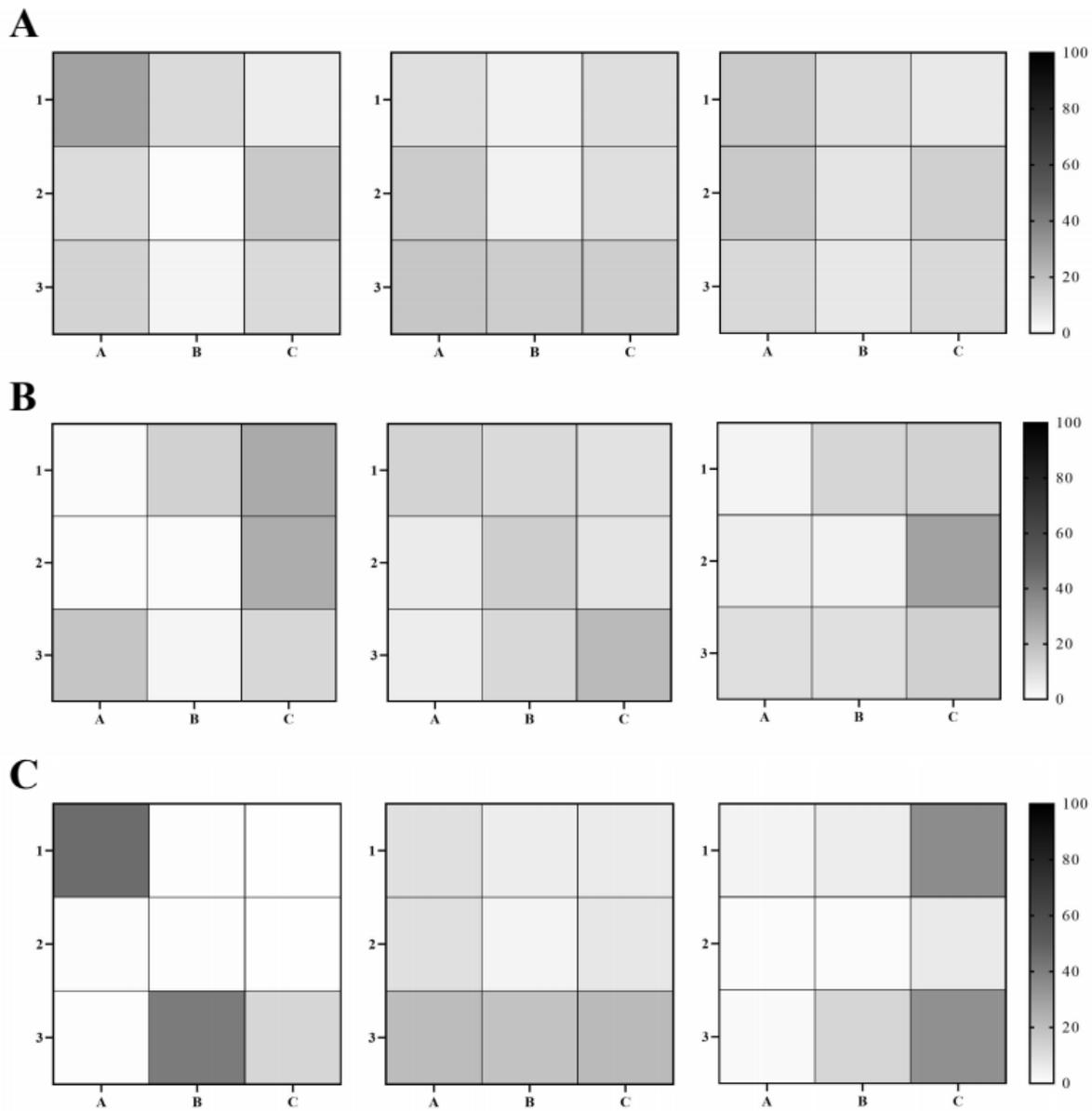
Supplementary Figure 2: Heat map of not injected nymphs. Average time (%) of nymphs in each quadrant (three replicates) after 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C) of infection.



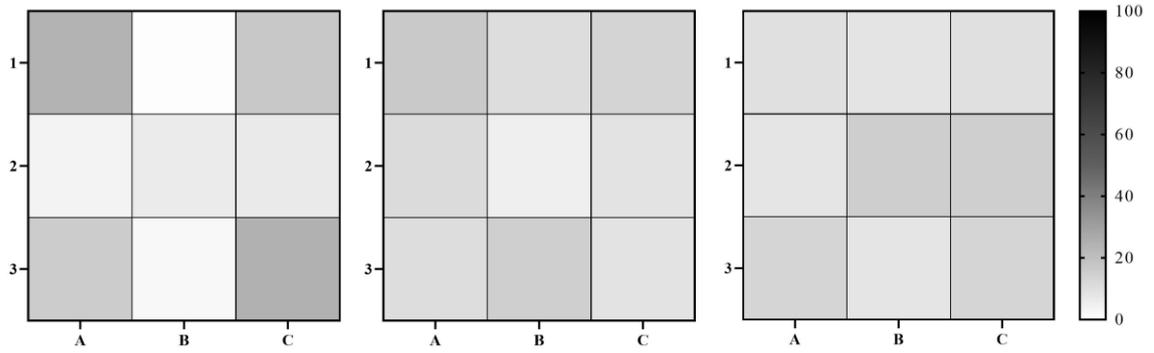
Supplementary Figure 3: Heat map of sham nymphs. Average time (%) of nymphs in each quadrant (three replicates) after 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C) of infection.



Supplementary Figure 4: Heat map of nymphs injected with 2×10^7 CFU/cockroach. Average time (%) of nymphs in each quadrant (three replicates) after 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C) of infection.



Supplementary Figure 5: Heat map of nymphs injected with 2×10^8 CFU/cockroach. Average time (%) of nymphs in each quadrant (three replicates) after 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C) of infection.



Supplementary figure 6: Heat map of nymphs injected with 2×10^{10} CFU/cockroach. Average time (%) of nymphs in each quadrant (three replicates) after 24 h of infection.

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da enzima fenoxidase na hemolinfa de *N. cinera* após inoculação de *S. aureus*.
- Comparar dados moleculares de *N. cinerea* e outros insetos.

Evolutionary conservation of phenoloxidase and its participation in the innate immunity of the cockroach *Nauphoeta cinerea*

Juliana Marzari Rossato^A, Terimar Ruoso Moresco^B, Bruna Candia Piccoli^A, Olawande Olagoke^A, João Batista Teixeira da Rocha^A

^A Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. julianamrossato@gmail.com; bruna_piccoli@hotmail.com; olagokeco@gmail.com; jbtrocha@yahoo.com.br;

^B Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria 98300-000, Palmeira das Missões, RS, Brazil. terimarm@gmail.com;

Abstract

Insect immunity involves several responses against infections, including the activity of phenoloxidase. We have previously demonstrated the induction of sepsis in *Nauphoeta cinerea*. In this study, we used the available transcriptome of the Lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* and identified the phenoloxidase (PO) amino acid sequence, named it NcPO. We further highlighted the evolutionarily conserved copper binding site in an alignment with phenoloxidases from other insects within the Neoptera infra-class and reconstructed the phylogenetic relationship. We then determined the relative expression of PO and serine protease in the head and fat body, and investigated the participation of PO in the immune response of *Nauphoeta cinerea* nymphs upon *S. aureus* infection by measuring the temporal variation of PO activity. The NcPO sequence is 694 amino acids long and shares 85.16%, 78.53%, 78.35% and 77.09% identity with the PO sequences of *Blattella germanica*, *Coptotermes formosanus*, *Zootermopsis nevadensis* and *Cryptotermes secundus* respectively. The copper B binding site histidines are conserved in the NcPO sequence and they align with the copper B binding site of other insect sequences. The relative expression results showed

that PO and serine proteases are more expressed in head than the fat body of *N. cinerea* nymphs. PO activity had no difference in the acute phase of infection, but was strongly inhibited after 24 h, and priming did not enhance the PO activity. Our results present *N. cinerea* as a good alternative model to study host-parasite interactions.

Keywords: Immune response; Infection; Hemolymph; Fat body; *Staphylococcus aureus*; Phylogeny; Insect

1. INTRODUCTION

Phenoloxidase (PO) is largely recognized as an enzyme involved in a key humoral factor of insects, the melanization process (Cerenius et al., 2008; Binggeli et al., 2014). PO participates in melanin biosynthesis, through the catalysis of monophenol (tyrosine or tyramine) hydroxylation, oxidation of o-diphenol (catechol substrates), and dehydrogenation of dihydroxyindole (Aguilera et al., 2013). The oxidation of catecholamines by PO produces reactive quinone compounds, which are chemical unstable becoming cytotoxic for pathogens (Ashida et al., 1983; Ayres and Schneider, 2012). Further, PO-induced melanization reaction involves melanin deposition to hardening the coagulates and the nodulation/encapsulation responses, avoiding the spread of microbial infection (Mavrouli et al., 2005; Cerenius et al., 2008; Binggeli et al., 2014). However, the activity of PO against intruders varies between organisms (Adamo, 2004).

PO is synthesized as inactive prophenoloxidase (proPO), which is proteolytic cleavage by serine proteases upon the recognition of microbial components and host molecular patterns (Ashida et al., 1983; Cerenius et al., 2008; Dubovskiy et al., 2016). Several studies have evaluated PO activity in insects after the infection with live or dead bacteria, fungi, protozoa, nematodes, apicomplexa, acanthocephalan and isolated pathogen molecules like phthalic acid (Stoltz and Cook, 1983; Plaistow et al., 2003; Moret and Siva-Jothy, 2003; Gomes et al., 2003; Leclerc et al., 2006; Eleftherianos et al., 2006; Eleftherianos et al., 2007; Eleftherianos et al., 2009; Abdel-Razek and Mohamed, 2007; Haine et al., 2008; Bidla et al., 2009; Povey et al., 2009; Shaban et al., 2010; Kryukova et al., 2011; Crawford et al., 2012; Ullah et al., 2014;

Reddy A, Harinatha and Venkatappa, 2016; Sadekuzzaman et al., 2017; Dhinaut et al., 2018). However, a positive relationship between PO activity and successful pathogen defense remains controversial (González-santoyo and Córdoba-aguilar, 2012).

The cockroach *Nauphoeta cinerea* has been used to investigate sepsis (Rossato et al., 2019) and the response of biological systems to xenobiotic exposure (Afolabi et al., 2020; Piccoli et al., 2019), making it a viable experimental organism for accessing immune response to bacterial infections. The characterization of the PO active site has been well documented in several metazoan organisms (Aguilera et al., 2013), but there is the crucial need to fulfil the 3R's principle and improve our understanding of the innate immune system using big insects like *N. cinerea*.

We herein use multiple sequence alignment to characterize the *N. cinerea* PO and show its active site while inferring evolutionary conservation of POs across the Neoptera infra-class, using the published transcriptome (Segatto et al., 2018). Also, we assessed the relative expression of PO and serine proteases in head and fat body. We further investigated the participation of PO in the immune response of *N. cinerea* nymphs upon *S. aureus* infection by measuring the temporal variation of PO activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Identification of *Nauphoeta cinerea* phenoloxidase, multiple sequence alignment and phylogenetic analysis.

We identified the transcript for NcPO from the available transcriptome (accession numbers SRX1797073 – head; SRX1797270 – fat body) by blasting known Blattodea phenoloxidase sequences from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) against the transcriptome (Segatto et al., 2018). We then confirmed the resulting sequence on the NCBI Blast platform (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phenoloxidase amino acid sequences of other insects representing broad varieties of the insect Neoptera infra-class were downloaded from UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) and NCBI. Amino acid sequences were aligned by MUSCLE (Edgar, 2004) and BMGE (Criscuolo and Gribaldo, 2010) using default parameters. MEGA X (Kumar et al., 2018) was used to reconstruct the evolutionary

history of aligned insect PO sequences by maximum likelihood method and the JTT matrix-based model with 100 bootstrap replications. Evolutionary distance was computed by Poisson correction method and the pairwise deletion option was used for ambiguous positions (Figure S1).

2.2 Relative expression

For relative expression analysis, we used the *N. cinerea* amino acid sequences of interest as references for a tBLASTn search of the reads of *N. cinerea* head and fat body transcriptomes available in the NCBI (under accession numbers SRX1797073 – head; SRX1797270 – fat body). The number of mapped nucleotides was divided by the number of CDS nucleotides and by the total number of nucleotides sequenced in the transcriptome. The data were expressed as Reads per Kilobase Million (RPKM).

2.3 Cockroach husbandry

Last instar nymphs of the lobster cockroach *N. cinerea* were used in this study. We randomly selected nymphs measuring between 2 and 2.5 cm from insect vivarium. The nymphs were raised at Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), at Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. Selected nymphs were transferred to small plastic boxes (19 x 19 x 7 cm), containing a plastic part from an egg-holder (Figure S2). The bottom of the box was replaced by wire mesh to avoid the accumulation of feces. A second plastic box was placed below to collect the feces. Experimental cockroaches were acclimatized in the new environment for two days in groups of 20 – 30 nymphs. Test and control nymphs were maintained under controlled temperature (25 – 30 °C), humidity (50 – 70%), 12:12 lighting/darkening conditions, and water and food *ad libitum*.

2.4 Bacterial preparation

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (ATCC® 25923™; USA) were grown overnight on Brain Heart Infusion (BHI) broth (calf brain infusion 200 g/L, beef heart infusion 250 g/L, peptone 10 g/L, dextrose 2 g/L, sodium chloride 5 g/L, disodium phosphate 2.5 g/L; Himedia Laboratories, India). Cultures were centrifuged for 10 min at 4,000 rpm and washed with 1% sterile saline, three times. Aliquots were stored at -20 °C with 10% glycerol. Before each test, an aliquot was washed with saline and diluted to obtain the bacterial suspensions, which were determined by measuring optical density at 600 nm (OD₆₀₀). The bacterial suspensions were diluted with 1% saline to give adequate bacteria concentrations.

2.5 Injection

The cockroaches were anesthetized on ice for about 6 – 10 min before injection of 20 µL of saline (sham group) or *S. aureus* suspensions (with 1 mL syringe; Shandong Weigao Group Medical Polymer CO, China). Nymphs were cleaned with distilled water and the injection was applied at the base of the leg, in the second thoracic segment, close to the junction of the ventral and dorsal cuticles (Figure S3A).

2.6 Acute infection assay

Nymphs were injected with 2×10^7 CFU/cockroach (n = 90 nymphs), or a diluted solution of the first (2×10^4 cfu/cockroach) (n = 70 nymphs). Control was injected with 1% saline (sham) (n = 90 nymphs), and an additional control group was not injected (n = 40 nymphs). After 15 min, 1, 2, and 4 h post-injection, nymphs were euthanized on ice and hemolymph was collected. The experiments were repeated three independent times. We observed the survival of infected nymphs one week after infection and the number of molts.

2.7 Priming assay

In the first week, it was injected 2×10^7 CFU/cockroach (n = 160), 2×10^{10} CFU/cockroach (n = 40), saline (sham) (n = 160) or maintained intact (not injected) (n = 200). We collected the hemolymph of treated nymphs 24 h post-injection. The replicates at each of

these treatments (n = 6) represent a pool of tissues from six nymphs, that were euthanized before hemolymph collection to measure PO activity.

One week later of priming dose, we applied a second injection with the same or the other treatments, according to Figure S3B. Following the procedures explained before, we collected the hemolymph of treated nymphs 24 h post-injection. The replicates at each of these treatments (n = 6) represent a pool of tissues from six nymphs, that were euthanized before hemolymph collection to measure PO activity. Each experimental procedure consisted of two independent replicated.

2.8 Colony forming unit

We also evaluated the colony forming unit (CFU) in the injected nymphs after 15 min, 1, 2 and 4 h post-infection. The hemolymph (10 μ L) was serially diluted in sterile saline 1 % and spread (0.1 mL) in Nutrient Agar (Himedia, China) Petri dishes. After overnight incubation, at 37 °C, the colonies were counted and *S. aureus* was confirmed with Gram staining. The results are expressed in CFU/mL.

2.9 Sample preparation

Hemolymph was placed in a microtube and immediately stored at -20 °C for no more than three days. We defrost the hemolymph and homogenized in a potter-like tool, then centrifuged at 2.000 rpm for 2 min. The supernatant was used to evaluate the PO activity. The total protein was determined using NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher).

2.10 Phenoloxidase assay

To measure the spontaneous activation of PO, the samples (15 μ L) were incubated with 50 μ L Tris-HCl buffer (0.1 M) and 65 μ L distilled water, at 30 °C for 30 min, into a 96-well plate, then 70 μ L of 6.25 mM L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma) was added as substrate. To estimate the total amount of enzyme present in the same samples (total PO), we

used α -chymotrypsin (Sigma) to chemically activated proPO. The samples were diluted with distilled water (1:10) and incubated with 50 μ L Tris-HCl buffer (0.1 M), 25 μ L distilled water and 40 μ L chymotrypsin (1 mg/mL), in the same conditions followed before, then 70 μ L of 6.25 mM L-DOPA was added as substrate. PO was measured using a spectrophotometer (BioRad iMark™) at 490 nm, during 2 h. The specific activity of PO was expressed as units formed in each hour per mg of protein (unit/h/mg).

2.11 Statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software). Percent survival was plotted in Kaplan-Meier curve and analyzed using Log-rank test for trend. Fisher's exact probability test was applied to compare the percentages of adults. Data were tested for normal distribution using D'Agostino-Pearson, and the Two-Way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test were applied to analyze PO activity (15 min, 1 h, 2 h, and 4 h post-infection). In case of not following normal distribution, we applied the Kruskal-Wallis, followed by Dunn's *post-hoc* test to analyze PO activity (24 h post-infection), and CFU. In all cases, P-value ≤ 0.05 was considered significant. The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. RESULTS

3.1 Sequence comparison and phylogenetic analysis of *Nauphoeta cinerea* phenoloxidase

The NcPO sequence is 694 amino acids long and shares 85.16%, 78.53%, 78.35% and 77.09% identity with the PO sequences of *Blattella germanica*, *Coptotermes formosanus*, *Zootermopsis nevadensis* and *Cryptotermes secundus* respectively. The copper B binding site histidines are conserved in the NcPO sequence and they align with the copper B binding site of other insect sequences (Figure 1).

The phylogenetic comparison of PO sequences across the insect Neoptera infra-class showed distinct clusters as sequences of insects in the same order (differentiated by colors) were identical and formed monophyletic groups including; Blattodea, Hemiptera,

Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera and Thysanoptera. The *N. cinerea* PO sequence was in the Blattodea clade alongside *B. germanica*, *C. secundus*, *C. formosanus* and *Z. nevadensis* (Figure 2).

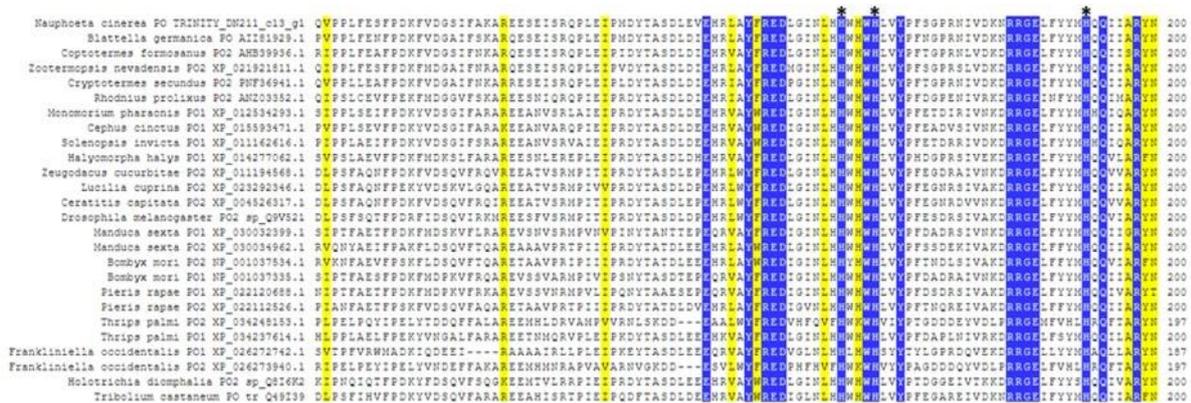


Figure 1: Putative active site and phylogenetic analysis of Insect phenoloxidase (PO). A. Comparison of CuB sequences of *Nauphoeta cinerea* PO with other insects. Copper-binding site are represented by active histidine residues highlighted with ``*``.

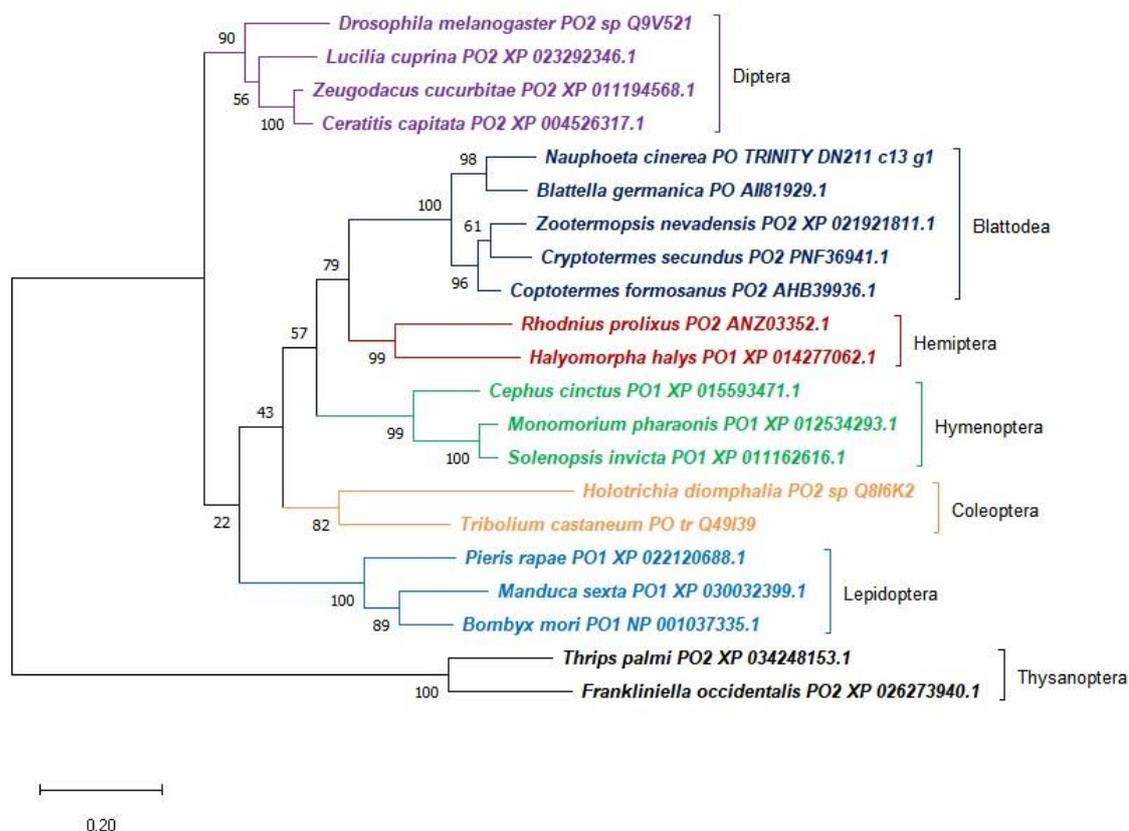


Figure 2: Evolutionary conservation of phenoloxidases between *Nauphoeta cinerea* and other insects. The phylogenetic tree is inferred by maximum likelihood method with the JTT matrix-based model and tested with 1000 bootstrap replications.

3.2 Relative expression

To evaluate basal transcription levels of the gene encoding PO and other related proteins, PO activation factor and melanization protease (Figure 3), we use the available head and fat body transcriptomes. The basal relative expression of the three genes in the *N. cinerea* head is similar to each other and higher than that observed in fat body. However, in the fat body basal relative expression is quite varied, with melanization protease having the highest transcription levels followed by PO, and PO activation factor.

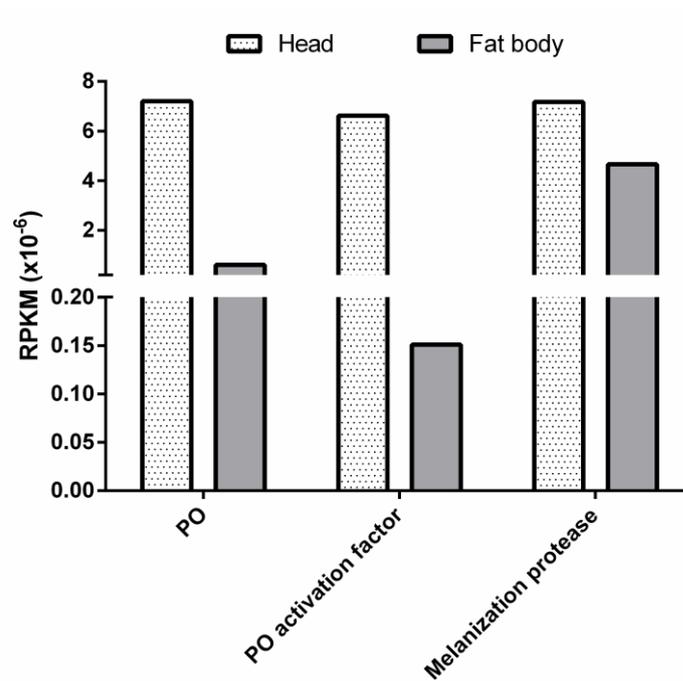


Figure 3: Relative expression of *Nauphoeta cinerea* phenoloxidase (PO), PO activation factor, and melanisation protease coding genes in the head and fat body.

3.3 Survival

Nymphs of *N. cinerea* injected with 2×10^7 CFU had a significant decrease in survival after 168 h post-injection (Figure 4A). During survival observation, some nymphs molted to adults. The number of adults 24 h post-injection were lower in the nymphs infected with 2×10^4 cfu/cockroach when compared to control groups (Figure 4B). After 168 h post-injection, the number of adults were significant lower in the group injected with 2×10^7 CFU group (Figure 4C).

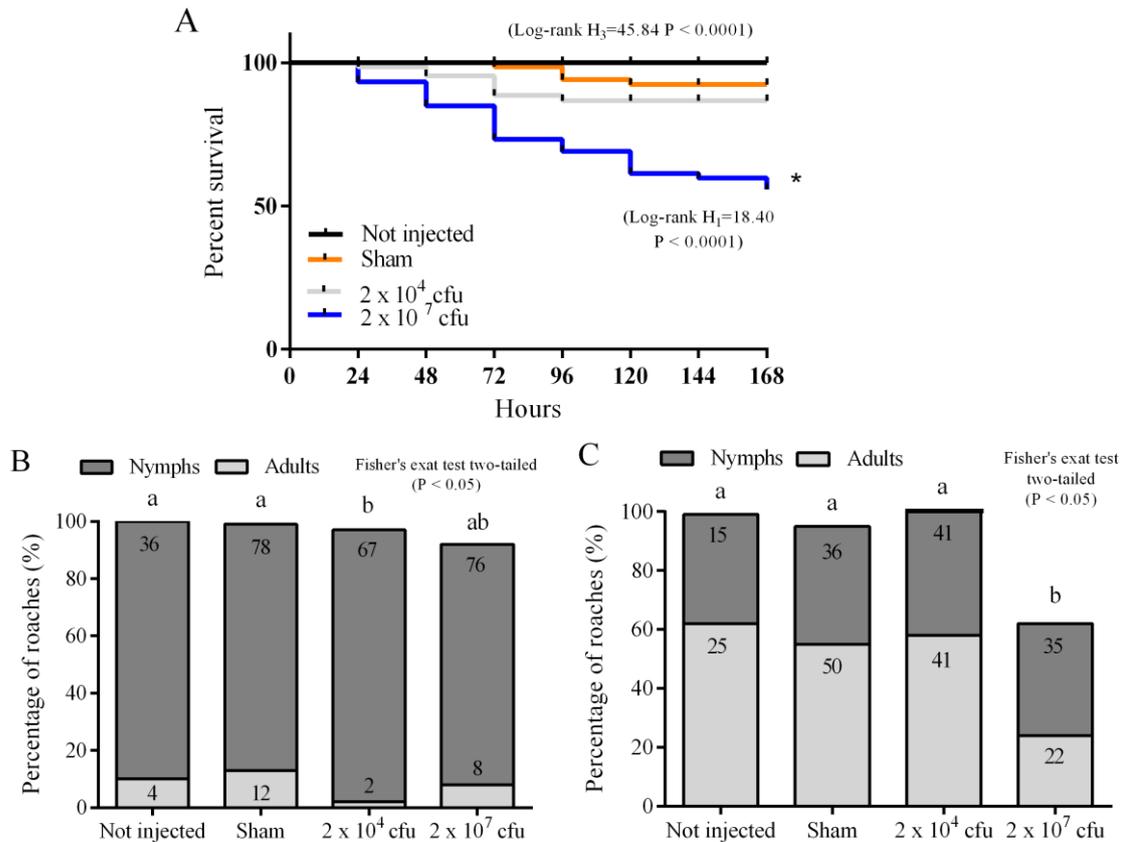


Figure 4: Survival and molts of acute infection experiment. (A) Survival curves of not injected, sham, 2×10^4 cfu/cockroach, and 2×10^7 cfu/cockroach groups. Percentage of nymphs and adults after 24 h (B) and 168 h (C) post-infection (the number of live cockroaches is inside the bars). Percent survival was analyzed by Log-rank test for trend and percentage of nymphs and adults were analyzed by Fisher's exact test. Different letters mean statistical difference ($p < 0.05$).

3.4 CFU count in the hemolymph of *Nauphoeta cinerea*

CFU count was performed after 15 min, 1, 2 and 4 h post-infection (Figure 5). The number of CFU was higher in the infected nymphs than in the sham group as expected. Among the infected groups, only after 4h post-infection occurred a significant decrease in CFU in the group injected with a diluted bacterial solution (2×10^4 cfu/cockroach) when compared to 2×10^7 CFU/cockroach.

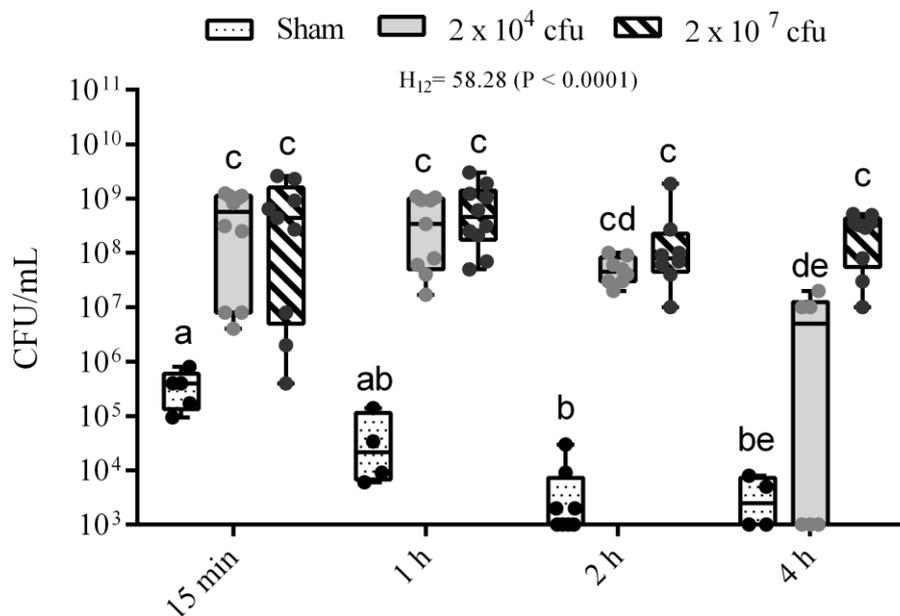


Figure 5: Colony forming unit (CFU) in the hemolymph of *Nauphoeta cinerea* nymphs after 15 min, 1, 2 and 4 h post-injection. Results were expressed as median \pm interquartile range. Data were analyzed by by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test (letters). Different letters mean statistical difference ($p < 0.05$). Sham, 15 min (n=5), 1 h (n=4), 2 h (n=8), 4 h (n=4); 2×10^7 cfu/cockroach, 15 min (n=9), 1 h (n=10), 2 h (n=8), 4 h (n=9); 2×10^4 cfu/cockroach, 15 min (n=10), 1 h (n=9), 2 h (n=8), 4 h (n=6).

3.5 Acute infection assay

The spontaneous activation of the enzyme had lower detectable values (data not shown), therefore, total PO activity using chymotrypsin as an activator, was assessed. Two-way ANOVA indicated a significant second order interaction between treatment x time [$F(6,411) = 6.692$; $p < 0.0001$] (Figure 6). Tukey *post-hoc* indicates the differences between treatments in each time. Sham and infected groups do not follow a specific pattern of activity.

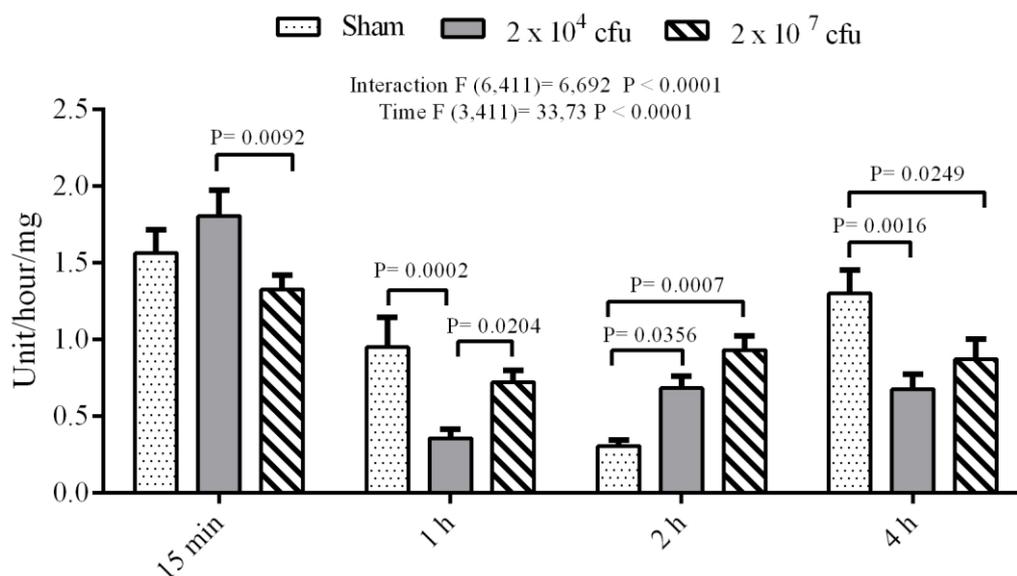


Figure 6: Phenoloxidase activity performed in the hemolymph of *Nauphoeta cinerea* after acute infection with *S. aureus* at different time points (15 min, 1, 2, and 4 h post-injection). Results were expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by Two-way ANOVA and Tukey *post-hoc*. Significant multiple comparisons are demonstrated by p values.

3.5 Priming assay

The spontaneous PO activity measured 24 h post-infection presented statistical difference ($H_4 = 89.03$; $p < 0.0001$) (Figure 7A). *S. aureus* infection caused an inhibition of PO, in a dose-depend manner. When PO activity was assessed in the hemolymph of cockroaches that did not received injection in the first week, a similar pattern was observed when compared to the nymphs injected in the first week ($H_4 = 55.82$; $p < 0.0001$) (Figure 7B). However, primed nymphs with saline or 2×10^7 CFU and re-injected with saline or 2×10^7 CFU depicted similar PO activity. In opposite, priming with saline or 2×10^7 CFU and reinfection with 2×10^{10} CFU induced a decrease in PO activity (Figure 7C-D).

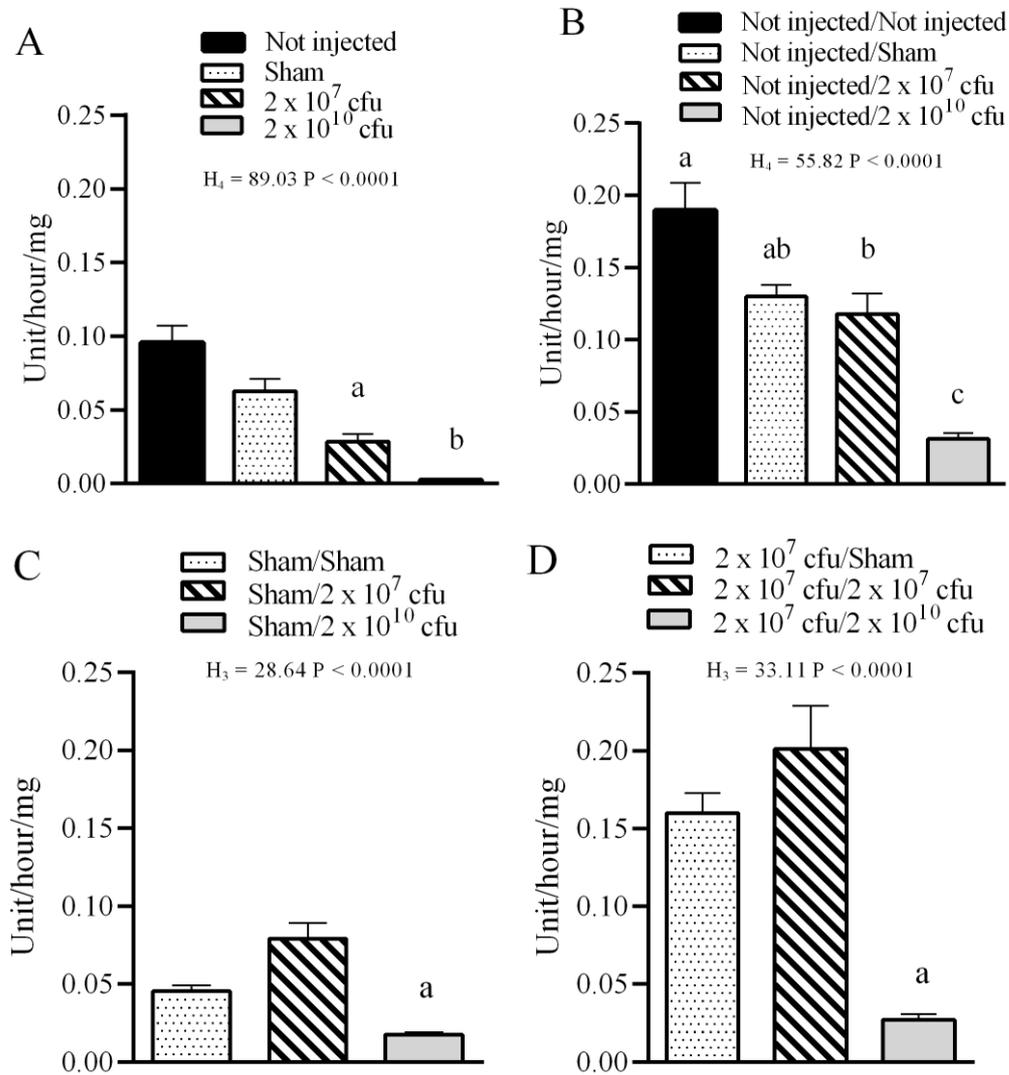


Figure 7: Phenoloxidase (PO) activity measured in the hemolymph of *N. cinerea* after priming assay with *S. aureus*. (A) PO activity after 24h post-infection. (B) Nymphs not injected in the first week and challenged with saline, 2×10^7 , and 2×10^{10} CFU (C) nymphs primed with saline (sham) and challenged with saline, 2×10^7 , and 2×10^{10} CFU, and (D) nymphs primed with 2×10^{10} CFU and challenged with saline, 2×10^7 , and 2×10^{10} CFU. Results were expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test (letters). Different letters mean statistical difference ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

PO is a type-3 copper protein and is characterized by two copper binding sites, each of which is coordinated by three conserved histidine residues; Cu (A) featuring a H₁ (n) – H₂ (8) – H₃ motif and Cu (B) featuring a H₁ (3) – H₂ (n) – H₃ motif, with the number of residues between histidines designated by n (Aguilera et al., 2013; Decker et al., 2007)□, and the CuB site exhibits higher conservation than CuA (Kanteev et al., 2015)□. The amino acid sequence that we showed for NcPO is the first to be reported for the lobster cockroach and the alignment of the putative NcPO copper B binding site with those of other insects in the Neoptera infraclass (Figure 1) is similar to results from studies that show conservation of the PO copper binding site across type 3 copper proteins (Aguilera et al., 2013)□(Zhang et al., 2016)□. The conserved sites are potentially important for the structural conformation of these proteins, whilst differences may affect substrate preferences (Aguilera et al., 2013)□. The phylogenetic relationships of insect POs based on amino acid sequences demonstrate the closest groups (Figure 2).

The relative expression showed that PO and serine proteases are greater found in head and lower in the fat body of *N. cinerea* nymphs (Figure 3). This may occur because the inactive form of PO, proPO, is usually synthesized and stored in the circulating hemocytes in the hemolymph (Cerenius et al., 2010)□(Pereira et al., 2018)□. Further, proPO appears to be present on the surface of haemocytes and at low levels in hemolymph (Charalambidis et al., 1996)□(Mavrouli et al., 2005)□(Sideri et al., 2008)□. According to González-Santoyo and Córdoba-Aguilar (González-santoyo and Córdoba-aguilar, 2012)□, the fat body is definitively not a place where proPO synthesis takes place.

Transcriptional analysis of *Musca domestica* larvae infected with *S. aureus* and *Escherichia coli* revealed an increased levels of proPO and serine proteases transcripts at 24 or 48 h post-bacterial challenge (Tang et al., 2014)□. However, the serpins (endogenous inhibitors of serine proteases) were also up-regulated, which suggests a negative feedback mechanism to avoid damage of host tissues and cells by excess reactive components generated by PO (Tang et al., 2014)□. The serine proteases are constitutively present in the cytoplasm of freshly isolated hemocytes of *Ceratitis capitata* (Mavrouli et al., 2005)□, and in integument, hemocytes, and salivary glands from *Bombyx mori*, but not in the fat body (Satoh et al., 1999)□. Similarly, the relative mRNA levels of serine proteases (hemolymph protease

1a and b) from control larvae *Manduca sexta* were high in hemocytes (granulocytes and oenocytoids), head, Malpighian tubules, muscle, but not in fat body (Yang et al., 2016)□. However, the *M. sexta* proPO activating protease (PAP-1) is expressed in the larval fat body, tracheae, nerve tissue, and is up-regulated in the fat body and hemocytes after injection of bacteria (Zou et al., 2005)□. PAP-2 expression was detected in the fat body and hemocytes only after *M. sexta* larvae were injected with bacteria (Jiang et al., 2003)□. PAP-3 mRNA was found at a low level in the fat body and hemocytes, and its expression was significantly up-regulated in tissues after injection of bacteria (Jiang et al., 2003)□.

There was a significant reduction in the CFU from the hemolymph of the nymphs infected with 2×10^4 CFU at 4 h post-infection (Figure 5). CFU in the sham group indicates that the rupture of the exoskeleton caused the exposure of hemolymph to a low level of infection and activation of the immune response. Despite the slight differences in PO activity until 4 h post-infection, we suggest that the production of reactive quinones or a low melanisation levels could be contributed to decreasing the CFU in the hemolymph of infected nymphs. In the case of *Drosophila melanogaster* mutant for proPO, with no production of PO, and infected with *S. aureus*, the authors observed an increase in CFU after 6 and 24 h, culminating in death (Dudzic et al., 2019)□.

We showed that there was no clear pattern on total PO activity in the acute phase of infection, after 15 min, 1, 2, and 4 h post-infection (Figure 6), and no detectable values of spontaneous PO was observed in these periods. Similar to our results, the spontaneous PO activity measured in male crickets (*Gryllus texensis*) injected with dead bacteria (*Serratia marcescens*) had no detectable values of PO after 5, 15, and 60 min (Adamo, 2004)□. Also, beetles (*Tenebrio molitor*) had no clear pattern in PO activity over time (2, 6, 12, 18, and 24 h), when challenged with LPS, peptidoglycan and live/dead *Bacillus subtilis* and *E. coli* (Haine et al., 2008)□.

However, we observed a strong decline in spontaneous PO activity 24 h post-infection, in a dose-dependent manner in the first and second week (Figure 7A). *N. cinerea* nymphs primed with the lower concentration of bacteria (2×10^7 CFU) or saline depicted an inhibition in PO activity 24 h after the second challenge (2×10^{10} CFU), one week later (Figure 7B). Different from our observations, adult beetles (*T. molitor*) primed with inactivated *B.*

thuringiensis or *S. entomophila* and challenged twenty days with the active bacteria showed no alteration in spontaneous PO and total-PO activity (Dhinaut et al., 2018)□. Larvae beetles (*T. molitor*) primed with LPS and challenged (4 or 7 days after priming) with the fungus *Metarhizium anisopliae* had no difference in PO activity when compared to not injected larvae, but had a decrease in PO comparing with Ringer-injected larvae (Moret and Siva-Jothy, 2003)□.

Unchallenged and sham nymphs depicted high levels of PO activity, but no protection against the challenge (Figure 7). Similar to Moret and Siva-Jothy (Moret and Siva-Jothy, 2003)□, Ringer-injected larvae had no better protection against fungal infections. To the authors, the high PO levels of Ringer-injected larvae could be the result of the mobilization of the wound-healing apparatus, to the production of new exocuticle and melanin, or could be a preventive strategy to avoid opportunistic infections (Moret and Siva-Jothy, 2003)□. According to Povey and colleagues (Povey et al., 2009)□, the high PO levels of unchallenged larvae of armyworm (*Spodoptera exempta*) was associated with its involvement in functions other than immunity.

As the physiological role of PO appears to be the detoxification of hemocoel from bacteria (e.g. entrapment by hemocytes, formation of nodules, and humoral reactions) (Charalambidis et al., 1996)□, we suggest that *S. aureus*-derived factors could be interfered negatively on PO activity and melanin synthesis. We observed that the hemolymph collected from infected nymphs delay to coagulate when compared to control groups (sham and intact) (data not shown). *S. aureus* may be prevented the degranulation or disintegration of hemocytes, avoiding the release of other coagulation factors, proPO, and nodule formation (Theopold et al., 2004). This phenomenon was demonstrated by (Ryuno et al., 2019)□ in the silkworm (*Bombyx mori*) plasma in vitro. In agreement, poor nodule formation was observed in lepidoptera larvae (*G. mellonella* and *Pieris brassicae*) 24 h post-infection with *S. aureus* (Ratcliffe and Gagen, 1976)□.

Together, a possible avoidance of proPO release, maturation, and the decrease of catechol substrates until 24 h after *S. aureus* infection may be contributed to increase the mortality of infected nymphs and decrease the number of adults (Figure 4). Further, we have previous reported cuticle impairments in the new molted adults of *N. cinerea* induced by *S.*

aureus infection (Rossato et al., 2019)□. The present results confirm the inhibition of PO activity. Evidences from this study demonstrate the viability of *N. cinerea* as an experimental organism for studying the participation of PO in the innate immunity process.

Conclusion

The lobster cockroach is a viable experimental organism for monitoring immune responses in insects. *N. cinerea* PO active site is conserved across other known insect models and *S. aureus* infection directly impacts on PO activity in the cockroach.

Acknowledgment

This study was financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil, CAPES-PROEX (23038.004173/2019- 93;0493/2019;88882.182126/2018-01), FINEP (CTINFRA), FAPERGSCAPES (082018 DOCFIX), FAPERGS-CNPQ (12/2014) PRONEX (16/ 255100044994), CNPQ (INCT 465671/20144). O.C.O is supported by CNPq-TWAS (FR number: 3240299312).

References

- Abdel-Razek, A.S., Mohamed, S.A., 2007. The role of bacterial symbionts in suppressing the defence reaction in larval hemolymph of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Biosd.). Arch. Phytopathol. Plant Prot. 40, 423–430. <https://doi.org/10.1080/03235400600627882>
- Adamo, S.A., 2004. Estimating disease resistance in insects phenoloxidase.pdf. J. Insect Physiol. 50, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2003.11.011>
- Afolabi, B.A., Olagoke, O.C., Souza, D.O., Aschner, M., Rocha, J.B.T., Lúcia, A., Segatto, A., 2020. Modified expression of antioxidant genes in lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* exposed to methylmercury and monosodium glutamate. Chem. Biol. Interact. 318. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108969>
- Aguilera, F., McDougall, C., Degnan, B.M., 2013. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: Lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. BMC Evol. Biol. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-96>

- Ashida, M., Ishizaki, Y., Iwahana, H., 1983. ACTIVATION OF PRO-PHENOLOXIDASE BY BACTERIAL CELL WALLS OR B-1,3-GLUCANS IN PLASMA OF THE SILKWORM, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. COMMUNICATIONS* 113, 562–568.
- Ayres, J.S., Schneider, D.S., 2012. Tolerance of Infections. *Annu. Rev. Immunol.* 271–296. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075030>
- Bidla, G., Hauling, T., Dushay, M.S., Theopold, U., 2009. Activation of Insect Phenoloxidase after Injury: Endogenous versus Foreign. *J. Immun. Innate Res.* 301–308. <https://doi.org/10.1159/000168009>
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M., Lemaitre, B., 2014. Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004067>
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B.L., Nonaka, M., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.006>
- Cerenius, L., Lee, B.L., So, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Charalambidis, N.D., Foukas, L.C., Zervas, C.G., Vassilis, J., 1996. Hemocyte Surface Phenoloxidase (PO) and Immune Response to Lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 867–874.
- Crawford, J.M., Portmann, C., Zhang, X., Roeffaers, M.B.J., Clardy, J., 2012. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *PNAS* 109, 10821–10826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201160109>
- Criscuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Czapla, T.H., Hopkins, T.L., Kramer, K.J., 1990. Catecholamines and related o-diphenols in cockroach hemolymph and cuticle during sclerotization and melanization: comparative studies on the order Dictyoptera. *J. Comp. Physiol. B* 160, 175–181. <https://doi.org/10.1007/BF00300950>
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., Tucek, F., 2007. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.051>

- Decker, H., Terwilliger, N., 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* 203, 1777–1782.
- Dhinaut, J., Chogne, M., Moret, Y., 2018. Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *J. Anim. Ecol.* 87, 448–463. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661>
- Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V. V, Ratcliffe, N.A., 2016. Encapsulation and nodulation in insects. *Inf. Syst. J.* 13, 229–246.
- Dudzic, J.P., Hanson, M.A., Iatsenko, I., Kondo, S., Lemaitre, B., Dudzic, J.P., Hanson, M.A., Iatsenko, I., Kondo, S., Lemaitre, B., 2019. More Than Black or White : Melanization and Toll Share Regulatory Serine Proteases in *Drosophila* Article More Than Black or White : Melanization and Toll Share Regulatory Serine Proteases in *Drosophila*. *CellReports* 27, 1050-1061.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.101>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T., Clarke, D.J., Ffrench-Constant, R.H., Reynolds, S., 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *PNAS* 104, 2419–2424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610525104>
- Eleftherianos, I., Millichap, P.J., Richard, H., Ñ, S.E.R., 2006. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photobacterium*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1099–1107. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.02.008>
- Eleftherianos, I., Waterfield, N.R., Bone, P., Boundy, S., Reynolds, S.E., 2009. A single locus from the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* inhibits activated *Manduca sexta* phenoloxidase. *Res. Lett.* 293, 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01523.x>
- Gomes, O.A., Feder, D., Garcia, E., Azambuja, P., 2003. Supression of prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect* 49, 829–837.
- González-santoyo, I., Córdoba-aguilar, A., 2012. Phenoloxidase : a key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.* 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>

- Haine, E.R., Pollitt, L.C., Moret, Y., Siva-Jothy, M.T., Rolff, J., 2008. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *J. Insect Physiol.* 54, 1090–1097. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.013>
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X., Zhu, Y., Kanost, M., 2003. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1049–1060. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00123-1)
- Kanteev, M., Goldfeder, M., Fishman, A., 2015. Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci.* 24, 1360–1369. <https://doi.org/10.1002/pro.2734>
- Kryukova, N.A., Dubovskiy, I.M., Chertkova, E.A., Vorontsova, Y.L., Slepneva, I.A., Glupov, V. V., 2011. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.008>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Evol. Genet. Anal. across Comput. Platforms* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leclerc, V., Pelte, N., El Chamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., 2006. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 7, 231–235. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400592>
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y.X., Ling, E., 2014. Insect prophenoloxidase: The view beyond immunity. *Front. Physiol.* 5 JUL, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252>
- Mavrouli, M.D., Tsakas, S., Theodorou, G.L., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 1744, 145–156.
- Moret, Y., Siva-Jothy, M.T., 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 2475–2480. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>
- Pereira, T., de Barros, P., Fugisaki, L., Rossoni, R., Ribeiro, F., de Menezes, R., Junqueira, J., Scorzoni, L., 2018. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J. Fungi* 4, 128. <https://doi.org/10.3390/jof4040128>

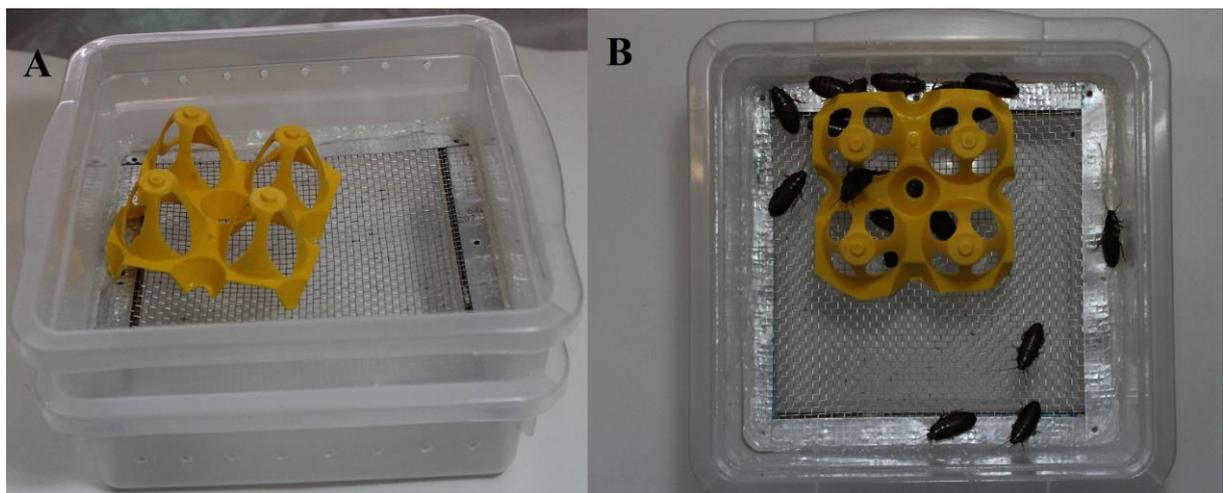
- Piccoli, B.C., Alvim, J.C., Silva, F.D., Nogara, P.A., Olagoke, O.C., Aschner, M., Oliveira, C.S., Rocha, J.B.T., 2019. High level of methylmercury exposure causes persisted toxicity in *Nauphoeta cinerea*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06989-9>
- Plaistow, S.J., Outreman, Y., Moret, Y., Rigaud, T., 2003. Variation in the risk of being wounded : an overlooked factor in studies of invertebrate immune function ? *Ecol. Lett.* 6, 489–494.
- Povey, S., Cotter, S.C., Simpson, S.J., Lee, K.P., Wilson, K., 2009. Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour ? 78, 437–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01499.x>
- Ratcliffe, N., Gagen, S., 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae.pdf. *J. Insect Physiol.* 28, 373–382.
- Reddy A, Harinatha and Venkatappa, B., 2016. Effect of *Staphylococcus aureus* Infection on Biochemical and Antioxidant Activities of Fifth Instar Silkworm Larvae (*Bombyx mori* L.). *J. Bacteriol. Parasitol.* 07. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000286>
- Rossato, J., Moresco, T., Uczay, J., Rocha, J.B., 2019. *Staphylococcus aureus* -induced sepsis in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 66. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101343>
- Ryuno, H., Nigo, F., Naguro, I., Sekimizu, K., Kaito, C., 2019. *Staphylococcus aureus* aggregation in the plasma fraction of silkworm hemolymph. *PLoS One* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217517>
- Sadekuzzaman, M., Park, Y., Lee, S., Kim, K., Kyo, J., Kim, Y., 2017. An entomopathogenic bacterium , *Xenorhabdus hominickii* ANU101 , produces oxindole and suppresses host insect immune response by inhibiting eicosanoid biosynthesis. *J. Invertebr. Pathol.* 145, 13–22.
- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., Ashida, M., 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 274, 7441–7453. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7441>
- Segatto, A.L.A., Diesel, J.F., Loreto, E.L.S., da Rocha, J.B.T., 2018. De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae). *Genet. Mol. Biol.* 41, 713–721. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0264>

- Shaban, H., Helal, I., El husseiny, I., Shamseldean, M.M., Seif, A., 2010. DEFENSIVE REACTIONS OF PERIPLANETA AMERICANA (BLATTODEA : BLATTIDAE) ADULTS AGAINST STEINERNEMA SP. 2D (RHABDITIDA) 6, 263–271.
- Sideri, M., Tsakas, S., Markoutsas, E., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2008. Innate immunity in insects: Surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology* 123, 528–537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02722.x>
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J., Lowery, M.D., 1992. Electronic Structures of Active Sites in Copper Proteins: Contributions to Reactivity. *Chem. Rev.* 92, 521–542. <https://doi.org/10.1021/cr00012a003>
- Stoltz, D.B., Cook, D.I., 1983. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid hymenoptera. *Experientia* 39, 1022–1024. <https://doi.org/10.1007/BF01989783>
- Sugumaran, M., 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15, 2–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x>
- Tang, T., Li, X., Yang, X., Yu, X., Wang, J., Liu, F., Huang, D., 2014. Transcriptional response of musca domestica larvae to bacterial infection. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104867>
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K., Dushay, M.S., 2004. Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.004>
- Ullah, I., Khan, A.L., Ali, L., Khan, A.R., Waqas, M., Lee, I.J., Shin, J.H., 2014. An insecticidal compound produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Molecules* 19, 20913–20928. <https://doi.org/10.3390/molecules191220913>
- Wang, K., Ren, Q., Shen, X., Li, B., Du, J., Yu, X., Du, Z., 2019. Molecular characterization and expression analysis of dopa decarboxylase involved in the antibacterial innate immunity of the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*.pdf. *Fish Shellfish Immunol.* 91, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.013>
- Yang, F., Wang, Y., He, Y., Jiang, H., 2016. In search of a function of Manduca sexta hemolymph protease-1 in the innate immune system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.06.009>

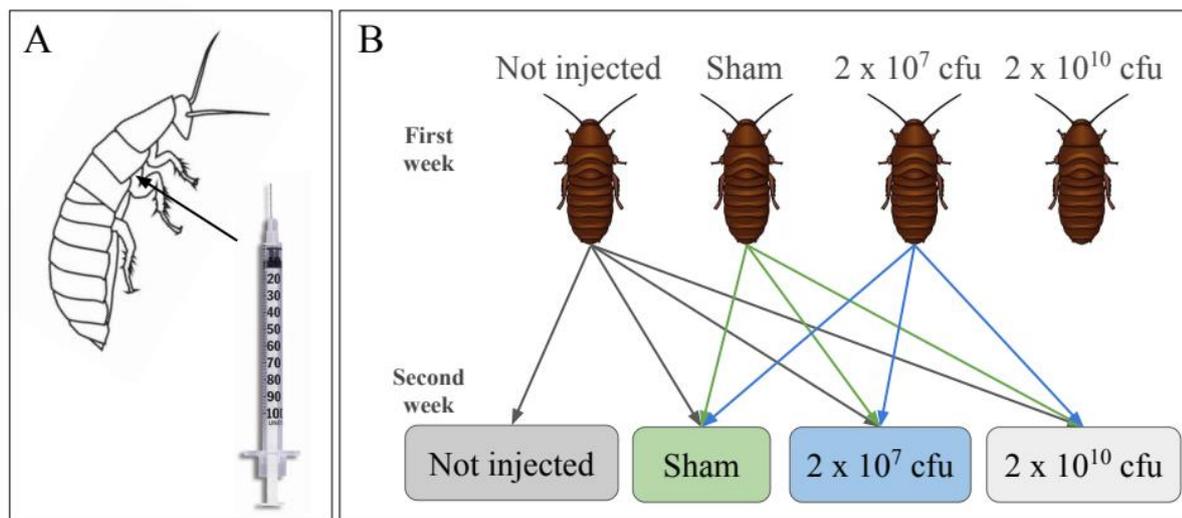
- Zhang, S., Hong, F., Song, H., Wang, L., Liu, Q., An, C., 2016. Cloning, Expression, and Characterization of Prophenoloxidas from Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Günée). *J. Immunol. Res.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1781803>
- Zou, Z., Wang, Y., Jiang, H., 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: Organization, expression, and regulation by immune and hormonal. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.004>

Supplementary material

Supplementary Figure S1. Multiple sequence alignment showing the relationship between *Nauphoeta cinerea* phenoloxidase and other insect phenoloxidase representing Holometabola, Polyneoptera and Paraneoptera. MEGA X was used to align the amino acid sequence of *Nauphoeta cinerea* phenoloxidase with 25 other insect phenoloxidase sequences from UNIPROT. 100% identical amino acids are marked blue while similar amino acids are marked yellow, Copper-binding site which are represented by active histidine residues are highlighted with ``*``.



Supplementary Figure S2. Rearing boxes (19 x 19 x 7 cm) with small holes to facilitate air exchange. Wire mesh in the bottom to avoid the accumulation of feces, and a plastic part from an egg-holder as shelter (A). The distribution of nymphs inside the cages (B).



Supplementary Figure S3. Injection application site (A) and schema of priming assay, indicating the treatment applied in the first and second week.

4.4 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos desenhados para avaliação da expressão gênica em *N. cinerea*.

| Gene | Oligonucleotídeos | Função |
|------------------|---------------------------|---|
| roach_GPDH f | AGTTCATCAGGACGCTCTGC | Reguladores |
| roach_GPDH r | AGATCAATGCTGCCATCCTC | |
| roach_tubulin f | TTGCCAGTGATGAGTTGCTC | |
| roach_tubulin r | AGCATGTACCAAGGGCAGTT | |
| roach_Gapdh f | CCGTGTCCCTGTTCCCTAATG | |
| roach_Gapdh r | GTCCAAGATGCCCTTCAGAG | |
| roach_eEF1a1 f | CGTGTCTGTTAAGGAACTGC | |
| roach_eEF1a1 r | CAAGCAATGTGAGCTGTATG | |
| roach_PGRP f | CGGTATGATGGTTCCTTTTTGT | Proteínas de Reconhecimento de Peptídeo glicano |
| roach_PGRP r | CAGTTCCTTTCTTTCCAGGCAGA | |
| roach_TOLL1 f | TTGTGTTTCTGGACATCAGTCATAA | Receptor da via de reconhecimento de bactéria Gram-positiva e fungo |
| roach_TOLL1 r | CATGCAGATTGTTGTGTTCCTCA | |
| roach_SPZ f | GAGTCTCATGTTCAAGGTGTGC | Citocina processada por SPE que ativa o receptor de membrana Toll |
| roach_SPZ r | TGCTGACAACCTCGTCGTGTA | |
| roach_Spe f | AGTTTACACCCGAGTATCTG | Enzima que processa SPZ |
| roach_Spe r | GTGTTAGCATGAAACAATAT | |
| roach_REL f | TCGTTTGGAGAAGTTACGAAGC | Fator de transcrição para produção de AMP da via IMD |
| roach_REL r | ATATTCTGGCAGGCAAATCG | |
| roach_FOXO f | TCATTCACGGCACTCACCTA | Fator de transcrição insulina, regula a produção de AMP e genes anabólicos |
| roach_FOXO r | GGTGCTGAGTCACAAGTCCA | |
| roach_AKT f | CGGATGATGCGAAAGAAATA | Regulador positivo do FOXO e Tor (inibi a via catabólica e induz via anabólica) |
| roach_AKT r | CGTTACTTGTGGCTTGAAGG | |
| roach_CATALASE f | ACGAGATCCAGCATCTGACC | Enzima antioxidante catalase |

| | | |
|------------------|------------------------|--|
| roach_CATALASE r | CTCCACGGTTATCCACAGGT | |
| roach_SOD f | GTATTCTGGTGGCTGCGAAA | Enzima antioxidante supeóxido dismutase |
| roach_SOD r | TAAACCCAACACAGAGCCTTG | |
| roach_DUOX f | TTGGGCCTTGACTACAAAC | Dualoxidase, induz formação de espécies reativas de oxigênio nos enterócitos |
| roach_DUOX r | AAATTGATACCAGTCCTGATGC | |
| roach_Reaper f | CGAAGAGCGAGAGAGGATTG | Indutor de apoptose |
| roach_Reaper r | CAGGATGGTCTGCTGAAGGT | |

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados testes de infecção utilizando a barata *N. cinerea*, com o objetivo de investigar a resposta imune desse inseto, por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos na hemolinfa e no corpo gorduroso, memória imunológica frente a desafios bacterianos repetidos, contagem da carga microbiana recuperada na hemolinfa, alterações comportamentais associadas à infecção e atividade da enzima fenoloxidase na hemolinfa. Foram analisados os níveis basais da expressão relativa de genes relacionados à cascata da FO, na cabeça e no corpo gorduroso e a relação filogenética dos aminoácidos da FO e outros insetos utilizando o transcriptoma disponível de *N. cinerea*.

Visto que a grande maioria dos estudos sobre imunologia de insetos foi conduzida com holometábolos (Diptera e Lepdoptera), nós investigamos elementos que compõem a resposta imunológica de um inseto hemimetábolo. Este estudo pretendeu fornecer ferramentas para contribuir na elucidação das complexas interações entre patógenos e hospedeiros. Nesse sentido, o entendimento sobre os mecanismos fisiológicos que conduzem resistência às infecções pode ser aproveitado para futuras investigações na área da imunologia, microbiologia, infectologia, zoologia, evolução, ecologia, toxicologia, entre outras.

Os resultados demonstram que a quantidade de bactéria inoculada produziu efeitos diversos sobre a bioquímica, fisiologia e comportamento das ninfas. Essas respostas podem ser consequência da própria quantidade de PAMPs na hemolinfa, interferindo nas cascatas proteolíticas, como a da FO (ABDEL-RAZEK e MOHAMED, 2007; CERENIUS et al., 2008) e, até mesmo, indução ou bloqueio de mecanismos celulares e humorais de defesa por fatores de virulência de *S. aureus*, (GOMES et al., 2003; CERENIUS et al., 2008).

Ninfas infectadas com as maiores concentrações de *S. aureus* (2×10^8 e 2×10^{10} UFC), quando comparadas às ninfas controle (intactas ou injetadas com salina), apresentaram um aumento na mortalidade e de UFC na hemolinfa ao longo do tempo. De modo semelhante, larvas de *G. mellonella* inoculadas com *S. aureus* vivo também apresentaram um aumento na mortalidade, conforme o aumento na concentração de bactéria injetada (DESBOIS e COOTE, 2011). No entanto, a injeção de bactérias mortas por calor não resultou em efeitos prejudiciais na sobrevivência das lepdópteras (DESBOIS e COOTE, 2011). UFC de *S. aureus*

determinantes para mortalidade de *Drosophila* foram entre 2×10^7 – 2×10^9 (GARCIA-LARA et al., 2005). Outros estudos avaliando a sobrevivência de insetos após infecção com *S. aureus* foram demonstrados na Tabela 2 (material suplementar do Artigo 1).

Ninfas infectadas com as maiores concentrações de *S. aureus* também apresentaram diminuição de metabólitos na hemolinfa (glicose, aminoácidos, proteínas e colesterol) e dos níveis de proteína no corpo gorduroso (Artigo 1). Apesar das ninfas inoculadas com 2×10^7 UFC de *S. aureus* também terem apresentado uma diminuição dos metabólitos na hemolinfa, os níveis de proteínas no corpo gorduroso estavam elevados e houve diminuição de UFC na hemolinfa ao longo do tempo. A depleção desses metabólitos na hemolinfa das baratas pode ter ocorrido devido à ativação do catabolismo de carboidratos e proteínas, em decorrência do aumento na demanda energética dos sistemas imune e metabólico (PENKOV et al., 2019). O catabolismo fornece substrato para síntese de carboidratos e produção de peptídeos antimicrobianos, no corpo gorduroso dos insetos após infecção (ARRESE e SOULAGES 2011; SCHMIDT e PLATZER, 1980). O corpo gorduroso é o principal produtor de proteínas nos insetos (ARRESE e SOULAGES 2011), portanto, os altos níveis de proteínas nesse tecido indicam que esse fator pode ter sido determinante para garantir a sobrevivência das ninfas injetadas com a concentração subletal de *S. aureus* (2×10^7 UFC).

Sugere-se aqui que a malformação de adultos após o processo de muda das ninfas infectadas com 2×10^8 e 2×10^{10} UFC de *S. aureus* foi consequência da depleção dos níveis de colesterol, redução no consumo de alimentos (observação pessoal), inibição da atividade da FO e da desregulação do metabolismo (Artigo 1). O colesterol está envolvido na síntese de diversos hormônios, principalmente aqueles associados ao processo de muda, manutenção da integridade das membranas celulares e tecidos de todo o organismo, porém, os insetos necessitam obtê-lo através da dieta (CLARK e BLOCK, 1959; CLAYTON, 1964; IGARASHI et al., 2018). Além disso, várias bactérias e outros microrganismos patogênicos também carecem da síntese de colesterol e são dependentes do colesterol obtido no hospedeiro (CARAGATA et al., 2013). A redução na ingestão de alimento pode ter contribuído na diminuição da disponibilidade de colesterol, glicose, e de substratos para atividade da FO. No besouro *T. molitor*, a privação de comida levou à redução da resposta imunológica e a uma menor atividade da enzima fenoloxidase (SIVA-JOTHY e THOMPSON, 2002).

A atividade da FO, na fase aguda da infecção, não diferiu dos grupos controles, enquanto que após 24 h, os grupos infectados tiveram significativa diminuição da atividade de FO. Segundo Cerenius e colaboradores (2008), o custo e manutenção da ativação e atividade da FO é muito alto, especialmente por duas questões que tornam esse processo dependente da dieta. A primeira é que os precursores para formação da melanina derivam da tirosina, produzida a partir da fenilalanina, cuja obtenção se dá através da alimentação. Segunda, a melanina é rica em compostos nitrogenados, o que envolve catabolismo e anabolismo de macromoléculas para sua síntese (CERENIUS et al., 2008). Esses fatores podem ter interferido negativamente na atividade FO, na síntese de melanina e comprometido integridade da nova cutícula (DUDZIC et al., 2015; CERENIUS e LEE, 2008). Apesar de vários estudos demonstrarem resultados controversos sobre o aumento da atividade da enzima após infecção (Tabela 5), esta enzima ainda é amplamente considerada fator fundamental na imunidade dos insetos (GONZÁLEZ-SANTOYO e CÓRDOBA-AGUILAR, 2011).

O papel fisiológico da FO parece ser a desintoxicação dos patógenos da hemocele (formação de quinonas reativas, formação de nódulos e reações humorais) (CHARALAMBIDIS et al., 1996), mas FO também está envolvida em outras funções além da imunidade (POVEY et al., 2009). A atividade da FO parece estar positivamente associada com condições individuais do hospedeiro, como idade e estado nutricional, e condições ambientais, incluindo disponibilidade de comida, estresse, densidade de indivíduos, temperatura, risco de predação, entre outros (GONZÁLEZ-SANTOYO e CÓRDOBA-AGUILAR, 2011). Diversas pressões seletivas estão associadas ao melanismo em insetos como a termorregulação, resistência à radiação ultravioleta, tolerância à dessecação, resistência à abrasão, força da cutícula e resistência a patógenos (TRUE, 2003). Pesquisas recentes propõem que proFO tem relação com a atividade neuronal, longevidade, melanização das fezes (insetos fitófagos) e desenvolvimento, o que demonstra o complexo envolvimento dessa enzima em diferentes vias (LU et al., 2014).

Observamos que a hemolinfa coletada de ninfas infectadas apresentou uma demora na coagulação quando comparada aos grupos controles (sham e intacta). *S. aureus* pode ter prevenido a degranulação ou desintegração dos hemócitos, evitando a liberação dos fatores de coagulação, proFO, e a formação de nódulos (THEOPOLD et al., 2004). Esse fenômeno foi demonstrado por Ryuno e colegas (2019) no plasma do bicho-da-seda *in vitro*.

Tabela 5: Atividade da fenoloxidase contra diferentes desafios imunológicos em insetos.

| Inseto | Desafio | Atividade FO | Referência |
|--------------------------------|--|---------------|-------------------------------|
| <i>Spodoptera exempta</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | ↓ | Povey et al., 2009 |
| | <i>Steinernema sp.</i> , <i>Xenorhabdus</i> | ↓ | Shaban et al., 2010 |
| <i>S. littoralis</i> | <i>X. nematophilus</i> (vivo ou morto) | ↓ | Abdel-Razek and Mohamed, 2007 |
| | <i>Photorhabdus luminescens</i> (vivo ou morto) | ↓ | |
| <i>S. exigua</i> | <i>X. hominickii</i> (morto) | ↑ | Sadekuzzaman et al., 2017 |
| | <i>X. hominickii</i> (vivo) | ↓ | |
| <i>Tenebrio molitor</i> | <i>Bacillus thuringiensis</i> | sem diferença | Dhinaut et al., 2017 |
| | <i>Serratia entomophila</i> | sem diferença | |
| | <i>B. subtilis</i> (vivo, morto ou PGN) | sem diferença | Haine et al., 2008 |
| | <i>Escherichia coli</i> (vivo, morto ou LPS) | sem diferença | |
| | LPS (Sigma: L8274) | sem diferença | Moret e Siva-Jothy, 2003 |
| <i>Bombyx mori</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | ↑ | Reddy e Venkatappa, 2016 |
| <i>Acheta domesticus</i> | <i>X. nematophilus</i> (morto) | ↓ | Silva et al., 2000 |
| <i>Gryllus texensis</i> | <i>S. marcescens</i> | | |
| | <i>S. liquefaciens</i> | sem diferença | Adamo, 2004 |
| <i>Trichoplusia ni</i> | <i>B. cereus</i> | | |
| | <i>E. coli</i> | sem diferença | Shikano et al., 2010 |
| <i>Manduca sexta</i> | <i>P. luminescens</i> | ↓ | Eleftherianos et al., 2007 |
| | <i>E. coli</i> | ↑ | |
| | <i>P. luminescens subsp. laumondii strain TT01</i> | sem diferença | Eleftherianos et al., 2006 |
| | <i>P. asymbiotica ATCC43949</i> | sem diferença | |
| | <i>E. coli</i> com <i>P. luminescens cosmid Pl_2BF12</i> | ↓ | Eleftherianos et al., 2009 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Beauveria bassiana</i> | | |
| | <i>Candida albicans</i> | sem diferença | Leclerc et al., (2006) |
| | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | | |

| | | | |
|---|---|---------------|-------------------------|
| | <i>E. coli</i> | | |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | | |
| | <i>S. aureus</i> | | |
| | LPS (<i>E. coli</i>) and PGN (<i>B. megaterium</i>) | sem diferença | |
| | L -phosphatidylinositol sodium (PI) | ↑ | |
| | L-phosphatidylethanolamine (PE) | sem diferença | |
| | L-phosphatidylcholine (PC) | | |
| | L-phosphatidyl- L -serine (PS) | ↑ | Bidla et al., 2009 |
| | LPS (<i>E. coli</i>) and PGN (<i>B. megaterium</i>) | ↑ | |
| | L -phosphatidylinositol sodium (PI) | | |
| | L-phosphatidylethanolamine (PE) | sem diferença | |
| | L-phosphatidylcholine (PC) | | |
| | L-phosphatidyl- L-serine (PS) | | |
| <i>Galleria mellonella</i> | Rhabduscin (<i>X. nematophila</i>) | ↓ | |
| | Byelyankacin (<i>Enterobacter</i> sp. B20) | ↓ | Crawford et al., 2012 |
| | Aglycone (<i>X. nematophila</i>) | ↓ | |
| | Phthalic acid (<i>P. temperata</i> M1021) | ↓ | Ullah et al., 2014 |
| | <i>Habrobracon hebetor</i> | ↓ | Kryucova et al., 2011 |
| <i>Bombus terrestris</i> | LPS | sem diferença | Sadd et al., 2005 |
| <i>Gammarus Pulex</i> | <i>Pomphorhynchus laevis</i> | ↓ | Plaistow et al., 2003 |
| <i>Rhodnius prolixus</i> <i>adults</i> | <i>Trypanosoma rangeli</i> | ↓ | Gomes et al., 2003 |
| <i>Mnais costalis</i> | <i>Hoplorhynchus polyhamatus</i> | sem diferença | Siva-Jothy et al., 2008 |
| | <i>Hyposoter exiguae</i> | ↓ | |
| <i>Trichoplusia ni</i> | <i>Ceratonia sonorensis</i> | sem diferença | |
| | Ambos | ↓ | |
| | <i>H. exiguae</i> | ↓ | Stoltz and Cook, 1983 |
| <i>Heliothis virescens</i> | <i>C. sonorensis</i> | ↓ | |
| <i>Anticarsia gemmatalis</i> | <i>H. exiguae</i> | sem diferença | |

A inoculação das maiores concentrações de *S. aureus* (2×10^8 e 2×10^{10} UFC) também causaram significativa diminuição dos comportamentos de agregação e de *grooming* (Artigo 2). *N. cinerea*, assim como outros insetos que vivem agrupados (subsociais e sociais) interagem em um ambiente confinado, o que favorece o crescimento microbiano e, portanto, pode elevar os riscos de infecção (MORET e SCHMID-HEMPEL, 2004). A ocorrência de comportamentos higiênicos individuais e coletivos, é fundamental para manutenção da integridade dos órgãos sensoriais e das atividades quimio-induzidas (comunicação, alimentação, entre outras) (WADA-KATSUMATA e SCHAL, 2019). A ocorrência deste comportamento em espécies pré-sociais sugere que ele é basal na biologia eusocial de insetos (MORET e SCHMID-HEMPEL, 2004). A supressão do *grooming* também sugerida como fator determinante na mortalidade dos grupos infectados com 2×10^8 e 10^{10} UFC, assim como observado em *B. germanica* (ROBINSON, 1996).

As ninfas injetadas com solução salina (sham) demonstraram comportamentos semelhantes às ninfas inoculadas com 2×10^7 UFC de *S. aureus*, indicando que possivelmente a ruptura do exoesqueleto causou a exposição da hemolinfa a um baixo nível de infecção e ocorreu uma fraca ativação da resposta imune. Nestes grupos houve um aumento significativo da atividade locomotora, mas o *grooming* e a interação entre coespecíficos não foi alterada.

Os comportamentos associados à doença observados em *N. cinerea* foram comparados às hipóteses preditas para explicar os comportamentos de doença observados em mamíferos, incluindo conservação de energia, redução da transmissão de patógenos e evitar predadores (HART, 1988; DANTZER, 2001; GELLMAN e TURNER, 2013)□□. A redução no comportamento de *grooming* e de agregação estão de acordo com a hipótese de conservação de energia (preservação de fluidos) e a hipótese de redução na transmissão de patógenos (ADAMO, 2006; SHAKHAR e SHAKHAR, 2015). No entanto, a hipótese de evitar predadores não se aplicou aos grupos infectados. As ninfas que receberam as maiores concentrações de bactéria permaneceram mais tempo na área central da caixa, enquanto que as ninfas inoculadas com a menor concentração, ou salina, demonstraram um aumento no comportamento de risco, com elevada atividade locomotora e exploração da caixa.

O *priming* com concentração subletal de *S. aureus* (2×10^7 UFC) ou injeção de solução salina (sham) não promoveu aumento da atividade da FO após segundo desafio (2×10^{10} UFC) (Artigo 3). Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos utilizando *T.*

molitor (MORET e SIVA-JOTHY, 2003; DHINAUT et al., 2017). Nesse estudo, as ninfas intactas ou injetadas com salina também demonstraram maior atividade de FO do que os grupos infectados, após 24 h. Para Moret e Siva-Jothy (2003), maior atividade de FO das larvas injetadas com Ringer podem representar a mobilização de moléculas envolvidas na cicatrização de feridas, o que requer a produção da nova exocutícula e deposição de melanina, ou pode ser uma estratégia preventiva para evitar infecções oportunistas (MORET e SIVA-JOTHY, 2003).

A sobrevivência e proteção de baratas pré-imunizadas com 2×10^7 UFC e desafiadas após uma semana com 2×10^{10} UFC, variou de acordo com a condição bacteriana (Artigo 1), demonstrando que *N. cinerea* foi sensível aos fatores de virulência de *S. aureus*. Nós sugerimos algumas hipóteses para explicar como as ninfas pré-imunizadas com *S. aureus* foram protegidas do desafio, após uma semana: 1) ninfas pré-imunizadas adquiriram a capacidade de reconhecer e matar a bactéria mais rapidamente do que o grupo injetado com salina, aumentando a sobrevivência; 2) ninfas pré-imunizadas podem ter sido capazes de tolerar uma carga maior de *S. aureus* após a segunda injeção que foi altamente letal para ninfas sham; e, 3) a presença de UFC na hemolinfa das ninfas uma semana após o *priming*, pode indicar a persistente produção de efetores imunológicos para combater a infecção, o que também contribuiu para o aumento na sobrevivência deste grupo.

Outros fatores não avaliados neste trabalho podem ter relação com a resposta ao *priming*. Dados da literatura confirmam que a duração da produção de peptídeos antimicrobianos varia entre os insetos, demonstrando altos níveis de transcrição 6 h pós-infecção, podendo se manter por até um mês (PHAM e SCHNEIDER, 2008). Outro mecanismo humoral que carece de estudos e pode contribuir com a eficiente eliminação dos patógenos envolve as proteínas da família do complemento, α -Macroglobulinas, e proteínas contendo motivo tioéster. Estas proteínas podem ser produzidas no corpo gorduroso e hemócitos, contribuem para opsonização e mediam a fagocitose e eliminação de patógenos (PHAM e SCHNEIDER, 2008).

Embora haja variação na eficiência de mortalidade entre as cepas existentes de *S. aureus*, não existe uma clara evidência de quais os componentes estão envolvidos nessa variação (toxinas ou outros fatores) (GARCIA-LARA et al., 2005). A diversidade de cepas (clínicas e ATCC) e meios de cultura podem explicar a abolição ou diminuição dos fatores de

virulência em alguns experimentos publicados com *C. elegans* (GARSIN et al., 2001; CHEUNG et al., 2004).

Altas concentrações de *S. aureus* e/ou a expressão diferencial dos fatores de virulência podem ter levado à variabilidade nas respostas comportamentais associadas à doença em *N. cinerea*. Considerando que os sintomas associados às doenças são uma estratégia evolutiva para proteger os hospedeiros, envolvendo interações entre o sistema nervoso e o sistema imunológico (ADAMO, 2006; Adamo, 2008; VANHA-AHO et al., 2016)□□, conforme o aumento da virulência do patógeno, maiores serão os efeitos causados sobre o seu hospedeiro (WOJDA 2017; SHAKHAR, 2019).

O transcriptoma de *N. cinerea*, recentemente publicado (SEGATTO et al., 2018), auxiliou na realização do desenho de oligonucleotídeos de proteínas envolvidas em diferentes cascatas proteolíticas e vias associadas à resposta imune. Através dele, conseguimos relatar, pela primeira vez, as sequências de proteínas envolvidas na cascata da FO, compará-las com outros insetos e construir um cladograma, baseado nas relações filogenéticas. Da mesma forma, realizamos a expressão relativa dos níveis basais da enzima FO e serino proteínas, no corpo gorduroso e cabeça de ninfas de *N. cinerea*.

O alinhamento das sequências de aminoácidos, especialmente da região do sítio de ligação do cobre B da FO, demonstra o alto nível de conservação desta proteína entre os insetos pertencentes à infraclasse Neoptera, como também verificado anteriormente (AGUILERA et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Os sítios conservados são potencialmente importantes para conformação estrutural dessas proteínas, enquanto que as diferenças podem revelar a preferência a diferentes substratos (AGUILERA et al., 2013). As relações filogenéticas utilizando as sequências (N=25) dos insetos pertencentes à infraclasse Neoptera demonstraram alta reprodutibilidade, segundo a metodologia utilizada (neighbour-joining).

A expressão relativa basal mostrou que FO e serino-proetases envolvidas na cascata de FO é maior na cabeça e menor no corpo gorduroso das ninfas de *N. cinerea*. A forma inativa da FO, proFO, geralmente é sintetizada e armazenada nos hemócitos (CERENIUS et al., 2010; Pereira et al., 2018), além de já ter sido observada na superfície dos hemócitos e em níveis baixos na hemolinfa (CHARALAMBIDIS et al., 1996; MAVROULI et al., 2005; SIDERI et al., 2008). Segundo González-Santoyo e Córdoba-Aguilar (2012), o corpo gorduroso definitivamente não é um local onde ocorre a síntese de proFO.

O genoma de *N. cinerea* ainda não foi sequenciado e não há nenhum método estabelecido para gerar cepas mutantes ou RNA de interferência, que auxiliariam nos estudos moleculares. Além disso, não há centros de estoque para *N. cinerea*, como os centros de estoque de *Drosophila*, onde os pesquisadores podem comprar genótipos específicos que foram criados em condições padrão. No entanto, *N. cinerea* apresenta várias características que conferem a este inseto grande potencial para o estudo de infecções. O seu tamanho, especialmente nos estágios juvenis mais próximos ao adulto, permitem a utilização de seringas para inoculação da bactéria. Esse recurso permite maior controle sobre a quantidade de bactéria que está sendo injetada (KAITO et al., 2020). Também é possível selecionar vários indivíduos do mesmo estágio de desenvolvimento, diminuindo a variação fisiológica que pode ocorrer, de acordo com a idade (KAITO et al., 2020). Somado a isso, a *N. cinerea* pode ser criada e multiplicada em espaços pequenos e ser utilizada com sucesso em estudos toxicológicos (ver item 1.2). Portanto, quanto maior o conhecimento acumulado sobre a espécie, maior o entendimento e a compressão sobre os mecanismos de interesse, bem como maior a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos nessa tese, pode-se concluir que:

- ✓ A infecção bacteriana no tórax das ninfas de *N. cinerea* foi um bom método para simular um modelo de infecção neste inseto.
- ✓ A sobrevivência das ninfas infectadas diminuiu com o aumento da concentração de bactéria inoculada e o aumento de UFC recuperadas da hemolinfa indica que a bactéria foi capaz de se multiplicar no interior da barata.
- ✓ A infecção com as maiores concentrações de *S. aureus* (2×10^8 e 2×10^{10} UFC) prejudicou o processo de muda, causando alterações morfológicas permanentes nos adultos recém-formados. Os dados indicam que isso deve ter ocorrido pela inibição da atividade da fenoloxidase, assim como em decorrência da diminuição dos metabólitos da hemolinfa (glicose, aminoácidos, proteínas e colesterol) e corpo gorduroso (proteínas).
- ✓ A sobrevivência frente ao desafio bacteriano repetido variou de acordo com a condição metabólica da bactéria, demonstrando que a barata foi sensível às mudanças no metabolismo do patógeno.
- ✓ Não houve mudança na atividade da FO nas ninfas infectadas por *S. aureus* nas primeiras 4 h pós-infecção (fase aguda), mas a atividade foi significativamente inibida (dose dependente) após 24 h da infecção. O *priming* não promoveu o aumento da atividade da FO após o segundo desafio, com maior concentração de bactéria. Estes resultados indicam que a FO pode não ser o principal mecanismo utilizado para combater a infecção contra *S. aureus*. Por outro lado, *S. aureus* pode ter tido a capacidade de interferir na ativação e funcionamento desta via.
- ✓ A infecção com as maiores concentrações de *S. aureus* (2×10^8 e 2×10^{10} UFC/barata) diminuiu o *grooming* e a agregação das ninfas, mas não alterou a atividade locomotora. Nós sugerimos que a diminuição do *grooming* ocorreu via desregulação da dopamina e, a falta deste comportamento, pode ter agravado a manutenção da interação entre coespecíficos (agregação) e causado um aumento na mortalidade das ninfas (danos aos quimio e mecanoreceptores).

- ✓ Os comportamentos relacionados à doença em *N. cinerea*, apesar de concordarem parcialmente, não podem ser explicados com base nas hipóteses de mamíferos. O desafio imunológico não reduziu a atividade locomotora, o comportamento exploratório e os comportamentos de risco, conforme previsto pelas hipóteses de conservação da energia e fuga de predadores. O desafio imunológico afetou de forma diferente a agregação e o *grooming*, o que está parcialmente de acordo com a teoria de redução da transmissão e conservação de energia.
- ✓ O transcriptoma de *N. cinerea* permitiu realizar o desenho de oligonucleotídeos relacionados a proteínas envolvidas em vias imunológicas, a expressão relativa basal da enzima fenoloxidase e serino proteases, a comparação das sequências de aminoácidos da fenoloxidase, bem como construir um cladograma filogenético. A partir destes dados, verificamos a semelhança da estrutura primária da proteína fenoloxidase, com a de outros insetos, indicando provável semelhança na sua forma e função. A expressão relativa basal da fenoloxidase e serino proteases indica que o corpo gorduroso não representa local de produção dessas proteínas, enquanto a cabeça pode ser um órgão útil para futuras avaliações imunológicas.
- ✓ Demonstramos que a barata *N. cinerea* é uma alternativa atraente para estudar os mecanismos subjacentes à infecção bacteriana, podendo ser uma ferramenta para futuras pesquisas em imunologia.
- ✓ A validação de metodologias experimentais utilizando insetos amplia as possibilidades de pesquisa em diferentes áreas do conhecimento, como a toxicologia, imunologia, biologia molecular, etologia, ecologia, evolução, entre outros.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão de genes durante a infecção em *N. cinerea*, utilizando os oligonucleotídeos já desenhados.
- Investigar a recuperação de *N. cinerea* infectadas com *S. aureus* após administração de antimicrobianos.

- Avaliar os níveis de mRNA após infecção com *S. aureus* utilizando os oligonucleotídeos desenhados.
- Explorar os mecanismos celulares de *N. cinerea*: caracterizar e contar os hemócitos presentes na hemolinfa.
- Determinar a especificidade da resposta imune, pré-imunizando e desafiando as ninfas com diferentes bactérias.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAZEK, A. S.; MOHAMED, S. A. The role of bacterial symbionts in suppressing the defence reaction in larval hemolymph of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Biosd.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 40, n. 6, p. 423–430, 2007.

ADAMO, SHELLEY A.; FIDLER, T. L.; FORESTELL, C. A. Illness-induced anorexia and its possible function in the caterpillar, *Manduca sexta*. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 21, n. 3, p. 292–300, 2007.

ADAMO, SHELLEY ANNE. Bidirectional Connections Between the Immune System and the Nervous System in Insects. Elsevier I ed. [S.l: s.n.], 2008. p. 129–150.

ADEDARA, I. A.; ROSEMBERG, D. B.; DE SOUZA, D.; *et al.* Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinerea* following dietary exposure to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 130, p. 22–30, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.12.004>>.

ADEDARA, I. A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; *et al.* Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 243–251, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.02.001>>.

ADELMAN, J. S.; MARTIN, L. B. Vertebrate sickness behaviors: Adaptive and integrated neuroendocrine immune responses. *Integrative and Comparative Biology*, v. 49, n. 3, p. 202–214, 2009.

AFOLABI, B. A. *et al.* Dietary co-exposure to methylmercury and monosodium glutamate disrupts cellular and behavioral responses in the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 64, n. September, p. 70–77, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.09.003>>.

- AGUILERA, F.; MCDOUGALL, C.; DEGNAN, B. M. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: Lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13, n. 1, 2013.
- ALAUX, C. *et al.* Brain, physiological and behavioral modulation induced by immune stimulation in honeybees (*Apis mellifera*): A potential mediator of social immunity? *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 26, n. 7, p. 1057–1060, 2012.
- AMARAL, I. M. R. *et al.* Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, v. 41, n. 2, p. 123–129, 2010.
- ARAI, I. *et al.* Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*, v. 13, p. 1–13, 2013.
- ASGARI, S. *et al.* A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 10, p. 1017–1024, 2003.
- AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. *PLoS biology*, v. 6, n. 12, 2008.
- AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. Tolerance of Infections. *Annual Review Immunology*, p. 271–296, 2012.
- AZEEZ, O. I.; MEINTJES, R.; CHAMUNORWA, J. P. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: The nexus. *Lipids in Health and Disease*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2014.
- BELL, W. J. *et al.* *Cockroaches - Ecology, Behavior, and Natural History*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.
- BINGGELI, O. *et al.* Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 5, 2014.
- BOS, N. *et al.* Sick ants become unsociable. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 25, n. 2, p. 342–351, 2012.
- BOUCHEBTI, S. *et al.* Subsocial Cockroaches *nauphoeta cinerea* mate indiscriminately with kin despite high costs of inbreeding. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, p. 1–17, 2016.
- BRONSTEIN, S. M.; CONNER, W. E. Endotoxin-induced behavioural fever in the Madagascar cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *Journal of Insect Physiology*, v. 30, n. 4, p. 327–330, 1984.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 12, p. 796–810, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3763>>.

CARAGATA, E. P. *et al.* Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by Wolbachia. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 6, p. e1003459, 2013.

CARRAZONI, T. *et al.* Mechanism of the Entomotoxic Activity Induced by *Araucaria Angustifolia* Methanolic Extract in *Nauphoeta cinerea* Lobster Cockroaches. *Journal of Botany Research*, v. 1, n. 1, p. 38–49, 2017.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SO, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. n. May, p. 263–271, 2008.

CHARALAMBIDIS, N. D. *et al.* Hemocyte Surface Phenoloxidase (PO) and Immune Response to Lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, n. 96, p. 867–874, 1996.

CHEUNG, A. L. *et al.* Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2004.

CLARK, A. J.; BLOCK, K. The absence of sterol synthesis in insects. *The Journal of biological chemistry*, v. 234, n. 10, p. 2578–2582, 1959.

CLARK, A. J.; TRIBLEHORN, J. D. Mechanical properties of the cuticles of three cockroach species that differ in their wind-evoked escape behavior. *PeerJ*, v. 2014, n. 1, 2014.

CLAYTON, R. B. The Utilization of sterols by insects. *Journal of lipid research*, v. 15, n. 1, p. 3–19, 1964. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/5/1/3.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14173327>>.

COOPER, D.; ELEFThERIANOS, I. Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. MAY, 2017.

CORLEY, L. S.; BLANKENSHIP, J. R.; MOORE, A. J. Genetic variation and asexual reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*: Implications for the evolution of sex. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 68–74, 2001.

CORLEY, LAURA S. *et al.* Developmental constraints on the mode of reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Evolution and Development*, v. 1, n. 2, p. 90–99, 1999.

COSTA-LEONARDO, A. M. *et al.* The fat body of termites: Functions and stored materials. *Journal of Insect Physiology*, v. 59, n. 6, p. 577–587, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.009>>.

DA SILVA, C. S. *et al.* Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Chemico-Biological Interactions*, v. 282, n. November 2017, p. 77–84, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.011>>.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 15, n. 1, p. 7–24, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1- 3 SPEC. ISS., p. 399–411, 2004.

DAVIS, H. E. *et al.* Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

DE ROODE, J. C.; LEFÈVRE, T. Behavioral immunity in insects. *Insects*, v. 3, n. 3, p. 789–820, 2012.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 8, p. 1785–1790, 2011.

DHINAUT, J.; CHOGNE, M.; MORET, Y. Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *Journal of Animal Ecology*, v. 87, n. 2, p. 448–463, 2018.

DIONNE, M. S.; SCHNEIDER, D. S. Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Disease Models and Mechanisms*, v. 1, n. 1, p. 43–49, 2008.

DOS SANTOS, D. S.; ZANATTA, A. P.; *et al.* *Jaburetox, a natural insecticide derived from Jack Bean Urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior.* . [S.l: s.n.] , 2019

DOS SANTOS, D. S.; ROSA, M. E.; *et al.* *Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on Nauphoeta cinerea cockroaches.* . [S.l: s.n.] , 2019

DUBOVSKIY, I. M. *et al.* Encapsulation and nodulation in insects. *Information Systems Journal*, v. 13, n. July, p. 229–246, 2016.

- DUDZIC, J. P. *et al.* Drosophila innate immunity : regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biology*, p. 1–16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12915-015-0193-6>>.
- DUSHAY, M. S. Insect hemolymph clotting. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 16, p. 2643–2650, 2009.
- ELEFThERIANOS, I. *et al.* An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *PNAS*, v. 104, n. 7, p. 2419–2424, 2007.
- EVERAERTS, C.; FARINE, J. P.; BROSSUT, R. Changes of species specific cuticular hydrocarbon profiles in the cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Leucophaea maderae* reared in heterospecific groups. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 85, n. 2, p. 145–150, 1997.
- FINK, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence*, v. 5, n. 1, p. 143–153, 2014.
- FLEMING, V. *et al.* Agr interference between clinical *Staphylococcus aureus* strains in an insect model of virulence. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 21, p. 7686–7688, 2006.
- GARCÍA-LARA, J.; NEEDHAM, A. J.; FOSTER, S. J. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: A window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 311–323, 2005.
- GARSIN, D. A. *et al.* A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 19, p. 10892–10897, 2002.
- GELLMAN, M. D.; TURNER, J. R. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. New York: Springer, 2013.
- GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY. *Annual Review of Entomology*, v. 42, p. 611–643, 1997.
- GOLDSWORTHY, G. J.; KHAN, N. A. Locusts as models for studying brain diseases and behaviour. p. 1–6, 2007.
- GOMES, O. A. . *et al.* Suppression of prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect*, v. 49, p. 829–837, 2003.
- GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase : a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, p. 1–16, 2012.
- HAINÉ, E. R. *et al.* Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 6, p. 1090–1097, 2008.

- HAINE, E. R.; ROLFF, J.; SIVA-JOTHY, M. T. Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 31, n. 5, p. 456–464, 2007.
- HANADA, Y.; SEKIMIZU, K.; KAITO, C. Silkworm apolipoprotein protein inhibits *Staphylococcus aureus* virulence. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 45, p. 39360–39369, 2011.
- HEDRICK, S. M. Understanding Immunity through the Lens of Disease Ecology. *Trends in Immunology*, v. 38, n. 12, p. 888–903, 2017.
- HERNÁNDEZ, Y. L. *et al.* Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens ALTERNATIVE METHODS. v. 6, n. February, p. 1–19, 2015.
- HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis Julián. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 58, p. 102–118, 2016.
- HOWARD, R. W.; MILLER, J. S.; STANLEY, D. W. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology*, v. 44, n. 2, p. 157–164, 1998.
- IGARASHI, F. *et al.* Cholesterol internalization and metabolism in insect prothoracic gland, a steroidogenic organ, via lipoproteins. *Steroids*, v. 134, n. February, p. 110–116, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.01.012>>.
- IMADA, K.; LEONARD, W. J. The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, v. 37, p. 1–11, 2000.
- ISHII, K. *et al.* Insect cytokine Paralytic Peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 37, p. 28635–28642, 2010.
- ISHII, K.; HAMAMOTO, H.; SEKIMIZU, K. Establishment of a bacterial infection model using the European honeybee, *Apis mellifera* L. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2014.
- JUNG, J.; SAJJADIAN, S. M.; KIM, Y. Journal of Asia-Pacific Entomology Hemolin, an immunoglobulin-like peptide, opsonizes nonself targets for phagocytosis and encapsulation in *Spodoptera exigua*, a lepidopteran insect. v. 22, n. June, p. 947–956, 2019.
- KAITO, C.; SEKIMIZU, K. A silkworm model of pathogenic bacterial infection. *Drug discoveries & therapeutics*, v. 1, n. 3, p. 89–93, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504393>>.
- KAITO, CHIKARA *et al.* Animal infection models using non-mammals. *Microbiology and Immunology*, v. 64, n. 9, p. 585–592, 2020.

- KAITO, CHIKARA *et al.* Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms. *Drug Discoveries & Therapeutics*, v. 5, n. 2, p. 66–70, 2011.
- KANOST, M. R.; JIANG, H. ScienceDirect Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. n. September, 2015.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. v. 28, p. 101–112, 2004.
- KAZLAUSKAS, N. *et al.* Sickness Behavior in Honey Bees. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. June, p. 1–10, 2016.
- KENDALL, L. V *et al.* Replacement , Refinement , and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. p. 1–18, 2019.
- KINDT, T.J., GOLDSBY, R.A AND OSBORNE, B. A. *Imunologia de Kuby*. 6th editio ed. Brasil: [s.n.], 2008.
- KOCHI, Y. *et al.* A human pathogenic bacterial infection model using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 15, p. 1–10, 2016.
- KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences*, v. 25, n. 3, p. 154–159, 2002.
- KOU, R.; HSU, C. C. Mating enhances the probability of winning aggressive encounters in male lobster cockroaches. *Hormones and Behavior*, v. 64, n. 3, p. 546–556, 2013.
- LACKIE, A. M. Cellular Recognition of Foreignness in 2 Insect Species, the American Cockroach and the Desert Locust. *Immunology*, v. 36, n. 4, p. 909–914, 1979.
- LEAL, A. P. *et al.* Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 148, n. May, p. 175–181, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.016>>.
- LEE, L. Y. L. *et al.* Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *Journal of Infectious Diseases*, v. 190, n. 3, p. 571–579, 2004.
- LIBERSAT, F.; PFLUEGER, H. J. Monoamines and the Orchestration of Behavior. *BioScience*, v. 54, n. 1, p. 17, 2004.
- LIHOREAU, M.; RIVAULT, C. Tactile stimuli trigger group effects in cockroach aggregations. *Animal Behaviour*, v. 75, n. 6, p. 1965–1972, 2008.
- LU, A. *et al.* Insect prophenoloxidase: The view beyond immunity. *Frontiers in Physiology*, v. 5 JUL, n. July, p. 1–15, 2014.

- MASRI, L.; CREMER, S. Individual and social immunisation in insects. *Trends in Immunology*, v. 35, n. 10, p. 471–482, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.08.005>>.
- MAVROULI, M. D. *et al.* MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1744, p. 145–156, 2005.
- MELILLO, D. *et al.* Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans : A Critical Appraisal. v. 9, n. August, 2018.
- MILUTINOVIĆ, B. *et al.* Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, v. 119, n. 4, p. 254–261, 2016.
- MIYAZAKI, S. *et al.* Evaluation of *Staphylococcus aureus* virulence factors using a silkworm model. *FEMS Microbiology Letters*, v. 326, n. 2, p. 116–124, 2012.
- MOORE, A. J.; GOWATY, P. A.; MOORE, P. J. Females avoid manipulative males and live longer. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 16, n. 3, p. 523–530, 2003.
- MOORE, P. J.; MOORE, A. J. Reproductive aging and mating: The ticking of the biological clock in female cockroaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 16, p. 9171–9176, 2001.
- MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Social life-history response to individual immune challenge of workers of *Bombus terrestris* L.: A possible new cooperative phenomenon. *Ecology Letters*, v. 7, n. 2, p. 146–152, 2004.
- MUSTARD, J. A.; PHAM, P. M.; SMITH, B. H. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, v. 56, p. 422–430, 2010.
- MYLLYMÄKI, H.; RÄMET, M. JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 79, n. 6, p. 377–385, 2014.
- NAKHLEH, J.; MOUSSAWI, L. EL; OSTA, M. A. The Melanization Response in Insect Immunity. v. 52, p. 83–109, 2017.
- NASCIMENTO, M. T. C. *et al.* DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 84, p. 62–70, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.012>>.
- NEGREIRO, M. C. C.; CARVALHO, R. B. R.; ANDRADE, F. G.; LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, A. M. F. Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. *Iheringia*, v. 99, n. 1, p. 66-70, 2009.

- PANAYIDOU, S.; IOANNIDOU, E.; APIDIANAKIS, Y. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*. *Virulence*, v. 5, n. 2, p. 253–269, 2014.
- PARKER, B. J. *et al.* Non-immunological defense in an evolutionary framework. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 26, n. 5, p. 242–248, 2011.
- PENKOV, S. *et al.* Immunometabolic Crosstalk: An Ancestral Principle of Trained Immunity? *Trends in Immunology*, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.002>>.
- PEREIRA, T. *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 128, 2018.
- PHAM, L. N.; SCHNEIDER, D. S. *Evidence for Specificity and Memory in the Insect Innate Immune Response*. *Insect Immunology*. [S.l.: s.n.], 2008
- POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. *et al.* Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 53–59, 2008.
- POUDEL, A. *et al.* Multidrug-resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus* spp. in houseflies and blowflies from farms and their environmental settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 19, p. 1–12, 2019.
- POVEY, S. *et al.* Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? v. 78, p. 437–446, 2009.
- RAHMET-ALLA, M.; ROWLEY, A. F. Studies on the cellular defense reactions of the Madeira cockroach, *Leucophaea maderae*: Nodule formation in response to injected bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 54, p. 200–207, 1989.
- RATCLIFFE, N.; GAGEN, S. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae.pdf. *Journal of Insect Physiology*, v. 28, p. 373–382, 1976.
- RHEINS, L. A.; KARP, R. D. Effect of gender on the inducible humoral immune response to honeybee venom in the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 9, n. 1, p. 41–49, 1985.
- RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, v. 52, n. 5, p. 417–429, 2006.
- ROBINSON, W. H. Antennal Grooming and Movement Behaviour in the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Proceedings of the Second International Conference on Urban Pests*, p. 361–369, 1996.

- ROEDER, T. TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism. *Annual Review of Entomology*, v. 50, n. 1, p. 447–477, 2005.
- ROHMER, L., HOCQUET, D., AND MILLER, S. I. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Nature protocols*, v. 10, n. 461, p. 168–170, 2011.
- ROTH, L. M.; WILLIS, E. R. *THE BIOTIC ASSOCIATIONS OF COCKROACHES*. Washington: Smithsonian Institution, 1960. v. 141. Disponível em: <<http://www.pgdp.net>>.
- RYUNO, H. *et al.* Staphylococcus aureus aggregation in the plasma fraction of silkworm hemolymph. *PLoS ONE*, v. 14, n. 5, p. 1–14, 2019.
- SALES JUNIOR, J.A.L., DAVID, C.M, HATUM, R., SOUZA, P.C.S.P., JAPIASSÚ, A., PINHEIRO, C.T.S., FRIEDMAN, G., BARBOSA DA SILVA, O., D’AGOSTINO DIAS, M., KOTERBA, E., DIAS, F.S., PIRAS, C., GRUPO DE ESTUDO DE SEPSE DO FUNDO AMIB, LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 18, n. 1, p. 9–17, 2008.
- SALGADO-PABÓN, W.; SCHLIEVERT, P. M. Models matter: The search for an effective Staphylococcus aureus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 8, p. 585–591, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3308>>.
- SALZET, M. Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Research Reviews*, v. 34, n. 1–2, p. 69–79, 2000.
- SANTOS, D. S. *IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX*. 2019. 0–120 f. Universidade Federal de Santa Maria, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/17545/TES_PPGCBBT_2019_SANTOS_DOUGLAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- SCHALLER, M.; PARK, J. H. The behavioral immune system (and why it matters). *Current Directions in Psychological Science*, v. 20, n. 2, p. 99–103, 2011.
- SCHERFER, D. L. C. *et al.* Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 919–928, 2002.
- SCHMIDT, S. P.; PLATZER, E. G. Changes in body tissues and hemolymph composition of *Culex pipiens* in response to infection by *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 36, n. 2, p. 240–254, 1980.

SEGATTO, A. L. A. *et al.* De novo transcriptome assembly of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 41, n. 3, p. 713–721, 2018.

SHAKHAR, K.; SHAKHAR, G. Why Do We Feel Sick When Infected—Can Altruism Play a Role? *PLoS Biology*, v. 13, n. 10, p. 1–15, 2015.

SHEEHAN, G. *et al.* Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 1625–1639, 2018.

SHEEHAN, G.; DIXON, A.; KAVANAGH, K. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 165, n. 8, p. 863–875, 2019.

SHELBY, K. S. *et al.* Parasitism-linked block of host plasma melanization. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 75, n. 3, p. 218–225, 2000.

SHELBY, K. S.; WEBB, B. A. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *Journal of Insect Physiology*, v. 45, n. 5, p. 507–514, 1999.

SHOKAL, U.; ELEFThERIANOS, I. Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 2017.

SIDERI, M. *et al.* Innate immunity in insects: Surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, v. 123, n. 4, p. 528–537, 2008.

SIFRI, C. D. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 2208–2217, 2003. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/71/4/2208.short>>.

SIVA-JOTHY, J. A.; VALE, P. F. Viral infection causes sex-specific changes in fruit fly social aggregation behaviour. *Biology Letters*, v. 15, n. 9, 2019.

SIVA-JOTHY, M. T.; THOMPSON, J. J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, v. 27, n. 3, p. 206–212, 2002.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 10, n. 1, p. 23–28, 1998.

SOULAGES, J. L. AND A. E. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *NIH Public Access*, n. 87, p. 207–225, 2011.

SUGUMARAN, M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, v. 15, n. 1, p. 2–9, 2002.

- SUGUMARAN, M.; BAREK, H. Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 10, p. 1–24, 2016.
- SULLIVAN, K.; FAIRN, E.; ADAMO, S. A. Sickness behaviour in the cricket *Gryllus texensis*: Comparison with animals across phyla. *Behavioural Processes*, v. 128, p. 134–143, 2016.
- TAUB, D. . Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunology*, v. 252, n. 1–2, p. 1–6, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- THEOPOLD, U. *et al.* Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 6, p. 289–294, 2004.
- TIZARD, I. Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Animal health research reviews*, v. 9, n. 1, p. 87–99, 2008.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2019.
- TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>>.
- TYLER, E. R.; ADAMS, S.; MALLON, E. B. An immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* leads to increased food consumption. *BMC Physiology*, v. 6, p. 4–7, 2006.
- VALLET-GELY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 302–313, 2008.
- VANHA-AHO, L. M.; VALANNE, S.; RÄMET, M. Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunology Letters*, v. 170, p. 42–51, 2016.
- WACZUK, E. P. *et al.* Assessing the toxicant effect of spontaneously volatilized 4-vinylcyclohexane exposure in nymphs of the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 72, n. August, 2019.
- WADA-KATSUMATA, A.; SCHAL, C. Antennal grooming facilitates courtship performance in a group-living insect, the German cockroach *Blattella germanica*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- WOJDA, I. Temperature stress and insect immunity. *Journal of Thermal Biology*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.08.001>>.
- WOLCOTT, R. D. *et al.* Wound Healing by an Anti-Staphylococcal Biofilm approach. In: FLEMMING (Org.). *Biofilm Highlights*. Berlin: Springer, 2011. v. 5. p. 141–161.

WÜEST, J. Histological and cytological studies on the fat body of the cockroach *Nauphoeta cinerea* during the first reproductive cycle. *Cell and Tissue Research*, v. 188, n. 3, p. 481–490, 1978.

ZHANG, S. *et al.* Cloning, Expression, and Characterization of Prophenoloxidasases from Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Günée). *Journal of Immunology Research*, v. 2016, 2016.

ZHUKOVSKAYA, M.; YANAGAWA, A.; FORSCHLER, B. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects*, v. 4, n. 4, p. 609–630, 2013.

ZIBAEE, A.; REZA, A.; MALAGOLI, D. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera : Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 158, n. 1, p. 117–123, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.10.006>>.