

Aspectos do sistema imunológico dos INSETOS

Cleonor Cavalcante A. da Silva
M.Sc. Pesquisadora da Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia
cleonor@cenargen.embrapa.br

Fotos cedidas pela autora

Novos discernimentos e perspectivas

Os insetos ocupam quase todos os nichos ecológicos e estão constantemente expostos ao ataque de inúmeros inimigos naturais, muitos dos quais são potencialmente patogênicos. Para sobreviver a esses ataques, os insetos desenvolveram um eficiente sistema de defesa. O tegumento, o sistema respiratório, composto pelos espiráculos e as traquéias, e o trato digestivo, incluindo a membrana peritrófica e o epitélio, constituem a primeira linha de defesa dos insetos (Dunn, 1988). A estrutura e a composição química da cutícula representam, provavelmente, as principais barreiras. Somente alguns fungos e nematóides conseguem quebrar essa barreira. Na passagem da cutícula para a hemocele (cavidade do corpo), esses microorganismos encontram vários componentes antimicrobianos, como proteínas, lipídios, hidrocarbonetos, difenóis, carboidratos, quitina e melanina, os quais inibem o crescimento e a penetração na hemocele (Dunn, 1988). No bicho da seda, *Bombyx mori*, lipídios na epicutícula inibem a invasão de fungos como *Beauveria bassiana* (Saito e Aoki, 1983) e danos na cutícula estimulam a síntese de peptídios antibacterianos pelas células epidérmicas (Brey et al., 1993). Bactérias, vírus e protozoários geralmente não conseguem invadir a hemocele dos insetos via tegumento, contudo, se essa barreira for danificada, bactérias oportunistas, que vivem na superfície da cutícula, podem penetrar na hemocele. Trabalhos realizados com a mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* mostraram que proteínas na cutícula são responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de bactérias que podem infectar as larvas quando estas abandonam os frutos e caem no solo para empupar (Marmaras et al., 1993). Acidentalmente, os insetos sofrem in-

júrias na parede do exoesqueleto, as quais servem de entrada para inúmeros microorganismos. Na maioria das vezes, os insetos são capazes de fechar essas entradas através da coagulação da hemolinfa. Na formação dos coágulos, proteínas solúveis na hemolinfa interagem com células especializadas do sistema imunológico, que constitui a barreira final do sistema de defesa dos insetos.

Nos últimos anos, tem havido um enorme progresso no conhecimento das defesas imunológicas dos insetos. A biodiversidade desses organismos tem proporcionado modelos importantes para se estudarem suas estratégias antimicrobianas, as quais podem fornecer informações relevantes para o combate a doenças como a malária, o dengue, a tripanosomíase e a leishmaniose, bem como para o estudo da imunologia geral. A caracterização e a purificação de peptídios antimicrobianos produzidos em resposta a infecções causadas por bactéria ou fungos em várias espécies de insetos, como as lagartas *Manduca sexta* (Russell e Dunn, 1996) e *Galleria mellonella* (Dunphy e Halwani, 1997) e o mosquito *Aedes aegypti* (Lowenberger et al., 1999), juntamente com as informações genéticas sobre a mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster* (Han et al., 1998), têm proporcionado novos discernimentos sobre a organização e a regulação do sistema imunológico dos insetos. Sabe-se hoje que os insetos possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e de coordenar a expressão de vários genes (Franc e White, 2000). Além disso, o conhecimento das respostas imunológicas que estão presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico.

Imunidade adquirida

Alguns pesquisadores discordam do termo imunidade para os insetos pelas seguintes razões: o sistema imunológico dos insetos não é específico; a reação que ele desencadeia para uma bactéria é a mesma para um fungo, para um parasita ou um parasitóide; não possui memória, isto é, ele não aprende com as experiências e nem lembra de seus encontros; não produz linfócitos e nem sintetiza imunoglobulinas (anticorpos) que são células e proteínas especializadas da imunidade adquirida ou específica dos vertebrados.

Não existem evidências da especificidade molecular dos anticorpos monoclonais no sistema imunológico dos insetos. Uma resposta imunológica adquirida geralmente leva dias ou semanas para se desenvolver; esse tempo de espera para adquirir imunidade seria desvantajoso para um inseto cujo ciclo de vida é relativamente curto quando comparado com a maioria dos vertebrados. Contudo, esse argumento não se aplica às baratas, que podem viver 2 ou 3 anos em condições de laboratório, tempo de vida mais longo que o de certos ratos, nas mesmas condições (Karp, 1990). Estudos realizados com a barata *Periplaneta americana* mostraram que quando inoculadas com fosfolipase A₂ inativada, uma toxina do veneno das abelhas, os insetos desenvolveram uma resposta imunológica que durou cerca de quatro dias. Essa resposta foi específica para essa toxina e foi possível transferi-la para outras baratas (não imunizadas) através da injeção da hemolinfa das baratas imunizadas (Karp, 1990). Alguns pesquisadores têm observado que insetos, especialmente lepidópteros e dípteros, quando inoculados com bactérias não patogênicas, adquirem resistência a uma segunda inoculação com

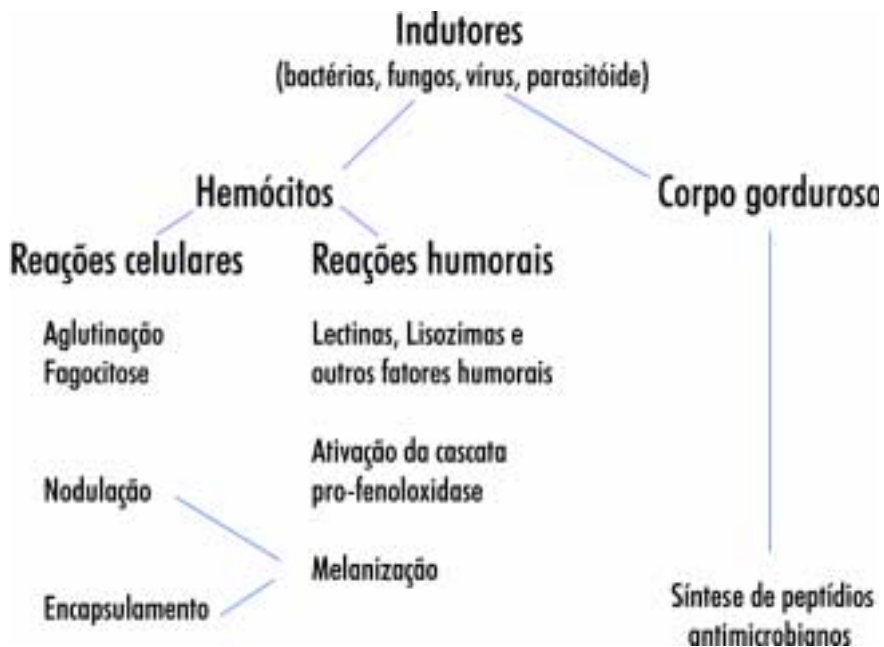


Figura 1. Representação esquemática das respostas imunológicas dos insetos. A ligação de moléculas receptoras na superfície de um microorganismo pode induzir diferentes tipos de reações tais como aglutinação, fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento pelos hemócitos. A ativação da cascata de profenoloxidase é necessária para o processo de melanização e morte dos microorganismos isolados nos nódulos ou capsulas. A síntese de peptídios antimicrobianos constitui a última fase no combate a um microorganismo invasor

bactérias patogênicas. Em *Drosophila*, as reações humorais antimicrobianas a infecções causadas por bactérias e fungos são específicas e podem discriminar esses patógenos. As bactérias Gram-negativas são potentes indutoras da expressão desses genes antibacterianos. Quando infectadas com fungos entomopatogênicos, larvas desse inseto exibem uma resposta imunológica adaptativa, sintetizando peptídios (drosomicina) com atividade antifúngica. Os genes que codificam peptídios antibacterianos e antifúngicos são expressos de maneira diferente após a injeção desses microorganismos na hemocele (Han et al., 1998). Contudo, os efeitos dessas reações não são idênticas à imunidade adquirida dos vertebrados. A síntese desses peptídios e o aumento da atividade antimicrobiana não é acompanhada de memória.

Imunidade natural

Os insetos não possuem o sistema imunológico sofisticado dos vertebrados. Contudo eles são particularmente resistentes aos seus inimigos naturais. Para se defender, eles desenvolveram

uma série de mecanismos, tais como reações de reconhecimento, aglutinação, ativação de enzimas proteolíticas, que leva à coagulação da hemolinfa e à produção de melanina, reações celulares, e à síntese de peptídios antimicrobianos e inibidores de proteases (Wheeler et al, 1993; Soderhall e Cerenius, 1998; Wilson et al, 1999). Essas reações de defesa fazem parte da imunidade natural dos insetos. Uma representação esquemática das defesas imunológicas dos insetos está resumida na Fig. 1.

Reconhecimento e ativação do sistema imunológico

A habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico de qualquer indivíduo. Nos insetos, a natureza das moléculas de reconhecimento não está bem definida. Alguns receptores associados à membrana dos hemócitos e outros solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas. Alguns pesquisadores consideram a

interação lectina-carboidrato e a ativação da cascata pro-fenoloxidase um dos mediadores no processo de reconhecimento de patógenos e parasitóides (Boucias e Pendland, 1993; Kawasaki et al., 1996; Wilson et al., 1999). As lectinas são uma classe de glicoproteínas que participam de muitos processos biológicos. Especificamente, as lectinas se ligam a glicolipídios, glicoproteínas ou polissacarídeos na superfície de células animais, causando a sua aglutinação e/ou precipitação. As unidades glicídicas dessas moléculas têm um enorme potencial para codificar informações biológicas.

Nos insetos, as lectinas têm sido detectadas na hemolinfa, agindo como opsoninas (proteínas que se fixam e transformam as propriedades da superfície dos patógenos), aglutinando os microorganismos e como receptores na membrana dos hemócitos. São produzidas, durante os processos infecciosos, injúrias no tegumento e na degradação dos tecidos durante os estágios de desenvolvimento (Boucias e Pendland, 1993; Drif e Brehélin, 1994; Kawasaki et al., 1996).

Em larvas da mosca *Sarcophaga peregrina*, moléculas de lectina são liberadas na hemolinfa todas as vezes que a cutícula do inseto é danificada. Essa proteína auxilia os hemócitos no reconhecimento e na fagocitose dos tecidos injuriados ou de microorganismos que tenham tido a oportunidade de invadir a hemocele. Em larvas do dictioptero *Blaberus discoidalis*, injeções de *Escherichia coli* induzem o aparecimento de lectina na hemolinfa, que aumenta a fagocitose das bactérias. Nas larvas não vacinadas, a lectina não é detectada (Boucias e Pendland, 1993).

Moléculas de lectinas na membrana dos hemócitos têm sido reportadas por vários pesquisadores (Bradley et al. 1989; Wheeler et al 1993). Nos gafanhotos, *Melanoplus differentialis* e *M. sanguinipes* 20% a 30% dessas moléculas estão na membrana dos granulócitos (células de reconhecimento e causadoras de lise) (Bradley et al., 1989). Em seu trabalho com uma dessas espécies (*M. differentialis*), Wheeler et al (1993) reportaram que essa proteína apresentou um efeito opsonico contra esporos de *B. bassiana*, mas nenhuma opsonização foi observada contra esporos do fungo *Nomuraea rileyi*. Foi constatado que os esporos

de *N. rileyi* não possuem em sua superfície resíduos de galactose, portanto, não foram reconhecidos pela lectina desse inseto, cuja especificidade é para carboidratos galactocídicos. Os granulócitos dessa espécie de gafanhoto claramente discriminam entre os esporos de *B. bassiana* e *N. rileyi*. Na maioria dos insetos estudados, as moléculas de lectinas formam pontes entre os hemócitos e células conduzindo galactose em suas membranas. Várias moléculas de lectinas já foram purificadas e caracterizadas em lepidópteros e ortópteros (Drif e Brehélin, 1994; Chen et al., 1998).

A cascata pro-fenoloxidase

Fenoloxidase é uma enzima que cataliza a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos. O produto final dessa oxidação é a melanina, que participa de três importantes processos fisiológicos: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas (Ashida et al., 1983; Brookman et al., 1989; Rowley, 1990; Marmaras et al., 1993; Lee et al., 1999; Silva et al., 2000). A fenoloxidase encontra-se como uma proenzima, chamada pro-fenoloxidase. É ativada proteoliticamente por uma ou duas serina-proteases em resposta a infecções com bactérias, fungos, lipopolissacarídeos (componentes da parede celular das bactérias Gram-negativas), peptidoglicanas (componente celular das bactérias Gram-positivas) e β -1,3 glucanas (componente da parede celular de fungos e algas), bem como parasitóides, enzimas proteolíticas (tripsina e chimotripsina) e injúrias nos tecidos (Ashida et al., 1983; Rowley, 1990; Silva et al., 2000). Oxidações subsequentes de fenóis pela fenoloxidase levam à produção de quinonas que polimerizam para formar melanina. As proteases da cascata pro-fenoloxidase não estão bem caracterizadas. Contudo, em larvas de *B. mori* infectadas com lipopolissacarídeo de *E. coli*, duas diferentes serina-proteases, foram identificadas na hemolinfa. Pesquisas recentes com larvas de *M. sexta* demonstraram que uma proteína de reconhecimento de 53-kDa presente na hemolinfa liga-se à superfície de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, e de diversas glucanas (β -1,3 glucanas). Após o ligamento, mudanças na

conformação desse receptor ativam uma serina-protease que, por sua vez, dispara a ativação da cascata pro-fenoloxidase (Ma e Kanost, 2000).

Fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microorganismos invasores como para o próprio inseto, por isso sua ativação é limitada ao local de infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o inseto. No plasma e nos hemócitos, existem proteínas inibidoras que regulam a atividade das serina-proteases (Kanost, 1999).

Defesas celulares

As defesas celulares são executadas pelos hemócitos e incluem fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos. Elas ocorrem em combinação com as defesas humorais (Dunn, 1986). Na hemocela existem vários tipos de hemócitos, mas os granulócitos, os plasmócitos e os coagulócitos são os que participam das defesas celulares e humorais na maioria dos insetos estudados (Fig. 2). Os hemócitos também participam da eliminação de toxinas e de tecidos anormais ou mortos. Na maioria dos insetos estudados, os plasmócitos são as principais células fagocíticas, ao receberem sinais da presença de bactérias ou outro microorganismo essas células estendem protrusões finas e rígidas, chamadas filopódias, as quais exercem um papel importante na fagocitose (Silva et al., 2000; Russo et al., 2001).

Os hemócitos circulam livremente na hemolinfa, mas, após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários rapidamente migram para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (Silva et al., 2000; Russo et al., 2001). Se a concentração de patógenos é muito grande, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e de removê-los da circulação. Contra larvas e ovos de endoparasitóides que são depositados na hemocela e não podem ser fagocitados e nem isolados em nódulos, os insetos se defendem formando cápsulas (Strand e Pech, 1995). O encapsulamento é influenciado por fatores genéticos e fisiológicos tanto do hospedeiro quanto do parasitóide. A quantidade e os tipos de hemócitos são fatores-chave para o sucesso dessa reação. Mudanças na contagem dessas células são os primeiros sinais de parasitismo (Russo et al., 2001). Geral-

mente, os granulócitos são os primeiros hemócitos que chegam ao local de infecção. Após contactar a presença do parasitóide, essas células se agregam e rapidamente liberam uma substância granular na hemolinfa, que atrai os plasmócitos. Em seguida, os plasmócitos chegam para formar uma camada de células, que endurece por um período de várias horas. Normalmente, a formação de capsulas é acompanhada pela produção de melanina. Durante a síntese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas e inativam ou matam grande parte dos microorganismos (Silva et al., 2000).

Alguns inimigos naturais desenvolveram estratégias para escapar das defesas celulares dos seus hospedeiros. Apesar dos mecanismos de escape não serem ainda bem entendidos, alguns aspectos já são conhecidos. Por exemplo, *Metarhizium anisopliae* libera uma protease que inibe a atividade de adesão e de fagocitose dos plasmócitos dos insetos infectados. Outro exemplo de estratégia de escape é a utilizada, pelo endoparasitóide *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae), que injeta, juntamente com os ovos, uma secreção produzida pelos ovários. Essa secreção contém inibidores de proteases (serpinas) e partículas de vírus, que são essenciais para o sucesso do parasitismo (Bechga, 1998).

Defesas humorais

As respostas humorais são realizadas por proteínas solúveis existentes na hemolinfa e normalmente levam algumas horas ou dias para sua completa expressão. Muitas dessas proteínas são inibidoras de fungos e bactérias. Em lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros, ferimentos ou injeções de bactérias induzem a síntese de peptídeos antibacterianos (Cociancich et al., 1994). As cecropinas são uma classe desses peptídeos que possuem uma ampla ação antibactericida. Foram isoladas, pela primeira vez, da hemolinfa da pupa *Hyalophora cecropia* (Brey et al., 1993). Na presença desses peptídeos, algumas espécies de bactérias perdem a integridade da parede celular. Em geral esses peptídeos são moléculas cilíndricas, anfipáticas, com um polo hidrofóbico em uma das terminações. Eles atuam rompendo as bicamadas lipídicas da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Moléculas de

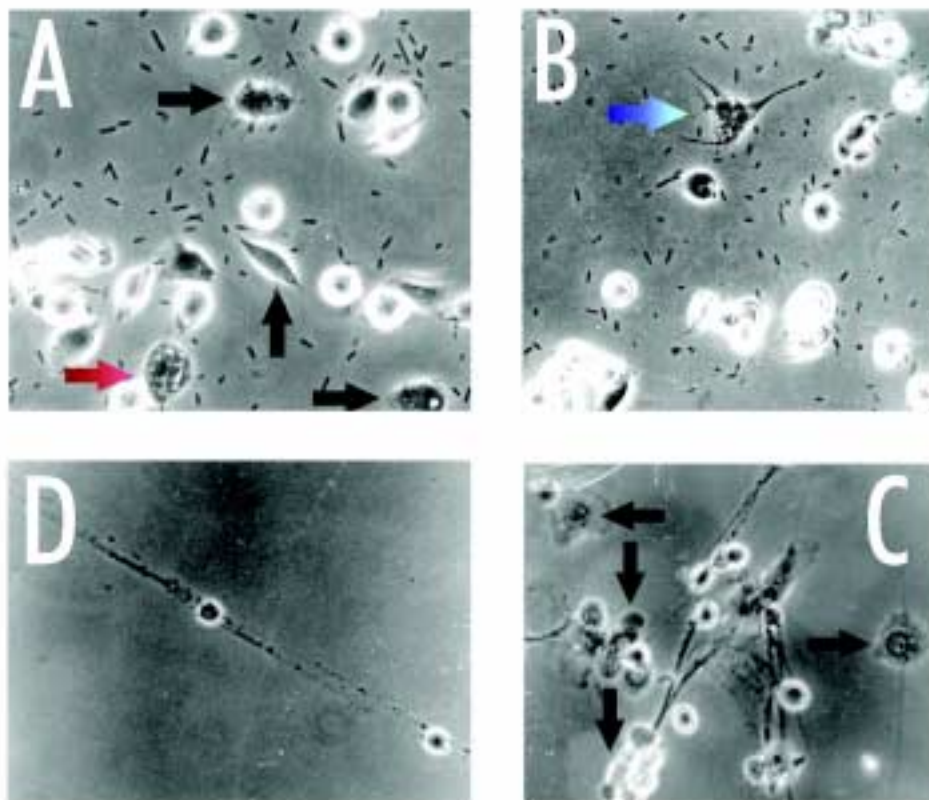


Figura 2. Micrografia de contraste de fase dos principais hemócitos de defesa do grilo doméstico, *Acheta domestica*. **A.** Plasmócitos circulares (→) e na forma de fibroblastos (↑) mostrando partículas de bactérias em início de ligamento à membrana dos hemócitos. **B.** Plasmócito em forma de estrela (→) mostrando finos filopódios projetando-se da superfície da célula. **C.** Plasmócitos com extrusão nuclear (→) e granulócitos agregados (↓) e ligados por fibras gelatinosas formadas pela coagulação da hemolinfa. **D.** Coagulócitos com fibras gelatinosas de citoplasma

cecropinas de cargas positivas ligam-se às proteínas negativas periféricas da membrana fosfolipídica das bactérias, levando a um enfraquecimento da bicamada de lipídios que, eventualmente, causa o vasamento do citoplasma e apoptose da célula.

As cecropinas atuam contra várias espécies de bactérias, mas não são ativas contra *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria produz uma zinco-protease que degrada essas proteínas. Outra bactéria entomopatogênica que não é afetada pelos peptídios antibacterianos é a *Xenorhabdus nematophilus*, que vive em simbiose com o nematóide *Steinernema carpocapsae*. Ao infectar os hospedeiros, o nematóide sintetiza uma protease que inativa esses peptídios (Jarosz, 1998). Uma característica de *X. nematophilus* é neutralizar as defesas imunológicas dos insetos hospedeiros, inclusive a ativa-

ção da profenoloxidase. Isso é essencial para a sobrevivência e reprodução do nematóide que é sensível aos efeitos tóxicos dos produtos intermediários produzidos durante a ativação de fenoloxidasas (Silva et al., 2000).

Outros peptídios antibacterianos que fazem parte da imunidade humoral dos insetos são os atacins que têm sido isoladas da hemolinfa dos lepidópteros e os dipterocins isolados da hemolinfa de várias espécies de dípteros. Os atacins são peptídios consideravelmente maiores que as cecropinas (180 aminoácidos), mas sua ação antibactericida é menor. Estudos realizados demonstraram que cada tipo de peptídeo liga-se a um receptor diferente na parede celular das bactérias. Essa característica impede que as bactérias escapem através de mutações (Cociancich et al., 1994).

Alguns insetos, como grilos, baratas

e gafanhotos, não sintetizam esses peptídios antibacterianos. Na hemolinfa desses insetos a atividade antimicrobiana é realizada principalmente pelas lisozimas. As lisozimas estão presentes na hemolinfa de todas as espécies de insetos. Elas dissolvem certas bactérias hidrolisando as cadeias glicídicas da camada de peptidoglicana da parede celular. A remoção dessa cadeia, mesmo em número reduzido, provoca a ruptura da parede celular e, conseqüentemente, a morte das bactérias. Nos lepidópteros, fragmentos da parede celular das bactérias resultantes da ação das lisozimas servem como sinalizadores para a síntese das cecropinas e atacinas. (Kano, 1999).

Conclusão

O interesse pelo sistema imunológico dos insetos tem aumentado nos últimos anos. Atualmente, o entendimento, de que os insetos são um grupo primitivo com atividades metabólicas limitadas não é verdadeiro. Os insetos são organismos geneticamente complexos e com grande resistência aos seus inimigos naturais. Uma área de investi-

gação que vem sendo estudada é a caracterização de proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases que participam das defesas humorais, tais como a coagulação e a ativação da profenoloxidase. Informações provenientes desses estudos permite compreender como essas cascatas são disparadas. A fenoloxidase é uma enzima fundamental na adesão hemócito-microorganismo. Um grande número de inibidores de proteases tem sido identificados na hemolinfa dos insetos. Além de participarem das defesas humorais, esses inibidores inativam muitas proteases que são liberadas pelos patógenos invasores durante o parasitismo.

Referências Bibliográficas

Ashida, M.; Ishizaki, Y.; Iwahana, H. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or β -1,3-gulcans in

- plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 113, 2: 562-564, 1983.
- Beckage, N. E.; Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. Parasitology 116: 557-564, 1998.
- Boucias, D. G.; Pendland, J. C. The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. Insect Biochemistry Molecular Biology, 23, 2: 233-242, 1993.
- Bradley, R. S., Stuart, G. S. Stiles, B. e Hapner, K. Grasshopper haemagglutinin: Immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. Journal Insect Physiology, 35, 5: 353-361, 1989.
- Brey, p. T.; Lee, W. J.; Yamakawa, M.; Koizumi, Y.; Perrot, s.; François, M. e Ashida, M. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction o cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90, 13: 6275-6279, 1993.
- Brookman, J. I.; Rowley, A. F.; Ratcliffe, N. A. Studies on nodule formation in locust following injection of microbial products. Journal Invertebrate Pathology, 53: 315-323, 1989.
- Chen, C.; Rowley, A. F.; Ratcliffe, N. A. Detection, purification by immunoaffinity chromatography and properties of β -1,3-glucan-specific lectins from the sera of several insect species. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 721-731, 1998.
- Cociancich, S.; Bulet, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A. The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitology Today, 10: 132-139, 1994.
- Drif, L.; Brehelin, M. Purification and characterization of an agglutinin from hemolymph of *Locusta migratoria* (Orthoptera). Insect Biochemistry Molecular Biology, 24, 3: 283-289, 1994.
- Dunn, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. Annual. Review of Entomology, 31: 321-339, 1986.
- Dunphy, G. B.; Halwani, A. Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). Journal of Insect Physiology, 43: 383-391, 1997
- Franc, N. C.; White, K. Innate recognition in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. Special issue: Innate recognition systems in host defense. Microbes and Infection, 2, 30: 243-250, 2000.
- Han, Z. S.; Enslin, H.; Hu, XD; Meng, XJ.; Wu, IH; Barrett, T.; Davis, R. J.; Ip, YT. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. Molecular and Cellular Biology, 18, 6: 3527-3539, 1998.
- Jarosz, J. Active resistance of entomophagous rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. Parasitology, 117: 3, 201-208, 1998.
- Karp, R. D. Inducible humoral immunity in insects: does an antibody-like response exist in invertebrates? Research in Immunology 141: 923-926, 1990.
- Kanost, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Developmental and Comparative Immunology, 23: 291-301, 1999.
- Kawasaki, K; Kubo, T.; Natori, S. Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26, 4: 355-364, 1996.
- Lee, HS; Cho, MY; LeeKM; Kwon, TH; Lee, BL. The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. FEBS Letter, 444, 2-3: 255-259, 1999.
- Lowenberger, C. A.; Smart, C. T.; Bulet, P. Ferdig, M. T. Severson, D. W. Hoffmann, J. A. Christensen, B. M. Insect immunity: molecular cloning, expression and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, 8: 1, 107-118, 1999.
- Ma, CC; Kanost, M. R. A beta 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta* agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. Journal of Biological Chemistry, 275, 11: 7505-7514, 2000.
- Marmaras, V. J.; Bournazos, S. N.; Katsoris, P. G.; Lambropoulou, M. Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 23:169-180, 1993.
- Rowley, A. F.; Brookman, J. L.; Ratcliffe, N. A. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. Journal of Invertebrate Pathology, 56: 31-38, 1990.
- Russell, V.; Dunn, P. E. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. Journal of Insect Physiology, 42: 41-52, 1996.
- Russo, J.; Brehélin, M.; Carton, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi* Journal of Insect Physiology 47: 167-172, 2001.
- Saito, T.; Aoki, J. Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces o two lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) (Deuteromycetes: Moniliales). Applied Entomology and Zoology, 18: 225-233, 1983.
- Silva, C.; Gary, B. D.; Rau, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Developmental and Comparative Immunology 24: 367-379, 2000.
- Söderhäll, K.; Cerenius, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion Immunology, 10, 1: 23-28, 1998.
- Strand, M. R.; Pech, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annual Review Entomology, 40: 31-56, 1995.
- Wheeler, M. B.; Stuart, G.; Hapner, K. D. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). Journal Insect Physiology, 39, 6: 477-483, 1993.
- Wilson, R.; Chen, C.; Ratcliffe, N. A. Innate immunity in insects – the role of multiple endogenous serum lectin in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis*. Journal of Immunology, 162: 1590-1596, 1999. 🌱