

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Composição e variabilidade da microbiota intestinal de triatomíneos (Hemiptera:
Reduviidae): o papel das comunidades bacterianas na transmissão da doença de
Chagas**

Sebastián Díaz Zuleta

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular
da UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Genética e
Biologia Molecular

Orientadora: Karen L. Haag

Porto Alegre, Fevereiro de 2016.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nos Laboratórios de Genômica Evolutiva e de Imunogenética, com o auxílio financeiro da FAPERGS e do CNPq.

À meus pais

Agradecimentos

À minha orientadora Karen Haag por, ainda sem me conhecer, ter me dado a oportunidade de vir ao Brasil e desenvolver meu mestrado e este projeto.

À meus pais, Ivan e Beatriz Lucia por terem brindado seu apoio e carinho por toda a minha vida.

Aos meus irmãos e meus pequenos sobrinhos por serem sempre uma família unida mesmo na distância de três países.

Aos meus colegas de laboratório, Sarah, Jennifer e Juliano, por terem me acolhido e tornado esta experiência mais fácil.

Às pessoas que fizeram um esforço para que este projeto fosse possível: A Dr. Jane Costa e a Msc. Nathália Cordeiro da IOC-Fiocruz; A Msc. Fernanda de Mello do FEEPPS/IPB-Lacen; O Dr. José Artur Bogo Chies e seu Laboratório de Imunogenética da UFRGS e a Dr. Carla Martins Lopes.

À todos os colegas e professores do PPGBM em especial, por criar um ambiente não só acadêmico mas também de boa convivência.

Ao Elmo por toda sua paciência com as cartas, certificados, perguntas, dúvidas...

À todos os novos amigos que Porto Alegre me deu: Gustavo, Shirley, Viviane, Lauro, Otto, Valeria, Esteban, Heydy, Cesar, Diego, Adrian, Maria Alexandra, Marcela, Maria, Luisa, Marianela, Mayra.

Aos meus amigos que, ainda distantes, eu sabia que podia contar com eles: Paula, Camilo, Arturo, Ana, Natalia, Ignacio, Laura, Alejandro, Maria Camila, Karina.

À UFRGS, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro para os meus estudos e para a pesquisa.

À Esly Maria, por todo o amor e companhia que me tem dado neste último ano.

Índice

1. Resumo	6
2. Abstract.....	7
3. Introdução.....	8
3.1. A doença de Chagas.....	8
3.2. Controle vetorial e suas dificuldades	10
3.3. Microbiota de Triatominae	12
3.4. Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal de Triatominae .	17
4. Objetivos.....	20
5. Manuscript: Alterations in the core gut microbiota of triatomine bugs in response to <i>Trypanosoma cruzi</i> infection	22
5.1. Abstract.....	23
5.2. Author Summary.....	24
5.3. Introduction.....	25
5.4. Methods	27
5.5. Results.....	32
5.6. Discussion.....	42
5.7. Acknowledgments	48
5.8. References.....	48
5.9. Supporting Information.....	54
6. Considerações Finais	66
6.1. A microbiota intestinal de Triatominae sob a ótica da simbiose	66
6.2. Microbiota intestinal de Triatominae e simbiose nutricional	69
6.3. Microbiota intestinal de Triatominae e simbiose protetora	70
7. Referências	72

1. Resumo

Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) conhecidos no Brasil como “barbeiros” são os vetores do flagelado *Trypanosoma cruzi*, o parasita causador da doença de Chagas, uma das mais importantes doenças parasitárias no continente americano. O estudo da microbiota intestinal dos triatomíneos tem ganhado relevância nos últimos anos dado seu papel potencial em modular a competência vetorial, além do uso de bactérias modificadas geneticamente para inibir o desenvolvimento do inseto ou do parasita. Porém, para um uso prospectivo em estratégias de controle, se requer um bom conhecimento da interação vetor-microbiota-parasita, incluindo a composição da microbiota, rotas de transmissão e a resposta a infecção com *T. cruzi*. Para responder estas perguntas, neste trabalho foi amostrada a microbiota intestinal de insetos criados em colônias de laboratório de seis espécies representativas dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, usando sequenciamento em larga escala de um fragmento do gene ribossomal 16S. Nosso estudo compara insetos desafiados experimentalmente contra *T. cruzi* e controles não desafiados, bem como amostras obtidas de intestino e gônadas. Nossos resultados demonstram que a microbiota intestinal de triatomíneos tem uma baixa diversidade dentro de indivíduos, pode ser transmitida horizontal ou tanto vertical como horizontalmente, e é altamente variável na sua composição taxonômica dentro de uma mesma espécie de hospedeiro. No entanto, as espécies bacterianas da microbiota padrão são principalmente restritas a Enterobacteriales e Corynebacteriales. Nossos resultados sugerem que desafio com *T. cruzi* influencia a composição da microbiota de acordo com a susceptibilidade do vetor: nas espécies com infecção não detectável, ela é variável entre os grupo desafiado e o controle, mas nas espécies com infecção detectável, ela permanece em sua maioria sem mudanças. Nossas observações são discutidas à luz do nosso conhecimento sobre a resposta imune do inseto e sobre a capacidade do parasita de modulá-la. Nós consideramos que, embora a diversidade da microbiota ser altamente variável entre espécies e indivíduos, grupos taxonômicos-chave definem a microbiota padrão intestinal dos triatomíneos, permitindo-nos explorar o papel dos simbiossomas na nutrição e defesa do hospedeiro. Finalmente, nós sugerimos caminhos através dos quais novas pesquisas sobre a regulação fisiológica dos triatomíneos pela microbiota intestinal podem ser realizados a fim de avaliar a sua resposta posterior contra *T. cruzi* e ser usada como indicador de susceptibilidade dos insetos à infecção pelo o parasita.

2. Abstract

Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) known in Brazil as “barbeiros” are the vectors of flagellate *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of the Chagas disease, one of the most important parasitic diseases in the American continent. The study of triatomine gut microbiota has gained relevance in the last years given its potential role to modulate vector competence, besides the use of genetically modified bacteria to inhibit the development of either insects or parasites. However, for a prospective use in control strategies, a good understanding of the vector-microbiota-parasite interactions is required, including microbiota composition, its transmission routes, and its responses to *T. cruzi* infection. To answer these questions, we sampled the gut microbiota of colony-reared insects of six representative species of the genera *Triatoma*, *Rhodnius* and *Panstrongylus*, using high throughput sequencing of a fragment of the ribosomal gene 16S. Our study compares experimental *T. cruzi*-challenged and non-challenged control individuals, as well as samples obtained from guts and gonads. Our results demonstrate that the triatomine gut microbiota has a low intra-individual diversity, is either horizontally or both horizontally and vertically transmissible, and is highly variable in its taxonomic composition within the same host species. Nevertheless, bacterial species of the core microbiota are mostly restricted to Enterobacteriales and Corynebacteriales. *T. cruzi*-challenge seems to influence microbiota composition according to vector susceptibility: in species with non-detectable infection, it is variable between experimentally challenged and non-challenged vectors, while in species with detectable infection, the microbiota remains mostly undisturbed. This latter observation is discussed in the light of insect immune responses and the parasite capacity of modulating it. We consider that, although the microbiota diversity is highly variable between species and individuals, key taxonomic groups define the core triatomine gut microbiota, allowing us to explore their symbiotic role in host nutrition and defense. Finally, we suggest avenues through which new research on triatomine physiological regulation of gut microbiota could be conducted in order to evaluate its subsequent response to *T. cruzi* and be used as indicator of infection susceptibility to the parasite.

3. Introdução

3.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença tropical causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Seu principal modo de transmissão é vetorialmente pelos insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), conhecidos no Brasil como barbeiros. O ciclo de transmissão vetorial do parasito (Figura 1) é diferente de outras doenças transmitidas por artrópodos hematófagos, pois o agente infeccioso não é transmitido através da saliva do barbeiro, mas pelas suas fezes que entram em contato com o sangue do hospedeiro vertebrado através da ferida da picada. Dessa forma, o *T. cruzi* não replica nas glândulas salivares, mas replica no sistema digestivo, através de uma forma replicativa conhecida como epimastigoto que está localizada dentro do intestino, com sua forma infecciosa para o hospedeiro mamífero, chamada de tripomastigoto metacíclico, encontrando-se no reto.

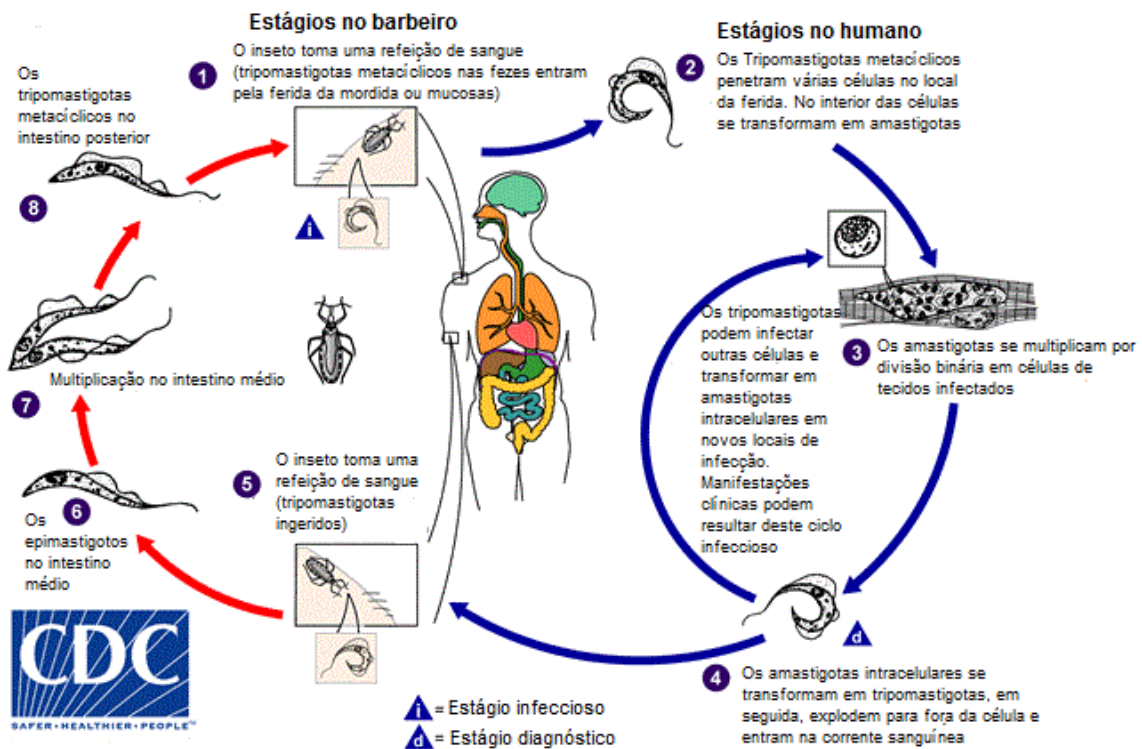


Figura 1. Ciclo de transmissão da doença de Chagas

Adaptado: Center for Disease Control and Prevention, March/2015.

Com uma prevalência estimada de 7-8 milhões de casos (Guhl and Lazdins-Helds 2007), a doença de Chagas é uma das principais infecções parasitárias da América Latina em termos de impacto econômico e social (Miles et al. 2003). Nos humanos, é uma patologia crônica, que pode ficar assintomática por muitos anos, eventualmente manifestando-se em cerca de 20-30% das pessoas infectadas na forma de uma cardiopatia ou síndrome de megaesôfago/megacólon (Rassi et al. 2010). Tendo a afecção poucas possibilidades terapêuticas, especialmente em estágios crônicos, o controle baseia-se na prevenção da transmissão vetorial doméstica, considerada a principal estratégia para a eliminação ou redução da doença em áreas de alta incidência.

Triatominae, o grupo de insetos vetores da doença de Chagas, está composto por cerca de 145 espécies (Schofield and Galvão 2009) de distribuição quase exclusivamente neotropical, com a maior parte delas de origem silvestre. Apenas uma dúzia de espécies possui relevância epidemiológica na transmissão da doença devido ao fato de possuir populações domiciliadas ou em habitats perto dos domicílios (peridomiciliadas). Além disso, os barbeiros se alimentam de sangue em todos seus estágios de vida sendo potenciais vetores tanto os adultos como as ninfas.

De acordo com a relevância epidemiológica na transmissão aos humanos podem ser descritos três grupos de barbeiros (Noireau et al. 2005): 1. Vetores primários como *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, espécies claramente antropofílicas de distribuição ampla e na maior parte invasiva, geralmente com populações de alta densidade que colonizam habitats humanos; 2. Vetores secundários como *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*, espécies geralmente nativas da região de distribuição e capazes de invadir e colonizar as casas na ausência dos vetores primários. Estas espécies ocupam ecótopos naturais ou artificiais perto dos domicílios, associadas a animais selvagens ou domésticos apresentando diferentes graus de antropofilia; 3. Espécies silvestres que mostram preferência por ecótopos específicos e com mínimo contato com os domicílios. Algumas espécies do gênero *Rhodnius* estão principalmente associadas à palmeiras, o

gênero *Panstrongylus* é predominantemente encontrado dentro de tocas e cavidades de árvores, e o gênero *Triatoma* é associado com habitats rochosos terrestres ou tocas de roedores (Gaunt and Miles 2000)

3.2. Controle vetorial e suas dificuldades

Desde 1991 uma série de iniciativas multinacionais têm se centrado na eliminação das populações domésticas de barbeiros em todas as áreas endêmicas da América Latina com o uso de inseticidas, principalmente do grupo dos piretróides. Como resultado dessas iniciativas, as taxas de transmissão e prevalência de infecção têm sido constantemente reduzidas. As estimativas atuais sugerem que cerca de 7 milhões de pessoas estão infectadas, abaixo da estimativa de 24 milhões feita em 1984 e as taxas de transmissão anuais são provavelmente menores que 50.000 novos casos por ano (Gorla et al. 2010)

Entretanto, os programas de controle dos barbeiros enfrentam dificuldades, como o desenvolvimento de resistência aos inseticidas, um fenômeno que há 15 anos tem sido descrito extensivamente para várias espécies. A resistência se manifesta com a diminuição da mortalidade observada na população submetida a um tratamento contínuo com inseticidas. Esta característica é expressa por um maior número de espécimes que toleram doses letais em comparação com amostras consideradas sensíveis durante a aplicação inicial do produto, levando a uma pressão de seleção nas populações. O fenômeno tem sua origem na variabilidade genética de populações naturais, e conseqüentemente, essa variabilidade combinada com a pressão seletiva dos inseticidas tem como resultado o aumento das frequências de genótipos para resistência (Pessoa et al. 2015).

O problema da resistência aos inseticidas, que também ocorre com outros insetos hematófagos que são vetores de doenças como culicídeos (Liu 2015) e os mosquitos-palha (Alexander and Maroli 2003) tem impulsionado, nos últimos anos, o estudo da sua microbiota intestinal como possível alvo de controle. Uma descoberta importante é o provável efeito inibitório da microbiota do vetor sobre o ciclo de vida dos agentes infecciosos, fenômeno já descrito em grupos de vetores como mosquitos, mosquitos-palha,

moscas tsé-tsé e barbeiros (Azambuja et al. 2005). As pesquisas também mostram uma grande variação na biologia das bactérias que compõem esta microbiota em relação a características como a localização no hospedeiro (intracelular ou extracelular), tipo de associação (obrigatória ou facultativa), tipo de interação (mutualista, comensal ou parasitária) e modo de transmissão (vertical ou horizontal) (Kikuchi 2009). Isto demonstra a dificuldade de se fazer generalizações sobre a interação hospedeiro-parasito-microbiota.

Dessa forma, a identificação de microbiotas simbiotes específicas para cada grupo tem impulsionado metodologias como a paratransgênese, que envolve o uso destes simbiotes modificados geneticamente como vetores de expressão de genes que interfiram com a aptidão do inseto. Isto foi proposto originalmente para o barbeiro *Rhodnius prolixus* usando sua bactéria simbiote *Rhodococcus rhodnii* (Beard et al. 2002). Uma primeira abordagem desta metodologia, que procurou alterar especificamente a aptidão do inseto, foi a modificação de cepas das bactérias *Escherichia coli* e *R. rhodnii* para induzir um sistema de RNA de interferência capaz de inibir a expressão de genes de função antioxidante do inseto, afetando o desenvolvimento e a fecundidade dos barbeiros *R. prolixus* tratados (Taracena et al. 2015).

Além da paratransgênese, também têm sido pesquisados métodos de controle biológico, usando-se certas cepas da bactéria *Wolbachia* principalmente para mosquitos *Aedes* e *Anopheles* (McMeniman et al. 2009; Moreira et al. 2009; Kambris et al. 2010). Esta bactéria é um endosimbiote celular transmitido maternamente e infecta cerca de 66% das espécies de artrópodes no mundo (Hilgenboecker et al. 2008). Pode-se utilizá-la como método de controle vetorial, seja diminuindo a população de vetores por incompatibilidade citoplasmática ou diminuindo o tempo de vida dos adultos ou até mesmo bloqueando diretamente o desenvolvimento dos patógenos transmitidos pelos vetores (Vírus dengue, Vírus Chikungunya e *Plasmodium* nos modelos estudados) (McGraw and O'Neill 2013). A aplicação destas metodologias exige um bom entendimento da interação hospedeiro-microbiota-patógeno, incluindo a distribuição da microbiota dentro do vetor, o padrão do processo de colonização e a diversidade filogenética e genômica da comunidade bacteriana.

3.3. Microbiota de Triatominae

O interesse pela microbiota do intestino começou muito cedo no estudo da biologia dos barbeiros, começando com a descrição de bactérias Gram-positivas no intestino do barbeiro *Rhodnius prolixus* (Duncan 1926). Posteriormente, numerosos estudos usando métodos de cultivo, microscopia e provas fisiológicos permitiram descrever um amplo número de gêneros de bactérias associadas ao intestino dos barbeiros, complementando-se nos últimos anos estes estudos com outros feitos com técnicas que não precisam de cultivo. Os resultados taxonômicos de estes estudos estão resumidos na Figura 2.

Para o gênero *Rhodnius*, os trabalhos pioneiros do biólogo britânico Vincent Wigglesworth, os quais estabeleceram o barbeiro *Rhodnius prolixus* como um importante modelo experimental para a fisiologia de insetos (Edwards 1998), identificaram uma espécie de Actinobacteria predominante nos cultivos de trato digestivo (Wigglesworth 1936), que mais tarde foi descrita taxonomicamente como *Rhodococcus rhodnii* (Goodfellow and Alderson 1977). Esta bactéria, que é transmitida dos insetos adultos para as ninfas por coprofagia, proporciona nutrientes dentro do intestino do inseto, especificamente a vitamina B, que é necessária para o seu desenvolvimento. Dessa forma, ninfas de *Rhodnius prolixus* sem simbiontes morrem prematuramente (Brecher and Wigglesworth 1944; Hill et al. 1976). Devido ao potencial uso da bactéria *Rhodococcus rhodnii* na transformação por paratransgênese, foi montado um rascunho de seu genoma, que pode fornecer informações úteis para posteriores estudos da relação hospedeiro-simbionte (Pachebat et al. 2013).

Outra espécie isolada de cultivo do intestino do barbeiro *Rhodnius prolixus* é a enterobactéria *Serratia marcescens*. Estudos experimentais mostram que a população desta bactéria aumenta aproximadamente 10.000 vezes após o inseto se alimentar, produzindo o metabólito secundário prodigiosina, o qual se tem proposto tem atividade tripanolítica, sendo o efeito dependente da cepa do *T. cruzi* que infecta o inseto (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012). Além das bactérias *R. rhodnii* e *S. marcescens*, outros taxa descritos através de

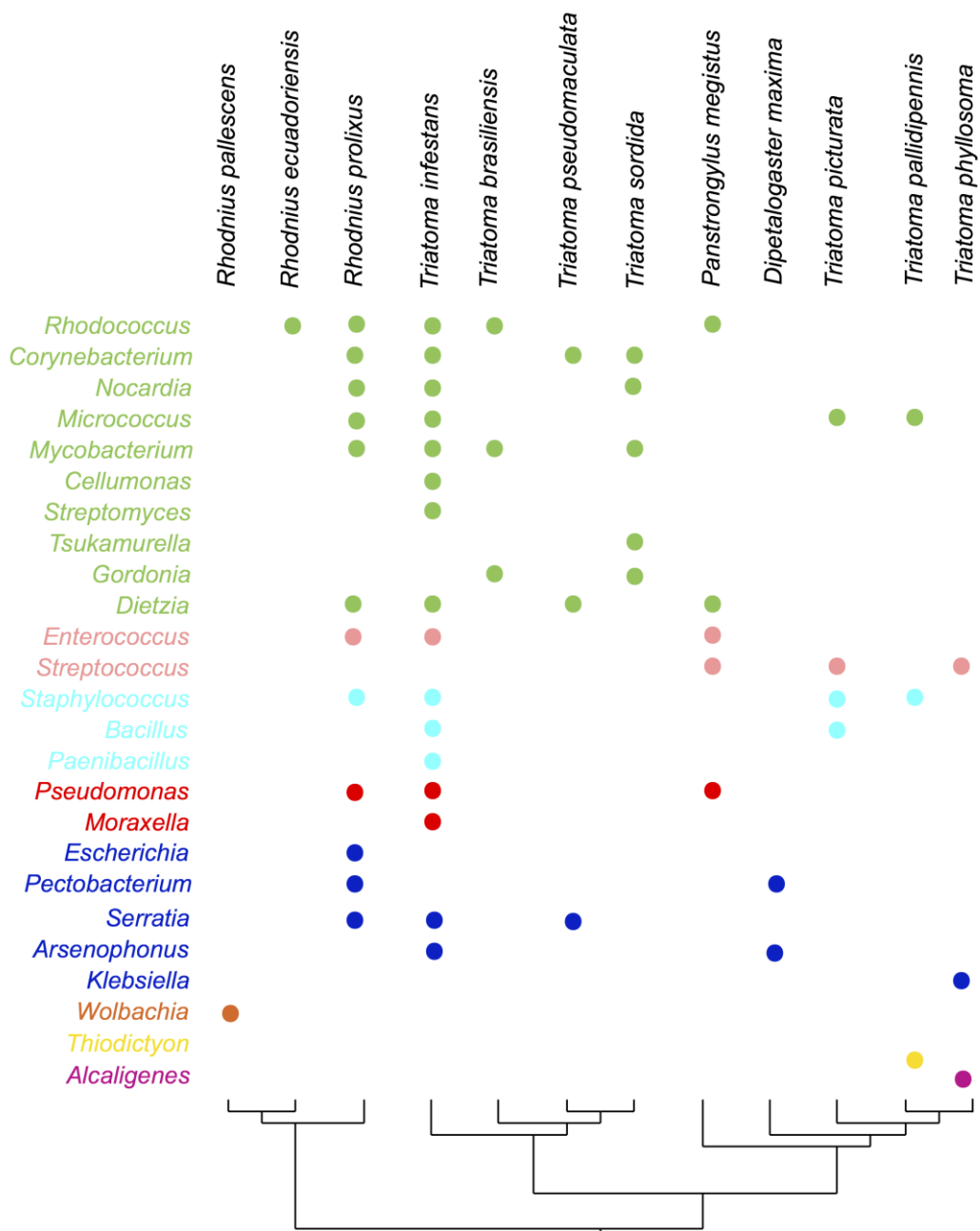


Figura 2. Filogenia das espécies de Triatominae com microbiota intestinal estudada, e a distribuição dos gêneros de bactérias encontrados. Cada ordem bacteriana é mostrada de uma cor diferente: Corynebacteriales (verde), Lactobacilles (cor-de-rosa), Bacillales (cyan), Pseudomonadales (vermelho), Enterobacteriales (azul), Rickettsiales (laranja), Chromatiales (amarelo) e Burkholderiales (fúcsia).

Fonte: Filogenia adaptada de Justi et al. (2014) e distribuição dos gêneros adaptados de Varela & Aparicio (1951), Eichler et al. (1996), Espino et al. (2009), Vallejo et al. (2009), Rodríguez et al. (2011), Da Mota et al. (2012) e Gumiel et al. (2015).

cultivo para *Rhodnius prolixus* estão listados em Vallejo et al. (2009), com os principais grupos de bactérias presentes sendo as actinobactérias e as enterobactérias.

Numa outra espécie do gênero *Rhodnius*, o *R. pallescens*, é descrito a presença da bactéria simbiote *Wolbachia*, não somente nas gônadas mas também nas glândulas salivares e no intestino. Esta rápida propagação, pode ser explicada pelos hábitos canibalescos e coprófagos dos barbeiros nas primeiras etapas do desenvolvimento (Espino et al. 2009). Dada a distribuição ubíqua de *Wolbachia* em insetos e seu uso potencial em controle biológico, é imprescindível avaliar sua presença em outras espécies de barbeiros.

A tribo Triatomini é o maior grupo da subfamília Triatominae, incluindo os gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*. Para o *Triatoma infestans*, uma das bactérias mais relevantes descritas é a enterobactéria *Candidatus Arsenophonus triatominarum*, localizada em amostras de tecido do intestino, hemolinfa, coração, gânglio neural e glândulas salivares (Hypsa and Dale 1997). O gênero *Arsenophonus* é um dos grupos de bactérias simbiotes de insetos mais amplamente distribuídos, possivelmente devido a transmissão horizontal. Assim como a *Wolbachia*, o *Arsenophonus* pode ser desde um simbiote parasito até um mutualista dependente do hospedeiro (Nováková et al. 2009). Outras bactérias descritas para o barbeiro *T. infestans* e outras espécies da tribo como *Panstrongylus megistus* estão descritas em Valera e Aparicio (1951) e Vallejo et al. (2009), também destacando-se a forte presença de actinobactérias e enterobactérias.

A maior parte destas bactérias conhecidas para Triatominae (resumidas na Figura 2), foram identificadas por métodos de cultivo, e um equívoco comum quanto aos microrganismos isolados em cultivo é pensar que eles representam as espécies numericamente dominantes e/ou funcionalmente significativas do ambiente de onde foram isolados. Na verdade, os microrganismos isolados a partir de métodos de cultivo raramente são numericamente

dominantes nas suas respectivas comunidades, tendo sido isolados em virtude de sua capacidade de formar colônias rapidamente em meios de cultura artificiais (Hugenholtz 2002).

Além da representatividade, outro problema das metodologias de cultivo, é que se é estimado que apenas 1% das espécies de bactérias têm a capacidade de crescer sob condições normais de laboratório. Este valor é calculado por comparação entre as contagens de bactérias em placas com as feitas diretamente ao microscópio a partir de amostras ambientais, cuja disparidade é chamada de "a grande anomalia da contagem de placas" (Hugenholtz 2002). Outra evidência adicional para a presença de *taxa* bacterianos não cultiváveis em laboratório advém de ferramentas de sequenciamento de DNA, que revelaram uma grande diversidade taxonômica até então desconhecida. Assim, a partir de 11 filos bacterianos descritos em 1987, o número de divisões de filos cresceu para pelo menos 85, com a maioria sem representantes cultiváveis (Stewart 2012).

A real diversidade de *taxa* bacterianos que habitam o sistema digestivo dos barbeiros, inclusive as espécies identificadas por cultivo, é ainda desconhecida. Somente com uma abordagem baseada em metodologias independentes de cultivo se poderia obter uma maior representatividade taxonômica. Levando isto em consideração, um primeiro estudo, baseado em amostras não cultivadas, utilizou a metodologia de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do gene ribossomal 16S usando insetos de colônia de laboratório (da Mota et al. 2012). Surpreendentemente, este estudo mostrou uma baixa diversidade da microbiota intestinal, dominada principalmente por uma ou duas espécies de bactérias para cada uma das espécies de barbeiros amostrados: *Rhodnius prolixus*, que tem como espécie dominante *Serratia sp.*; *Triatoma infestans* com *Arsenophonus sp.* e *Serratia sp.*; *Panstrongylus megistus* com *Arsenophonus sp.*; e *Dipetalogaster maximus* com *Candidatus Rohrkolberia cinguli* e *Serratia sp.* Outro resultado importante deste estudo foi a presença de *Wolbachia* em ninfas de uma espécie silvestre amazônica de *Rhodnius*.

Outro estudo que utilizou a metodologia DGGE (Gumiel et al. 2015) fez a comparação de indivíduos do barbeiro *T. brasiliensis* com hábito peridoméstico tanto de colônias de laboratório quanto de colônias de campo. No grupo dos insetos de colônias, foram encontradas diferenças na microbiota de acordo com o momento de fundação da colônia, com as mais recentes (de umas poucas semanas) possuindo uma microbiota dominada por *Serratia*, enquanto as mais velhas (de 3 a 5 anos) possuíam uma diminuta presença de *Serratia* e uma maior presença de *Arsenophonus*. Nos insetos de campo, como as espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, as bactérias *Serratia*, *Gordonia* e *Mycobacterium* foram os grupos mais dominantes, além de serem descritos em menores proporções os gêneros *Pantoea*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes*, *Corynebacterium*, *Dietzia* e *Rhodococcus*.

A chegada das tecnologias de sequenciamento em larga escala permitiu o desenvolvimento de novas abordagens para o estudo de comunidades microbianas, como o *DNA metabarcoding*. Esta técnica tem como objetivo identificar quais espécies estão presentes em uma amostra de DNA a partir da amplificação e sequenciamento de um código de barras de nucleotídeos (*barcoding*), que são sequências de um DNA marcador padrão como fornecedoras da identidade genética única para cada *taxa* em estudo (Mendoza et al. 2015). Para a aplicação desta técnica é preciso o uso de um marcador que seja capaz de discriminar entre os diferentes *taxa* de interesse, com as regiões hiper-variáveis do gene ribossomal 16S (16S rRNA) sendo o marcador padrão para estudos de Bactéria (Klindworth et al. 2013).

Além de estudar a microbiota intestinal dos barbeiros utilizando DGGE, o estudo de Gumiel *et al.* (2005) também avaliou a microbiota das espécies dos barbeiros *Triatoma brasiliensis* e *T. pseudomaculata* através de *metabarcoding* do 16S rRNA, utilizando a tecnologia de pirosequenciamento. O estudo de pirosequenciamento incluiu dois indivíduos por espécie. Para o barbeiro *T. brasiliensis* foram descritos 20 gêneros de bactérias, sendo os gêneros *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Serratia* os mais numerosos. Enquanto isso, no barbeiro *T. pseudomaculata* foram descritos 23 gêneros, com os mais representativos sendo *Corynebacterium*, *Dietzia* e *Serratia*. Estes resultados

mostram a vantagem do método de *metabarcoding* em relação ao DGGE por ter uma maior sensibilidade para detectar a diversidade microbiológica.

3.4. Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal de Triatominae

a) Cultivo dos insetos

A maior parte dos estudos da microbiota intestinal de barbeiros têm usado insetos criados em laboratório, o que a primeira vista poderia criar um viés no resultado. Para entender a possível influência do cultivo dos insetos sobre a composição da microbiota é preciso avaliar as descobertas feitas com outros organismos.

Por exemplo, trabalhos com a *Drosophila*, que é o modelo mais estudado de interação inseto-microbiota, tem mostrado que as bactérias da família Acetobacteraceae e da ordem Lactobacillales dominam a microbiota de moscas criadas em laboratório, enquanto que nos insetos silvestres há uma maior diversidade de ordens bacterianas, mais notavelmente a ordem Proteobacteria. Não está claro se a maior diversidade microbiana nas moscas silvestres reflete meramente um maior número de bactérias transientes no intestino devido a um aumento da exposição a bactérias ambientais, ou se elas formam associações estáveis com os insetos na natureza (Broderick and Lemaitre 2012). Além disso, estudos experimentais em laboratório com moscas axênicas, isto é sem seus simbioses *Acetobacter* e *Lactobacillus*, demonstram problemas no desenvolvimento e fisiologia das moscas (Lee and Brey 2013; Broderick et al. 2014).

Voltando ao caso dos Triatominae, um estudo que compara insetos de laboratório e silvestres encontrou, utilizando a abordagem DGGE, uma maior diversidade de bactérias em insetos silvestres comparativamente a insetos de laboratório, mas tanto insetos cultivados como silvestres possuíam uma microbiota composta principalmente por actinobactérias e enterobactérias (Gumiel et al. 2015). Além disso, experimentos com *Rhodnius prolixus* de laboratório axênicos também têm mostrado que os insetos precisam

da microbiota para o seu desenvolvimento (Vallejo et al. 2009). Estes resultados mostram que, ainda que no laboratório se possa perder parte da diversidade da microbiota dos barbeiros, esta ainda inclui grupos de bactérias essenciais para o desenvolvimento do inseto, ou seja, uma microbiota padrão.

b) Infecção com parasitas

Diferentes estudos têm avaliado o efeito de parasitas tripanossomatídeos sobre a microbiota de barbeiros. Por exemplo, o tripanossomatídeo entomopatogênico *Blastocrithidia triatoma* diminui o número de unidades de formação de colônias em barbeiros *Triatoma infestans* infectados experimentalmente (Eichler and Schaub 2002). A infecção experimental de *Trypanosoma rangeli*, outro parasita tripanossomatídeo entomopatogênico, no barbeiro *Rhodnius prolixus* diminuiu a presença da bactéria *Rhodococcus rhodnii* (Eichler and Schaub 2002). Outro estudo quantificando a composição da microbiota por pirosequenciamento encontrou modificações profundas na composição da microbiota do *R. prolixus* pela infecção experimental por *T. rangeli*, diminuindo a presença da famílias bacterianas Enterococcaceae e Mycobacteriaceae e aumentando da família Burkholderiaceae (Vieira et al. 2015).

A infecção experimental de barbeiros com *T. cruzi* afeta sua capacidade de resistir a inanição, mas não afeta o seu desenvolvimento ou taxa de mortalidade, sendo este parasita classificado como subpatogênico para o vetor. Por isso, os efeitos da infecção com *T. cruzi* sobre a microbiota são menos evidentes do que para os parasitas entomopatogênicos, embora os tripanossomatídeos provavelmente afetem a homeostasia do intestino, uma vez que uma diversidade maior de bactérias e fungos se desenvolvem no intestino de insetos infectados (Vallejo et al. 2009).

Um último exemplo da complexidade das interações microbiota-parasita é a bactéria *Serratia marcescens*, encontrada nos intestinos de *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. Como já foi mencionado anteriormente, esta bactéria tem atividade tripanolítica sobre certas cepas de *T. cruzi* (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012). Entretanto, em

barbeiros *R. prolixus* infectados experimentalmente com *Trypanosoma rangeli*, existe uma maior atividade antibacteriana contra *S. marcescens* do que no grupo controle não infectado, demonstrando que a infecção afeta a composição da microbiota através da resposta imunológica do inseto (Vieira et al. 2015)

c) *Modo de transmissão*

Em comparação com a quantidade de informação disponível para hemípteros fitófagos, são poucos os estudos que abordam diretamente o modo de transmissão da microbiota em Triatominae. Um primeiro estudo, focado na transmissão da bactéria *Rhodococcus rhodnii* no *Rhodnius prolixus*, encontrou que, embora as ninfas do primeiro estágio contenham as bactérias simbiotes, estas não se encontram em cultivos feitos de conteúdo do ovo, sendo sua transmissão de forma horizontal, principalmente pela coprofagia das ninfas sobre as fezes secas de outros indivíduos da população (Brecher and Wigglesworth 1944).

Um estudo posterior avaliando a presença de simbiotes em tecidos do barbeiro *Triatoma infestans* histologicamente identificou o simbiote *Arsenophonus* em tecidos de ovários e gônadas, mas não em ovócitos e espermátócitos, nem nas células nutridoras (Hypša 1993). Este estudo considerou que, diferentemente de outros insetos onde os ovos são infectados desde os primeiros estágios embrionários, no *T. infestans* ocorre uma transmissão vertical, porém depois de o ovo sair do ovário, e antes de chegar ao oviduto. Este modo de transmissão foi confirmado pela presença de bactérias no intestino do embrião antes da eclosão do ovo; os demais órgãos passam a estar infectados somente após a primeira alimentação da ninfa.

4. Objetivos

Em geral, os estudos já feitos sobre a microbiota intestinal de Triatominae tiveram uma abordagem principalmente descritiva. Por isso, como objetivo dentro do presente estudo, pretende-se não somente ampliar a descrição da microbiota a partir de técnicas de sequenciamento em larga escala de um fragmento do gene marcador 16S rRNA, mas também identificar os fatores que influenciam a composição da microbiota dos Triatominae. Estes fatores incluem a espécie do hospedeiro, tendo em conta a grande diversidade de espécies e gêneros no grupo; o status de infecção com o parasita *T. cruzi*, já que no intestino dos barbeiros acontece a interação tripanossomo-vetor e a replicação dos epimastigotos do parasito; e por último, o modo de transmissão da microbiota, um fator ainda não estudado amplamente neste grupo.

a) *Que taxas constituem a microbiota padrão de Triatominae?*

Na primeira parte do estudo, para ser feita a avaliação da variação da microbiota intestinal entre espécies de Triatominae, procurou-se definir quais *taxa* bacterianos podem ser considerados como a microbiota padrão do grupo, sendo estas as bactérias que acompanham o desenvolvimento normal e a fisiologia do inseto. Para conhecer esta microbiota padrão, que pode variar entre diferentes hospedeiros, foram analisadas, através do metabarcoding do gene ribossomal 16S usando sequenciamento massivo, intestinos de insetos de colônias de laboratório de 6 espécies de barbeiros: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sherlocki*, *T. juazeirensis* e *Panstrongylus megistus*, sendo a maioria delas previamente estudadas tanto por métodos de cultivo como por DGGE do gene ou no caso de *T. brasiliensis*, por pirosequenciamento do gene 16S.

De nossas espécies de análises, de acordo com a classificação descrita anteriormente dos barbeiros dada sua importância epidemiológica, *R. prolixus* e *T. infestans* são vetores primários, sendo considerados os principais vetores da doença de Chagas por serem espécies com grande número de populações domiciliadas. *T. brasiliensis* e *P. megistus* por sua vez são dois vetores emergentes que começaram a se domiciliar em localidades do

Brasil onde o *T. infestans* foi eliminado por programas de controle químico. Por último, *T. sherlocki* e *T. juazeirensis* são espécies principalmente silvestres pertencentes ao complexo de espécies de *T. brasiliensis*.

b) Como a microbiota de Triatominae muda com a infecção por T. cruzi?

Num segundo objetivo do estudo, para investigar o efeito da infecção com o parasito *T. cruzi* sobre a microbiota intestinal dos barbeiros, além das amostras utilizadas para estudar a microbiota padrão, foram avaliadas amostras de insetos desafiados experimentalmente contra o parasito, utilizando-se as mesmas seis espécies de barbeiros e indivíduos procedentes das mesmas colônias experimentais. O desafio foi feito, alimentando artificialmente o grupo de insetos com sangue contendo a cepa 0354 de *T. cruzi* isolada de indivíduos silvestres do barbeiro *T. brasiliensis*.

b) Como é transmitida a microbiota de Triatominae?

Finalmente, devido às escassas informações sobre as rotas de transmissão (vertical ou horizontal) da microbiota dos triatomíneos e sua presença em outros tecidos além do intestino, foi testado um possível rota de transmissão vertical, avaliada a microbiota presente em gônadas (ovários e testículos) para as seis espécies, nos dois grupos experimentais, desafiados e não desafiados.

Com este trabalho pretende-se aprimorar a caracterização da microbiota de um grupo de insetos de relevância médica, os Triatominae, a partir de uma nova abordagem metodológica. Dessa maneira, será permitido descrever mais *taxa* bacterianos associados ao grupo, além dos descritos com os métodos de cultura e o DGGE. Com este novo conhecimento, visa-se criar uma referência da microbiota padrão que possa ser utilizada para estudos comparativos com a microbiota de outras espécies de triatomíneos em diferentes estágios e diferentes taxas de infecção. Além disso, com base neste novo conhecimento, será possível melhorar a base teórica para os métodos de controle dos insetos baseados em agentes biológicos.

5. Manuscript: Alterations in the core gut microbiota of triatomine bugs in response to *Trypanosoma cruzi* infection

Short title: Triatomine core gut microbiota responses to *T. cruzi*.

Target Journal: PLOS Neglected Tropical Diseases

Sebastián Díaz¹, Nathália Correia², Jane Costa², Karen L. Haag^{1,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author

E-mail: karen.haag@ufrgs.br (KLH)

5.1. Abstract

Background:

Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) known in Brasil as “barbeiros” are the vectors of flagellate *Trypanosoma cruzi* the causative agent of the Chagas disease. The study of triatomine gut microbiota has gained relevance in the last years due to its possible role in interfering with vector competence. However, for its prospective use in control strategies, a good understanding of the vector-microbiota-parasite interactions is required, including the microbiota composition, mode of transmission, and response to *T. cruzi* infection.

Methodology/Principal Findings:

Using high throughput sequencing of 16S rRNA, we sampled colony-reared insects of six species, comparing between experimental *T. cruzi*-challenged and non-challenged individuals, as well as gut and gonad tissues. The triatomine gut microbiota has a low intra-individual diversity, with each bacterial species being either horizontally or both horizontally and vertically transmissible, and is highly variable in its taxonomic composition within the same host species. Nevertheless, bacterial species of the core microbiota are mostly restricted to Enterobacteriales and Corynebacteriales. *T. cruzi*-challenge significantly influences microbiota composition, but seems to be influenced by vector susceptibility.

Conclusions/Significance:

Our results show that, although highly variable between species and individuals, key taxonomic groups define the triatomine core gut microbiota, and that the fate of *T. cruzi* infection may be related with variations in gut microbial composition. This latter

observation is discussed in the light of vector immune responses. We suggest avenues through which new research on triatomine physiological regulation of gut microbiota could be conducted in order to evaluate its subsequent response to *T. cruzi* and be used as indicator of infection susceptibility.

5.2. Author Summary

Interaction of vector insects and their gut microbiota can influence vector competence (i.e., the ability to acquire, maintain and transmit pathogens). In this study, we analyze the composition of the gut microbiota of triatomine bugs, vectors of Chagas disease, and how it is affected by the infection with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of the disease. We sampled the gut microbiota of six different species, comparing *T. cruzi* experimentally challenged and non-challenged insects. We identified a core gut microbiota defined by key taxonomic groups despite variation between species and individuals. Because we detect major changes in the core microbiota composition of vector species with non-detectable parasite growth, we suspect that insect physiological regulation of its own symbiont microbiota has a potential for parasite killing. This study provides new insights into the interaction between vectors and their microbiota, a relationship of great interest for its potential application in vector control.

5.3. Introduction

Microorganisms living in the midgut of insect vectors have an important role in modulating vector competence, that is., the ability to acquire, maintain and transmit pathogens. Microorganisms may interfere with vector competence either by direct interaction with parasites and competition for resources in the gut, or indirectly by inducing vector antiparasitic activity and humoral immune defense factors [1–4]. Furthermore, some symbiont bacteria can be genetically modified to express antiparasitic molecules or proteins that reduce insect fitness, as shown for *Anopheles* mosquitoes and *Glossina* tsetse flies in which transformed *Pantoea* and *Sodalis* symbionts, respectively, were introduced [5,6].

Triatomine bugs are vectors of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas disease in humans and can infect more than 150 mammal species [7]. The insect acquires the protozoan by feeding on human or animal blood that contains circulating parasites that multiply and differentiate in the insect midgut. The mammal host acquires the parasite when an infected insect takes a blood meal and releases infective parasite forms with its feces near to the bite wound. Up to 7 million people are estimated to be infected worldwide, mostly in Latin America [8], but in later years *T. cruzi* became a public health concern also in the United States, mostly by the human immigration from areas of endemicity in Latin America [9,10]. It has been suggested that transmission might be controlled through the vector microbiota, since some strains of *Serratia marcescens*, a common symbiont of various triatomine species, have trypanolytic activity on specific *T.*

cruzi strains [11]. Methods for genetically modifying bacterial symbionts to effectively decrease parasite transmission or the development and fecundity of triatomine bugs have been established [12,13].

However, the efficacy of such methods in the real world relies on the identification of key factors that influence the establishment of a successful *T. cruzi* infection on one hand, as well as the bacterial colonization of the insect gut microbiota on the other hand. A successful trypanosomatid infection can reduce or alter the triatomine gut microbiota composition [14–16]. Moreover, the ability of some *T. cruzi* strains to develop in certain vector species depends on the intrinsic qualities of either parasite or insect vector, including the host gut microbiota [17]. This conclusion is driven by a series of observations, such as the tendency of local insect vectors to be more susceptible to strains of *T. cruzi* from the same geographic areas [18], and the variation of responses of the gut microbiota to the immune challenge with different *T. cruzi* strains [11,14]. We think that the triatomine-microbiota-parasite interaction could be further explored and understood using a study unit called “core microbiota”, i.e., the organisms in common across microbial assemblages hypothesized to play a key role in ecosystem function within a habitat [19]. Previous studies using non-culturing based methods [20,21], offer some glimpses of the characteristics of triatomine gut microbiota: (i) it is primarily composed by the bacterial orders Enterobacteriales (*Serratia*, *Arsenophonus*, *Pectobacterium*) and Corynebacteriales (*Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*); (ii) the diversity in each host is low, with only one or few genera being dominant; (iii) guts of lab-reared insects, unlike natural populations, are selective to some degree according to each triatomine genera, losing part of the original microbiota diversity; and (iv) some bacterial

genera appear to be specific to certain triatomine hosts, i.e. *Rhodococcus* with *Rhodnius* or *Arsenophonus* with *Triatoma*. Another important feature of the triatomine gut microbiota is that, given the absence of specialized cells to harbor symbiotic bacteria. (bacteriocytes), the triatomine symbionts live freely in the mesenteron lumen and are hypothetically acquired through the consumption of feces of conspecifics or by cannibalism [22]. Therefore, defining a species-specific core gut microbiota remains a challenge, considering the variability of factors that may influence its establishment.

In this study, we analyze the composition of the Triatomine bug gut microbiota using metabarcoding of the 16S rRNA gene of colony-reared individuals of six representative species of the genera *Triatoma*, *Panstrongylus* and *Rhodnius*. The common and unique bacterial groups of different individuals and species are identified. The effect of infection with *T. cruzi* on the vector microbiota is evaluated, and its possible routes of transmission are discussed.

5.4. Methods

Insect sampling and dissection

We analyzed the microbiota of six species of triatomine bugs belonging to three different genera: *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, and *T. sherlocki*, the last three belonging to the so called “Brasiliensis” subcomplex of the *Triatoma* genus. Insects were obtained from colonies maintained at the Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz, IOC) in Rio de Janeiro. For each species, a group of insects were fed with 10 mL of rabbit decomplexed blood resuspended in liver infusion

tryptose (LIT) medium containing 1.5×10^7 epimastigote forms of *T. cruzi* per milliliter. We used the *T. cruzi* strain 0354, belonging to the *T. cruzi* Discrete Typing Unit I (DTU I), isolated from *T. brasiliensis* insects naturally infected from the municipality of Caico (RN, Brazil). In addition, we sampled the gut microbiota of one *P. megistus*, positive for *T. cruzi* as confirmed by microscopy, collected in a peridomestic area in the municipality of Parobé (RS, Brazil).

Dissection was performed for *T. cruzi*-challenged insects one week after the treatment. We used sterile ultrafine scissors and forceps to open the ventral side of specimens from the last thoracic segment to the rectum, and separating the midgut (stomach and intestine) and gonads. The organs were separated in individual sterile tubes and washed twice with 1 ml Phosphate-buffered saline (PBS) before DNA extraction. All procedures performed in laboratory aseptic conditions.

DNA extraction and sequencing

DNA from gut and gonads was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol, with a previous lysozyme treatment to break the cell walls of gram-positive bacteria. DNA concentrations were determined on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

The quality of bacterial DNA was tested using an initial amplification of the 16S rRNA gene, with primers Bakt_341F (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3') and Bakt_805R (5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3') [23], which generate a fragment of 464 bp

corresponding to the V3-V4 regions of the *E. coli* 16S rRNA gene. In addition, positive infections with *T. cruzi* were diagnosed by PCR of a 180 bp fragment of the parasite satellite DNA using primers TcZ1 and TcZ2 [24].

We selected 84 tissue samples (including the natural infected *P. megistus*) to be used for a final 16S PCR. Samples were selected according to the quality of bacterial DNA in the initial screening. The PCR was performed in triplicates, using modified versions of the original 16S rRNA primers, in which an individual tag barcode of 8 nt was added to the 5' end. PCR reactions were performed in a total volume of 25 μ L containing 2 μ L of total DNA (200ng on average), 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1.25 U of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), and 0.4 mM of each primer. We controlled for DNA contamination by performing negative PCR reactions with 2 μ l of sterile water or with 2 μ l of the eluate of a DNeasy column that went through the kit protocol but no tissue was added. PCR included an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 20 cycles of 94°C denaturation for 30 sec, 55°C annealing for 30 sec (with a touchdown of 0.5°C every cycle) and 72°C extension for 20 sec, and another 15 cycles with an annealing temperature of 45°C, with a final extension step at 72°C for 10 min.

PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gels, and the remaining amplicon volume was purified using PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final products were pooled and 2x300 paired-end sequenced on an Illumina MiSeq flowcell using the Illumina MiSeq Reagent Kit Version3 (Illumina, San Diego, CA, USA) at Fasteris facilities (Geneva, Switzerland).

Sequence pre-processing

Sequencing reads were pre-processed using Mothur v. 1.36.1 [25]. Forward and reverse paired ended reads merged and assigned to their respective replicate according to the tag barcodes. Sequences shorter than 250bp, containing ambiguous bases, with homopolymer stretches longer than 15 bases or having mismatches in primer sequences were discarded. Non-bacterial sequences were removed by performing a preliminary classification using the SILVA v119 nr database [26]. Chimeric sequences were removed with Mothur's implementation of UCHIME [27].

A final dataset was obtained in which singleton sequences as well as replicates with a number of sequences equal or smaller than the highest number of sequences obtained for negative controls (=1,000 sequences) were discarded. Non-singleton sequences from two or more of the remaining replicates of the same sample were pooled. Finally, Operational Taxonomic Units (OTUs) were identified at 97% sequence similarity using the nearest neighbor option, and classified with a confidence threshold of 80% with the same SILVA database.

Alpha and Beta diversity analyses

Rarefaction curves and alpha-diversity estimators for each individual host, i.e., sample coverage (Good's coverage), richness (Chao1 index), and diversity (Shannon and Inverse Simpson index), were obtained with Mothur. Mann-Whitney tests were used to evaluate the chance that a random sampling would result in differences between alpha-diversity means as far apart as those observed in our samples. Using the Vegan package [28]

implemented in R, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) [29], was calculated to test the null hypothesis of no difference in composition of bacterial communities, using Bray-Curtis distances and 9,999 randomizations. Finally, to analyze the influence of environmental variables, i.e., host species, sex of the insect, tissue and *T. cruzi*-immune challenge, on bacterial community composition we carried out a redundancy analysis (RDA). As strongly skewed OTU distributions can bias the ordinations, we evaluated different transformation approaches in a detrended canonical correspondence analysis (DCA) to find one that meets the linearity assumption of RDA. Accordingly, we found that the Hellinger transformation was the best model of community composition, with the longest axis being equal to 3.23. To identify qualitatively the environmental sources of variation that most significantly contributed to the variation in bacterial community composition, a Monte Carlo permutation test and a variance partitioning analysis were used based on the RDA output.

Phylogenetic analyses

For selected OTUs corresponding to taxa previously reported as triatomine bacterial symbionts, we made phylogenetic reconstructions of 16S sequences to determinate their relationship with other known bacteria. Using the SINA aligner [30], we searched for the 50 most related sequences in the SILVA SSU database for each OTU. A final alignment was made with MAFFT v. 7.187 [31], and phylogenetic analyses were performed with FastTree v. 2.1.8 [32] using the GTR model. Local support values were estimated with the Shimodaira-Hasegawa test based on 1,000 resamplings.

5.5. Results

Description of triatomine bacterial communities

After sequence pre-processing, a final dataset with 70 samples (plus the field-collected *T. cruzi*-infected *P. megistus* female) belonging to four major groups was obtained (Table 1 and Table S1). The six triatomine bug species are represented, with at least one individual per sample type. Thirteen samples are from insects that showed positive amplification for the *T. cruzi* diagnostic PCR, as confirmed by agarose gel electrophoresis: seven from gut tissues and six from gonads tissues (Table 1). In all tested individuals from three vector species, i.e., *R. prolixus*, *T. infestans* and *T. juazeirensis*, the parasite was not detected in any tissue at day 10 post infection.

Table 1 – Number of microbiota samples analyzed in our study. Number of insects showing positive *T. cruzi* infection at 10 days post-challenge are shown in parenthesis. Ch=challenged; NCh=Non-challenged.

Vector species	Sex	Gut		Gonads	
		Ch (+)	NCh	Ch (+)	NCh
<i>P. megistus</i>	Female	2 (1)	1	2 (1)	1
	Male	2 (1)	2	1 (0)	1
<i>R. prolixus</i>	Female	2 (0)	2	2 (0)	2
	Male	1 (0)	2	1 (0)	2

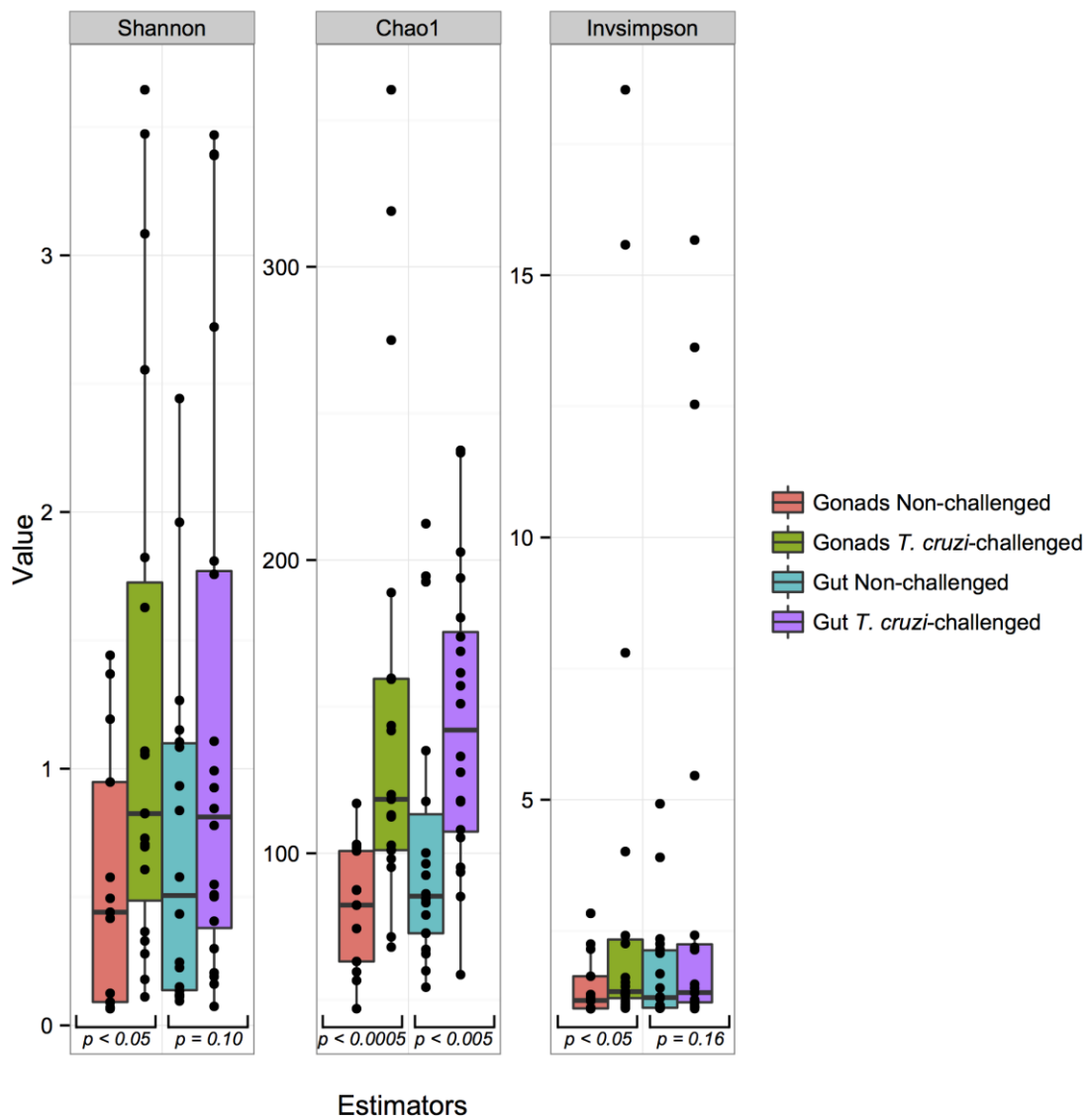
<i>T. infestans</i>	Female	2 (0)	2	2 (0)	1
	Male	2 (0)	2	1 (0)	0
<i>T. brasiliensis</i>	Female	1 (1)	1	2 (2)	1
	Male	2 (2)	2	1 (1)	1
<i>T. juazeirensis</i>	Female	0 (0)	1	0 (0)	1
	Male	2 (0)	0	3 (0)	0
<i>T. sherlocki</i>	Female	2 (2)	1	2 (2)	1
	Male	2 (0)	2	2 (0)	2
<i>P. megistus*</i>	Female	1 (1)	0	0 (0)	0
Total		21(8)	18	19(6)	13

* Field-collected naturally infected insect

The bacterial 16S rRNA amplicons of the lab-reared insects, yielded a total of 1,464,421 sequences (mean \pm SD = 20,920 \pm 10,580 per sample), that were binned into 1,071 OTUs (mean \pm SD = 105 \pm 58 per sample, Table S2). Good's coverage estimators (Table S1) are close to 1 –i.e., individual samples reflect very well the entire sampled population– and the rarefaction curves (Figure S1) where some don't reach saturation, indicate an overestimation of low coverage OTUs in the samples. In fact, the 11 OTUs that have more than 10,000 sequences represent 92.8% of the amplicons, and only 34 OTUs have an abundance of more than 0.1% of the total sampling (>1,468 sequences). *T. cruzi*-challenged insects showed more diverse bacterial communities (Figure 1). The difference

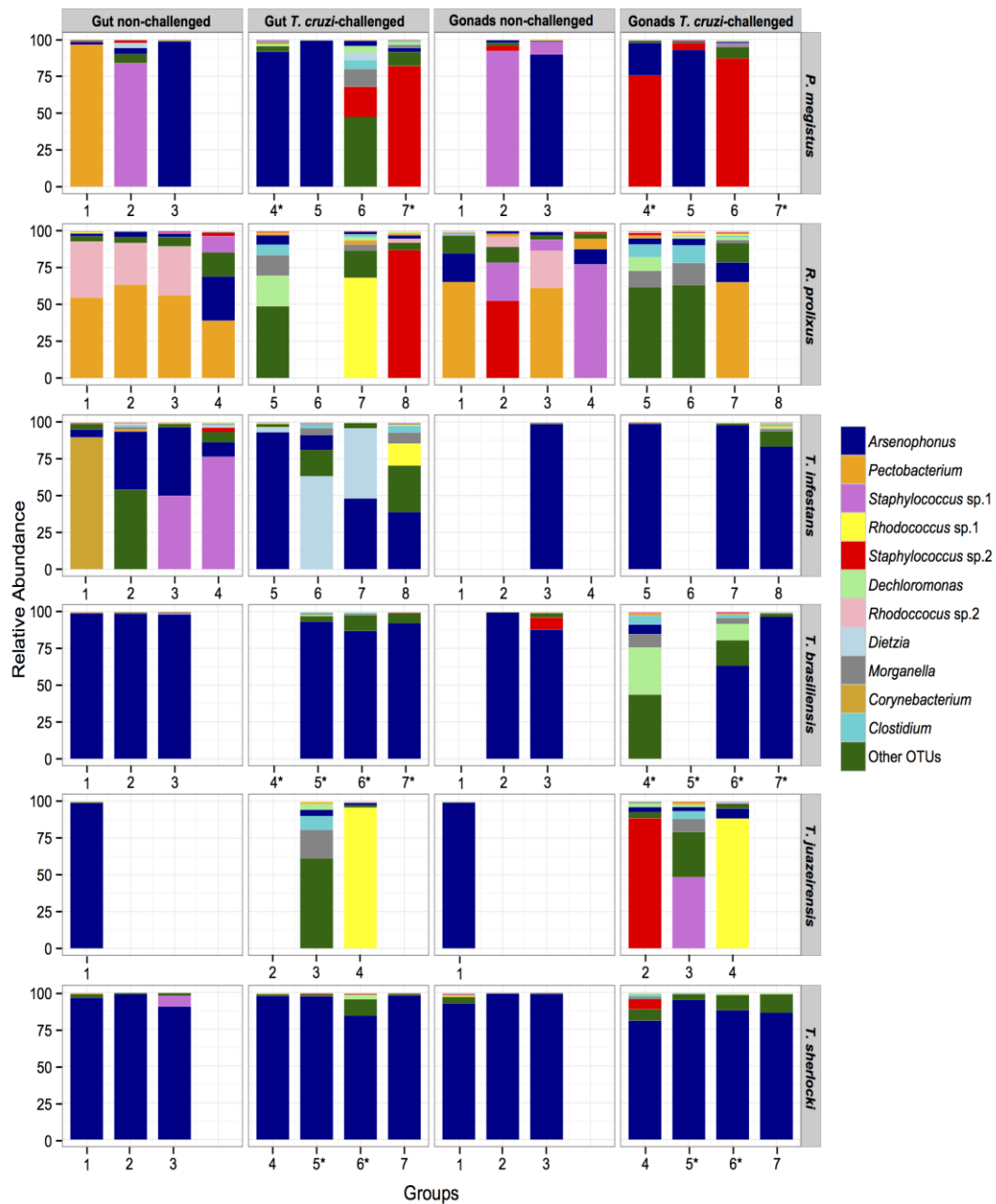
between challenged and non-challenged insects was statistically significant for the three indices estimated from gonads and for the Chao1 index estimated from guts.

Figure 1 - Estimators of microbiota alpha-diversity. Boxplots show estimator distributions among individual samples that were grouped according to vector tissue and to the experimental infection challenge with *T. cruzi*. P-values represent the result of Mann-Whitney tests conducted between paired samples (*T. cruzi*-challenged x Non-challenged).



To analyze the distribution of bacterial taxa in gut samples we focus on the 11 richest OTUs (>10,000 sequences) pooling the remaining OTUs in a single group (Figure 2). Bacteria belonging to the orders Enterobacteriales (*Arsenophonus Pectobacterium*) and Corynebacteriales (*Rhodococcus*, *Dietzia*, *Corynebacterium*) are predominant in our triatominae samples, and a surprising abundance of Bacillales –represented by the two abundant *Staphylococcus* OTUs– is found in some samples of different species (Figure S2). In the non-challenged gut samples, the bacterial community composition is defined by host species, i.e., for *R. prolixus* the dominant OTUs are *Pectobacterium* and *Rhodococcus* sp.2, for the *T. brasiliensis* subcomplex the dominant bacterium is *Arsenophonus*, while *T. infestans* and *P. megistus* show great variation across samples. The *T. cruzi* naturally infected *P. megistus* collected in the field shows one of the most complex gut communities of our study, not having any dominant OTU, with only the five more abundant representing the 30.9% of the sampling: *Dietzia* (9.5%), *Corynebacterium* (7.6%), *Arsenophonus* (6.0%), *Rubrobacter* (5.1%) and *Escherichia* (2.7%).

Figure 2 - Relative abundance of OTUs in each triatomine bug sample. Abundance of the 11 richest OTUs and the pooled remaining OTUs is shown in different colors. Numbers correspond to an individual sample code (see Table S1 for details). Asterisks indicate individuals that showed *T. cruzi* infection at day 10 post-feeding with epimastigote-containing blood.



The gut microbiota from *T. cruzi*-challenged insects shows three patterns: (i) in the triatomine species where *T. cruzi* remained undetectable after 10 days post challenge, i.e. *R. prolixus*, *T. infestans* and *T. juazeirensis* (see Table 1), there is a higher frequency of OTUs, such as *Staphylococcus* sp. 2, *Morganella*, *Clostridium*, *Dietzia* and *Rhodococcus* sp.1, that are less common in the guts of non-challenged insects from the respective species (see Figure 2); (ii) in *Triatoma* species where infection is detected at day 10 post challenge, i.e., *T. brasiliensis* and *T. sherlocki*, a more stable bacterial composition is observed between challenged and non-challenged insects, with a strong dominance of *Arsenophonus*; and (iii) in *P. megistus*, the microbiota composition of challenged samples is as variable as in non-challenged samples. In the gonads, bacterial communities are composed by the same OTUs found in the guts, though showing differences in their abundance. Likewise, no differences were observed in the OTUs found in the guts and gonads of males and females from all six triatomine species (data not shown).

Factors influencing the structure of bacterial communities

The bacterial microbiota structure significantly differs across host species and is affected upon *T. cruzi*-infection in both the gut and gonads (Table 2). The PERMANOVA shows that host species is the most significant variable influencing the bacterial community composition, since each host is often associated to a few specific bacterial OTUs. At the species level, a significant dissimilarity was detected between *T. cruzi*-challenged and non-challenged *R. prolixus*, which did not show any positive infection at day 10, but not in the remaining vector species; *T. brasiliensis* also showed significant dissimilarity in the

bacterial community composition of gut and gonads. Vector gender was not a significant variable for any dataset (data not shown).

Table 2 – Factors influencing microbiota composition by PERMANOVA. Tests were performed with all samples or with samples separated according to vector tissue and species. df=degrees of freedom; SS=sum of squares; *F*=permuted *F* statistic; *P*=probability value.

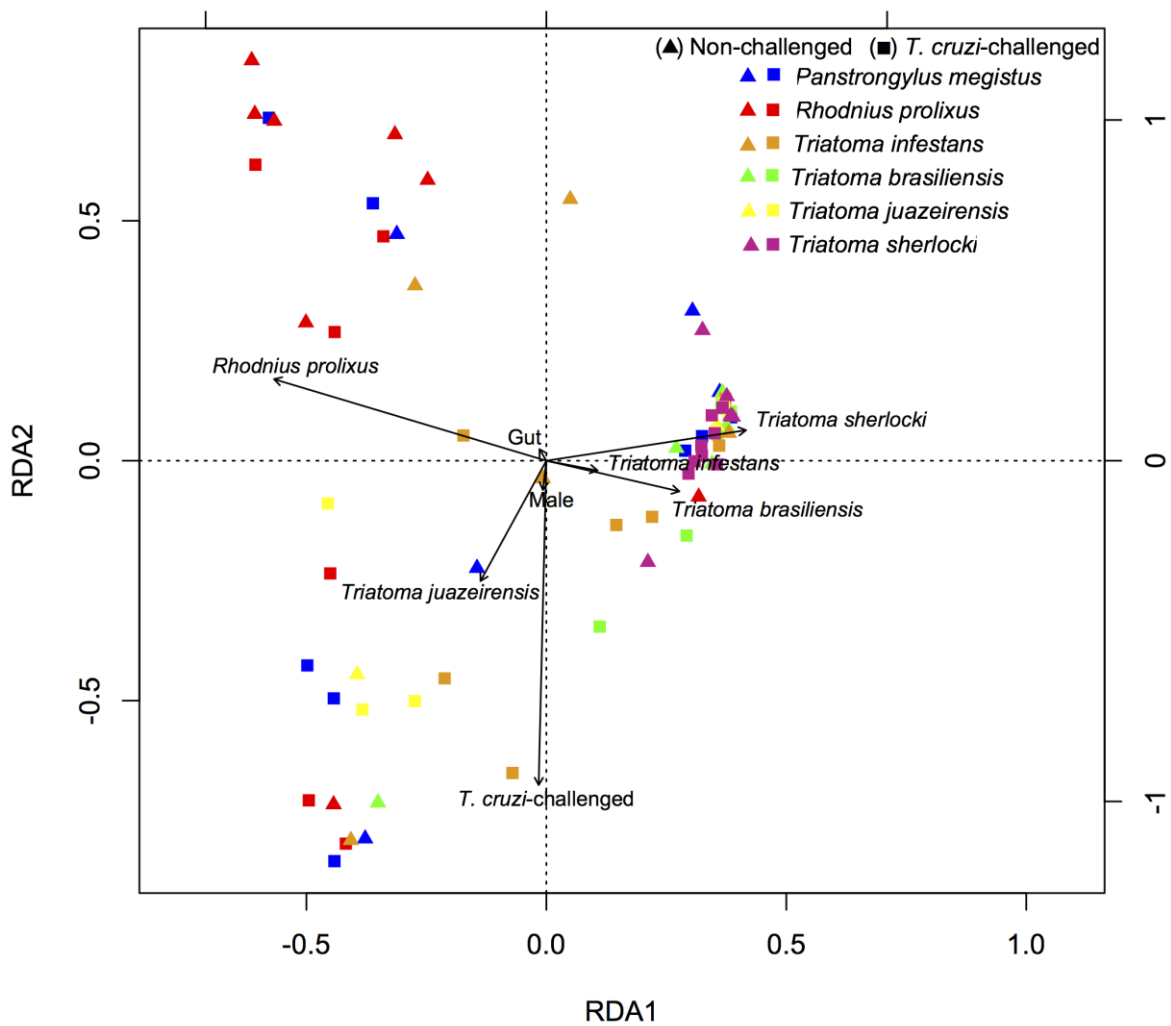
Data	Source of Variation	df	SS	<i>F</i>	<i>P</i>
All samples	Host Species	5	5.459	4.711	0.000***
	Tissue	1	0.189	0.814	0.544
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	1.016	4.384	0.001**
Gut samples	Host Species	5	3.572	3.152	0.000***
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.715	3.153	0.013*
Gonad samples	Host Species	5	3.323	2.936	0.000***
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.558	2.465	0.034*
<i>P. megistus</i>	Tissue	1	0.144	0.470	0.804
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.619	2.018	0.091
<i>R. prolixus</i>	Tissue	1	0.309	1.132	0.334
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.983	3.600	0.005**
<i>T. infestans</i>	Tissue	1	0.517	2.178	0.061

	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.349	1.469	0.166
<i>T. brasiliensis</i>	Tissue	1	0.310	3.087	0.035*
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.158	1.579	0.247
<i>T. juazeirensis</i>	Tissue	1	0.167	0.445	0.821
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.787	2.100	0.093
<i>T. sherlocki</i>	Tissue	1	0.168	3.189	0.074
	<i>T. cruzi</i> -Challenge	1	0.043	0.819	0.416

*** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$.

RDA (Figure 3), shows that the variables host species, sex, tissue and *T. cruzi*-infection challenge explain 36.1% of total variance of community composition (constrained variance), and a Monte Carlo permutation test (n=199) indicates that host species (F = 5.4, P = 0.005) and *T. cruzi*-infection challenge (F = 5.8, P = 0.005) are the most significant variables. A variance partitioning of the significant variables shows that host species and infection challenge explain, respectively, 28.8% and 6.3% of the variance. The limited explanatory power of the significant variables in RDA is because our variables are not quantitative, making them more difficult to fit in a linear model, nevertheless these results are consistent with the PERMANOVA output.

Figure 3 – Redundancy analysis of bacterial community structure in triatomine bug samples. Independent variables are host species, insect gender, tissue and *T. cruzi*-infection challenge. Arrow length indicates the strength of correlation between the variable and the ordination scores.



Phylogenetic analyses of bacterial symbiont 16S sequences

Some of the most abundant OTUs found in our samples such as *Staphylococcus*, *Morganella*, *Dietzia* and *Clostridium*, can be found in diverse environments, linking their presence in our data to the colony room environment. Therefore, we focus our phylogenetic analyses on the three genera that were previously described as important members of triatomine gut microbiota, i.e., *Arsenophonus*, *Pectobacterium* and *Rhodococcus*,

The *Arsenophonus* genus, which is dominant in our *Triatoma* spp. samples, belongs to Enterobacteriales, and is mainly an insect-associated genus. The *Arsenophonus* 16S sequence that we found is related to previous reported sequences of symbionts of the Triatomini tribe (Figure S3), i.e., *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Meccus* and *Eratyrus*. Interestingly, their closest relatives are endosymbionts of other hematophagous arthropods, namely *Dermacentor* ticks and *Basilica* bat fly.

The 16S sequence of *Pectobacterium*, another Enterobacteriales that is dominant in some samples of the three insect genera analyzed in our study, forms a clade with sequences isolated from triatomine bugs (Figure S4), i.e., *R. prolixus* and *Dipetalogaster maximus*, and is more related to phytophagous Hemiptera than with phytopathogenic- and *Cimex* bedbug-related clades. For *Rhodococcus*, a Corynebacteriales, we found two OTUs, i.e. *Rhodococcus* sp1, which is found in challenged but non infected *R. prolixus* and *Triatoma* spp, and *Rhodococcus* sp2, only found in non-challenged *R. prolixus*. These OTUs fall in separate clusters of our phylogeny (Figure S5), with *Rhodococcus* sp1 being related to bacteria found in the soil, and *Rhodococcus* sp2 clustering with other *Rhodnius*

endosymbiont sequences. The latter is yet the only known *Rhodococcus* clade associated with insects.

5.6. Discussion

Low intra-individual, but high inter-individual variation in microbiota composition.

The gut microbiota of lab-reared triatomine bugs analyzed in our study is characterized by low diversity, being dominated by one or few bacterial genera. Surprisingly, the taxonomic composition of these gut bacterial communities differs from previous results obtained with non-culture- [20,21] and culture-based methods (reviewed in great extension by Vallejo *et al.* [33]). Although previous analyses also detected inter-individual variation in microbiota taxonomic composition, major differences in the presence and absence of bacterial genera are found in our study. A significant absence in our samples is *Serratia*, a bacterium that has trypanolytic activity on specific *T. cruzi* strains [11], which could be explained by the already described loss of this symbiont in laboratory conditions [21]. Nevertheless, the presence of some genera such as *Rhodococcus* and *Arsenophonus* is consistent with previous reports.

Unfortunately, data on the gut microbiota of field-collected triatomine bugs are scarce, but overall, they show higher complexity than lab-reared insects, possibly due to a higher chance of contact with soil bacteria [21]. The microbiota of our field-collected *P. megistus* female is unique in having the highest species richness and a higher evenness of genera abundance, with a lower dominance of the most common bacteria of lab-reared insects such as *Dietzia*, *Arsenophonus* and *Corynebacterium*. Similarly, previous studies on

bacterial 16S pyrosequencing of peridomestic *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* show a low diversity microbiota from which paired samples were discordant in bacterial community composition [21]. The widespread insect symbiont *Wolbachia*, which was previously recorded in the gut samples of sylvatic *Rhodnius* and lab-reared *R. pallescens* [20,34], was not found in our samples.

The triatomine microbiota is both horizontally and vertically transmitted.

The first studies on triatomine gut microbiota transmission hypothesized a horizontal route for the symbiont *Rhodococcus* in *R. prolixus* via coprophagy of dry excreta [35]. Trypanosomatid parasites are supposed to use the same route (as well as cannibalism) for being horizontally transmitted within triatomine vector populations [36,37]. The low abundance of *Rhodococcus* in the gonads of our *Rhodnius* samples supports the hypothesis of horizontal transmission. In contrast, *Arsenophonus* is highly abundant in the gonads of *Triatoma* spp and *P. megistus*, concordant with previous histological evidence [38]. Unlike other insects where the eggs become infected in early embryonic stages, it is known that in *T. infestans* a vertical trans-ovarial transmission of *Arsenophonus* occurs after eggs leave the ovary, but before reaching the oviduct, an observation that has been confirmed by the presence of bacteria in the gut of the embryo prior to egg hatching [38]. *Pectobacterium* (named in [20] as *Candidatus Rohrkolberia cinguli*) was previously found in *R. prolixus*, *P. megistus* and *Dipetalogaster maxima*. It is related to intracellular symbionts of bedbugs [39] and lygaeoid bugs [40,41]. In these groups, the symbiont is hosted in a bacteriome and is trans-ovarially transmitted. Our results indicate that this form of transmission is possible in triatomine bugs, although a high abundance of *Pectobacterium* was only detected in two

of four *R. prolixus* gonad samples and none in *P. megistus*, consistent with results obtained for bedbugs, where this bacterium is considered a facultative rather than an obligate symbiont [42].

Taken together with previous studies, our data demonstrate that: (i) the triatomine gut microbiota has a low intra-individual diversity, (ii) is either horizontally or vertically transmissible, and (iii) is highly variable in its taxonomic composition within the same host species. Similar to other insects such as *Drosophila* [43,44] and mosquitoes [45], these transient microbiotas are determined by factors that prevent a stable microbial colonization such as diet, behavior, molt events and short life cycles [46,47].

Is there a core triatomine gut microbiota?

The high intra-specific variation in taxonomic composition is not necessarily in conflict with the idea of a core triatomine gut microbiota. For example, human gut microbiota shows extensive variation between host individuals in lower bacterial taxonomic ranks, but the phyla Firmicutes and Bacteroidetes constitute the vast majority of bacteria, suggesting that a core microbiome at the functional rather than at the taxonomic level, is more significant [48,49]. Both for lab-reared and field-captured triatomine, most of the described bacteria fall into two orders, Enterobacteriales and Corynebacteriales. Enterobacteriales are known for having intimate relationships with insects, giving rise to a variety of symbiotic forms, from facultative to obligate mutualist symbionts [50,51]. *Arsenophonus* and *Pectobacterium*, which seem to have a trans-ovarial transmission, both belong to this group. Corynebacteriales are found in diverse environments, notably in the soil ecosystem

[52], suggesting an environmental mode of transmission, which is the case of *Rhodococcus*. We believe that the gut environmental conditions –involving pH, oxygen levels and nutrient availability– act as selective filters allowing mostly but not exclusively the colonization of Enterobacteriales and Corynebacteriales, with groups such as Bacillales (*Staphylococcus*) or Rhodocyclales (*Dechloromonas*) being less frequent.

Gut microbiota response to infection

Over 60 of the approximate 140 species of triatomine bugs have been found naturally infected or have been experimentally infected with *T. cruzi*, suggesting that probably all species are potential vectors of this parasite. However, different experimental combinations of triatomine species and/or parasite strains show that susceptibility is variable [53], with a tendency of local vectors to be more susceptible to parasite strains of *T. cruzi* from the same geographic areas [18]. In our experimental infection setting, we used a *T. cruzi* strain isolated from the parental population of our *T. brasiliensis* samples. It is therefore not surprising to find that all challenged *T. brasiliensis* individuals developed detectable infection by molecular diagnostic. The infection was also detected in two of four samples of the closely related *T. sherlocki* and in the same number of *P. megistus*.

According to our statistical analyses of the microbiota variation (RDA and PERMANOVA), *T. cruzi*-challenge is the second more important factor in determinate microbiota composition after host species, although this influence seems to be relative to the species-specific infection susceptibility, i.e., resistant species (with non-detectable infection, such as *R. prolixus*) show differences in their microbiota profile after the

immune challenge, whereas the susceptible species (such as *T. brasiliensis* and *T. sherlocki*) may remain virtually undisturbed in their microbiota composition. This pattern can be understood in light of the tripartite vector-parasite-microbiota interaction. At 10 days post feeding trypomastigotes transform into replicative epimastigotes in the stomach of the insect (dilated anterior part of the midgut), and in subsequent weeks they migrate to the intestine (posterior midgut) and rectum [17,54]. This temporal window is not only important for parasite survival but also for the insect homeostasis. After blood ingestion the gut microbiota populations increase dramatically probably due to iron and protein richness of the blood meal [11,14]. This increase in the number of bacteria in turn triggers the over-expression of anti-microbial molecules such as lysozymes, lectins and defensins, the latter two involved in the Imd immunological pathway [55–58]. Lectins and molecules produced by proliferating bacteria such as *Serratia* had trypanolytic activity *in vitro* [59]. In *Anopheles* mosquitoes, the activation of Imd as a consequence of proliferation of gut commensal bacteria can modulate the infection with *Plasmodium*, reducing parasite load [60,61]. This homeostatic microbiota-induced immune response –including Imd, Toll and JNK pathways– may not only directly regulate microbial abundance but also indirectly interfere with the capacity of specific parasite strains to develop on the vector host.

A proposed hypothesis argues that *T. cruzi* positively modulates the immune response increasing antibacterial activity, consequently reducing microbial population [14]. Moreover, in Imd-knockdown insects, in which there is an uncontrolled increase of bacterial populations, *T. cruzi* levels are not higher than in controls at seven and fourteen days post-infection, suggesting that *T. cruzi* is capable of active evasion or tolerance mechanisms against vector immune pathways [55]. It is possible that *T. cruzi* immune

evasion is obtained by negatively modulating the immune response disrupting other critical pathways. An elegant example of this kind of mechanism is the *Plasmodium falciparum* evasion of mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis [62,63]. As gut resident microbiota stimulate basal levels of insect immune responses that homeostatically regulate bacteria density and gut epithelium renewal [64,65], the disruption of these pathways may not only decrease parasite killing but could also indirectly prevent an alteration of the microbiota. Unfortunately, the focus of our study on qualitative –rather than quantitative– differences of bacterial communities does not allow us to test these hypotheses. Qualitative changes in microbiota composition possibly related with immune activation [58] were also reported for *R. prolixus* and *T. infestans* infected with entomopathogenic *Trypanosoma rangeli* and *Blastocrithidia triatomae* respectively [15,16]. Whether the immune response against pathogenic trypanosomatids is similar or not to the one that impedes a successful *T. cruzi* infection –altering microbiota composition– as we have seen in our study, whereas the unaltered microbiota of infected insects reflects the disruption of critical immune pathways needs to be further tested.

In the last decade, different suggestions have been made regarding the use of the gut microbiota trypanolytic activity for inhibiting the development *T. cruzi* in triatomine bugs. Accumulating evidence indicates that, given the unstable nature of the triatomine gut microbiota, other factors parasite genetic diversity as well as the physiological and immunological conditions of the vector– should be taken into account. Moreover, we consider that the immune evasion mechanisms used by the parasite, and its capacity to indirectly control bacterial gut populations and insect homeostasis, is a critical step to

determine the fate of infection, and should be a direction for conducting further research on the vector-parasite-microbiota interaction.

5.7. Acknowledgments

We are grateful to Sarah Urbano for her laboratory assistance, to Dr. José Artur Bogo Chies as well as his research group for providing us laboratory space, and to Msc. Fernanda de Mello do FEEPPS/IPB-Lacen for providing us the field-collected sample. We also thank Dr. Carla Martins Lopes for introducing us to the world of metabarcoding.

5.8. References

1. Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology*. 2005;21: 568–572. doi:10.1016/j.pt.2005.09.011
2. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*. 2004;49: 71–92. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416
3. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 307–310. doi:10.1016/j.chom.2011.09.006
4. Weiss B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol*. 2011;27: 514–522. doi:10.1016/j.pt.2011.05.001
5. Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109: 12734–12739. doi:10.1073/pnas.1204158109
6. Aksoy S, Weiss B, Attardo G. Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness. In: Aksoy S, editor. *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease*. New York: Springer; 2008. pp. 35–48.
7. Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán PE, Solari A. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77: 647–653.

8. World Health Organization (2010) Chagas disease (American trypanosomiasis): Fact Sheet No 340.
9. Montgomery SP, Starr MC, Canteley PT, Edwards MS, Meymandi SK. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90: 814–818. doi: 10.4269/ajtmh.13-0726.
10. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24: 655–681. doi: 10.1128/CMR.00005-11.
11. Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol.* 2004;107: 89–96. doi:10.1016/j.exppara.2004.04.007
12. Taracena ML, Oliveira PL, Almendares O, Umaña C, Lowenberger C, Dotson EM, et al. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. *PLoS Negl Trop Dis.* Public Library of Science; 2015;9: e0003358. doi: 10.1371/journal.pntd.0003358.
13. Beard C Ben, Cordon-Rosales C, Durvasula R V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol.* 2002;47: 123–141. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145144
14. Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One.* 2012;7: e36591. doi: 10.1371/journal.pone.0036591.
15. Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasit Vectors.* 2015;8: 135. doi: 10.1186/s13071-015-0736-2.
16. Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol.* 2002;100: 17–27. doi:10.1006/expr.2001.4653.
17. Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol.* 2007;53: 11–21. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.10.006.
18. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJ de C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease: 4-The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saude Publica.* 1990;24: 165–177.
19. Shade A, Handelsman J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol.* 2012;14: 4–12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.

20. da Mota FF, Marinho LP, de Moreira CJC, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, et al. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001631.
21. Gumiel M, da Mota FF, de Sousa Rizzo V, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM, et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors.* 2015;8: 245. doi: 10.1186/s13071-015-0836-z.
22. Otálora-Luna F, Pérez-Sánchez AJ, Sandoval C, Aldana E. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Rev Chil Hist Nat.* 2015;88: 4. doi:10.1186/s40693-014-0032-0.
23. Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal.* 2011;5: 1571–1579. doi:10.1038/ismej.2011.41
24. Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992;30: 2864–2868.
25. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75: 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
26. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;41: D590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
27. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 2011;27: 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
28. Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci.* 2003;14: 927–930. doi:10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x
29. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001;26: 32–46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
30. Pruesse E, Oliver F, Editor A, Wren J. SINA: accurate high throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics.* 2012; 1–8. doi:10.1093/bioinformatics/bts252
31. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30: 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
32. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood

- trees for large alignments. PLoS One. 2010;5: e9490
doi:10.1371/journal.pone.0009490
33. Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop. 2009;110: 137–147. doi:10.1016/j.actatropica.2008.10.001
 34. Espino CI, Gómez T, González G, do Santos MFB, Solano J, Sousa O, et al. Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). Appl Environ Microbiol. 2009;75: 547–550. doi:10.1128/AEM.01665-08
 35. Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology. 1944;35: 220–224. doi: 10.1017/S0031182000021648
 36. Schaub GA, Böker CA, Jensen C, Reduth D. Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between triatomines. J Protozool;36: 171–175. doi: 10.1111/j.1550-7408.1989.tb01067.x
 37. Schaub GA. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. Acta Trop. 1988;45: 11–19.
 38. Hypša V. Endocytobionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. J Invertebr Pathol. 1993;61: 32–38. doi:10.1006/jipa.1993.1006.
 39. Hypša V, Aksoy S. Phylogenetic characterization of two transovarially transmitted endosymbionts of the bedbug *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). Insect Mol Biol. 1997;6: 301–304. doi: 10.1046/j.1365-2583.1997.00178.x.
 40. Kuechler SM, Dettner K, Kehl S. Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). Appl Environ Microbiol. 2011;77: 2869–2876. doi: 10.1128/AEM.02983-10.
 41. Kuechler SM, Renz P, Dettner K, Kehl S. Diversity of symbiotic organs and bacterial endosymbionts of lygaeoid bugs of the families Blissidae and Lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeoidea). Appl Environ Microbiol. 2012;78: 2648–2659. doi: 10.1128/AEM.07191-11.
 42. Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng X-Y, Fukatsu T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. Proc Natl Acad Sci National Acad Sciences; 2010;107: 769–774. doi: 10.1073/pnas.0911476107.
 43. Wong ACN, Chaston JM, Douglas AE. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. ISME J. 2013;7: 1922–1932. doi: 10.1038/ismej.2013.86.
 44. Broderick NA, Lemaitre B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. Gut Microbes. 2012;3: 307–321. doi: 10.4161/gmic.19896
 45. Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in

- the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*. 2013;6: 146. doi:10.1186/1756-3305-6-146.
46. Douglas AE. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 359–367. doi:10.1016/j.chom.2011.09.001.
 47. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013. 37: 699–735. doi:10.1111/1574-6976.12025
 48. Husník F, Chrudimský T, Hypša V. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (γ -Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biol*. 2011;9: 87. doi:10.1186/1741-7007-9-87.
 49. Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet*. 2008;42: 165–190. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130119.
 50. Goodfellow M, Jones AL. Corynebacteriales ord. nov. In: Goodfellow M, Kampfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, vol 5, part B, 2nd edition*. New York: Springer. 2012. pp: 235–243.
 51. Schaub GA. Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv In Insect Phys*. 2009;37: 177–242. doi:10.1016/S0065-2806(09)37004-6.
 52. Kollien A, Schaub G. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol today*. 2000;16: 381–387. doi:10.1016/S0169-4758(00)01724-5.
 53. Mesquita RD, Vionette-Amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro FA, Minx P, et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences*; 2015;112: 14936–14941. doi: 10.1073/pnas.1506226112.
 54. Araújo CAC, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM, Schaub GA. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36: 547–560. doi:10.1016/j.ibmb.2006.04.003.
 55. Ribeiro JMC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO, et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8 :e2594. doi: 10.1371/journal.pntd.0002594.
 56. Vieira CS, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, et al. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors*. 2014;7: 232. doi: 10.1186/1756-3305-7-232.
 57. Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 2010;26: 499–

505. doi:10.1016/j.pt.2010.07.003.
58. Meister S, Agianian B, Turlure F, Relógio A, Morlais I, Kafatos FC, et al. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. PLoS Pathog. 2009;5: e1000542. doi: 10.1371/journal.ppat.1000542
 59. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathog. 2009;5: e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
 60. Molina-Cruz A, Canepa GE, Kamath N, Pavlovic N V, Mu J, Ramphul UN, et al. *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2015;112: 15178–15183. doi:10.1073/pnas.1520426112.
 61. Ramphul UN, Garver LS, Molina-Cruz A, Canepa GE, Barillas-Mury C. *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2015;112: 1273–1280. doi: 10.1073/pnas.1423586112.
 62. Buchon N, Broderick NA, Lemaitre B. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. Nat Rev Microbiol. 2013;11: 615–626. doi: 10.1038/nrmicro3074.
 63. Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S, Lemaitre B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. Genes Dev. 2009;23: 2333–2344. doi:10.1101/gad.1827009.

5.9. Supporting Information

Table S1 – Triatomine bugs sample information.

Specie	Sample Code	Tissue	<i>T. cruzi</i> -challenge	Sex	<i>T. cruzi</i> positive	Location	Collecting date	# replicates	# sequences	# OTUs	Coverage	Shannon index	Chao1 index	Invsimpson index	
<i>Panstrongylus megistus</i>	Pmeg-1	Gut	Non-challenged	Male	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	21874	57	0.999	0.225	72.813	1.076	
	Pmeg-2	Gut	Non-challenged	Female	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	2	14858	78	0.998	0.837	92.526	1.412	
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	26574	84	0.999	0.441	102.056	1.173	
	Pmeg-3	Gut	Non-challenged	Male	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	35899	56	1.000	0.118	65.714	1.030	
		Gonads	Non-challenged	Male	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	29277	51	0.999	0.417	59.571	1.230	
	Pmeg-4	Gut	Challenged	Female	+	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	21171	95	0.999	0.549	117.556	1.188	
		Gonads	Challenged	Female	+	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	2	24233	65	1.000	0.705	68.000	1.611	
	Pmeg-5	Gut	Challenged	Male	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	2	30352	47	0.999	0.074	85.250	1.017	
		Gonads	Challenged	Male	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	41114	78	0.999	0.365	95.250	1.158	
	Pmeg-6	Gut	Challenged	Female	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	2	9453	181	0.997	3.394	193.878	13.624	
		Gonads	Challenged	Female	-	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	2	6652	66	0.998	0.825	71.500	1.316	
	Pmeg-7	Gut	Challenged	Male	+	Jacarepaguá (RJ)	01/10/1987	3	18658	150	0.998	1.107	180.370	1.483	
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Rpro-1	Gut	Non-challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	12788	76	0.999	1.104	86.200	2.251
			Gonads	Non-challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	2	4024	57	0.997	1.369	63.111	2.152
Rpro-2		Gut	Non-challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	32532	111	0.999	1.084	135.000	2.073	
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	22513	96	0.999	1.442	117.000	2.834	
Rpro-3		Gut	Non-challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	17504	106	0.998	1.266	117.700	2.347	
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	2	10605	67	0.998	1.193	82.300	2.249	

<i>Triatoma infestans</i>	Rpro-4	Gut	Non-challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	19997	175	0.998	1.960	192.575	3.901
		Gonads	Non-challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	15508	85	0.998	0.948	100.789	1.635
	Rpro-5	Gut	Challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	2	9305	219	0.995	3.389	237.429	12.536
		Gonads	Challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	12195	247	0.995	3.473	275.000	15.580
	Rpro-6	Gonads	Challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	25185	340	0.998	3.645	360.369	18.535
	Rpro-7	Gut	Challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	10690	118	0.998	1.757	127.625	2.138
		Gonads	Challenged	Female	-	Salvador (BA)	10/02/1988	2	6483	88	0.997	1.628	101.125	2.258
	Rpro-8	Gut	Challenged	Male	-	Salvador (BA)	10/02/1988	3	27062	130	0.998	0.779	161.538	1.324
	Tinf-1	Gut	Non-challenged	Male	-	Paraíba	15/10/1987	2	16091	96	0.999	0.578	100.136	1.242
	Tinf-2	Gut	Non-challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	9394	181	0.995	2.442	212.410	4.923
	Tinf-3	Gut	Non-challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	16849	70	0.999	0.933	83.125	2.148
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	37666	59	0.999	0.125	82.333	1.032
	Tinf-4	Gut	Non-challenged	Male	-	Paraíba	15/10/1987	3	16081	137	0.997	1.151	194.500	1.682
	Tinf-5	Gut	Challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	24512	80	0.999	0.406	93.588	1.154
		Gonads	Challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	39387	81	0.999	0.111	98.105	1.026
	Tinf-6	Gut	Challenged	Male	-	Paraíba	15/10/1987	3	8369	120	0.997	1.809	133.043	2.417
Tinf-7	Gut	Challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	36940	120	0.999	0.992	173.813	2.185	
	Gonads	Challenged	Female	-	Paraíba	15/10/1987	3	39788	96	0.999	0.179	112.435	1.044	
Tinf-8	Gut	Challenged	Male	-	Paraíba	15/10/1987	3	22043	215	0.998	2.721	236.579	5.459	
	Gonads	Challenged	Male	-	Paraíba	15/10/1987	3	9928	116	0.997	1.069	141.833	1.442	
<i>Triatoma brasiliensis</i>	Tbra-1	Gut	Non-challenged	Male	-	Caicó (RN)	12/05/2011	3	21479	43	0.999	0.111	54.333	1.029
	Tbra-2	Gut	Non-challenged	Female	-	Caicó (RN)	12/05/2011	3	26982	72	0.999	0.133	78.955	1.032
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Caicó (RN)	12/05/2011	3	19602	42	0.999	0.070	56.615	1.016
	Tbra-3	Gut	Non-challenged	Male	-	Caicó (RN)	12/05/2011	2	19876	55	0.999	0.150	67.214	1.040
		Gonads	Non-challenged	Male	-	Caicó (RN)	12/05/2011	3	15385	79	0.999	0.577	87.400	1.287

<i>Triatoma juazeirensis</i>	Tbra-4	Gonads	Challenged	Female	+	Caicó (RN)	12/05/2011	3	16763	288	0.996	3.084	319.000	7.802
	Tbra-5	Gut	Challenged	Male	+	Caicó (RN)	12/05/2011	3	28592	141	0.999	0.501	168.857	1.152
		Gonads	Challenged	Male	+	Caicó (RN)	12/05/2011	3	6156	124	0.995	1.823	143.556	2.411
	Tbra-6	Gut	Challenged	Male	+	Caicó (RN)	12/05/2011	3	24252	142	0.998	0.845	202.714	1.323
	Tbra-7	Gut	Challenged	Female	+	Caicó (RN)	12/05/2011	3	20639	97	0.999	0.509	108.040	1.181
		Gonads	Challenged	Female	+	Caicó (RN)	12/05/2011	2	16299	82	0.998	0.279	113.059	1.077
	Tjua-1	Gut	Non-challenged	Female	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	3	15646	50	0.998	0.118	96.429	1.029
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	3	51883	74	0.999	0.091	103.000	1.021
	Tjua-2	Gonads	Challenged	Male	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	3	26047	139	0.999	0.696	159.323	1.276
	Tjua-3	Gut	Challenged	Male	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	2	4932	139	0.994	3.469	157.125	15.670
		Gonads	Challenged	Male	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	2	14347	182	0.998	2.554	188.900	4.012
	Tjua-4	Gut	Challenged	Male	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	3	48263	104	0.999	0.299	118.000	1.093
		Gonads	Challenged	Male	-	Juazeiro (BA)	01/12/2007	2	17642	90	0.999	0.607	101.000	1.277
	<i>Triatoma sherlocki</i>	Tshe-1	Gut	Non-challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	16049	62	0.999	0.246	72.688
		Gonads	Non-challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	2	7434	70	0.998	0.495	74.333	1.164
Tshe-2		Gut	Non-challenged	Female	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	30690	46	0.999	0.095	59.909	1.025
		Gonads	Non-challenged	Female	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	18258	32	0.999	0.065	47.000	1.016
Tshe-3		Gut	Non-challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	2	30310	75	0.999	0.434	84.545	1.214
		Gonads	Non-challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	24323	58	0.999	0.090	87.545	1.021
Tshe-4		Gut	Challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	34582	84	0.999	0.190	105.368	1.050
		Gonads	Challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	2	8120	102	0.997	1.054	120.000	1.520
Tshe-5		Gut	Challenged	Female	+	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	34467	74	0.999	0.205	95.231	1.056
		Gonads	Challenged	Female	+	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	18549	81	0.998	0.329	102.750	1.109
Tshe-6		Gonads	Challenged	Female	+	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	18634	126	0.998	0.729	159.682	1.292
		Gut	Challenged	Female	+	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	20104	135	0.998	0.926	151.000	1.410

	Tshe-7	Gut	Challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	2	11285	45	0.998	0.161	58.600	1.042	
		Gonads	Challenged	Male	-	Gentio do Ouro (BA)	12/08/2010	3	13277	112	0.998	0.827	118.417	1.342	
*Additional field-collected sample															
	<i>Panstrongylus megistus</i>	Pmeg-8	Gut	Naturally infected	Female	+	Parobé (RS)	18/03/2014	2	3965	256	0.998	4.441	256.560	35.846

Table S2 – Bacterial OTUs information. (First 100 OTUs)

OTU Label	# sequences	Taxonomy
OTU00001	886224	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Arsenophonus(100);
OTU00002	85037	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Pectobacterium(100);
OTU00003	93634	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Staphylococcaceae(100);Staphylococcus(100);
OTU00004	74377	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Nocardiaceae(100);Rhodococcus(100);
OTU00005	108258	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Staphylococcaceae(100);Staphylococcus(100);
OTU00006	14451	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);Dechloromonas(100);
OTU00007	26007	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Nocardiaceae(99);Rhodococcus(99);
OTU00008	5274	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Proteus(100);
OTU00009	3045	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Lactobacillales(100);Enterococcaceae(100);Vagococcus(100);
OTU00010	26311	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Dietziaceae(100);Dietzia(100);
OTU00011	2606	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Microbacteriaceae(100);Leucobacter(100);
OTU00012	1409	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Rubrobacteria(100);Rubrobacteriales(100);Rubrobacteriaceae(100);Rubrobacter(100);
OTU00013	3579	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(96);
OTU00014	3282	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
OTU00015	2402	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
OTU00016	4887	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Providencia(99);
OTU00017	17780	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Morganella(100);
OTU00018	2100	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Brevibacteriaceae(100);Brevibacterium(100);
OTU00019	3692	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Brucellaceae(100);Pseudochrobactrum(92);
OTU00020	7503	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Escherichia-Shigella(100);
OTU00021	4632	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Rhizobiaceae(99);Rhizobium(99);
OTU00022	862	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Staphylococcaceae(100);Staphylococcus(100);
OTU00023	2079	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Alteromonadales(100);Shewanellaceae(100);Shewanella(100);
OTU00024	759	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(78);
OTU00025	5014	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
OTU00026	2436	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(92);
OTU00027	528	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Microbacteriaceae(100);unclassified(100);
OTU00028	1697	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylobacteriaceae(100);Methylobacterium(100);
OTU00029	2423	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Bradyrhizobiaceae(100);Bradyrhizobium(94);
OTU00030	365	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(100);
OTU00031	1974	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Brucellaceae(100);unclassified(93);
OTU00032	14708	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Corynebacteriaceae(100);Corynebacterium(100);
OTU00033	310	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(99);

OTU000 34	11555	Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);Clostridiaceae_1(100);Clostridium_sensu_stricto_5(100);
OTU000 35	1319	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Burkholderia(100);
OTU000 36	2429	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Aeromonadales(100);Aeromonadaceae(100);Aeromonas(100);
OTU000 37	434	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Arsenophonus(100);
OTU000 38	440	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);unclassified(64);unclassified(64);
OTU000 39	2202	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(99);Sphingomonas(99);
OTU000 40	2437	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Oceanospirillales(100);Halomonadaceae(100);Halomonas(100);
OTU000 41	668	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
OTU000 42	1132	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Microbacteriaceae(100);Leifsonia(100);
OTU000 43	477	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Acinetobacter(100);
OTU000 44	1758	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);unclassified(100);
OTU000 45	434	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Pectobacterium(65);
OTU000 46	168	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(52);
OTU000 47	707	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Corynebacteriaceae(100);Corynebacterium(100);
OTU000 48	2752	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Lactobacillales(100);Streptococcaceae(100);Streptococcus(100);
OTU000 49	410	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);unclassified(98);unclassified(98);unclassified(98);
OTU000 50	955	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Corynebacteriales_Incertae_Sedis(100);Tomitella(100);
OTU000 51	403	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(90);
OTU000 52	141	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(54);
OTU000 53	520	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Acinetobacter(100);
OTU000 54	549	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Dietziaceae(100);Dietzia(100);
OTU000 55	160	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Arsenophonus(56);
OTU000 56	131	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);unclassified(100);
OTU000 57	100	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Staphylococcaceae(96);Staphylococcus(96);
OTU000 58	2202	Bacteria(100);Bacteroidetes(100);Bacteroidia(100);Bacteroidales(100);Porphyromonadaceae(100);Dysgonomonas(100);
OTU000 59	411	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Corynebacteriaceae(100);Corynebacterium(100);
OTU000 60	971	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
OTU000 61	160	Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Staphylococcaceae(84);Staphylococcus(84);
OTU000 62	145	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Arsenophonus(100);
OTU000 63	182	Bacteria(100);unclassified(69);unclassified(69);unclassified(69);unclassified(69);unclassified(69);
OTU000 64	507	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Psychrobacter(100);
OTU000 65	149	Bacteria(100);unclassified(52);unclassified(52);unclassified(52);unclassified(52);unclassified(52);
OTU000 66	113	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Corynebacteriaceae(100);Corynebacterium(100);
OTU000 67	214	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacteriales(100);Caulobacteraceae(100);Pseudomonas(90);
OTU000 68	190	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Alcaligenaceae(100);Pseudomonas(100);
OTU000 69	162	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Micrococcaceae(100);unclassified(88);

OTU000 70	563	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);Brevundimonas(100);
OTU000 71	214	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(99);Oxalobacteraceae(99);Massilia(98);
OTU000 72	99	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(70);
OTU000 73	149	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);Janthinobacterium(99);
OTU000 74	160	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Arsenophonus(100);
OTU000 75	141	Bacteria(100);Proteobacteria(100);unclassified(92);unclassified(92);unclassified(92);unclassified(92);
OTU000 76	311	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Yersinia(100);
OTU000 77	152	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);unclassified(100);unclassified(100);
OTU000 78	114	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Intrasporangiaceae(100);unclassified(56);
OTU000 79	81	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(84);Sphingomonas(84);
OTU000 80	130	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Xanthomonadaceae(100);Stenotrophomonas(100);
OTU000 81	104	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);Devosia(96);
OTU000 82	54	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);unclassified(86);unclassified(86);unclassified(86);
OTU000 83	53	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);unclassified(93);
OTU000 84	58	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);unclassified(64);unclassified(64);
OTU000 85	351	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylobacteriaceae(100);Methylobacterium(100);
OTU000 86	193	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Nocardiaceae(93);Rhodococcus(70);
OTU000 87	960	Bacteria(100);Bacteroidetes(100);Flavobacteriia(100);Flavobacteriales(100);Flavobacteriaceae(100);Myroides(100);
OTU000 88	135	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);Dietziaceae(100);Dietzia(100);
OTU000 89	689	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);Urburulla(100);
OTU000 90	214	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Phyllobacteriaceae(100);unclassified(100);
OTU000 91	188	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodobacterales(100);Rhodobacteraceae(100);Paracoccus(99);
OTU000 92	176	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(99);Novosphingobium(95);
OTU000 93	45	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Deiftia(69);
OTU000 94	98	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Micrococcales(100);Microbacteriaceae(100);unclassified(100);
OTU000 95	288	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Enterobacteriales(100);Enterobacteriaceae(100);Pectobacterium(76);
OTU000 96	188	Bacteria(100);Actinobacteria(100);Actinobacteria(100);Corynebacteriales(100);unclassified(100);unclassified(100);
OTU000 97	51	Bacteria(100);Proteobacteria(100);unclassified(95);unclassified(95);unclassified(95);unclassified(95);
OTU000 98	81	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Comamonas(75);
OTU000 99	62	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);unclassified(89);
OTU001 00	239	Bacteria(100);Proteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Alcaligenaceae(100);Alcaligenes(100);

Figure S1 – Rarefaction curves per species.

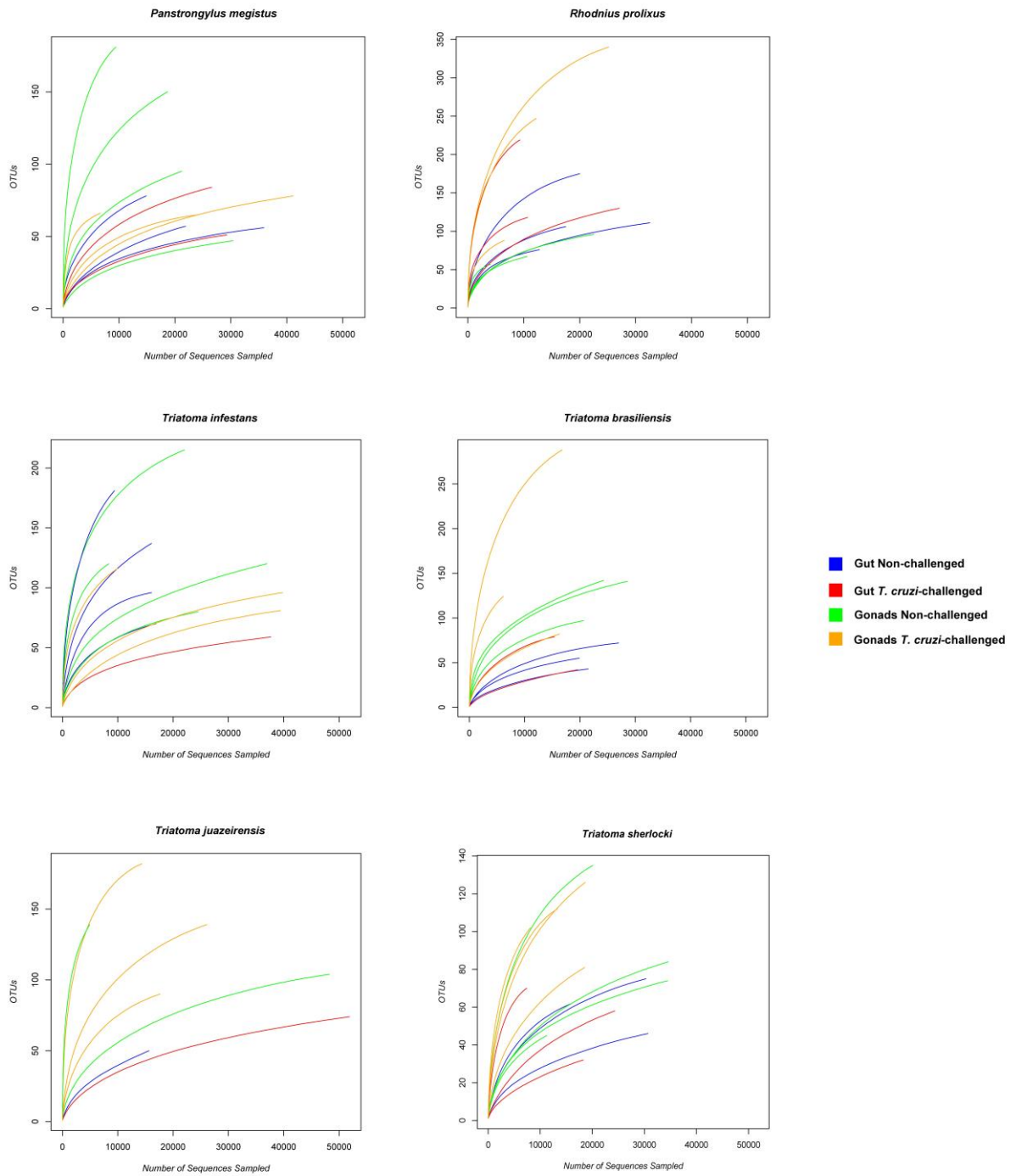


Figure S2 - Relative abundance of bacterial orders in triatomine bugs samples.

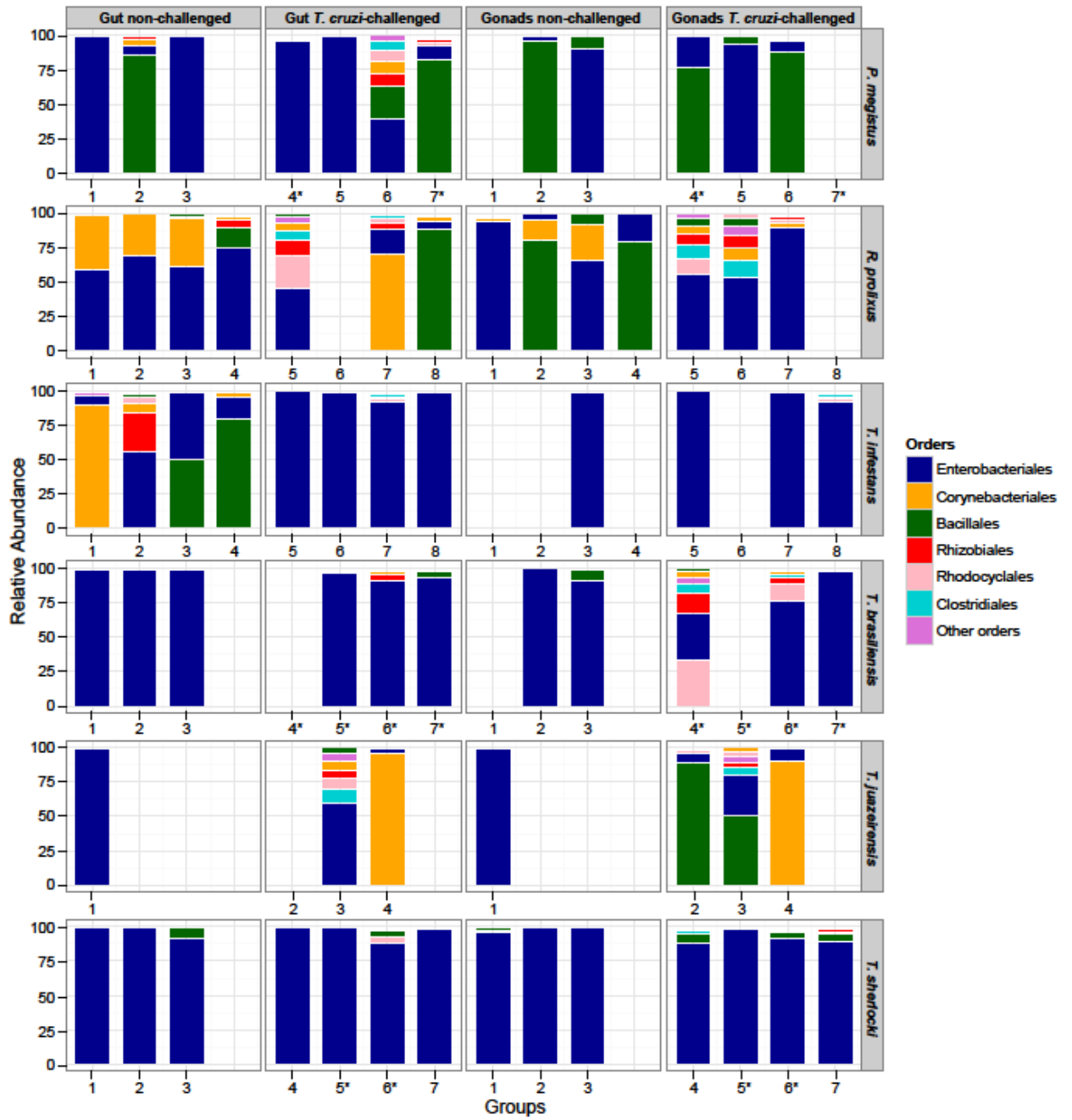


Figure S3 - Phylogenetic analysis of *Arsenophonus* related sequences.

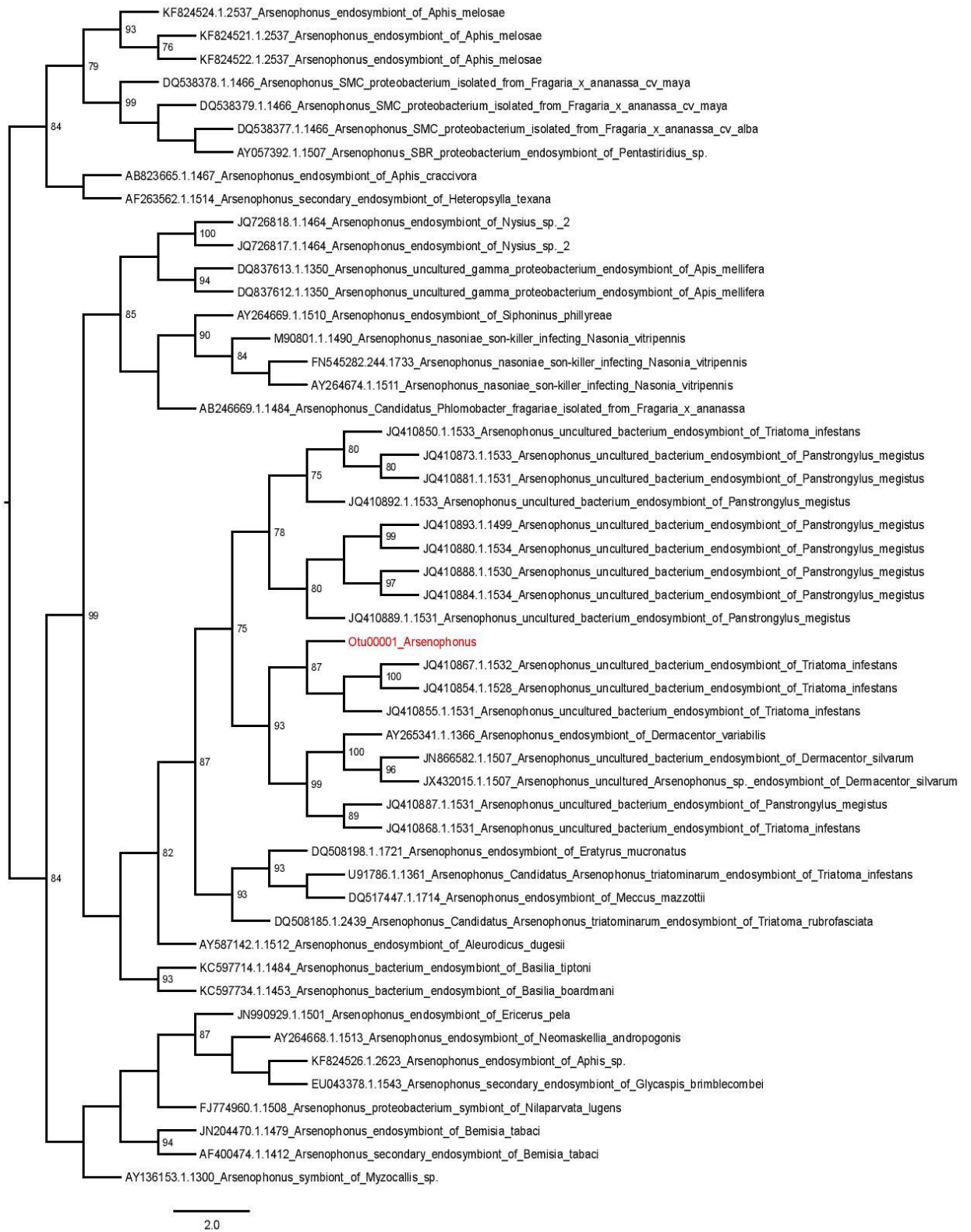
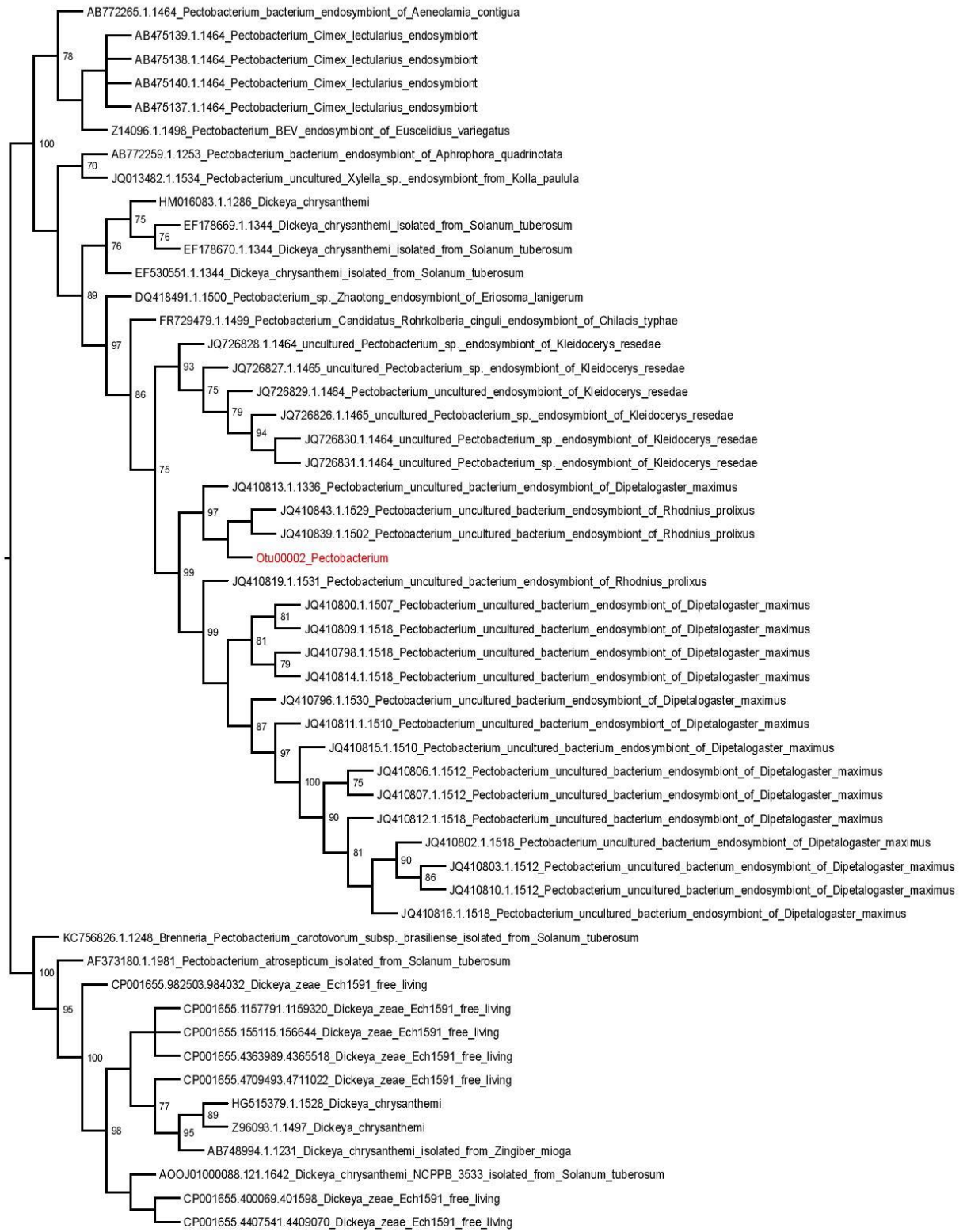
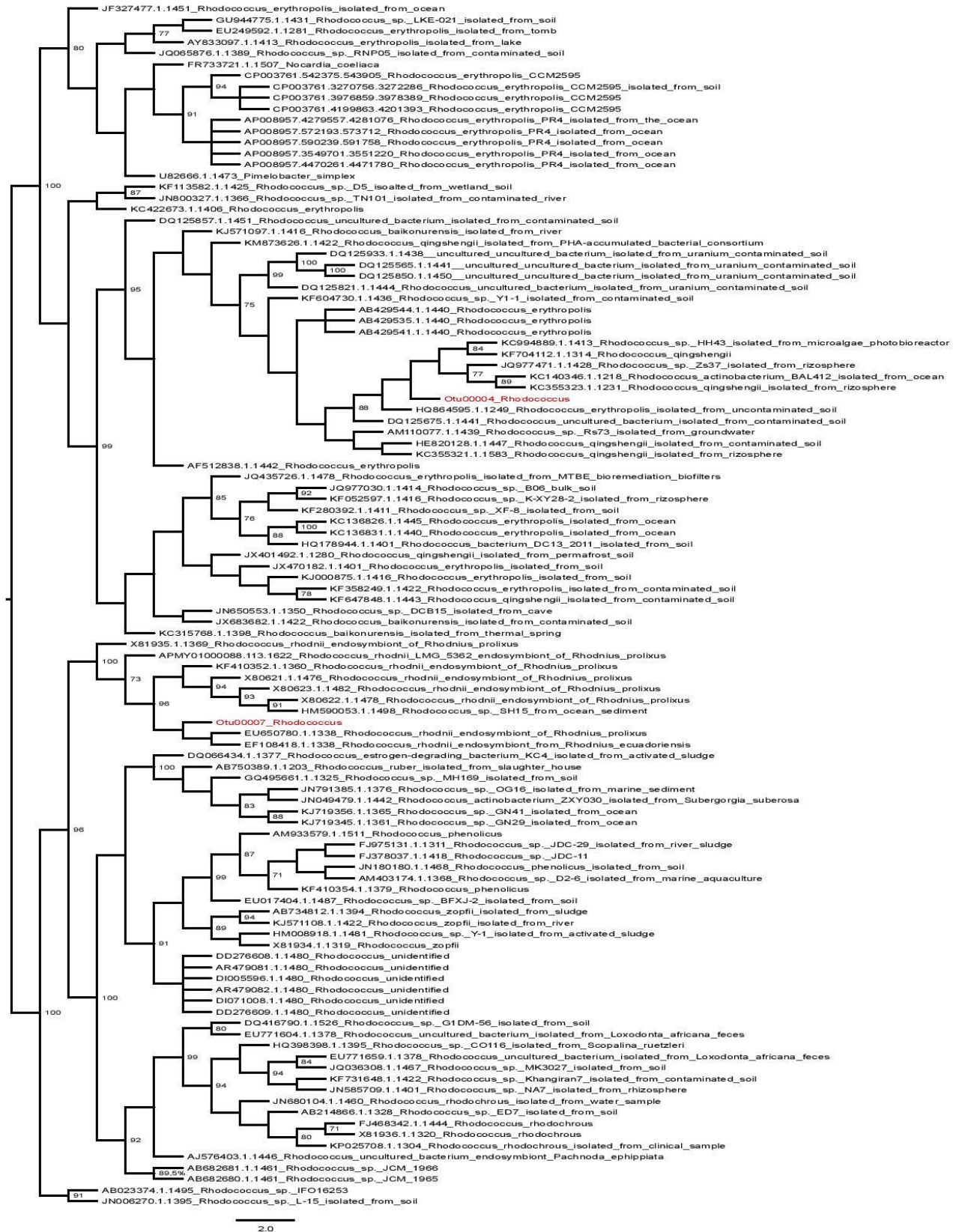


Figure S4 - Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* related sequences.



3.0

Figure S5 - Phylogenetic analysis of *Rhodococcus* related sequences.



6. Considerações Finais

6.1. A microbiota intestinal de Triatominae sob a ótica da simbiose

A associação da vida microbiana com os organismos multicelulares ganhou relevância nos últimos anos, pois levou à ideia de que animais e plantas não são entidades autônomas, mas sim "holobiontes", compostos do hospedeiro, além de todos os seus micróbios simbióticos (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008; Bordenstein and Theis 2015), sendo esta associação vital para o desenvolvimento normal, manutenção fisiológica e prevenção de doenças no hospedeiro. Para entender como funciona esta relação simbiótica é necessário definir a "microbiota padrão", ou seja, os organismos em comum em um conjunto de amostras microbianas, as quais desempenham um papel fundamental no funcionamento do ecossistema dentro de um habitat (Shade and Handelsman 2012). No caso particular da microbiota associada, são os microrganismos envolvidos na homeostase do hospedeiro.

Um bom exemplo da microbiota core e sua relevância para um organismo é a altamente bem descrita microbiota intestinal humana. Esta microbiota tem contribuições funcionais dentro do hospedeiro humano, tais como o metabolismo de nutrientes e xenobióticos, a renovação das células epiteliais do intestino, e o desenvolvimento e atividade do sistema imune (Turnbaugh et al. 2007). Quanto a sua composição, amostragens extensivas têm encontrado uma grande variação intra-individual nos níveis taxonômicos bacterianos mais baixos, mas os filos Firmicutes e Bacteroidetes constituem a grande maioria da microbiota, indicando que o nível funcional ao invés de taxonômico é mais apropriado para caracterizar a microbiota do intestino humano (Turnbaugh et al. 2009; Arumugam et al. 2011)

Os insetos por sua vez têm características únicas na sua microbiota intestinal em comparação com humanos e outros mamíferos: (i) a diversidade da microbiota tende a ser uma ordem de grandeza menor em insetos do que em mamíferos, e (ii) muitos insetos, mas não mamíferos, possuem microrganismos intracelulares benéficos, caracterizados por uma

estreita relação simbiótica com seu hospedeiro, incluindo transmissão vertical e genomas geralmente muito reduzidos (Douglas 2011). Além dos residentes microbianos intracelulares, o lúmen intestinal de muitos insetos, como por exemplo mosquitos e a *Drosophila*, é habitado por uma microbiota transitória instável e variável, determinada por fatores que dificultam a colonização microbiana estável como propriedades físico-químicas do microambiente do intestino e outras como dieta, comportamento social e ciclo de vida (incluindo eventos de muda) (Douglas 2011; Engel and Moran 2013).

Nossos resultados de sequenciamento em larga escala do gene marcador 16S rRNA, mostram que a microbiota intestinal dos barbeiros não está longe de ser o que é esperado para insetos, possuindo baixa diversidade intra-individual, além disso ao comparar a composição da microbiota entre nossas amostras para uma mesma espécie e contra os estudos baseados em cultivo quanto aqueles independentes de cultivo, se pode determinar que existe uma alta variabilidade inter-individual. Duas observações podem ser feitas sobre a composição da microbiota: (i) alguns dos gêneros de bactérias encontrados mostram ter uma maior especificidade por certos hospedeiros barbeiros, por exemplo, o *Rhodococcus* com o gênero *Rhodnius*; o *Arsenophonus* com membros da tribo Triatomini (*Triatoma* e *Panstrongylus*); e o *Pectobacterium* só ausente em *Triatoma*. Esta observação precisa ser confirmada com a amostragem de insetos obtidos de campo; (ii) embora um pequeno número tenha sido estudado, os insetos coletados em campo mostram uma maior complexidade na sua microbiota, mas com a maior parte dos gêneros de bactérias encontrados também em insetos de laboratório.

Uma conclusão significativa do nosso trabalho é que embora exista esta alta variabilidade taxonômica da microbiota ao nível de gênero entre espécies de vetores, entre indivíduos silvestres e de laboratório e até mesmo entre indivíduos de uma mesma colônia, a maior parte deles se encontra dentro de duas ordens taxonômicas: Enterobacteriales, representado por gêneros como *Arsenophonus*, *Pectobacterium* e *Serratia*; e a ordem Corynebacteriales, que conta com gêneros tais como *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, entre outros. É importante ressaltar que outros grupos bacterianos são encontrados em

proporções menores, como o caso de Bacillales (*Staphylococcus*) e Rhodocyclales (*Dechloromonas*).

Tal como foi mencionado acima, múltiplos fatores parecem atuar como filtros seletivos determinando a capacidade destes grupos bacterianos colonizarem o intestino do inseto. Um primeiro fator é o microambiente encontrado dentro do intestino. Nos barbeiros, o intestino é uma estrutura simples, dividida em duas partes principais, o estômago (*anterior midgut* em inglês) e o intestino delgado (*posterior midgut*). Este habitat tem um pH variável, que pode ir de um pH 5.5-6.0 até mais de 7 depois de uma refeição de sangue (Schaub 2009). Além disso, a alimentação também constitui um estresse para a microbiota. Depois da ingestão de sangue por parte do inseto, as populações microbianas aumentam drasticamente, provavelmente devido à riqueza de ferro e proteína no sangue que se concentra no estômago (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012), mas só uma pequena parte da refeição passa ao intestino delgado onde é feita a digestão, com a absorção dos nutrientes. Este processo influencia na regulação da densidade de bactérias, já que muitas são mortas ou expulsas pela urina e fezes (Schaub 2009).

Outra variável determinante da composição da microbiota é o seu modo de transmissão. De acordo com os nossos resultados em conjunto com os da literatura, nós propomos que as duas principais ordens bacterianas tem modos de transmissão diferenciados. Enterobacteriales é um grupo de bactérias conhecido por formar amplas relações simbióticas com diversos grupos de insetos, que vão desde facultativas até mutualistas obrigatórias (Moran et al. 2008; Husník et al. 2011). Dentro deste grupo se encontra *Arsenophonus* e *Pectobacterium*, os quais parecem ter uma transmissão vertical trans-ovariana devido a sua abundância em tecido de gônadas em nossas amostras. A outra ordem, Corynebacteriales, são bactérias encontradas em diversos ambientes, nomeadamente no ecossistema do solo (Goodfellow and Jones 2012), levando-nos a sugerir que seu modo de transmissão mais provável é por via ambiental (horizontal), aproveitando os hábitos canibais e coprófagos das ninfas de barbeiros. A baixa abundância encontrada de *Rhodococcus* em tecidos de gônadas suporta a hipótese deste modo de transmissão. Bactérias simbiotes localizadas e transmitidas extracelularmente, como as

Corynebacteriales, podem apresentar padrões semelhantes de integração metabólica e até de co-evolução com um hospedeiro como as mutualistas estritamente intracelulares (Salem et al. 2015), sendo o *Rhodococcus* talvez o melhor candidato, cuja relação simbiótica com os barbeiros é até agora a única conhecida em insetos.

6.2. Microbiota intestinal de Triatominae e simbiose nutricional

Os avanços no estudo da composição e modo de transmissão da microbiota intestinal dos barbeiros é um primeiro passo para o estudo funcional destes simbioses bacterianas. Um primeiro avanço dado muito antes do estudo mais amplo desta microbiota foi a hipótese nutricional de Wigglesworth, segundo a qual o simbiote, neste caso *Rhodococcus* em *R. prolixus*, proporciona vitamina B para o hospedeiro. Dessa forma ninfas do inseto sem simbioses morrem prematuramente (Wigglesworth 1936; Brecher and Wigglesworth 1944). Como este gênero e outros relacionados dentro da ordem Corynebacteriales são conhecidos por ter um extenso repertório metabólico (Finnerty 1992), não seria estranho pensar que eles estão envolvidos em mais funções nutricionais além da síntese de vitamina B.

Menos estudados têm sido os papéis funcionais das enterobactérias simbioses nos barbeiros. Este grupo compreende simbioses de um grande número de animais hematófagos, incluindo não só insetos como mosquitos, moscas Hippoboscidae e piolhos, mas também carrapatos e sanguessugas. Os dois gêneros principais deste grupo descritos em nossos resultados, *Arsenophonus* e *Pectobacterium*, estão presentes em insetos hematófagos e fitófagos, ambos com dietas pobres em nutrientes, sendo possível, que assim como o *Rhodococcus*, poderiam ser simbioses nutricionais.

Finalmente, o estudo da simbiose nutricional pode incrementar com o sequenciamento genômico destas bactérias. Por exemplo, no rascunho do genoma do *R. rhodnii* foi possível identificar genes das vias de biossíntese de várias vitaminas do complexo B (Pachebat et al. 2013). Enquanto isso, na actinobactérias, outros estudos tem permitido descrever vias metabólicas conservadas entre distintos grupos simbioses que fornecem vitaminas a seus

hospedeiros hematófagos como a mosca tsé-tsé (Akman et al. 2002; Rio et al. 2012) e sanguessugas (Manzano-Marín et al. 2015). Além disso, também se tem encontrado que estas vias podem ser adquiridas por transferência horizontal de genes como no caso da *Wolbachia* associada a percevejos da cama (Nikoh et al. 2014). Esta última descoberta é significativa, já que numa microbiota intestinal como dos barbeiros, altamente variável e de simbiontes predominantemente facultativos, este mecanismo permitiria manter as capacidades funcionais nutricionais independente do *taxa* específico que esteja colonizando um hospedeiro.

6.3. Microbiota intestinal de Triatominae e simbiose protetora

Insetos barbeiros tem inimigos naturais como parasitoides e patógenos como vírus, fungos e protozoários (Marti et al. 2009). Por isso, outra função da microbiota intestinal é a defesa contra parasitas que também colonizam o intestino, sendo de principal interesse a proteção que poderia oferecer contra o *T. cruzi*. Lamentavelmente, é pouco o que se tem avançado sobre esta matéria além do efeito tripanolítico de metabólitos secundários de *Serratia* contra certas cepas do parasita (Azambuja et al. 2004; Garcia et al. 2010). Isto tendo em conta que as actinobactérias (grupo ao qual pertence *Corybacteriales* e *Streptomyces*) são reconhecidas como mutualistas protetores em outros insetos por sua capacidade de produzir ampla variedade de metabólitos secundários com propriedades antibióticas e antifúngicas (Kaltenpoth 2009).

A microbiota também pode atuar na simbiose protetora de uma maneira indireta. Como foi discutido acima, as bactérias residentes do intestino proliferam após a ingestão de sangue e este aumento no número de bactérias, por sua vez, desencadeia a super-expressão de moléculas antimicrobianas tais como lisozimas, lectinas e defensinas (Araújo et al. 2006; Ribeiro et al. 2014; Vieira et al. 2014; Mesquita et al. 2015), das quais ao menos as lectinas tem atividade tripanolítica testada *in vitro* (Garcia et al. 2010). Esta resposta induzida pela microbiota é de interesse para entender a suscetibilidade à infecção com tripanossomatídeos, sendo proposto que a capacidade do parasita de modular esta resposta imune facilitaria sua sobrevivência e replicação (Castro et al. 2012; Vieira et al. 2015).

Avaliar a hipótese de modulação do parasita e, de um modo mais geral a interação vetor-parasita-microbiota é importante para entender os fatores que fazem um barbeiro ser suscetível ou refratário a certos parasitas, em especial, no contexto da doença de Chagas, a certas cepas do parasita. Uma proposta é ampliar o nosso modelo de experimentos de infecção comparada, fazendo infecções cruzadas entre distintas espécies de barbeiros e cepas de *T. cruzi*, avaliando a composição e densidade de bactérias além da expressão de genes envolvidos em resposta imune entre controles e os diferentes tratamentos.

Como uma observação, um benefício adicional da microbiota intestinal está na ativação basal de vias imunológicas pela regulação da densidade bacteriana intestinal. Como se tem encontrado na *Drosophila*, esta resposta não só inclui a expressão de genes relacionados com vias imunes de *stress* oxidativo e morte celular, mas também de homeostase dos tecidos, fisiologia do intestino e metabolismo, induzindo o processo à renovação do tecido intestinal (Buchon et al. 2009; Buchon et al. 2013; Broderick et al. 2014)

Como se pode concluir, os avanços no conhecimento das características básicas de microbiota intestinal dos barbeiros, incluindo sua composição entre espécies e tecidos, e como ela é afetada pelos patógenos, são passos iniciais para estudar em profundidade suas características funcionais envolvidas na transmissão de *T. cruzi*, incluindo a procura de alternativas de controle. Além disso, o estudo de barbeiros serve como modelo para o entendimento da fisiologia de insetos hematófagos, interação inseto-microbiota e evolução da hematofagia.

7. Referências

- Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M and Aksoy S (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet* 32:402–407.
- Alexander B and Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 17:1–18.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM and Schaub GA (2006) Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 36:547–560.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto J-M et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180.
- Azambuja P, Feder D and Garcia ES (2004) Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol* 107:89–96.
- Azambuja P, Garcia ES and Ratcliffe NA (2005) Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21:568–572.
- Beard C Ben, Cordon-Rosales C and Durvasula R V (2002) Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol* 47:123–141.
- Bordenstein SR and Theis KR (2015) Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol* 13:e1002226.
- Brecher G and Wigglesworth VB (1944) The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology* 35:220–224.
- Broderick NA, Buchon N and Lemaitre B (2014) Microbiota-induced changes in *Drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *MBio* 5:e01117–14.
- Broderick NA and Lemaitre B (2012) Gut-associated microbes of *Drosophila*

melanogaster. Gut Microbes 3:307–321.

Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S and Lemaitre B (2009) Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. Genes Dev 23:2333–2344.

Buchon N, Broderick NA and Lemaitre B (2013) Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. Nat Rev Microbiol 11:615–626.

Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P and Garcia ES (2012) *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS One 7:e36591.

da Mota FF, Marinho LP, de Moreira CJC, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, Carels N and Azambuja P (2012) Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis 6:e1631.

Douglas AE (2011) Lessons from studying insect symbioses. Cell Host Microbe 10:359–367.

Duncan JT (1926) On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids. Parasitology 18:238–252.

Edwards JS (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. Int J Dev Biol 42: 471-473

Eichler S, Reintjes N, Jung M, Yassin AF, Schaal KP, Junqueira A, Coura JR and Schaub GA (1996) Identification of bacterial isolates and symbionts from wild populations of *Triatoma infestans* and *T. sordida*. Mem Inst Oswaldo Cruz 91(Suppl): 125

Eichler S and Schaub GA (2002) Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp Parasitol 100:17–27.

Engel P and Moran NA (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol Rev 37:699–735.

Espino CI, Gómez T, González G, do Santos MFB, Solano J, Sousa O, Moreno N, Windsor D, Ying A, Vilchez S et al. (2009) Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae).

Appl Environ Microbiol 75:547–550.

Finnerty WR (1992) The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. Annu Rev Microbiol 46:193–218.

Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P and Schaub GA (2010) Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol 26:499–505.

Gaunt M and Miles M (2000) The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 95:557–565.

Goodfellow M and Alderson G (1977). The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the ‘*rhodochrous*’ complex. J Gen Microbiol 100:99–122.

Goodfellow M and Jones AL (2012) Corynebacteriales ord. nov. In: Goodfellow M, Kampfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey’s manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, vol 5, part B, 2nd edition. Springer, New York, pp 235–243.

Gorla DE, Ponce C, Dujardin J-P and Schofield CJ (2010) Control strategies against Triatominae. In: Telleria J, Tibayrenc M (eds) American trypanosomiasis Chagas disease: One hundred years of research, Elsevier, Madrid, pp 233-245.

Guhl F and Lazdins-Helds JK (eds) (2007) Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 17 a 20 de abril de 2005. Organización Mundial de la Salud/Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR), Buenos Aires, Argentina, 104 pp.

Gumiel M, da Mota FF, de Sousa Rizzo V, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM, de Souza Garcia E, Carels N and Azambuja P (2015) Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. Parasit Vectors 8:245.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A and Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? –a statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett 281:215–220.

Hill P, Campbell JA, and Petrie IA (1976) *Rhodnius prolixus* and its symbiotic

actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. *Proc R Soc B* 194:501–525.

Hugenholtz P (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol*, 3: 1–0003.

Husník F, Chrudimský T and Hypša V (2011) Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (γ -Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biol* 9:87.

Hypša V (1993) Endocytobionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. *J Invertebr Pathol* 61:32–38.

Hypša V and Dale C (1997) In vitro culture and phylogenetic analysis of “Candidatus *Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 47:1140–1144.

Justi SA, Russo CAM, Mallet J, Obara MT and Galvão C (2014) Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vectors* 7:149.

Kaltenpoth M (2009) Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol* 17:529–535.

Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MSC, Godfray HCJ, Sinden RE and Sinkins SP (2010) *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*.

Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ* 24:195–204.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M and Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*.

Lee W-J and Brey PT (2013) How microbiomes influence metazoan development: insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:571–592.

Liu N (2015) Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research

directions. *Annu Rev Entomol* 60:537–559.

Manzano-Marín A, Oceguera-Figueroa A, Latorre A, Jiménez-García LF and Moya A (2015) Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome Biol Evol* 7:2871–2884.

Marti GA, Echeverria MG, Susevich ML, Becnel JJ, Pelizza SA and García JJ (2009) Prevalence and distribution of parasites and pathogens of Triatominae from Argentina, with emphasis on *Triatoma infestans* and Triatoma virus TrV. *J Invertebr Pathol* 102:233–237.

McGraw EA and O’Neill SL (2013) Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol* 11:181–193.

McMeniman CJ, Lane R V, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F and O’Neill SL (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323:141–144.

Mesquita RD, Vionette-Amaral RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro FA, Minx P, Spieth J, Carvalho AB, Panzera F and Lawson D (2015) Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci* 112:14936–14941.

Miles MA, Feliciangeli MD and de Arias AR (2003) American trypanosomiasis (Chagas’ disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ Br Med J* 326:1444–1448.

Moran NA, McCutcheon JP and Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* 42:165–190.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M et al. (2009) A *Wolbachia Symbiont* in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139:1268–1278.

Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M and Fukatsu T (2014) Evolutionary origin of insect–*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci* 111:10257–10262.

- Noireau F, Carbajal-de-La-Fuente AL, Lopes CM and Diotaiuti L (2005) Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc* 77:431–436.
- Nováková E, Hypša V and Moran NA (2009). *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol* 9:143
- Pachebat JA, Keulen G Van, Whitten MMA, Girdwood S, Sol D, Dyson PJ and Facey D (2013) Draft Genome Sequence of *Rhodococcus rhodnii* Strain LMG5362 , a Symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera , Reduviidae , Triatominae),. *Genome Announc* 1:3–4.
- Pessoa GCD, Vinãs PA, Rosa ACL and Diotaiuti L (2015) History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Rev Soc Bras Med Trop* 48:380–389.
- Rassi A, de Rezende JM and Luquetti AO (2010) Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. In: Telleria J, Tibayrenc M (eds) *American trypanosomiasis Chagas disease: One hundred years of research*, Elsevier, Madrid, pp 709–741
- Ribeiro JMC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO, Majerowicz D, Medeiros M, Koerich L and Terra WR (2014) An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLOS Negl Trop Dis* 8: e2594.
- Rio RVM, Symula RE, Wang J, Lohs C, Wu Y, Snyder AK, Bjornson RD, Oshima K, Biehl BS and Perna NT (2012) Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *MBio* 3:e00240–11.
- Rodríguez J, Pavía P, Montilla M and Puerta CJ (2011) Identifying triatomine symbiont *Rhodococcus rhodnii* as intestinal bacteria from *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) laboratory insects. *Int J Trop Insect Sci* 31:34–37.
- Salem H, Florez L, Gerardo N and Kaltenpoth M (2015) An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proc R Soc London B Biol Sci* 282:20142957.
- Schaub GA (2009) Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv In Insect Phys* 37:177–242.

- Schofield CJ and Galvão C (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110:88–100.
- Shade A and Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14:4–12.
- Taracena ML, Oliveira PL, Almendares O, Umaña C, Lowenberger C, Dotson EM, Paiva-Silva GO and Pennington PM (2015) Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003358
- Stewart EJ (2012) Growing Unculturable Bacteria. *J Bacteriol* 194:4151–4160.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R and Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* 449:804–10.
- Vallejo GA, Guhl F and Schaub GA (2009) Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* 110:137–147.
- Varela G and Aparicio A (1951) Intestinal bacteria found in *Triatoma* and *Ornithodoros*. *Am J Trop Med Hyg* 31:381–382.
- Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, Da Mota FF, Castro DP, Garcia ES and Azambuja P (2015) *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasit Vectors* 8:135.
- Vieira CS, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, Garcia ES and Azambuja P (2014) Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors* 7:232.
- Wigglesworth VB (1936) Symbiotic Bacteria in a Blood-sucking Insect, *Rhodnius Prolixus* Stål. (Hemiptera, Triatomidae). *Parasitology* 28:284–289.

Zilber-Rosenberg I and Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev* 32:723–735.