



Instituto Nacional de
Ciência e Tecnologia em
Entomologia Molecular

TÓPICOS AVANÇADOS EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR

2^a edição

Andréa Cristina Fogaça
Itabajara da Silva Vaz Junior
ORGANIZADORES



TÓPICOS AVANÇADOS EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR

Andréa Cristina Fogaça
Itabajara da Silva Vaz Junior
Organizadores

2ª edição

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre
2024

© 2024 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM

This is an open-access work distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Elaboração e promoção:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Financiamento:

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM,
CNPq, CAPES, FAPERJ

Organização:

Andréa Cristina Fogaça, Itabajara da Silva Vaz Junior

Revisão de texto:

Sylvia Furtado Félix

Capa e diagramação:

Adriana Silva da Silva

Dados internacionais de catalogação na publicação

T674	Tópicos avançados em entomologia molecular [recurso eletrônico] / Andréa Cristina Fogaça, Itabajara da Silva Vaz Junior, organizadores. – 2. ed. – Dados eletrônicos (1 arquivo : 26.068 KBytes). Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2024. 923 p. : il. color. Livro digital Formato: PDF ISBN 978-65-5973-430-6 1. Artrópodes. 2. Doenças. 3. Diagnóstico. 4. Transmissão. 4. Entomologia. 5. Parasitas-hospedeiros. I. Fogaça, Andréa Cristina. II. Vaz Junior, Itabajara da Silva. CDD 595.7
------	---

Catálogo na fonte: Maurício de Vargas Corrêa – CRB-10/2370

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

91501-970 - Porto Alegre - RS



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Sumário

Prefácio _____ 1

Biologia reprodutiva, vitelogênese e embriogênese

Capítulo 01: Mosquitos e arbovírus: aspectos fisiológicos e moleculares da biologia reprodutiva de culicídeos _____ 4

Luana Cristina Farnesi, Karine Pedreira Padilha, Léo Nava Piorsky Dominici Cruz, Rafaela Vieira Bruno

Capítulo 02: Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes _____ 28

Rodrigo Nunes-da-Fonseca, Daniel Bressan, Lupis Ribeiro, Helena Araujo

Capítulo 03: Vitelogeninas e vitelogênese: novos rumos na era pós-genômica _____ 79

Carlos E. Winter, Hatisaburo Masuda e Isabela Ramos

Sistemas

Capítulo 04: Sistema neuroendócrino de insetos _____ 105

Cecília S. Vieira, Marcela B. Figueiredo, Marcelo S. Gonzalez, Patrícia Azambuja, Eloi S. Garcia, Daniele P. Castro

Capítulo 05: Comunicação química: olfação _____ 139

Nathália F. Brito, Daniele S. Oliveira, Victória B. Lamim, Pamela Winnie C. Ramos, Gabrielle C. M. Cabo, Larissa S. Oliveira e Ana Claudia A. Melo

Capítulo 06: O sistema imune de carrapatos _____ 172

Andréa C. Fogaça, Eliane Esteves, Daniel B. Pavanelo e Sirlei Daffre

Capítulo 07: O relógio biológico endógeno e seus mecanismos moleculares em mosquitos vetores	214
---	-----

Andresa Borges de Araujo Fonseca, Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra, Luciana Ordunha Araripe e Rafaela Vieira Bruno

Metabolismo

Capítulo 08: Metabolismo de lipídeos em insetos	249
--	-----

Emerson G. Pontes, Katia C. Gondim, Georgia C. Atella e David Majerowicz

Capítulo 09: O metabolismo mitocondrial nos insetos voadores	293
---	-----

Marcos T. Oliveira, Hosana S. Petita, Marcus F. Oliveira

Capítulo 10: Genômica de vetores	330
---	-----

Leonardo Barbosa Koerich e Rafael Dias Mesquita

Interação patógeno-vetor

Capítulo 11: Interações entre triatomíneos e tripanossomas	365
---	-----

Alessandra A. Guarneri

Capítulo 12: Interação do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ecossistema no inseto vetor	408
--	-----

Marcia Paes, Carolina Vieira e Natália Nogueira

Capítulo 13: O conhecimento atual da biologia da interação <i>Leishmania</i> spp. e flebotomíneos vetores	443
--	-----

Nágila F. C. Secundino, Raquel S. M. Godoy, Thais B. Campolina, Barbara A. Chaves e Paulo F. P. Pimenta

Capítulo 14: Interação entre <i>Aedes aegypti</i> - vírus Dengue	481
---	-----

Ana C. Bahia, Gabriela de Oliveira Paiva e Silva, Marilvia Dansa-Petretski, Carla Polycarpo

Interação vetor-hospedeiro vertebrado

Capítulo 15: Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados	531
---	-----

Ricardo Nascimento Araújo, Nelder de Figueiredo Gontijo, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, Leonardo Barbosa Koerich, Maurício Roberto Viana Sant'Anna, Claudio R. Lazzari e Marcos Horácio Pereira

**Capítulo 16: Proteases e inibidores de proteases de artrópodes
hematófagos** _____ 553

Aparecida Sadae Tanaka, Adriana Seixas, Bruno de Souza Mayer, Lucas Tirloni, Luís Fernando Parizi, Carlos Termignoni

**Capítulo 17: Anti-hemostáticos da saliva e intestino de artrópodes
hematófagos: estrutura e função** _____ 600

Anderson Sá-Nunes, Stephen Lu, Leticia Barion Smith, Aparecida Sadae Tanaka e Carlos Termignoni

**Capítulo 18: Moléculas imunomoduladoras presentes na saliva de artrópodes
hematófagos** _____ 643

Anderson Sá-Nunes e Carlo Oliveira

Controle: mecanismos de resistência e novas tecnologias

**Capítulo 19: Novos desafios e perspectivas no controle de insetos: avaliando
resistência e inseticidas** _____ 677

Victor Guimarães Ribeiro, Brenda Martins Vasconcellos, Luis Felipe Costa Ramos, Camila Mattos de Oliveira, Danielle Maria Perpétua de Oliveira, Evelize Folly das Chagas e Monica Ferreira Moreira

**Capítulo 20: Enterobactérias entomopatogênicas simbiontes de
nematoides** _____ 727

Danilo Ribeiro Ferraz e Carlos E. Winter

Capítulo 21: Uso de *Wolbachia* no controle biológico _____ 747

José Márcio G. Fernandes, Álvaro G. Ferreira e Luciano A. Moreira

**Capítulo 22: Aplicação de proteínas olfativas de insetos no desenvolvimento
de biossensores** _____ 763

Nathália F. Brito e Ana Claudia A. Melo

**Capítulo 23: Novas Abordagens para o Controle de Transmissão da
Leishmaniose: Paratransgênese, Vacinas Bloqueadoras de Transmissão e
CRISPR** _____ 776

Antonio J. Tempone, Erich Loza Telleria, Felipe Soares Coelho e Yara M. Traub-Csekö

Capítulo 24: Tecnologia do RNA interferente no controle de insetos: aplicações, mecanismos e desafios _____ 811

Brenda Martins Vasconcellos, Victor Guimarães Ribeiro e Monica Ferreira Moreira

Capítulo 25: Desenvolvimento de vacinas contra carrapatos _____ 836

Itabajara da Silva Vaz Junior, Abid Ali, Luis Fernando Parizi e Jéssica Waldman

Capítulo 26: Mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos com ênfase em carrapatos _____ 873

Isabele da C. Angelo, Éverton Kort Kamp Fernandes, Patrícia S. Golo, Mariana G. Camargo, Elen Regozino Muniz, Ricardo de O. B. Bitencourt, José Luiz Ramirez, Nicolas Pedrini e Vania R. E. P. Bittencourt. Isabele da C. Angelo, Éverton Kort Kamp Fernandes, Patrícia S. Golo, Mariana G. Camargo, Elen Regozino Muniz, Ricardo de O. B. Bitencourt, José Luiz Ramirez, Nicolas Pedrini e Vania R. E. P. Bittencourt.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

Dedicatória

Este livro é dedicado a Mário Alberto Cardoso da Silva-Neto

Recebi o convite do professor Itabajara Vaz, para redigir um pequeno texto sobre o Prof. Mário Alberto Cardoso da Silva-Neto em nosso querido livro do INCT em Entomologia Molecular. Neste texto, ressalto um pouco da trajetória desse cientista tão dedicado e entusiasmado, que nos deixou há 6 anos, mas cuja memória continua a nos inspirar, por meio de sua presença marcante. Sua vivacidade e alegria são lembradas, assim como sua originalidade, altruísmo e gentileza. Uma pessoa singular, tão única, que se permitia sonhar com uma sociedade mais fraterna e justa para todos os brasileiros.

Mário Alberto Cardoso da Silva-neto, geneticista pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ingressou no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Bioquímica Médica em 1987, sob a co-orientação do, então, aluno de doutorado Pedro Lagerblad de Oliveira. Durante sua Iniciação Científica e Mestrado, se dedicou à purificação e caracterização bioquímica da proteína caseína quinase 2, durante a ovogênese de *Rhodnius prolixus*.

No seu doutorado, sob a orientação do professor Hatisaburo Masuda, defendeu, em 1996, sua tese com o estudo da proteína transportadora de cálcio durante a vitelogênese de *R. prolixus*. Sua inquietude o levou a realizar estágios de Pós-Doutoramento no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ (1997) e no National Institutes of Health (NIH), Bethesda, EUA (2000-2001), onde caracterizou uma quinase do parasita causador da malária. Foi pesquisador do CNPq, bolsista do Programa Cientista do Nosso Estado da FAPERJ e chefou o Laboratório de Sinalização Celular, LabSiCeL (desde 2008).

Foi diretor-geral do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis por duas gestões, onde foi homenageado pelos funcionários técnico-administrativos devido à sua dedicação e ao seu acolhimento às reivindicações desta categoria. Foi representante do Centro de Ciências da Saúde (CCS), no Conselho de Ensino para Graduados da Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da UFRJ (CEPG-PR2-UFRJ). Recebeu os Prêmios Antônio Luís Vianna (FUJB/UFRJ, 1999), Jovem Cientista do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, 2000), Gorgas (American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2001) e TWAS.

Em sua vida científica, se dedicou a identificar e compreender os mecanismos de sinalização celular potencialmente capazes de bloquear a transmissão de arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti*. Cultivou especial atenção àquelas moléculas sinalizadoras que afetam o metabolismo e a imunidade dos hospedeiros, que agem na fase que antecede a primeira refeição sanguínea do vetor. Seu objetivo maior era identificar novos alvos moleculares que pudessem ser usados para gerar um programa amplo e contínuo de bloqueio da primeira refeição sanguínea.

Por acreditar na educação e no potencial das gerações futuras, desenvolveu, ainda, várias atividades de Extensão destinadas à identificação de novos talentos em Ciência, através do ensino e da propagação da Bioquímica e da Entomologia Molecular. Em conjunto com a Escola Municipal Anísio Teixeira, no Rio de Janeiro, desenvolveu o projeto “Sons do Silêncio”, transformando em música os sons emitidos pelo *Aedes aegypti*. A sala de música dessa escola leva seu nome. Ainda no contexto da extensão, o grupo produziu e distribuiu, gratuitamente, diversos materiais didáticos, a saber: uma revista em quadrinhos sobre o centenário da doença de Chagas, distribuída gratuitamente, desde 2009 e uma cartilha digital sobre a bioquímica e imunidade do *Aedes aegypti*, disponibilizada desde 2013. Além disso, ministrou continuamente, por mais de 10 anos, cursos de férias sobre entomologia molecular para alunos e professores de escolas da rede pública do Estado do Rio de Janeiro.

Georgia Correa Atella



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

AGRADECIMENTO AOS REVISORES

Os autores e editores agradecem aos revisores abaixo relacionados, que gentilmente colaboraram na análise dos manuscritos originais de cada capítulo.

Biologia reprodutiva, vitelogênese e embriogênese

Capítulo 01

Revisão: Gustavo Rezende, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Capítulo 02

Revisão: Klaus Hartfelder, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Capítulo 03

Revisão: Pedro L. de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Sistemas

Capítulo 04

Revisão: Ana Beatriz Barletta, National Institutes of Health, EUA.

Capítulo 05

Revisão: Ana Claudia do Amaral Melo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Capítulo 06

Revisão: Rafael Diego da Rosa, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Capítulo 07

Revisão: Gustavo Bueno da Silva Rivas, Matica Biotechnology, EUA.

Metabolismo

Capítulo 08

Revisão: Gabriela de Oliveira Paiva Silva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Capítulo 09

Revisão: Luciane Carla Alberici, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Capítulo 10

Revisão: Lucas Freitas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Interação patógeno-vetor

Capítulo 11

Revisão: Daniele Castro, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Capítulo 12

Revisão: Fernando Genta, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Capítulo 13

Revisão: Luiz Fabiano Borges de Oliveira, National Institutes of Health, EUA

Capítulo 14

Revisão: Ana Beatriz Barletta, National Institutes of Health, EUA.

Interação vetor-hospedeiro vertebrado

Capítulo 15

Revisão: Fernando Genta, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Capítulo 16

Revisão: Patricia Hessab Alvarenga. National Institutes of Health, EUA.

Capítulo 17

Revisão: Pedro Amado Ceclio, National Institutes of Health, EUA.

Capítulo 18

Revisão: Clarissa Romero Teixeira, Fundação Oswaldo Cruz, Fortaleza.

Controle: mecanismos de resistência e novas tecnologias

Capítulo 19

Revisão: Maria Denise Feder, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Capítulo 20

Revisão: Pedro L. de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Capítulo 21

Revisão: João Trindade Marques, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Capítulo 22

Revisão: Matias Eliseo Melendez, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro.

Capítulo 23

Revisão: Luciana Araripe, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Capítulo 24

Revisão: Camila Mattos de Oliveira, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Capítulo 25

Revisão: Carlos Termignoni, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Capítulo 26

Revisão: Adalberto Perez de Leon, San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, EUA.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Prefácio

Este livro tem suas origens datadas, talvez, em 1997. Naquele ano, foi organizada a primeira reunião do grupo Arthromint, um nome inventado como forma de referenciar artrópodes e helmintos. De forma abreviada, tudo começa com um grupo de pesquisadores, inicialmente, ligados à bioquímica de invertebrados, que compartilhava o sentimento de que seus modelos de estudo eram animais “estranhos”, que ocupavam posições de pouco destaque nas reuniões anuais de bioquímica, dominadas por estudos dedicados, principalmente, à biologia de vertebrados. Surgiu, então, a ideia de organizar uma reunião independente, voltada para permitir, em um ambiente informal, a troca de informações relacionadas ao estudo de aspectos singulares da biologia destes fascinantes animais “desossados”. A especificidade da reunião, que se formou a partir dessa iniciativa, reside em colocar os estudantes no centro de todas as atividades e a sua mecânica consiste em misturar jovens e pesquisadores vindos de diferentes grupos, o que garante uma dinâmica fortemente multidisciplinar e contribui para quebrar barreiras institucionais. A trajetória desse grupo envolveu a formação de várias gerações de pesquisadores de múltiplas regiões de norte a sul do país, gerando grandes amizades, parcerias científicas produtivas, ideias e inúmeros projetos e redes de pesquisa colaborativas. Dentre estas redes, destaco o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, um consórcio de mais de 80 pesquisadores e cerca de 300 estudantes, que se mantém funcionando desde 2008.

Como uma forma de sistematizar essa experiência e contribuir para a formação dos alunos, surgiu, nas areias da Ilha Grande — onde se realizaram, até hoje, a maioria das reuniões do grupo Arthromint — a ideia de produzir um livro abrangente, escrito em português e de autoria de pesquisadores do grupo, visando proporcionar uma visão do estado da arte do conhecimento da sua área de pesquisa. Devemos a primeira edição desse livro, publicado em 2012, ao

professor Mário Alberto Cardoso da Silva Neto (UFRJ), que, juntamente com os professores Carlos Termignoni (UFRGS) e Carlos Winter (USP), entusiasmou os autores, reviu os textos e levou a cabo a árdua, mas bem sucedida tarefa de produção de uma peça de excelente qualidade. O falecimento de Mario gerou um vazio em todos nós, que talvez tenha dificultado a organização desse segundo volume, que sai como uma homenagem coletiva a um talentoso cientista e grande amigo, precocemente retirado do nosso convívio. Organizado pelos professores Andréa Fogaça (USP) e Itabajara da Silva Vaz (UFRGS), esse volume sai com 26 capítulos, alguns dos quais são versões atualizadas de capítulos existentes na primeira edição, somados à capítulos novos. O livro é organizado em blocos, que refletem as áreas de concentração da pesquisa em entomologia molecular no Brasil. Não é por acaso que o volume apresenta um perfil, de certa forma, similar ao clássico *Biology of Disease Vectors* (Marquardt, 2004), um livro influente gerado por uma série de cursos internacionais que levavam o mesmo nome e foram instrumentais no progresso da área de *Biologia de Insetos Vetores* (Beaty et al, 2009). A leitura dos textos do presente volume nos faz sentir a pulsação da ciência, que se faz viva nos laboratórios e que é trazida pelos alunos para as reuniões do Arthromint. Ao mesmo tempo, contextualiza, dentro de uma visão global do estado da arte, as questões biológicas ali relacionadas. Escrito em português, a leitura do livro mostra capítulos que se sucedem conjugando precisão e densidade, e cobrindo tópicos variados, entre eles aspectos fundamentais da biologia como determinantes moleculares da embriogênese e reprodução, aspectos variados da fisiologia insetos como hormônios, comportamento, ritmo circadianos, imunidade, metabolismo, genômica, interação entre insetos vetores e patógenos ou hospedeiros e, concluindo o volume, com análises de desafios ligados a uma perspectiva aplicada, como resistência a inseticidas, métodos inovadores de controle de insetos ou carrapatos e aplicações biotecnológicas. Em suma, o livro oferece, para aqueles que têm interesse na biologia de artrópodes, uma fascinante vista panorâmica da área, pela visão de alguns dos melhores grupos de pesquisa do país, que esperamos que acabe por se transformar em uma convidativa porta de entrada para novas gerações de estudantes.

Pedro Lagerblad de Oliveira
Coordenador do INCT-EM



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Biologia reprodutiva, vitelogênese e embriogênese





Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 1

Mosquitos e arbovírus: aspectos fisiológicos e moleculares da biologia reprodutiva de culicídeos

Luana Cristina Farnesi¹
Karine Pedreira Padilha¹
Léo Nava Piorsky¹
Dominici Cruz¹
Rafaela Vieira Bruno¹

¹Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Considerações iniciais

Mosquitos são vetores de importantes patógenos causadores de arboviroses consideradas endêmicas no Brasil, tais como dengue, zika e chikungunya. Para que ocorra sucesso no papel de mosquitos como vetores, aspectos relevantes de sua biologia reprodutiva devem ser considerados. Por este motivo, o foco deste capítulo é elucidar importantes pontos da biologia reprodutiva de culicídeos, com ênfase na interferência da infecção por patógenos em sua fisiologia reprodutiva. Destacaremos, ainda, os efeitos da infecção em nível bioquímico e molecular, nas estruturas reprodutivas.

Introdução

Mosquitos são insetos da ordem Diptera, da família Culicidae. Muitos gêneros estão envolvidos no ciclo de transmissão de diversos agentes etiológicos, responsáveis por graves questões de saúde pública (Clements, 1992, Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994, Vasconcelos, 2003; Huang et al., 2019; Bhatt et al., 2013, Kraemer et al., 2019). Os mosquitos estão agrupados em duas subfamílias: Culicinae e Anophelinae. A subfamília Culicinae é a maior e compreende 10 tribos, que reúnem 34 gêneros e cerca de 3.000 espécies. Nessa subfamília, estão os gêneros envolvidos com a transmissão de arbovírus (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Harbach, 2007). Por sua vez, a subfamília Anophelinae compreende apenas dois gêneros: *Chagasia*, cuja distribuição se concentra apenas na região Neotropical, e *Anopheles*, que engloba mais de 400 espécies, subespécies, tribos e variedades (Becker et al., 2020). Neste capítulo, abordaremos com maior ênfase os culicídeos.

Designa-se Arbovírus (do inglês, *Arthropod-borne virus*) os vírus transmitidos por artrópodes. Tal designação ocorre não somente pela transmissão do vírus ser realizada pelo artrópode, mas também pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer no vetor invertebrado. Entre os arbovírus, pode-se citar o vírus Dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKAV), o vírus Chikungunya (CHIKV), o vírus do Oeste do Nilo, (WNV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus Mayaro (MAYV) e o vírus Oropouche (OROV), que são responsáveis pela emergência ou reemergência de importantes doenças como: dengue, zika, chikungunya, febre do oeste do Nilo, febre amarela e febre amarela urbana. Tais doenças desafiam a saúde pública mundial e possuem os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Sabethes*, *Haemagogus* e *Culex* atuando como vetores em seus ciclos de transmissão (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Vasconcelos, 2003; Huang et al., 2019; Bhatt et al., 2013).

A importância do avanço no campo de estudos de vacinas é inegável, bem como a avaliação crítica de toda e qualquer estratégia de controle de vetores, para que se possa pensar em soluções para mitigar os danos causados por tais arboviroses (Valle et al., 2021). Neste sentido, o contínuo estudo das relações parasito-vetor é crucial para acompanhar a evolução, tanto dos vírus quanto dos vetores e, por conseguinte, das doenças.

Podemos medir o sucesso evolutivo dos insetos de diversas formas, mas certamente o número de descendentes por ciclo reprodutivo, que se relaciona diretamente com a extensão de sua distribuição, é um critério significativo e que deve ser considerado (Grimaldi & Engel, 2005). Outros critérios que podem ser usados são o sucesso na inseminação, o número de ovos viáveis, as escolhas de locais para desova e, até mesmo, as adaptações dos ovos a esse ambiente de escolha (Arnqvist & Nilsson, 2000). Uma adaptação muito importante é a resistência à dessecação, que permite a exposição dos ovos à baixa umidade, por um longo período (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Rezende et al., 2008; Valle et al., 2015, Farnesi et al., 2017).

Mosquitos e arbovírus: impacto e distribuição

Cerca de 3.500 espécies de culicídeos são conhecidas, com sua diversidade variando nas diferentes regiões biogeográficas. De maneira geral, a maior riqueza é encontrada na região Neotropical, com mais de 30% das espécies conhecidas. No Brasil, já foram registradas cerca de 400 espécies, que representaram mais de 40% das ocorrências neotropicais, sendo o ambiente de florestas tropicais o mais diverso e menos conhecido (Forattini, 2002).

A distribuição global dos principais mosquitos vetores de arbovírus de interesse médico, como *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* é um reflexo do processo de expansão do ser humano (Brown et al., 2011; Powell & Tabachnick, 2013; Kraemer et al., 2019), bem como das modificações ambientais causadas por ele (Wilke et al., 2021). Países em desenvolvimento são os mais afetados, tanto pela precária infraestrutura sanitária e dos sistemas públicos de saúde quanto pelas condições climáticas típicas das zonas tropicais e subtropicais, propícias ao desenvolvimento de vetores onde, em geral, esses países estão localizados (Clements, 1992; Bhatt et al., 2013; Valle et al., 2015; Kraemer et al., 2019).

Inseminação, hematofagia e desenvolvimento dos ovários: aspectos fisiológicos e moleculares

A reprodução dos mosquitos pode ser iniciada algumas horas após a emergência dos adultos, e a inseminação ocorrerá após a maturação sexual de machos e fêmeas. O modelo utilizado nesse tópico para descrição dos processos de inseminação, hematofagia e desenvolvimento dos ovários será o *Aedes aegypti*. Em fêmeas de *Ae. aegypti* sabe-se que os folículos dos ovários (ou câmaras de ovos) crescem de 40 até 100 μm , devido à captação do Hormônio Juvenil (HJ) III (HJ III) produzido pelo *corpus allatum*, do sistema nervoso, durante as primeiras horas pós-emergência (Hagedorn et al., 1977).

Os machos de *Ae. aegypti* levam cerca de 48 horas para completarem o processo de rotação de 180° dos últimos segmentos de sua genitália externa (ou terminália). Neste momento, estarão aptos para a cópula, quando poderão liberar o esperma contendo os espermatozoides no interior das fêmeas. Os espermatozoides são armazenados em câmaras revestidas de quitina, denominadas espermatecas, até o momento da fertilização. Assim, dependendo da espécie de mosquito, o número de espermatecas pode ser diferente. Por exemplo, os Anophelinos têm uma espermateca e os Aedinos têm três (Clements, 1992; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

Vale ressaltar que, em algumas espécies de culicídeos, é comum que fêmeas se tornem refratárias a futuras cópulas, após a primeira inseminação, evitando a segunda cópula com outros machos. (Baimai & Green, 1987; Hartberg, 1971; Young & Downe, 1983). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que em *Ae. aegypti*, espécie anteriormente considerada monândrica, uma segunda cópula é possível, dependendo do tempo em que a primeira foi realizada (Degner & Harrington, 2016a; Villarreal et al., 2018; Agudelo et al., 2021).

Alguns parâmetros podem influenciar na taxa de formação de esperma e na sua captação pelas fêmeas, como por exemplo, o tamanho dos insetos, a idade dos machos e algumas proteínas do fluido seminal dos machos (Helinski et al., 2012; Degner & Harrington, 2016b; Villarreal et al., 2018; Agudelo et al., 2021).

A inseminação e a fecundação do ovo (*i.e.*, o encontro entre gametas masculino e feminino), em dípteros, são processos separados. Isso porque, a fecundação só ocorre após todo o processo de maturação dos folículos ovarianos e dos ovócitos, quando estes se aproximam das espermatecas (Roth & Lynch, 2009; Degner & Harrington, 2016a).

Em *Ae. aegypti*, a inseminação tem relação com o *fitness* e com o comportamento das fêmeas de mosquitos, já tendo sido descrita a redução da amplitude da atividade locomotora diária das fêmeas inseminadas (Lima-Camara

et al., 2014). Durante a inseminação, a fêmea é provida de substâncias derivadas das glândulas acessórias dos machos (GAMs), que impedem cópulas posteriores, como demonstrado por Craig (1967), em experimentos com injeção de extratos de GAMs no tórax de fêmeas dessa espécie. Nesta situação, fêmeas controles foram injetadas com solução salina e permaneceram susceptíveis. Os primeiros isolados dos componentes destas glândulas, responsáveis por essa alteração comportamental foram, inicialmente, denominados matrone (Fuchs et al., 1969). Atualmente, sabe-se que vários outros peptídeos são transferidos dos machos às fêmeas de mosquitos, com uma provável diversidade de funções (Sirot et al., 2008, 2011).

Outros parâmetros do *fitness* de *Ae. aegypti* injetados com extratos de GAM foram avaliados por Villarreal e colaboradores (2018). Os autores demonstraram que fêmeas virgens submetidas a esse tratamento, tal como fêmeas inseminadas naturalmente tinham maior sobrevivência, ingeriam mais sangue e colocavam mais ovos por ciclo gonotrófico (CG) do que fêmeas não injetadas e/ou injetadas com salina. Vale ressaltar, ainda, que CG também pode ser chamado de ciclo de desenvolvimento ovariano, pois compreende o tempo entre o repasto sanguíneo e a postura de um lote de ovos pela fêmea (Valle et al., 2015).

Clifton e colaboradores (2014) também mostraram que, em *Ae. aegypti*, uma das substâncias transferidas pelo macho para a fêmea é o HJ III, o qual reduz a quantidade de folículos reabsorvidos pelas fêmeas, devido ao estresse nutricional, aumentando o número de folículos que entram no estágio vitelogênico e, conseqüentemente, aumentando o sucesso reprodutivo do inseto.

Além das variações fisiológicas, os estudos de transcriptoma também têm mostrado que a inseminação é um evento importante na história reprodutiva das fêmeas de *Ae. aegypti*. No trato reprodutivo inferior das fêmeas (*i.e.*, sem ovários), cerca de 150 genes têm sua expressão aumentada e 130 têm sua expressão reduzida em seis horas pós-inseminação (Alfonso-Parra et al., 2016). Curiosamente, quando a cópula foi impedida artificialmente, o contato de fêmeas virgens com machos alterou significativamente o perfil transcriptômico dessas fêmeas em relação às fêmeas virgens mantidas fora desse contato. Após a inseminação, esse perfil também é significativamente alterado (Alonso et al., 2019).

A inseminação também induz alterações no perfil de expressão de diversos genes na espermateca de *Ae. aegypti*. Camargo e colaboradores (2020) mostraram que as espermatecas de fêmeas inseminadas (independentemente do fato de estarem alimentadas com sangue ou não) apresentam cerca de 40 genes regulados positivamente em relação às espermatecas de fêmeas virgens. Entre esses genes, estão aqueles que codificam transportadores iônicos e

componentes relacionados à manutenção do equilíbrio osmótico e à proteção contra o estresse oxidativo, provavelmente atuando na homeostase do interior da espermateca e na proteção dos espermatozoides.

Apesar de provocar alterações na expressão de vários genes, alguns grupos de genes não têm sua expressão alterada devido à inseminação. É o caso da espécie *Ae. aegypti*, por exemplo, que possui os chamados genes de relógio biológico. Esses genes codificam componentes do mecanismo oscilatório, que geram os ritmos circadianos do inseto, como, por exemplo: a atividade locomotora, a sensibilidade olfativa e a oviposição. (Gentile et al., 2013). Fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas não apresentam alterações na amplitude de expressão dos genes da principal alça de regulação do relógio central (*i.e.*, os genes *period*, *timeless*, *Clock* e *cycle*) em relação a fêmeas virgens.

Independentemente do *status* de inseminação, antes de um repasto sanguíneo, os ovários dos mosquitos permanecem no chamado estágio de repouso previtelogênico, no qual cada folículo contém um oócito e sete células acessórias conectadas por pontes citoplasmáticas e com dimensões similares (Fill, 1978; Valzania et al., 2019). Nas primeiras 24 horas desse estágio, o HJ III induz, no intestino médio das fêmeas, a produção da tripsina precoce, uma protease essencial para a digestão do sangue, que será, posteriormente, obtido no repasto sanguíneo, necessário para maturação dos ovos (Noriega et al., 1997).

Durante as primeiras horas após o repasto, as proteínas da via de sinalização *target of rapamycin* (TOR) atuam no reconhecimento dos aminoácidos adquiridos e induzem a produção da tripsina precoce, mantendo seus níveis no intestino médio (Brandon et al., 2008). A ação da via TOR, por sua vez, em conjunto com os peptídeos semelhantes à insulina (ILP, do inglês *insulin-like peptides*), secretados pelo sistema nervoso central, coordena a digestão sanguínea e a maturação dos ovos. Desses peptídeos, o ILP3 é essencial para a expressão dos genes que codificam as tripsinas de fase tardia presentes no intestino médio, entre 12 e 48 horas após a alimentação sanguínea (Gulia-Nuss et al., 2011).

Nesse processo, é importante notar que ambas as tripsinas precoces e tardias são codificadas por uma grande família gênica, participando, ambas, da digestão do repasto sanguíneo, mas em momentos diferentes (Muhlia-Almazán et al., 2008). A alimentação sanguínea induz a produção do hormônio ecdisteroigênico ovariano (HEO) e dos ILP pelas células do sistema nervoso central das fêmeas, o que inicia o processo de vitelogênese (Brown et al., 1998; Gulia-Nuss et al., 2011). Tanto o HEO como os ILP pertencem à categoria das parsinas, neuropeptídeos grandes descobertos no sistema nervoso de insetos (Badisco et al., 2007). Contudo, o HEO não é uma ILP, pois pertence à família das

neuroparsinas (Badisco et al., 2007; Brown et al., 1998). Valzania e colaboradores (2019) demonstraram que, em *Ae. aegypti*, o HEO e a ILP3 ativam a via TOR e a via de insulina/sinalização de fator de crescimento de insulina (ISI), a partir dos aminoácidos obtidos da alimentação sanguínea. Essas vias, por sua vez, inibem a ação da *glycogen synthase kinase 3* (GSK3), pela proteína Akt fosforilada (pAKT), permitindo a progressão dos folículos primários ao estágio vitelogênico. A enzima GSK3, portanto, mantém os folículos no estágio de repouso previtelogênico, até a alimentação sanguínea.

A ação conjunta do HEO e dos ILPs induz à produção do hormônio esteroide ecdisona (20-hidroxiecdisona ou 20E) pelos ovários. A 20E é transportada pelo hemolinfa até o corpo gorduroso, que é um tecido importante para a manutenção das reservas nutricionais e da imunidade nos insetos. Além disso, promove a síntese e a liberação de proteínas precursoras do vitelo (PPVs) pelos adipócitos desse tecido para a hemolinfa, as quais serão captadas pelos ovários e acumuladas nos oócitos. Das PPVs verificadas no vitelo dos oócitos, encontram-se a carboxipeptidase vitelogênica, a catepsina vitelogênica B (ambas proteases) e, predominantemente, a vitelogenina (Vg) (Snigirevskaya et al., 1997). Entretanto, a 20E, sozinha, não induz a expressão dos genes das PPVs no corpo gorduroso, o que ocorre pela via TOR induzida pelos aminoácidos adquiridos com o repasto sanguíneo (Hansen et al., 2004). Por fim, a liberação de 20E induz a expressão das chamadas proteínas induzidas por ecdisona (*Ecdysone induced proteins*) nos ovários, as quais são atuantes no processo de vitelogênese.

A proteína E75, por sua vez, é um fator de transcrição com três isoformas distintas (E75-RA, E75-RB e E75-RC), cuja expressão aumenta logo após o repasto sanguíneo em *Ae. aegypti* (Pierceall et al., 1999). Cruz e colaboradores (2012) observaram que a E75 medeia qual a expressão de Vg no corpo gorduroso, diferencialmente, a partir de três de suas isoformas: enquanto E75-RA induz a expressão de Vg, E75-RC inibe sua expressão e E75-RB parece não participar nesse processo. A E75 também medeia expressão de Vg no corpo gorduroso induzida pelo grupo heme (componente do sangue ingerido pelo mosquito e que atua como um sinalizador para o início da vitelogênese) (Cruz et al., 2012). Após a produção das PPVs, o corpo gorduroso dos mosquitos sofre um processo de autofagia, essencial para a finalização da vitelogênese e o desenvolvimento normal do próximo ciclo gonotrófico da fêmea (Bryant & Raikhel, 2011). Xueli e colaboradores (2021) mostraram que a proteína 93 induzida por ecdisona (E93) participa da indução desse processo autofágico.

Estudos têm demonstrado, ainda, a importância dos microRNA (miRNA) no sucesso da vitelogênese, tanto na indução da produção de proteínas do vitelo

quanto na finalização do estágio de vitelogênese, alguns dos quais também são induzidos pela 20E. Bryant e colaboradores (2010), por exemplo, demonstraram que a depleção do microRNA de *Ae. aegypti* miR-275 compromete a digestão e excreção da alimentação sanguínea em fêmeas desse mosquito, além de impedir o desenvolvimento normal dos oócitos. A expressão do miR-8 é essencial para a secreção de lipoforina (um carreador de lipídeos) e Vg pelo corpo gorduroso em *Ae. aegypti* (Lucas et al., 2015). A atuação do miR-2940, induzida pelo HJ e mediada por uma isoforma da E75 (E75-RD), é essencial para a o desenvolvimento dos folículos e a manutenção do número de ovos postos pelas fêmeas de *Ae. aegypti* (Aksoy & Raikhel, 2021).

A captação das proteínas do vitelo pelos folículos ovarianos é mediada por receptores celulares, com estudos mais aprofundados nos receptores de vitelogenina (RVg). O RVg é uma proteína exclusiva dos ovários de mosquitos e se localiza no córtex e nas microvilosidades da membrana dos oócitos. É internalizado junto à Vg, formando corpos transitórios de vitelo (CTVs), à medida que se fundem a endossomos precoces no citoplasma. Após a internalização e na sequência de várias etapas de fusão de endossomos pelo CTV, a Vg dessas organelas cristaliza-se, originando a vitelina (Vt), a qual permanece acumulada nos corpos maduros de vitelo, até seu uso no desenvolvimento embrionário (Sappington et al., 1995; Snigirevskaya et al., 1997).

Ao final da vitelogênese, as células acessórias dos folículos primários se degeneram e os oócitos apresentam, em sua posição anterior, células polares, que formarão a micrópila do ovo (Soumaré & Ndiaye, 2005). É por meio da micrópila que o espermatozoide entrará no ovócito e iniciará a embriogênese, após a postura (Degner & Harrington, 2016b). Entre 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea, a membrana epitelial dos ovócitos começa a ser substituída pelo córion, o revestimento que irá formar a casca do ovo, com uma camada mais interna e densa, o endocóron, que é uma fina e externa camada lamelar com tubérculos (Christophers 1960, Curtin & Jones 1961; Clements 1992; Valle et al., 1999). Em *Ae. aegypti*, cerca de 3 dias após a alimentação sanguínea, os ovos de mosquitos estão aptos a serem postos pela fêmea (Curtin & Jones, 1961). Posteriormente, os folículos secundários tornar-se-ão folículos primários e entrarão no estágio de repouso previtelogênico (dando seguimento a outro CG), até uma futura alimentação sanguínea.

Os determinantes moleculares da embriogênese da maioria das espécies de mosquitos ainda são pouco conhecidos, em comparação ao modelo *Drosophila melanogaster*. Enquanto as vias de sinalização responsáveis pelos determinantes anterior e posterior do embrião são extensivamente estudadas nesse modelo (revisado em Merkle et al., 2020), os ensaios feitos em ovos de

mosquitos são, na maioria das vezes, descritivos sobre a expressão de alguns genes determinantes (Calvo et al., 2005; Juhn et al., 2008; Yoon et al., 2019). No entanto, alguns pontos merecem destaque. Ao longo da evolução de dípteros, houve mudanças importantes nos determinantes anteriores dos embriões dessa classe. Mosquitos pertencentes ao grupo Culicomorpha têm como responsáveis pela determinação anterior os genes *cucoid* e *pangolin* (*pan*). Enquanto isso, drosofilídeos, que fazem parte de um grupo mais derivado chamado Cyclorrhapha, têm *bicoid* (*bcd*) como principal gene nessa função (Wiengmann et al., 2011; Yoon et al., 2019). Por sua vez, os genes *nanos* (*nos*) e *oskar* (*osk*) são conservados evolutivamente e apresentam padrão de expressão espaço-temporal semelhantes em *Drosophila* e em mosquitos (Calvo et al., 2005; Juhn et al., 2008).

Postura e adaptações dos ovos: características ambientais e bioquímicas

Tipos e locais de postura de ovos de importantes culicídeos

Em mosquitos, a escolha do local onde a postura dos ovos será realizada pode ser considerada, até certo ponto, espécie-específica, que depende da percepção de características, que variam entre as espécies. Entre essas características, podemos citar: i) a presença de imaturos da mesma espécie; ii) o odor; iii) a salinidade; iv) a quantidade de matéria orgânica e v) os níveis de sombreamento. Certamente, a oviposição é um dos elementos críticos que contribuem para a expansão de populações de mosquitos vetores (Clements, 1992, Forattini, 2002; Honório & Lourenço-de-Oliveira, 2001). Destacamos, a seguir, algumas características de oviposição de importantes gêneros de culicídeos vetores.

As fêmeas de mosquitos do gênero *Culex* põem os ovos em conjunto, diretamente na superfície da água, formando aglomerados formados por dezenas de ovos comumente chamados de jangadas (Figura 1); geralmente fazem a postura em locais com grande quantidade de matéria orgânica (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Além disso, já foi descrito na literatura que fêmeas grávidas de *Culex quinquefasciatus* podem selecionar seu local de oviposição, por influência de feromônio emanado das gotículas apicais dos ovos, colocados, anteriormente, por outras fêmeas (Laurence & Pickett, 1982).

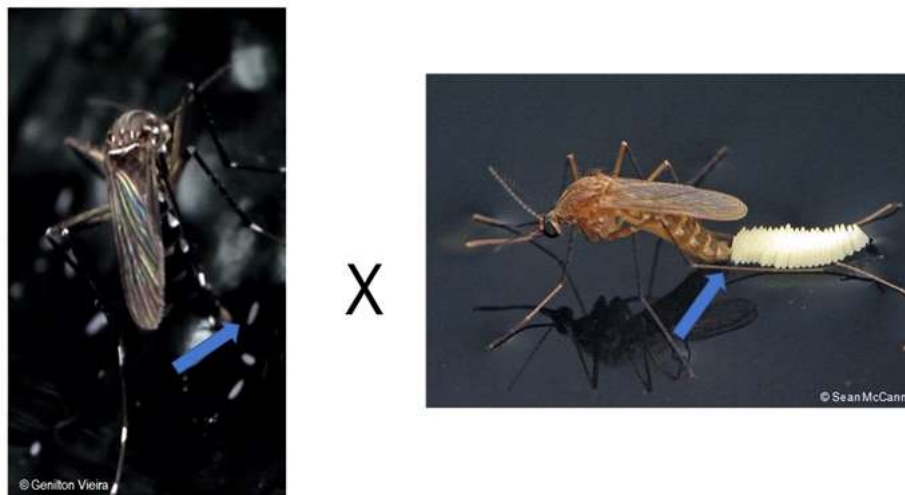


Figura 1: Exemplos de postura de ovos de mosquitos. À esquerda, fêmea do gênero *Aedes* e à direita, fêmea do gênero *Culex*, ambas realizando postura. Fêmea de *Aedes* colocando ovos separadamente; fêmea de *Culex* colocando ovos aglomerados, formando “jangada”. Os ovos dos dois gêneros recém postos têm coloração branca (setas azuis).

Fonte: Crédito nas fotos

Muitas espécies do gênero *Aedes* (como o vetor *Ae. aegypti*) depositam ovos na linha da superfície da água, onde ficam aderidos até a eclosão das larvas. Em criadouros temporários ou permanentes, naturais ou artificiais, os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* costumam colocar ovos em locais que acumulam água com baixa quantidade de matéria orgânica (Christophers, 1960; Clements, 1992; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Valle et al., 2015; Abreu et al., 2015). As fêmeas de *Ae. aegypti* tendem a colocar seus ovos em mais de um sítio de oviposição (dentro do mesmo CG). Tal característica pode aumentar, estrategicamente, as chances de sobrevivência e de dispersão das larvas, caso algum sítio de oviposição seja eliminado ou não tenha condições ideais para sobrevivência da prole (Abreu et al., 2015).

Mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* são silvestres, ou seja, esses vetores se concentram nos locais de vegetação preservada ou na periferia das florestas, dependendo da espécie. As fêmeas desses dois gêneros colocam seus ovos em locais da mata que acumulam água, como ocos de árvores e vegetação úmida. Assim como os *Aedes*, os *Haemagogus* não depositam seus ovos diretamente na superfície aquática, mas na parede interna do criadouro, próximo à lâmina d'água (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Marcondes & Alencar, 2010). Os criadouros usados por esses mosquitos podem ser afetados por flutuações do nível da água, com potenciais áreas de reprodução, ficando sem água em períodos mais secos e quentes. Já estão descritas na literatura estratégias de algumas espécies para lidar com essas questões ambientais (Alencar et al., 2008; Marcondes & Alencar, 2010). Um exemplo acontece com

mosquitos do gênero *Haemagogus*, mais especificamente com o vetor *Hg. leucocelaenus*, em que apenas parte dos seus ovos eclode após serem submersos em água. A outra parte, que foi posta do mesmo lote de ovos (mesmo CG), permanece latente, pronta para eclodir em outras submersões. Assim, diferentes grupos de mosquitos eclodem ao longo do tempo, favorecendo a sobrevivência da espécie, no ambiente, por extensos períodos (Marcondes & Alencar, 2010).

Por sua vez, os mosquitos do gênero *Sabethes*, assim como os do gênero *Culex*, lançam seus ovos diretamente sobre a superfície da água, pois os ovos dos sabetíneos não são resistentes à dessecação. De maneira geral, as fêmeas grávidas do gênero *Sabethes* lançam um ou dois ovos por vez, em orifícios de recipientes, como internódios de bambus, ocos de árvores e bromélias que contêm água no interior. Essa escolha de local de oviposição faz com que os ovos possam se desenvolver, mesmo em períodos de seca, pois os locais escolhidos conseguem se manter úmidos por mais tempo (Forattini, 2002; Bastos et al., 2021).

Características dos ovos de culicíneos: aspectos físicos e bioquímicos relativos às adaptações ambientais

Em mosquitos, o processo de embriogênese se desenvolve dentro do ovo e é considerada o período que se estende do momento da fusão dos núcleos dos gametas feminino e masculino até a formação completa da larva, antes da eclosão. Assim como em outros insetos, a forma dos ovos dos mosquitos é determinada durante o processo de ovogênese. Durante esse período, a produção e a maturação dos ovos ocorrem a partir da proliferação e da diferenciação das células-tronco primordiais nas fêmeas (Christopher, 1960; Clements, 1992; Chapman, 1998).

Os ovos de mosquito possuem características específicas, que podem ter importância taxonômica, como a forma dos tubérculos do exocório (Valle et al., 1999). No caso dos mosquitos vetores, os ovos, que não se dispersam de maneira ativa, têm ainda o potencial de ser alvo de ações de vigilância e controle populacional (Beament, 1989; Noleto et al., 2020).

Ovos de mosquito possuem diferentes tamanhos, volume, forma, composição e colorações de cascas, dependendo do gênero e até da espécie (Figura 2). Tais características podem ter funções fisiológicas específicas de cada gênero ou espécie (Monnerat et al., 1999; Li & Li, 2006; Vargas et al., 2014; Farnesi et al., 2015; Farnesi et al., 2017).

Em vetores como *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, a casca é a cobertura externa ao embrião que, além de sua proteção física, é relacionada com o manejo



Figura 2: Ovos de diferentes espécies de culicídeos: diferentes tamanhos e colorações das cascas.

Fonte: Crédito nas fotos

De maneira geral, em culicídeos, os ovos recém postos têm coloração branca, são flexíveis e permeáveis e irão adquirir sua coloração final e maior rigidez durante o desenvolvimento embrionário (Clements, 1992, Chapman, 1998, Li & Li, 2006, Rezende et al., 2008). Essas características são relacionadas com o revestimento dos ovos. Parte desse revestimento é produzido no ovário e chamado de córion, estrutura complexa e formada por duas subcamadas: i) o endocórion, mais homogêneo, que muda de coloração e que não se desprende do embrião até a eclosão da larva; ii) e o exocórion, mais heterogêneo, transparente e mais frouxo, que se desprende do endocórion com certa facilidade (Clements, 1992, Chapman, 1998, Monnerat et al., 1999, Valle et al., 1999; Farnesi et al., 2017). A espessura do endocórion varia na família Culicidae, na qual há registros entre 0,6 e 5 μm (Clements, 1992, Monnerat et al., 1999).

O enrijecimento e o escurecimento dos ovos estão relacionados à esclerotização à melanização do endocórion, que ocorre em muitos mosquitos, no início do desenvolvimento embrionário (Clements, 1992; Li & Li, 2006; Rezende et al., 2008; Farnesi et al., 2017). A casca se torna completa em momento posterior da embriogênese e que corresponde, em média, a 30% do desenvolvimento embrionário total. A composição final do revestimento dos ovos será, então, composta por três camadas, desde a mais externa até a mais interna: o exocórion, o endocórion e a cutícula serosa (Clements, 1992; Valle et al., 1999; Rezende et al., 2008; Farnesi et al., 2017). A cutícula serosa é formada quando um grupo de células extraembrionárias, chamada *serosa*, envolve completamente o embrião e secreta esta matriz extracelular situada internamente ao endocórion (Clements, 1992; Rezende et al., 2008; Vargas et al., 2014). Concomitantemente à formação da cutícula serosa, ovos de mosquitos se tornam total ou parcialmente impermeáveis (Beckel 1958; Rezende et al., 2008; Goltsev et al., 2009; Vargas et al., 2014; Farnesi et al., 2017), fenômeno que denominamos de resistência do ovo à dessecação. Essa resistência é importante, principalmente, quando

consideramos mosquitos vetores que realizam postura de ovos em criadouros temporários, um risco para sua dessecação, uma vez que inviabiliza a eclosão.

Na literatura, consta que mosquitos possuem diferenças no nível de resistência dos ovos à dessecação: ovos de *Ae. aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* possuem, respectivamente, alta, média e baixa resistência ao ressecamento (Vargas et al., 2014). A resistência de ovos à dessecação é também relacionada à composição bioquímica das cascas. A biossíntese de quitina, os processos de esclerotização, que são feitos através de *crosslink* com proteínas, e o nível de melanização das cascas estão relacionados com o nível dessa resistência, em diferentes mosquitos vetores (Li & Li, 2006; Rezende et al., 2008; Goltsev et al., 2009; Farnesi et al., 2017).

O revestimento dos ovos de mosquitos vetores possui um importante papel na proteção e na manutenção do balanço hídrico dos embriões, visto que é crucial para a viabilidade dos ovos (Clements, 1992; Rezende et al., 2008, Farnesi et al., 2017). Além do mais, outras características das cascas dos ovos podem ter relação com questões ecológicas, tais como a capacidade de dispersão e a conquista de novos *habitats* (Harwood & Horsfall, 1959; Christophers, 1960; Juliano & Lounibos, 2005; Farnesi et al., 2017).

Importantes aspectos reprodutivos: relação com a infecção por arbovírus e outros parasitas

Em culicídeos vetores, muitos estudos focam no entendimento acerca dos aspectos reprodutivos de fêmeas, devido à sua importância na manutenção das populações, que têm relação direta com o controle desses insetos. Compreender se há alterações nos parâmetros reprodutivos e como elas ocorrem quando os mosquitos estão infectados por diferentes patógenos é fundamental para um melhor entendimento sobre a sua capacidade vetorial. A capacidade vetorial é determinada através de uma fórmula, em que importantes aspectos comportamentais, fisiológicos e ambientais são levados em consideração, buscando compreender como ocorre a transmissão e a disseminação de patógenos pelos seus vetores (Macdonald, 1961; Valle et al., 2015; Bruno et al., 2019).

A infecção por patógenos acontece no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (transmissão horizontal). Entretanto, há possibilidade de a fêmea transmitir os patógenos para uma parte de seus ovos (transmissão vertical) (Dutary & Leduc 1981; Wu et al., 2019). O contato com patógenos pode, ainda, alterar diversos parâmetros reprodutivos dos mosquitos (Hogg & Hurd 1997; Ahmed et al., 1999; Styer et al., 2007; Maciel-de-Freitas et al., 2011; Sylvestre et al., 2013; Padilha et al., 2018; Pigeault & Villa 2018; Silveira et al., 2018; Resck et

al., 2020; Soni et al., 2020; Bombaça et al., 2021). Alguns destes parâmetros que podem ser alterados são: i) a fecundidade das fêmeas, que é mensurada através do número de ovos postos; ii) a fertilidade, que é a quantidade de ovos que eclodem em larvas e que seguem para a próxima fase do ciclo de vida do mosquito; iii) a esterilidade das fêmeas (número de fêmeas que não colocam ovos – que chamamos de fêmeas nulas) e iv) a eficiência de oviposição (que, neste capítulo, consideramos as fêmeas que colocam grande quantidade de ovos, sendo representativo do que ocorre na natureza, de acordo com Padilha et al., 2018; Resck et al., 2020).

Em *Ae. aegypti*, estudos da relação entre infecção com arbovírus como DENV, ZIKV e CHIKV e parâmetros reprodutivos estão ganhando cada vez mais espaço na literatura. Resck e colaboradores (2020) descreveram que a infecção por CHIKV causa diminuição na viabilidade de ovos postos por fêmeas infectadas, independentemente da idade das fêmeas. Por outro lado, a infecção não altera a fecundidade, ou seja, não há modificação no número de ovos postos. As fêmeas colocam ovos em igual número, mas aspectos da ovogênese e embriogênese não foram avaliados neste trabalho (Resck et al., 2020).

Quanto à infecção por ZIKV, as fêmeas de *Ae. aegypti* não apresentaram modificação na fecundidade e nem na fertilidade (viabilidade dos ovos) (Padilha et al., 2018; Silveira et al., 2018; Resck et al., 2020). Porém, essa infecção alterou outro aspecto reprodutivo: o aumento na quantidade de fêmeas que não colocam ovos quando estas estão mais velhas (2º CG) (Resck et al., 2020).

Em relação à infecção por DENV, considerando o número de ovos das fêmeas que colocam ao menos um ovo, Maciel-de-Freitas e colaboradores (2011) observaram que a fecundidade das fêmeas infectadas com o sorotipo DENV2 varia, ao longo da vida, apresentando diminuição, neste aspecto, somente a partir do terceiro CG (fêmeas com cerca de 18 dias de idade). Esses dados são consistentes com a disseminação viral de DENV2 em *Ae. aegypti*, que, com 15 dias, já se encontra disseminado por vários tecidos do mosquito, incluindo os ovários (Salazar et al., 2007). Ainda, Sylvestre e colaboradores (2013), considerando os mesmos parâmetros de eficiência de oviposição, observaram que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas por DENV2 apresentam queda nessa eficiência com o passar da idade dos mosquitos, principalmente no 3º e 4º CG. Soni e colaboradores (2020) analisaram os diferentes sorotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4) no primeiro CG das fêmeas de *Ae. aegypti* e verificaram que a infecção diminui, substancialmente, a fecundidade das fêmeas infectadas com qualquer um dos quatro sorotipos, sendo mais evidenciada com o DENV3. Adicionalmente, houve queda na viabilidade dos ovos postos pelas fêmeas infectadas por DENV1, DENV3 e DENV4, mas a viabilidade não foi alterada em DENV2.

A alteração na fertilidade e fecundidade acontece, também, quando *Ae. aegypti* está infectado por outros parasitas, que não vírus. Bombaça e colaboradores, mais recentemente (2021), realizaram estudos com infecções artificiais do protozoário tripanossomatídeo *Strigomonas culicis*, um protozoário monoxênico e parasita obrigatório encontrado no intestino médio de vários mosquitos. Foi visto que a infecção artificial de *Ae. aegypti* com tal protozoário prejudicou a viabilidade de ovos oriundos de fêmeas infectadas em relação às fêmeas controle e houve expressiva redução na eficiência de oviposição.

Dentro do gênero *Aedes*, Soni e colaboradores (2020) observaram que fêmeas de *Ae. albopictus* infectadas pelos quatro sorotipos de DENV apresentaram significativa queda na sua fecundidade. Ademais, a viabilidade dos ovos também foi afetada. Os ovos de fêmeas de *Ae. albopictus* apresentaram viabilidade de 20%, quando infectadas com sorotipo DENV1, 51% com o sorotipo DENV2, 22% com DENV3 e 38% com DENV4.

Em mosquitos do gênero *Culex*, dados semelhantes foram observados em diferentes espécies. Em *Cx. pipiens*, o vetor natural em campo do *Plasmodium relictum*, agente etiológico da malária aviária, Pigeault & Villa (2018) estudaram a infecção por este *Plasmodium*, em três ciclos gonotróficos seguidos, em que a refeição com sangue infectado era recebida somente uma vez (no primeiro CG). Os pesquisadores observaram diferenças na fecundidade das fêmeas infectadas, que colocam, estatisticamente, menos ovos do que as fêmeas controles, em todos os CG's analisados. Na espécie *Cx. tarsalis*, Styer e colaboradores (2007) analisaram a influência da infecção pelo WNV membro da família Flaviviridae, na fecundidade das fêmeas e, tal qual em outros exemplos, as fêmeas infectadas apresentaram menor fecundidade em comparação às controle, principalmente na primeira postura de ovos (1º CG).

Finalmente, no gênero *Anopheles*, Hogg e Hurd (1997) observaram, em fêmeas de *An. gambiae* capturadas da natureza e infectadas com *Plasmodium falciparum* (o principal parasita da malária em humanos), que havia redução de cerca de 17% na produção de ovos destas fêmeas comparadas às não infectadas (Hogg & Hurd, 1997). Também nesta espécie, mas em fêmeas infectadas pelo parasita da malária em roedores, *Plasmodium yoelii nigeriensis*, foi observado que a fecundidade e a fertilidade são significativamente reduzidas. A fecundidade apresentou queda de cerca de 40% e a viabilidade de, aproximadamente, 60% (Ahmed et al., 1999).

Compilados, os trabalhos discutidos nesse tópico comprovam que a infecção por parasitas de diferentes naturezas pode modular importantes parâmetros reprodutivos de mosquitos vetores e, conseqüentemente, impactar diretamente na capacidade vetorial.

Considerações finais

O sucesso reprodutivo de uma espécie depende de vários fatores, tais como a corte, a cópula e o desenvolvimento dos ovos e sua distribuição. No caso de vetores, os ovos têm importância primordial, uma vez que são os mais facilmente eliminados, se pensarmos em estratégias de controle, mas, paradoxalmente, ainda são pouco estudados em relação à espécie modelo *Drosophila melanogaster* e dentro do próprio ciclo de vida do vetor.

Adultos são os que atuam como vetores propriamente, mas muitas etapas do êxito na transmissão de patógenos estão relacionadas à quantidade e à qualidade da postura, bem como à distribuição e às características destes ovos. Esperamos que estudos acerca destes aspectos da biologia dos vetores continuem crescentes para maior conhecimento e aplicação em diferentes estratégias de controle e vigilância com melhorias na saúde pública.

Referências

- Abreu FV, Morais MM, Ribeiro SP, Eiras AE 2015. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(5):669-76.
- Agudelo J, Alfonso-Parra C, Avila FW 2021. Male Age Influences Re-mating Incidence and Sperm Use in Females of the Dengue Vector *Aedes aegypti*. Front Physiol. 12:691221.
- Ahmed AM, Maingon RD, Taylor RJ *et al.* 1999. The effects of infection with *Plasmodium yoelii nigeriensis* on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol. 10(4):347-56.
- Aksoy E, Raikhel AS 2021. Juvenile hormone regulation of microRNAs is mediated by E75 in the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci U S A. 118(29):e2102851118.
- Alfonso-Parra C, Ahmed-Braimah YH, Degner EC *et al.* 2016. Mating-Induced Transcriptome Changes in the Reproductive Tract of Female *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 10(2):e0004451.
- Alencar J, Almeida HM, Castro FC, Silva OV, Dégallier N, Marcondes CB, *et al.* 2008. Effect of multiple immersions on eggs and development of immature forms of *Haemagogus janthinomys* from south-eastern Brazil (Diptera: Culicidae). Entomol News. 119:239-44.
- Alonso, DP, Melina C, Troca H *et al* 2019. Gene expression profile of *Aedes aegypti* females in courtship and mating. Sci Rep. 9(1):15492.
- Arnqvist G, Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. Anim Behav. 60(2):145-164.
- Badisco L, Claeys I, Loy TV *et al* 2007. Neuroparsins, a family of conserved arthropod neuropeptides. Gen and Comp Endoc. 153(1): 64–71.
- Baimai V, Green CA 1987. Monandry (monogamy) in natural populations of anopheline mosquitoes. J Am Mosq Cont Ass. 3(3): 481–484.
- Bastos AQ, Leite PJ, de Mello CF, Maia DA, Machado SL *et al.* 2021. Bionomy of Mosquitoes in Bamboo Internodes in an Atlantic Forest Remnant of the State of Rio De Janeiro, Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 1;37(4):208-215.
- Beament J 1989. John Hull Grundy lecture. Eggs - the neglected insects. J Royal Army Medical Corps. 135: 49-56.
- Beckel W 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. Can J Zool. 36: 541-554.
- Becker, N. *et al.* (2020). Subfamily Anophelinae. In: Mosquitoes. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11623-1_9
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ *et al.* 2013. The global distribution and burden of dengue. Nature 496: 504-7.

Bombaça ACS, Gandara ACP, Ennes-Vidal V *et al.* 2021. *Aedes aegypti* Infection with Trypanosomatid *Strigomonas culicis* Alters Midgut Redox Metabolism and Reduces Mosquito Reproductive Fitness. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:732925.

Brandon MC, Pennington JE, Isoe J *et al.* 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 38(10):916-22.

Brown JE, McBride CS, Johnson P *et al.* 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc Biol Sci* 278: 2446–2454.

Brown MR, Graf R, Swiderek KM, *et al.* 1998. Champagne DE, Lea AO. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *J Biol Chem.* 273(7):3967-71.

Bruno RV, Farnesi LC, Araripe LO 2019. Effects of arbovirus infection on *Aedes aegypti* behavior. In: David Claborn. (Org.). *Current Topics in the Epidemiology of Vector-Borne Diseases.* Londres: InTechOpen, v. 1, p. 1-10.

Bryant B, Macdonald W, Raikhel AS 2010. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(52):22391-22398.

Bryant B, Raikhel AS 2011. Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles. *PLoS One.* 6(11):e25502.
Calvo E, Walter M, Adelman ZN, *et al.* 2005. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35(7):789-98.

Camargo C, Ahmed-Braimahet YH, Amaro IA *et al.* 2020. Mating and blood-feeding induce transcriptome changes in the spermathecae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Scientific Rep.* 10(1):1–14

Chapman RF 1998. *The insects - Structure and function*, Cambridge University Press, 959p.

Christophers SR 1960. *Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge at the University Press, Cambridge, 752p.

Clements A 1992. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.*, Chapman and Hall, London, 509p.

Clifton ME, Correa S, Rivera-Perez C 2014. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *J Insect Physiol.* 64(1): 40–47.

Consoli RA & Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 228p.

Craig GB 1967. Mosquitoes: Female Monogamy Induced by Male Accessory Gland Substance. *Science.* 156:1499-1501.

Cruz J, Mane-Padros D, Zou Z *et al.* 2012. Distinct roles of isoforms of the heme-liganded nuclear receptor E75, an insect ortholog of the vertebrate Rev-erb, in mosquito reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 349(2):262-71.

Cruz, Léo Nava Piorsky Dominici. Caracterização da expressão de genes de relógio em ovários de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológica. Orientador(a): Rafaela Vieira Bruno. 2022. 72f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2022.

Curtin TJ, & Jones JC 1961. The mechanism of ovulation and oviposition in *Aedes aegypti*. *Ann Entomol Soc Am.* 54(2): 298-313.

Degner, EC & Harrington LC 2016a. Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 780–785.

Degner EC & Harrington LC 2016b. A mosquito sperm's journey from male ejaculate to egg: mechanisms, molecules, and methods for exploration. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 897–911.

Dhara A, Eum JH, Robertson A *et al.* 2013. Ovary ecdysteroidogenic hormone functions independently of the insulin receptor in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 43(12):1100-8.

Dutary BE, Leduc JW 1981. Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, *Haemagogus equinus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75(1):128.

Farnesi LC, Barbosa CS, Araripe LO *et al.* 2018. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 113(4):e170362.

Farnesi LC, Martins AJ, Valle D *et al.* 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 124-6.

Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, *et al.* 2015. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol* 83: 43–52.

Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, *et al.* 2017. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(10):e0006063.

Fill A 1978. Follicle cell bridges in the mosquito ovary: syncytia formation and bridge morphology. *J Cell Sci.* 31:137-43.

Forattini OP 2002. Culicidologia médica. Identificação, biologia, epidemiologia. V.2. Edusp, São Paulo, 864p.

Fuchs MS, Craig GB, Despommier DD 1969. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol., 15: 701-709.

Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, *et al.* 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. Dev Biol 330: 462-70.

Grimaldi D & Engel MS 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 772p.

Gulia-Nuss M, Robertson AE, Brown MR *et al.* 2011. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. PLoS ONE. 6(5):e20401.

Hagedorn HH, Turner S, Hagedorn EA *et al.* 1977. Postemergence growth of the ovarian follicles of *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 23(2):203-6.

Hansen IA, Attardo GM, Park JH *et al.* 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. Proc Natl Acad Sci USA. 101(29):10626-31.

Harbach RE 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 16681:591-638.

Hardin PE 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. Advances in genetics 74: 141-173.

Hartberg WK 1971. Observations on the mating behaviour of *Aedes aegypti* in nature. Bull World Health Org. 45(6): 847–850.

Harwood RF, Horsfall WR 1959. Development, structure, and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. III. Functions of coverings. Ann Entomol Soc Am 52: 113–116.

Helinski MEH, Deewatthanawong P, Sirot LK *et al.* 2012. Duration and dose-dependency of female sexual receptivity responses to seminal fluid proteins in *Aedes albopictus* and *A. aegypti* mosquitoes. J. Insect Physiol. 58, 1307–1313.

Hogg JC, Hurd H 1997. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. Parasitology. 114 (Pt 4):325-331.

Honório NA & Lourenço-de-Oliveira R 2001. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. Rev Saúde Púb 34: 385-391.

Huang YS, Stephen H, Vanlandingham DL. 2019. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses, Curr Opin Virol 34, 104-109.

Juhn J, Marinotti O, Calvo E *et al.* 2008. Gene structure and expression of Nanos (nos) and Oskar (osk) orthologues of the vector mosquito, *Culex quinquefasciatus*. Insect Mol Biol. 17(5):545-52.

- Juliano SA & Lounibos P 2005. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecol Letters* 8: 558-574.
- Kliwer JW 1961. Weight and Hatchability of *Aedes aegypti* Eggs (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 54: 912-917.
- Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ *et al.* 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*, 4, 854–863.
- Laurence BR, Pickett JA 1982. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. *J Chem Soc Chem Commun.* 59-60.
- Li JS & Li J 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 954-964.
- Lima-Camara TN, Lima JBP, Bruno RV, *et al.* 2014. Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasit Vectors.* 7:304.
- Lucas KJ, Roy S, Ha J, *et al.* 2015. MicroRNA-8 targets the Wingless signaling pathway in the female mosquito fat body to regulate reproductive processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(5):1440-5.
- Macdonald G 1961. Epidemiologic models in studies of vector borne diseases. *Public Health Rep.*76(9):753-64.
- Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R 2011. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(8):452-458.
- Marcondes CB & Alencar J 2010. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev Biomed.* 21:221-38.
- Merkle JA, Wittes J, Schüpbach T 2020. Signaling between somatic follicle cells and the germline patterns the egg and embryo of *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol.*140:55-86.
- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB *et al.* 1999. Anopheles albitarsis eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45: 915-922.
- Muhlia-Almazán A, Sánchez-Paz A, García-Carreno FL 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol. B.*, 178: 655-672.
- Noletto OJV, Moura NMHL, De Moura LT, *et al.* 2020. Use of ovitraps for the seasonal and spatial monitoring of *Aedes* spp. in an area endemic for arboviruses in Northeast Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 14(4):387-393.
- Noriega FG, Shah DK, Wells MA 1997. Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 6(1):63-6.

- Padilha KP, Resck MEB, Cunha OATD *et al.* 2018. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 113(10):e180290.
- Pierceall WE, Li C, Biran A *et al.* 1999. E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 150(1-2):73-89.
- Pigeault R, Villa M 2018. Long-term pathogenic response to *Plasmodium relictum* infection in *Culex pipiens* mosquito. *Plos One.* 13(2): e0192315.
- Powell JR & Tabachnick WJ 2013. History of Domestication and Spread of *Aedes aegypti*: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 108, Suppl. 1,11-17.
- Resck MEB, Padilha KP, Cupolillo AP *et al.* 2020. Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. *Sci Rep.*10(1):13642.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C *et al.* 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol.* 8:82.
- Roth S, Lynch JA 2009. Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(2):a001891.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, *et al.* 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 7:9.
- Sappington TW, Hays AR, Raikhel AS 1995. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochem Mol Biol.* 25(7):807-17.
- Silveira ID, Petersen MT, Sylvestre G *et al.* 2018. Zika Virus Infection Produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success. *Front Microbiol.* 9:3011.
- Sirot LK, Hardstone MC, Helinski ME *et al.* 2011. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: protein identification and potential functions. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(3):e989.
- Sirot LK, Poulson RL, McKenna MC *et al.* 2008. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect Biochem Mol Biol.* 38(2):176-89.
- Snigirevskaya ES, Sappington TW, Raikhel AS 1997. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. *Cell Tissue Res.* 290(1):175-83.
- Soni M, Khan SA, Bhattacharjee CK *et al.* 2020. Experimental study of dengue virus infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A comparative analysis on susceptibility, virus transmission and reproductive success. *J Invertebr Pathol.* 175:107445.

- Soumaré ML, Ndiaye M 2005. Ultrastructural studies of mosquito oogenesis. *Tissue Cell*. 37(2):117-24.
- Styer LM, Meola MA, Kramer LD 2017. West Nile Virus Infection Decreases Fecundity of *Culex tarsalis* Females. *J Med Entomol*. 44(6):1074-85.
- Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R 2013. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. *Plos One*. 8(3):e59933.
- Valle D, Aguiar R, Pimenta DN *et al.* 2021. *Aedes de A a Z*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 172p.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ *et al.* 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.
- Valle D, Pimenta DN, Cunha RV da. 2015. *Dengue: teorias e práticas*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 458p.
- Valzania L, Mattee MT, Strand MR *et al.* 2019. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. *Dev Biol* 454(1):85-95.
- Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ *et al.* 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* v. 62: 54-60.
- Vasconcelos PFC. 2003. Febre amarela. *Rev Soc Bra Med Trop*, v. 36, n. 2, 275-293.
- Villarreal SM, Pitcher S, Helinski MEH *et al.* 2018. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*.108:1-9.
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS *et al.* 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *PNAS*. 108:5690–5695.
- Wilke ABB, Benelli G, Beier JC 2021. Anthropogenic changes and associated impacts on vector-borne diseases. *Trends Parasitol*, v.37(12),1027-1030.
- Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G 2019. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Rev Mol Med*. 13;21:e1.
- Xueli W, Ding Y, Lu X 2021. The ecdysone-induced protein 93 is a key factor regulating gonadotrophic cycles in the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Nat Acad Sci*. 118(8): 1–8.
- Yoon Y, Klomp J, Martin-Martin I *et al.* 2019. Embryo polarity in moth flies and mosquitoes relies on distinct old genes with localized transcript isoforms. *Elife*. 8:e46711.

Young ADM, Downe AER 1983. Influence of mating on sexual receptivity and oviposition in the mosquito, *Culex tarsalis*. *Physiological Entomology* 8(2) 213–217.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 2

Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes

Rodrigo Nunes-da-Fonseca¹
Daniel Bressan¹
Lupis Ribeiro¹
Helena Araujo¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Rodrigo Nunes-da-Fonseca, Daniel Bressan, Lupis Ribeiro, Helena Araujo].
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution
License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the
original author and source are credited.

Considerações iniciais

Um dos mais importantes aspectos fisiológicos dos artrópodes é a embriogênese. Ela compreende todos os estágios, desde a fecundação até a eclosão da larva ou do indivíduo adulto. Avanços metodológicos, nos últimos anos, têm permitido estudos de embriogênese, em nível molecular e celular, em várias espécies de artrópodes, estendendo o vasto conhecimento do organismo-modelo, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, para os artrópodes vetores de doenças tropicais e pragas agrícolas. Durante este capítulo, abordaremos várias questões importantes da embriogênese, tais como a formação dos eixos embrionários e sua relação com a ovogênese, as divisões iniciais (clivagens), a formação das membranas extraembrionárias, a gastrulação e a organogênese. Nos últimos dez anos, da primeira versão deste capítulo até os dias atuais, muito se avançou no conhecimento do controle molecular e celular da embriologia de insetos vetores e pragas agrícolas. Esperamos, com o presente capítulo, continuar a divulgar e estimular as pesquisas na área.

Introdução

Insetos pertencem ao mais diverso filo de metazoários (animais), o filo Arthropoda, cujo número de espécies é estimado em cinco milhões (Grimaldi et al., 2005). Toda essa diversidade biológica é importante para a ocupação de diversos nichos ecológicos, com uma imensa variedade de formas. Insetos podem apresentar desenvolvimento direto (ametabolia) ou se desenvolver por um dos dois modos distintos: i) por metamorfose completa (holometábolos); ou ii) no modo incompleto, com diferentes fases de ninfa (hemimetábolo). Ainda que diferentes, após a eclosão da larva ou ninfa de primeiro instar, respectivamente, nos dois modos, as etapas de embriogênese e ovogênese guardam muitas semelhanças. O primeiro inseto que teve os mecanismos do desenvolvimento embrionário descritos, em nível molecular, foi *D. melanogaster*, tornando-se o organismo modelo de base para tais estudos. No entanto, mais recentemente, com o sequenciamento genômico em larga escala, análises funcionais tornaram-se possíveis em várias espécies de artrópodes. Assim, ganharam o *status* de organismo modelo: o besouro *Tribolium castaneum*, a abelha *Apis mellifera*, a vespa *Nasonia vitripennis*, a aranha *Parasteatoda tepidariorum*, o percevejo fitófago *Oncopeltus fasciatus*, o barbeiro *Rhodnius prolixus* e os mosquitos *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*. Esses três últimos citados são vetores de patógenos causadores de doenças em humanos (Araújo, 2017).

A fase embrionária é aquela em que a organização da morfologia do animal se inicia, além de ser uma das mais importantes para qualquer ação de controle populacional, uma vez que o ovo não consegue se dispersar. Acredita-se que, durante a ocupação do nicho terrestre, várias modificações na estrutura dos ovos de artrópodes ocorreram, tornando-os resistentes a variações ambientais (Roth 2004). Estudos recentes indicam que variações na estrutura que protege os ovos dos insetos (o córion), na sua forma e no seu tamanho podem ser explicadas com base na ecologia. Assim, essas variações estariam correlacionadas ao local de oviposição, e não à velocidade do desenvolvimento embrionário ou mesmo ao tamanho dos indivíduos adultos (Church et al., 2019). Por outro lado, muitos dos mecanismos que estabelecem a organização axial dos embriões propriamente ditos são bastante conservados. Assim, ao longo deste capítulo, buscaremos descrever as principais características presentes em ovos de artrópodes, comparando o conhecimento presente nos insetos-modelo não-vetores à embriogênese de artrópodes vetores. Particularmente, discutiremos a embriogênese de carrapatos, percevejos, besouros e mosquitos vetores de patógenos causadores de doenças tropicais negligenciadas e de pragas agrícolas, particularmente daqueles de interesse nacional (Santos et al., 2013; Alvarenga et al., 2016; Tobias-Santos et al., 2021).

Evolução da ovogênese em artrópodes e sua relação com a formação dos eixos embrionários

Os ovos de artrópodes, quando colocados, podem ser bilateralmente simétricos, já tendo os eixos anteroposterior (AP) e dorsoventral (DV) evidentes (Figura 1). Exemplos dessas formas são, respectivamente, os ovos do mosquito vetor da dengue, em formato de banana, e ovos de espécies de aranhas e carrapatos, que possuem formas arredondadas ou sem evidente polaridade AP.

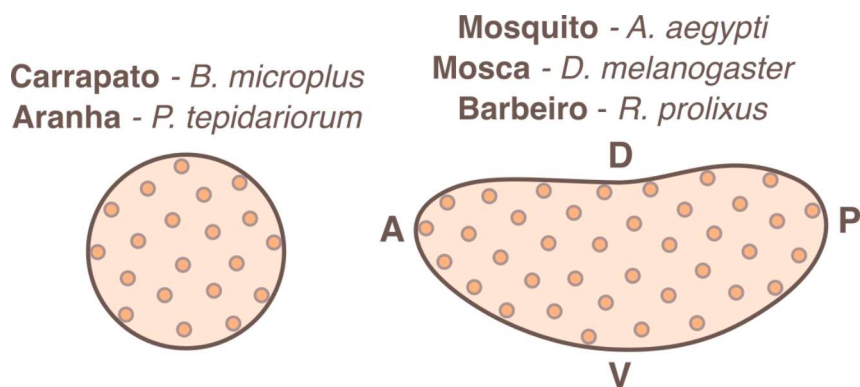


Figura 1: Ovos de artrópodes nos estágios iniciais da embriogênese. A linha preta representa a membrana plasmática comum dos ovos e as esferas amarelas os núcleos., Embriões de artrópodes podem variar da forma esférica, como aranhas, para forma de banana de insetos como mosquitos, barbeiros e moscas.

Fonte: Arquivo pessoal

A forma dos ovos de artrópodes é determinada durante o processo de ovogênese. Durante esse período, a produção e maturação dos ovos ocorre a partir da proliferação e diferenciação das células-tronco, primordiais nas fêmeas. Dois tipos básicos de ovogênese existem em insetos: o tipo panoístico e o tipo meroístico, cuja principal diferença está na presença de células nutritoras no último e na ausência, no primeiro. Em geral, artrópodes pertencentes aos grupos que divergiram há mais tempo (e.g. em posições mais basais nas árvores filogenéticas) possuem ovogênese do tipo panoística, enquanto aqueles das ordens mais derivadas possuem ovogênese do tipo meroística (Figura 2).

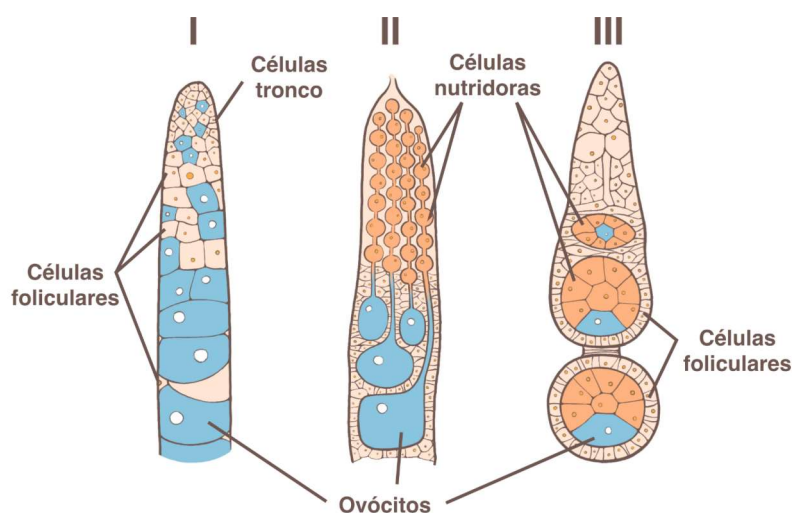


Figura 2: Representação esquemática de ovaríolos de insetos. Ovaríolos podem ser classificados como panoísticos (I) ou meroísticos (II, III) devido à ausência (I) ou presença (II, III) de células nutritoras. Os ovaríolos meroísticos podem ser divididos em telotróficos (II) e politróficos (III). Maiores detalhes descritos no texto.

Fonte: Arquivo pessoal

Nos ovários de insetos, o número de ovariolos pode variar de 1 a mais de 1.000, em uma única fêmea (Diptera como *Drosophila* ~10-30, *Calliphora* ~100). Algumas abelhas têm mais de 2.000 ovariolos; enquanto alguns afídeos podem possuir somente um ovariolo funcional (Chapman, 1998). É bem conhecido que o processo de ovogênese é sujeito à regulação pelo ambiente. Por exemplo, os ovários de abelhas-rainha se desenvolvem, constantemente, por meio de sinais externos, que regulam a produção de hormônio juvenil, enquanto as operárias têm ovários com 2% do tamanho do das rainhas (Humann and Hartfelder, 2011; Dallacqua and Bitondi, 2014; Cridge et al., 2017). Da mesma forma, o desenvolvimento dos ovários no vetor da doença de Chagas, *R. prolixus*, é estritamente dependente da alimentação sanguínea (Friend, Choy and Cartwright, 1965; Gomes, Azambuja and Garcia, 1990). Uma característica restrita aos insetos é o processo de maturação dos ovos, que acontece, temporalmente, no abdômen da mãe. Assim, ovos imaturos estão localizados na região mais anterior do abdômen e ovos maduros na região mais posterior. O processo de ovogênese é largamente conhecido no principal inseto-modelo, *D. melanogaster*, que possui um ovário meroístico politrófico (Drummond-Barbosa, 2019). Nesses ovários, as células nutridoras de origem germinativa acompanham o ovócito, ao longo de todo seu processo de crescimento e maturação. Durante os estágios iniciais de ovogênese, uma entre 16 células germinativas é selecionada para ser o ovócito, enquanto as 15 demais tornam-se células nutridoras. Essas últimas tornam-se poliplóides e especializam-se em transcrever RNAs mensageiros importantes para o futuro desenvolvimento embrionário. Durante todo este processo de crescimento, células somáticas da mãe, as células foliculares, envolvem cada folículo ovariano (Figura 2).

O ovário de *Drosophila* consiste em cerca de 15-20 ovariolos — arranjo linear de ovos em desenvolvimento, que se geram, a partir da região mais anterior chamada germário (Bastock and St Johnston, 2008). O germário possui de duas a três células germinativas primordiais (CGPs), das quais a linhagem se origina. As CGPs são mantidas por sinais produzidos por células somáticas presentes no nicho de células-tronco do ovário. A sinalização, através da *bone morphogenetic protein* (BMP), codificada por *decapentaplegic* (*dpp*), é fundamental para manter o caráter de autorrenovação destas células-tronco e permitir que a resposta, em termos de números de células germinativas, seja finamente controlada (Harris and Ashe, 2011; Harris et al., 2011; Wilcockson and Ashe, 2019). Dpp, gerado pelas células somáticas do germário, funciona como um sinal de curto alcance para manter as CGPs adjacentes. Assim, quando uma CGP se divide, uma célula-filha recebe o sinal de Dpp e mantém a característica tronco, enquanto a outra, mais distante do sinal de Dpp, se diferencia em cistoblasto e move-se,

posteriormente. Longe do sinal de Dpp, o gene *bag of marbles (bam)* é expresso, causando esta diferenciação das células germinativas. Em concordância com este papel, a perda do sinal de Dpp faz com que CGPs se diferenciem completamente, causando a perda de células tronco para a renovação do nicho, enquanto que a expressão ectópica de *dpp* leva a uma expansão tumoral das CGPs (Harris and Ashe, 2011; Harris et al., 2011).

Cada folículo ovariano é constituído de 16 células germinativas conectadas por canais em anel, todas originadas de uma mesma CGP (Figura 3, revisado em Roth and Lynch, 2009). Duas dessas células adquirem quatro canais de comunicação e são denominadas de pró-ovócitos e, por competição, somente uma terminará a meiose I e será o futuro ovócito (Figura 3, em vermelho). As demais 15 células se tornarão nutridoras poliploides. Nesse estágio de 16 células, o chamado cisto germinal é envolvido por células somáticas denominadas foliculares, que são essenciais para a formação do córion e padronização do ovo. As células nutridoras, que acompanham o ovócito, ao longo da maturação do folículo ovariano, fornecem RNAs mensageiros, proteínas e estruturas endomembranares (RER e Golgi) a ele via canais em anel. Em *D. melanogaster* cada ovaríolo contém de seis a sete câmaras ovocitárias (ou folículos ovarianos), em fases distintas de desenvolvimento, conectados por células somáticas conectoras (*stalk cells*). Nos estágios finais da ovogênese, tanto as células foliculares quanto as nutridoras sofrem um processo de apoptose e, no momento da postura, os ovos contêm um único núcleo haploide e as camadas externas, tais como a membrana vitelínica e o córion, cuja composição varia bastante, dependendo do local de oviposição.

Os ovários de *R. prolixus*, do tipo meroístico teletrófico, também são compostos de células nutridoras e foliculares somáticas, além do ovócito (Huebner, 1981; Lutz and Huebner, 1981). No entanto, células nutridoras são restritas ao trofário, de onde nutrem o ovócito via cordas tróficas, que conectam cada câmara ovariana em maturação. A análise transcriptômica de folículos pré-vitelogênicos deste inseto identificou homólogos putativos de vários genes que atuam na ovogênese de *D. melanogaster* (Brito et al., 2018), abrindo grandes possibilidades para análises funcionais.

Em um recente artigo publicado pelo nosso grupo (Berni et al., 2023) foi possível concluir que um homólogo de *dpp* atua em etapas precoces da ovogênese, já que, mediante o *knockdown* de *Rp-dpp*, o número de ovos é, sensivelmente, decrescido e se observa uma interrupção no desenvolvimento das câmaras ovarianas.

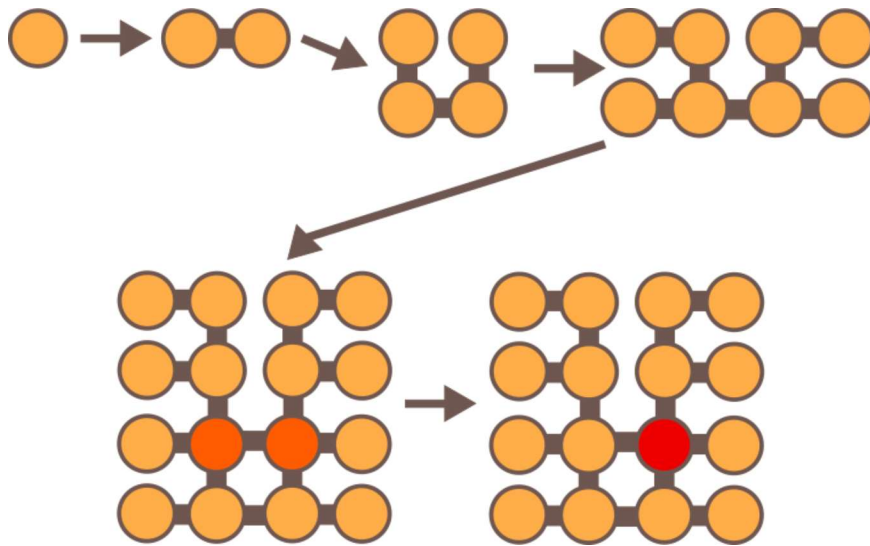


Figura 3: A célula germinativa primordial se divide e forma canais de comunicação entre as células filhas. Das 16 células haplóides formadas apenas uma contendo quatro canais será o ovócito e as quinze demais darão origem às células nutritoras poliplóides que se especializam em sintetizar substâncias (RER, RNAm) para o ovócito.

Fonte: Arquivo pessoal

Quatorze estágios morfológicamente distintos foram definidos para a ovogênese em *D. melanogaster*: os estágios 1 a 6 são chamados de iniciais, os de 7 a 10, de intermediários e os de 11 a 14 são os tardios (Bastock and St Johnston, 2008). Desta forma, o ovaríolo é uma estrutura tubular com um eixo longo composto de várias câmaras ovocitárias conectadas entre si e um eixo curto (Figura 2, por exemplo). Esses dois eixos, longo e curto, correspondem, respectivamente, aos eixos anteroposterior (AP) e dorsoventral (DV) do folículo ovariano e do futuro embrião.

A presença de ovaríolos é característica típica e exclusiva dos insetos, enquanto que os artrópodes pertencentes a grupos mais antigos e que divergiram precocemente, tais como o carrapato *Rhipicephalus microplus*, por exemplo, apresentam um tubo contendo uma parede epitelial e os diversos estágios de ovogênese são observados; todavia, ovaríolos não estão presentes (Figura 2, Santos et al., 2004; Saito et al., 2005). Neste tipo panoístico de ovogênese, todas as células germinativas darão origem a ovogônias, que se diferenciarão em ovócitos.

Padronização axial durante a ovogênese

Em artrópodes, o desenvolvimento do embrião depende, de forma variada, de fatores gerados pela mãe durante a ovogênese (fatores maternos) e de processos que ocorrem durante o desenvolvimento ovariano. Os mecanismos

moleculares por trás desta regulação foram bem caracterizados em *Drosophila melanogaster*. Durante o processo de crescimento das câmaras ovocitárias, um grande aumento do volume do ovócito é observado e se desenvolvem dois eventos fundamentais para a padronização dos eixos embrionários. Primeiro, a região posterior do ovócito se torna diferente das demais, através de interações com as células foliculares posteriores e de uma repolarização na estrutura da rede de microtúbulos do ovócito. Essa repolarização dos microtúbulos é fundamental para o transporte de dois RNAs mensageiros produzidos pelas células nutridoras, *bicoid* e *oskar*, vitais para a determinação das regiões anteriores e posteriores, respectivamente (revisado por Roth and Lynch, 2009). A localização anterior do RNAm de *bicoid* é importante para a formação da futura cabeça e tórax, assim como a localização posterior do RNAm de *oskar* é necessária para a formação do abdômen.

O segundo evento importante durante esta fase intermediária da ovogênese é a migração do núcleo do ovócito, ao longo da região cortical, movendo-se de uma região posterior para a dorso-anterior do folículo. Esta migração define a região em que o RNAm do ligante de EGF (*epidermal growth factor*), denominado *gurken*, será localizado, quebrando, assim, a simetria dorsoventral do ovócito e do futuro embrião (Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993). Esta função de definir polaridade axial exercida por EGF parece ser uma característica conservada, já que componentes da via de EGF polarizam ovários em *Nasonia vitripennis*, *T. castaneum* e *Gryllus bimaculatus* (Lynch et al., 2010).

Em *Drosophila*, a localização de *gurken* é apenas transiente e atua indiretamente, através de um processo de sinalização nas células foliculares. Estabelece-se, assim, uma região dorsal e uma região ventral do folículo ovariano, caracterizadas pela ausência e presença da expressão do gene *pipe*, respectivamente (Peri, Technau and Roth, 2002). Esse gene codifica uma sulfotransferase responsável por iniciar uma cascata proteolítica que levará à ativação do receptor Toll na região ventral do futuro embrião (Peri, Technau and Roth, 2002). É, também, durante esta etapa intermediária da ovogênese que as células foliculares somáticas padronizam o córion. Nas células foliculares localizadas sobre a região dorsal anterior do ovócito, por exemplo, Dpp e EGF definem a formação do opérculo e dos apêndices respiratórios (Shrivage et al., 2007). Desta forma, o córion assume uma distinção clara entre os lados anterior-posterior e dorsal-ventral, que acompanha a padronização do ovócito. Esta polaridade do córion também é evidente em ovos de *R. prolixus*, mas não de outro hemíptera, *O. fasciatus*, indicando que a formação das estruturas que protegem o ovo pode apresentar grande variabilidade, mesmo em espécies próximas. Interessantemente, nossos resultados recentes indicam que, em *Rhodnius*, a

BMP codificada por *dpp* também atua na padronização do córion (Berni et al., 2023), assim como evidenciado para *dpp* de *Drosophila* (Twombly et al., 1996) e seu antagonista *sog* (Carneiro et al., 2006; Negreiros et al., 2010).

Finalizado o estoque de nutrientes e carreamento de mensagens maternas, o ovócito está pronto para ser fertilizado. De modo geral, ovócitos maduros podem permanecer estocados por longos períodos, até que as condições externas ideais sejam adequadas à postura de ovos fertilizados. A fertilização acontece no momento da passagem do ovo pelo tubo ovariano, quando espermatozoides são liberados, a partir da espermateca, e penetram o ovócito por uma região especializada no córion denominada micrópila, que pode conter um ou mais orifícios por onde ele penetrará.

Diferentemente de outros animais, nos insetos o processo de fertilização não tem relação com a formação de eixos embrionários ou com a ativação do ovócito. Em *D. melanogaster* foi demonstrado, por imageamento *in vivo*, que a ativação do ovo depende da sinalização de cálcio, pois ondas de cálcio atravessam o ovo, quando este passa pelo trato reprodutivo (Kaneuchi et al., 2015), um evento que é, provavelmente, conservado em outros insetos. Com a fertilização, essa onda de cálcio sinaliza para que a segunda divisão meiótica termine e, conseqüentemente, permita a formação do zigoto com a fusão do pró-núcleo feminino com o pró-núcleo masculino. Em geral, insetos são ovíparos, isto é, colocam o ovo logo após a fertilização, embora existam vários exemplos de insetos vivíparos.

O processo de fertilização não é estritamente essencial para o desenvolvimento dos insetos. Por exemplo, afídeos da espécie *Acyrtosiphon pisum* podem realizar reprodução sexual ou assexual, a depender da resposta ao fotoperíodo sazonal e, portanto, gerar ovos por partenogênese, sem fertilização (Gallot et al., 2012). Um fenômeno similar é observado em abelhas e vespas (Hymenoptera), que geram indivíduos com ou sem fertilização, que podem ser haploides ou diploides e de diferentes sexos (machos ou fêmeas), ressaltando-se que a fertilização não é essencial para o desenvolvimento embrionário (Beukeboom, Kamping and Van de Zande, 2007).

Momentos iniciais da embriogênese — Clivagens e formação do blastoderma

A maior parte das espécies de artrópodes pertencentes a grupos antigos em nosso planeta (hemimetábolos, por exemplo) possuem grande quantidade de vitelo acumulado durante a ovogênese e uma embriogênese, em geral, bastante lenta, se comparada à embriogênese de *D. melanogaster* com período total de 24

horas. Nesses artrópodes, após o período embrionário, a ninfa que emerge do interior do ovo é bastante similar ao artrópode adulto. Por outro lado, insetos de ordens mais recentes, como os holometábolos, que têm fases intermediárias de larva e pupa bem diferentes do adulto, possuem ovos, em geral, de menor tamanho e uma embriogênese mais rápida (Davis and Patel, 2002).

Uma tendência geral é que insetos que possuem ovogênese panoística, isto é, sem células nutridoras, possuam uma embriogênese mais lenta. Uma forma bastante utilizada para acelerar este processo é a formação inicial de um sincício, em que núcleos (energídeos) se dividem dentro de um citoplasma comum, sem a formação de membranas plasmáticas entre as células. Estudos da primeira e segunda metade do século XX sugeriram que, em grupos que divergiram na base dos artrópodes, a formação de membranas plasmáticas e o isolamento das células acontece bem precocemente, durante o desenvolvimento embrionário (revisado em Sander, 1976). Todavia, a evidência direta de que existe um isolamento das membranas plasmáticas advém somente de estudos experimentais em que moléculas marcadas são injetadas em diferentes momentos da embriogênese e se observa, posteriormente, se estas moléculas se difundiram, através das membranas celulares. Poucos estudos foram realizados nos últimos anos, visando responder a esta questão. Na aranha *Parasteatoda tepidariorum*, a celularização, com o aparecimento de membranas celulares, acontece logo no início da embriogênese, antes do estágio de 16 células (Kanayama, Akiyama-Oda and Oda, 2010). Por outro lado, outros autores sugerem que, em embriões do carrapato *R. microplus*, a celularização aconteceria bem mais tardiamente (Campos et al., 2006), conforme previamente demonstrado para insetos holometábolos (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). Nossos resultados sugerem que os embriões dessa espécie teriam a celularização já no primeiro dia de desenvolvimento embrionário. Entretanto, não foram realizados experimentos com marcadores celulares no embrião desse carrapato, permanecendo, portanto, esta questão em aberto (Santos et al., 2013).

Em embriões holometábolos de ordens mais derivadas, tais como dípteros, as divisões iniciais do material genético são bastante rápidas, durando de 8 a 12 minutos, em *D. melanogaster*. Isso porque, ondas de cálcio perpassam o eixo AP do embrião, definindo uma quase sincronia das divisões mitóticas (Parry, McDougall and Whitaker, 2005; Whitaker, 2006). O cálcio que origina estas ondas é, provavelmente, advindo de estoques intracelulares, no retículo endoplasmático, que se torna, apicalmente, localizado próximo à membrana, à medida que os núcleos migram para a periferia. Essas ondas de cálcio controlam a atividade de ciclinas reguladoras do ciclo celular (Parry, McDougall and Whitaker, 2005). Alterações em processos dependentes de cálcio e que regulam

as ciclinas, como aqueles mediados pelas calpaínas, proteases cálcio-dependentes, resultam em mitoses assíncronas e erros nas divisões, sendo estes núcleos eliminados (Fontenele et al., 2009).

As primeiras 13 divisões ou clivagens são chamadas de superficiais, pois nelas as divisões nucleares (cariocinese) ocorrem sem a citocinese (divisão celular). Isso é realizado através da eliminação das fases de síntese do ciclo celular. Em *D. melanogaster*, após 10 ciclos de divisões metassincrônicas, os núcleos começam a migrar para o córtex (periferia). Esse estágio é chamado de blastoderma sincicial, visto que ainda não há membranas isolando cada núcleo. A transição do blastoderma sincicial para o blastoderma celular ocorre durante o 14º ciclo de divisões mitóticas, quando as membranas plasmáticas se estendem para o interior do embrião, de modo a isolar cada núcleo. Assim, forma-se o blastoderma celular, com as células organizadas na periferia e o vitelo permanecendo no interior. Esse blastoderma celular ou epitélio primário fica logo abaixo da membrana vitelínica (Foe and Alberts, 1983, Figura 4).

Entretanto, nem todos os insetos seguem esse padrão em que os núcleos migram uniformemente para a periferia. Por exemplo, em embriões dos hemipteras *O. fasciatus* e *R. prolixus* e do orthoptera *Schistocerca gregaria*, o processo de celularização ocorre primeiramente numa região do ovo e, somente depois, nas demais (Ho, Dunin-Borkowski and Akam, 1997; Panfilio et al., 2006). Mais recentemente, com o estabelecimento de animais transgênicos, como o grilo *G. bimaculatus*, cujos núcleos contêm histonas fusionadas à proteína fluorescente verde (GFP) determinou-se que, tanto as direções dos movimentos nucleares quanto a velocidade das divisões variam ao longo das regiões do ovo. Além disso, as forças assimétricas dos núcleos e sua densidade poderiam explicar o padrão de divisões observados nos ovos de Orthoptera (Donoughe et al., 2022). Esses resultados demonstram a necessidade de se estudar as clivagens em outras espécies de insetos, com divisões assincrônicas, através de metodologias mais acuradas, particularmente com *live imaging* de embriões contendo proteínas fluorescentes.

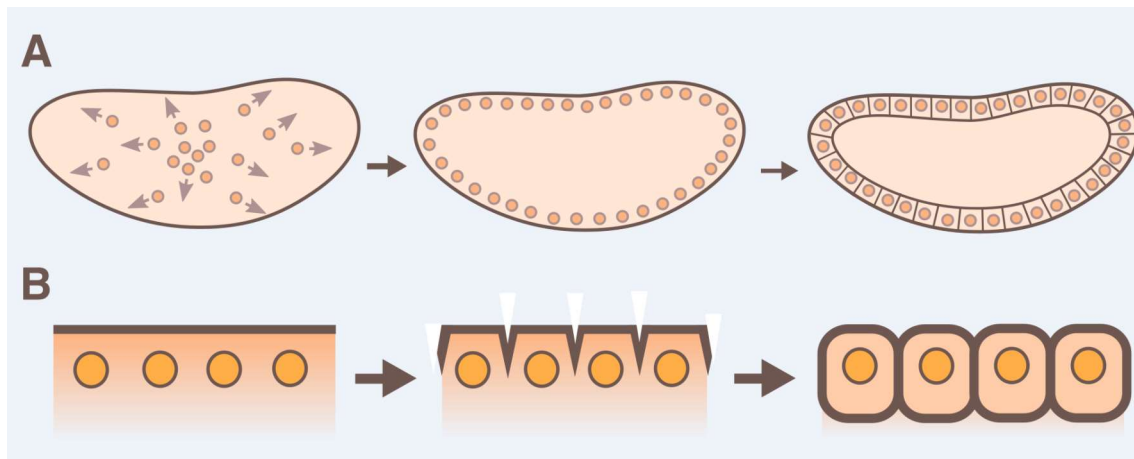


Figura 4: Representação esquemática das clivagens, divisões iniciais dos energídeos e a progressão do processo de formação das células (celularização) em embriões de *D. melanogaster*. (A,B), modelo para estudo de biologia do desenvolvimento. (A,B) Destaca-se o processo de formação de blastoderma a partir da migração dos núcleos para a periferia do ovo e o envolvimento dos núcleos pelas membranas plasmáticas do ovo em formação.

Fonte: Arquivo pessoal

Transição materno-zigótica

Um evento fundamental que ocorre durante estágios precoces da embriogênese é a transição entre o uso de RNAm maternos e o uso de mensagens zigóticas, a chamada transição materno-zigótica (MZT, na sigla do termo em inglês). Em *D. melanogaster*, o RNAm e as proteínas depositadas pela mãe durante a ovogênese são fundamentais durante as rápidas divisões nucleares que caracterizam as etapas sinciciais. Entre os ciclos mitóticos 10 e 14, quando as membranas celulares começam a se formar, RNAm maternos são degradados por um processo finamente controlado, permitindo o início da transcrição do genoma zigótico (De Renzi et al., 2007; Semotok and Lipshitz, 2007; Tadros, Timothy Westwood and Lipshitz, 2007). Neste caso, mutações que alteram esta transição alteram também o tempo de início do processo de celularização, podendo tornar o embrião inviável (Lu et al., 2009). A análise do transcriptoma de várias espécies indica que, de modo geral, todos os metazoários sofrem esta transição, variando o momento de sua ocorrência. Por exemplo, em camundongos, esta transição se dá no estágio de duas células, enquanto que em *D. melanogaster* ela se completa pouco tempo antes da gastrulação (Baroux et al., 2008).

Estudos de genética, transcriptômica e a análise da cromatina demonstraram que, durante a MZT, a abertura da cromatina em *D. melanogaster* depende da ação do fator de transcrição *zelda* (*Zld*; *Zinc-finger early Drosophila activator*). Mais recentemente, três outros fatores, *GAF*, *CLAMP* e *Odd-paired*

foram consideradas importantes em *D. melanogaster* para o controle inicial da transcrição da MZT (Koromila et al., 2020; Duan et al., 2021; Gaskill et al., 2021).

Nos últimos anos, a transição materno-zigótica foi analisada em diversas outras espécies de artrópodes, incluindo os mosquitos *Ae. aegypti* (Biedler et al., 2012) e *An. gambiae* (Wu et al., 2018), o besouro *T. castaneum* (Ribeiro et al., 2017), o hemiptera *Oncopeltus fasciatus* (Ewen-Campen et al., 2011), o crustáceo *Parhyale hawaensis* (Nestorov et al., 2013; Calvo et al., 2022) e a aranha *Parasteatoda tepidariorum* (Iwasaki-Yokozawa et al., 2022). Esta análise, em diferentes espécies de artrópodes, indica grande variação nos fatores utilizados para a ativação do genoma zigótico. Primeiro, no mosquito *Ae. aegypti* o gene *zld* não é expresso durante a MZT, nem materno depositado (Biedler et al., 2012). Segundo, o fator de transcrição *zld* está presente somente nos genomas de Pancrustacea, não ocorrendo em artrópodes que divergiram anteriormente (como miriápodes e quelicerados) (Ribeiro et al., 2017). Terceiro, na aranha *P. tepidariorum* um fator de transcrição do tipo GATA, com evolução rápida nos quelicerados, é essencial para a ativação zigótica (Iwasaki-Yokozawa et al., no date, 2022). Assim, a investigação desse fenômeno, utilizando uma abordagem comparativa e multiespecífica, indica que os fatores responsáveis pela MZT possuem evolução rápida e que a reprogramação celular que ocorre nos primeiros momentos do desenvolvimento pode ser específica de cada espécie ou de um grupo restrito de organismos.

Formação das células germinativas

Em várias espécies de insetos holometábolos (como vespas, moscas, mosquitos e borboletas), uma parte especial do citoplasma dos ovócitos em formação é chamada de plasma germinal, que contém as informações necessárias para a formação das células germinativas. O mecanismo genético de geração do plasma germinal e, conseqüentemente, das células precursoras da linhagem germinativa (PLGs, ou, no inglês, PGCs, de *germ cell precursors*) depende de produtos maternos, como os genes *vasa*, *nanos* e *oskar* em *Drosophila* (Ephrussi, Dickinson and Lehmann, 1991; Kobayashi et al., 1996; Wang and Lin, 2004). Durante a formação do blastoderma, células com morfologia característica, denominadas células polares, são observadas na região posterior do embrião de *Drosophila* e de outros insetos holometábolos com plasma germinal. Mutantes para *oskar* não formam PLG e são, conseqüentemente, estéreis (Ephrussi, Dickinson and Lehmann, 1991).

Por outro lado, a expressão ectópica de *oskar*, na região anterior, é capaz de gerar células germinativas nesta nova localização. Recentemente, foi

demonstrado que em mosquitos das espécies *An. gambiae* e *Ae. aegypti* os genes *oskar* e *nanos* são expressos durante a ovogênese e a embriogênese inicial (Calvo et al., 2005; Juhn and James, 2006). Da mesma forma, no afídeo vivíparo *Acyrtosiphon pisum*, a localização de *nanos* e de um segundo marcador geral de linhagem germinativa, *vasa*, sugere seu envolvimento na especificação do plasma germinal e no desenvolvimento dessa linhagem (Chang et al., 2006, 2007). O gene *vasa* também é expresso na linhagem germinativa de *An. gambiae* (Papathanos et al., 2009), sugerindo um mecanismo conservado na geração do plasma germinal em dípteros. Entretanto, o plasma germinal não foi identificado em abelhas, e a expressão de *vasa* e *nanos* só foi observada em etapas tardias, nas gônadas em desenvolvimento (Dearden et al., 2006).

Análises realizadas por nosso grupo indicam que *vasa* é expresso em PLGs localizados na região posterior de embriões de *R. prolixus*, em etapas anteriores ao processo de gastrulação (Martins e Araujo, dado não publicado), ainda que não tenha sido demonstrada a existência de plasma germinal nessa espécie. De fato, na maior parte de insetos hemimetábolos, incluindo baratas (*Periplaneta americana*) e *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), e no crustáceo *P. hawaiiensis*, entre outros, não foi demonstrada, até hoje, a existência de plasma germinal ou determinantes das células germinativas. Nesses animais, as evidências apontam para sinais específicos de células somáticas, que induzem as células vizinhas a se tornarem germinativas, em particular as células do mesoderma (Özhan-Kizil, Havemann and Gerberding, 2009). Assim, em insetos existem, pelo menos, duas maneiras de estabelecer as células germinativas, uma a partir de fatores germinativos depositados pela mãe, durante a ovogênese e, outra, a partir de induções de células somáticas (Figura 5, Extavour, 2011; Lynch et al., 2011). De forma interessante, analisando a distribuição filogenética de nucleadores de plasma germinal, dados recentes sugerem que o plasma germinal pode ter surgido várias vezes como determinante da linhagem germinativa, ao longo do processo evolutivo (Kulkarni and Extavour, 2017).

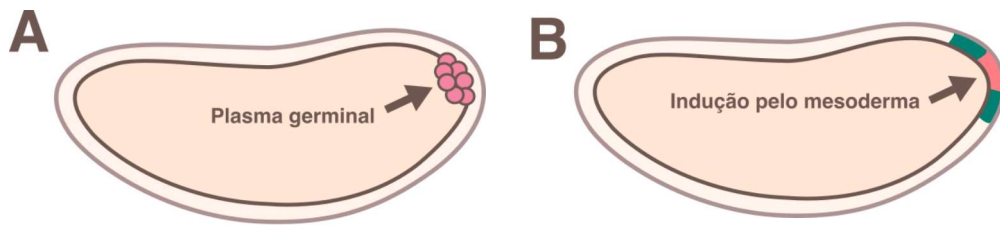


Figura 5: Dois modos de determinação das células germinativas existem em insetos, um por deposição do plasma germinal que ocorre durante a ovogênese, e outro com indução a partir do mesoderma.

Fonte: Arquivo pessoal

Nos últimos anos, estudos de genômica comparativa e de biologia evolutiva do desenvolvimento foram capazes de aumentar a compreensão sobre a origem e a diversificação dos mecanismos genéticos de determinação das células germinativas nos artrópodes. Por exemplo, o gene *oskar*, fundamental para o processo de formação das células germinativas em diversas ordens de insetos, surgiu por transferência gênica horizontal (HGT), com fusão de domínios procarióticos de bactérias e eucarióticos de insetos. Essa foi uma transição importante para a evolução molecular das células germinativas (Blondel, Jones and Extavour, 2020; Kempf and Lynch, 2022). Outro papel interessante de bactérias na determinação das células germinativas foi descrito para formiga-decupim ("carpenter ants") (Rafiqi, Rajakumar and Abouheif, 2020). Nesse estudo do grupo de Ehab Abouheif, com 31 espécies de formiga, foi demonstrado que simbiontes bacterianos (*Blochmannia*) são encontrados em diversos agrupamentos em regiões de células germinativas do embrião em desenvolvimento. A formação destes centros germinativos é controlada pela localização diferencial de genes *Hox*. A partir de uma análise comparativa filogenética e funcional, foi possível estabelecer uma hipótese sobre a evolução deste novo mecanismo de determinação de células germinativas pela expressão de genes *Hox*. Em conjunto, estes estudos recentes apontam para uma interação com procariontes simbiontes na formação e no estabelecimento das células germinativas. Ademais, essas pesquisas demonstram como a genômica comparativa pode ajudar na compreensão dos processos evolutivos envolvidos na embriogênese dos artrópodes, através de uma abordagem multiespecífica (Nunes-da-Fonseca, 2022).

Formação dos eixos anteroposterior em embriões banda curta e banda longa

A definição dos eixos anteroposterior (AP) e dorsoventral (DV), durante o desenvolvimento precoce, é fundamental para a correta alocação dos futuros órgãos e segmentos dos insetos adultos. Como citado anteriormente, em *Drosophila*, o eixo AP é definido primeiro, enquanto o eixo DV advém de um processo de perda de simetria, que está diretamente relacionado à via de sinalização por EGF. Nos últimos 30 anos, *screenings* genéticos realizados em *Drosophila* foram capazes de determinar que cerca de 150 genes estão envolvidos no estabelecimento dos eixos AP e DV ao longo da ovogênese e embriogênese. Os produtos proteicos de vários desses genes são providos como RNAm materno, enquanto uma fração maior de genes são transcritos e traduzidos pelo zigoto, após a MZT. Quatro sistemas maternos independentes estão envolvidos na padronização dos eixos AP e DV, sendo três sistemas (anterior, posterior e terminal) envolvidos na padronização do primeiro eixo e apenas um sistema (DV) estaria envolvido na padronização do segundo eixo (St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992).

Mais recentemente, *screenings* similares foram realizados, utilizando o besouro da farinha (*T. castaneum*) e a tecnologia de RNA de interferência (RNAi) (Dönitz et al., 2015; Schmitt-Engel et al., 2015). Nesse besouro e em diversas outras espécies de artrópodes, é possível obter um efeito sistêmico ao injetar o RNA dupla-fita no indivíduo, seguido pelo seu transporte para todas as células do corpo do inseto. Além disso, o RNA dupla-fita injetado na mãe é transferido para os ovos na próxima geração (efeito parental). Recentes estudos com *screenings* comparativos entre *D. melanogaster* e *T. castaneum* indicam que, enquanto 50% das funções dos genes foram conservadas entre besouros e a mosca-das-frutas, a outra metade dos genes estudados apresentaram funções distintas (Hakeemi et al., 2022).

Determinantes anteriores

Em *D. melanogaster*, moléculas essenciais para formação do eixo AP são localizadas no final do processo de ovogênese tanto na região anterior (*bicoid* - *bcd*) quanto na posterior (*nanos* - *nos*) do ovo. Assim que transcritos, os maternos de *bcd* são localizados na região anterior do ovócito, em *Drosophila* e, após a fertilização, um gradiente proteico de Bcd é formado, com concentrações maiores da proteína na região anterior e concentrações progressivamente mais baixas nas regiões posteriores do embrião. Desse modo, mutantes nulos para *bcd*, isto é, que

não produzem a proteína Bcd, não formam a região correspondente aos segmentos da cabeça e tórax, enquanto que mutantes contendo pouca atividade de Bcd ainda formam os segmentos torácicos (Driever and Nüsslein-Volhard, 1988a, 1988b). Assim, a Bcd se enquadra no modelo clássico de morfógeno, em que um gradiente de concentração anterior-posterior deste fator de transcrição é formado no blastoderma sincicial, induzindo diferentes padrões de expressão de genes alvo, segundo sua concentração (Sample and Shvartsman, 2010; Little et al., 2011).

Estudos clássicos da década de 1990 demonstraram que *bicoid* (*bcd*) regula, como fator de transcrição, mais de dez genes zigóticos, indicando um papel fundamental deste gene na rede gênica de padronização AP (Small, Blair and Levine, 1992; Simpson-Brose, Treisman and Desplan, 1994). Por exemplo, o gene *hunchback* (*hb*) é transcrito, a partir do zigoto, em resposta a altas concentrações de Bcd, definindo a posição das estruturas anteriores do animal, como cabeça e tórax (Struhl, Struhl and Macdonald, 1989). Dessa maneira, era esperado que o gene *bcd* fosse encontrado no genoma de todos os insetos. Todavia, estudos dos últimos 20 anos demonstraram que *bcd* é restrito a um grupo de dípteros derivados e possui várias características peculiares, incluindo o surgimento advindo da duplicação gênica de um gene bastante similar em sequência ao *bcd*, o gene *zen* (Dearden and Akam, 1999; Stauber, Prell and Schmidt-Ott, 2002).

O gene responsável pela padronização da região anterior do eixo AP apareceu em um momento relativamente recente na evolução dos insetos, há cerca de 200 milhões de anos. É importante ressaltar que mosquitos, besouros e todos os demais artrópodes não possuem um gene homólogo a *bcd* em seus genomas e, até o presente momento, não foram encontrados RNAm que se localizem estritamente na região anterior durante a sua ovogênese. Por outro lado, um gene homólogo a *bcd*, que também é fator de transcrição com domínio homeobox, *orthodenticle* (*otd*) é importante para a formação da região anterior (particularmente a cabeça) em aranhas, no besouro *Tribolium* e em vertebrados (Finkelstein and Boncinelli, 1994; Schröder, 2003). Bcd também reprime, via Hb, a tradução na região anterior do RNAm do determinante posterior *caudal* (*cad*), que se encontra expresso de forma ubíquitária, a partir da deposição maternal (Schulz and Tautz, 1995).

Nos últimos anos, estudos de biologia do desenvolvimento acoplados à genômica funcional foram capazes de identificar componentes responsáveis pelo estabelecimento da região anterior de ovos de diversos Diptera não-modelo, tais como a mosca-dos-filtros (*Clogmia*), o mosquito-palha (*Lutzomyia*), os vários mosquitos (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) e uma espécie de dípteros nematócero

(Tipulidae) (Yoon et al., 2019). Foram identificados diferentes determinantes do eixo AP nas diversas espécies estudadas e observado que, em dípteros pertencentes a grupos mais basais (nematóceros), um membro da via de Wnt (*pangolin*) é fundamental para a especificação deste eixo. Como no besouro *T. castaneum*, a via de Wnt é essencial para a padronização da região do eixo AP. A partir da localização da expressão anterior do gene *axin*, um inibidor desta via (Fu et al., 2012; Ansari et al., 2018), foi sugerido que, em insetos e em outros animais, a via de Wnt seria ancestralmente responsável pela padronização AP. Em diversas outras espécies de Diptera aconteceram mudanças nos fatores maternos localizados na região anterior destes ovos, inclusive com o aparecimento e a função do fator de transcrição *bcd* na mosca-das-frutas e em outros Cyclorrhapha. Para uma discussão mais aprofundada sobre a padronização AP em insetos, o leitor pode buscar uma revisão recente (Schmidt-Ott and Yoon, 2022).

Determinantes posteriores

O sistema posterior atua de forma similar ao anterior: o RNAm do principal determinante posterior *nanos (nos)* em *D. melanogaster*, nos mosquitos *Ae. aegypti* e *An. gambiae* e na vespa *Nasonia vitripennis* difunde para a região anterior. Ao contrário de Bcd, a proteína Nos não funciona como um regulador da transcrição, mas atua como um repressor da tradução gênica na região posterior. Dessa forma, estabelece-se um gradiente da proteína Hb, ao longo do eixo AP. Em *D. melanogaster*, o RNAm materno de outro determinante posterior, *oskar*, é transportado ao longo de microtúbulos pela proteína motora quinesina, até atingir sua localização final, na região posterior do ovócito (Zimyanin et al., 2008). Em outras espécies, a localização posterior de determinantes celulares também foi observada. No entanto, os mecanismos utilizados para a localização da proteína efetora final são variados. Por exemplo, enquanto na vespa *N. vitripennis* um gradiente do RNAm de *cad* controla o desenvolvimento posterior, em *D. melanogaster* o gradiente materno da proteína Cad (Cdx- em vertebrados) é estabelecido por repressão da tradução de seu RNAm exercida por Bcd e Hb (Olesnicky et al., 2006).

Outros mecanismos definem a região posterior nas espécies estudadas, especialmente quando se considera as diferenças temporais no desenvolvimento dessa região, entre insetos de banda longa e de banda curta (veja abaixo Figura 6; Fonseca, Lynch and Roth, 2009). Estudos recentes indicam que a mosca-dos-filtros (*Clogmia*) não possui nenhum transcrito materno localizado posteriormente, inclusive com a perda do gene *oskar* e plasma germinal,

enquanto, no embrião de *Lutzomyia*, o transcrito localizado no posterior é homólogo a *oskar*, indicando que ovos de *Lutzomyia* contêm plasma germinal materno, ao contrário de *Clogmia*, que não os possui. Outros mosquitos como *Ae. aegypti* e *An. gambiae* também apresentam *oskar* e plasma germinal, assim como nematóceros, entre eles, *Nephrotoma suturalis* (Tipulidae).

O Sistema terminal

O último sistema AP materno, o terminal, atua não por gradientes de grande amplitude, como Bcd e Nos, mas através de um sinal envolvendo a via Torso-MAP quinase nos dois polos do ovo de *D. melanogaster*. A ativação da via de Torso, receptor transmembrana presente na membrana plasmática do embrião e depositado pela mãe, ativa a expressão dos genes zigóticos *tailless (tll)* e *huckebein (hkb)* nos polos do ovo. Diferentemente do resto do sistema AP, no entanto, Torso não regula estes genes diretamente, mas, através da diminuição da expressão do repressor Capicua (Keenan et al., 2020; Smits and Shvartsman, 2020).

De fato, a correta especificação das estruturas terminais depende da integração de sinais do sistema AP e terminal, de forma a refinar o padrão de expressão dos genes terminais (Cinnamon et al., 2004; Heras, de las Heras and Casanova, 2006). Vale ressaltar que, mesmo sendo considerado que os sistemas AP e terminal são independentes da padronização DV em *D. melanogaster*, recentemente foi reportado que Capicua regula a expressão de genes DV por ligação a sítios cooperativos de baixa afinidade, juntamente com Dorsal, efetor da via de Toll (Papagianni et al., 2018). No besouro *T. castaneum*, homólogos a genes do sistema terminal de *D. melanogaster* definem a zona de crescimento na região posterior do embrião, e na anterior à membrana extraembrionária serosa. Portanto, em *T. castaneum*, elementos do sistema terminal definem os polos do embrião, apesar dos tecidos formados serem diferentes daqueles definidos em *D. melanogaster* (Schoppmeier and Schröder, 2005). Em *N. vitripennis* o efetor *tll* é expresso nos polos do embrião, mas depende de *otd* para ativar sua expressão (Lynch, Olesnický and Desplan, 2006), sugerindo que o sistema terminal e o sistema AP podem possuir alvos diferentes nos diversos artrópodes (Figura 7).

No hemiptera *O. fasciatus*, os genes do sistema terminal possuem papéis diferentes, quando comparados à *Drosophila* (Weisbrod, Cohen and Chipman, 2013). Torso-like é expresso durante a ovogênese nas células foliculares e na invaginação da região posterior, sugerindo uma função na zona de crescimento (SAZ - *segment addition zone* em inglês). O gene *tailless* é regulado por *orthodenticle*, tendo um papel apenas como determinante anterior, e *huckebein*,

por sua vez, é expresso somente no meio do blastoderma. Finalmente, *torso* não está presente no genoma de *Oncopeltus*. Desta forma, foi sugerido que seu papel no sistema terminal seria uma novidade evolutiva dos insetos holometábolos (com metamorfose completa).

Padronização do eixo anteroposterior por genes zigóticos

A padronização AP dos embriões de insetos se dá de forma sequencial, obedecendo a uma hierarquia temporal. Os gradientes AP maternos, citados anteriormente, regulam os genes zigóticos do tipo *gap*, que subdividem o embrião em grandes áreas. Esses últimos, junto aos genes maternos, regulam a expressão dos genes de “regras de pares”, em segmentos alternados (pares ou ímpares) do embrião. Finalmente, genes de “regras de pares” regulam a expressão inicial dos genes de polaridade dos segmentos (Figura 7). Dessa maneira, todo o embrião é dividido em regiões cada vez menores, com definições dos segmentos bem precocemente, em *D. melanogaster* e nos demais dípteros. Parecem existir grandes diferenças na cascata de genes do tipo *gap* em dípteros, conforme demonstrado na comparação dos dípteros *An. gambiae* e *D. melanogaster* (Goltsev et al., 2004). Em paralelo, em todos os insetos estudados até o presente momento, a identidade posicional de cada segmento é determinada a partir da expressão de diferentes genes, contendo o domínio *homeobox*, um domínio conservado de interação proteína-DNA, que obedece ao chamado código Hox, ao longo do eixo AP (Heffer and Pick, 2013).

Embora o conhecimento do processo de formação do eixo AP em *D. melanogaster* seja bastante importante, ele não pode ser diretamente estendido a outros artrópodes basais, como quelicerados ou mesmo outros insetos holometábolos, uma vez que em *D. melanogaster* e em outros dípteros, a região do primórdio do embrião, a banda ou disco germinal ocupam toda a extensão do ovo. Esta banda germinal, chamada de germinal longa, é encontrada em Diptera (moscas, mosquitos, etc), Lepidoptera (mariposas, borboletas) Hymenoptera (vespas, abelhas, formigas) e em alguns Coleoptera (besouros) (Sander, 1976) (Figura 6).

Outro tipo de desenvolvimento embrionário acontece nos insetos de banda germinal do tipo curta ou intermediária. Em Orthoptera (*Gryllus gryllus* e *S. gregaria*, por exemplo), a banda germinal é bastante curta, formando-se, inicialmente, apenas os segmentos da cabeça (Figura 6). Os segmentos do tórax e do abdômen são gerados num segundo momento, a partir de células da zona posterior. Sugere-se que a geração dos segmentos posteriores ocorra por proliferação de células, a partir da zona posterior destes insetos de banda curta,

formando-se, assim, novos segmentos. Enquanto em embriões de banda longa, como *D. melanogaster*, a expressão de genes de polaridade de segmento, como *engrailed*, são detectadas simultaneamente ao longo de todo o eixo AP, em embriões de banda-curta, tais como o besouro *T. castaneum*, o RNAm de *engrailed* aparece sequencialmente ao longo do eixo AP, com adição sequencial na região da zona de crescimento (Zc na Figura 7, revisado em Davis and Patel, 2002).


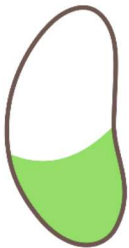



Tipo de ovário	Panoístico	Meroístico			
		Telotrófico		Politrófico	
Banda germinal	<i>Schistocerca</i> 	<i>Rhodnius</i> 	<i>Tribolium</i> 	<i>Aedes</i> 	<i>Drosophila</i> 
Embriogênese (duração)	20	10	4	3	1

Figura 6: Tamanho da banda germinal nos diferentes insetos (verde) em relação ao tamanho do ovo e o tipo de ovogênese das principais espécies discutidas no texto.

São destacados os tipos de ovário: panoístico (Orthoptera-*Schistocerca*, sem células nutridoras), meroístico telotrófico (Hemiptera-*Rhodnius* e Coleoptera-*Tribolium*) e meroístico politrófico (Diptera-*Aedes* e Diptera-*Drosophila*). Enquanto em *Schistocerca*, a banda germinal (em verde) é bastante pequena, em *Aedes* e *Drosophila* a banda germinal ocupa quase toda a extensão do ovo. O tempo total de embriogênese dessas espécies é menor em espécies com banda germinal mais longa, se comparado com espécies de banda germinal curta.

Fonte: Arquivo pessoal

Algumas diferenças importantes podem ser destacadas, quando comparamos embriões de embriogênese de banda germinal curta e longa. Primeiro, em embriões de banda longa, a região mais anterior corresponde à futura região da cabeça e a mais posterior ao abdômen e, pelo menos em *D. melanogaster* e na vespa *Nasonia vitripennis*, foram observados RNAs maternos que, uma vez localizados, serão responsáveis por padronizarem o eixo AP. Segundo, embriões de banda curta dividem seu processo de padronização em uma fase inicial, em que os segmentos anteriores da cabeça e tórax são padronizados, e uma segunda fase, em que a zona posterior é responsável pela geração de novas células que darão origem à região abdominal (Figura 7, revisado em Fonseca, Lynch and Roth, 2009). Terceiro, logo nos estágios iniciais

de desenvolvimento existe uma diferença extrema no modo e na velocidade de formação das membranas plasmáticas entre os ovos com embriogênese mais lenta, em geral de banda curta, e os de embriogênese rápida, como *D. melanogaster*, em geral de banda longa. Enquanto nos primeiros, membranas celulares existem e limitam a difusão de fatores de transcrição livremente pelo ovo, nos últimos, fatores de transcrição podem estabelecer os diversos territórios AP, que, no final, corresponderão aos domínios de expressão dos genes de polaridade de segmentos.

Vários estudos têm demonstrado uma grande variação no controle maternal da formação do eixo AP em artrópodes (visto anteriormente), bem como na cascata de genes do tipo *gap* (revisado em Jaeger, 2011). Em linhas gerais, em insetos de banda curta parece haver uma maior interação entre a rede zigótica composta pelos genes do tipo *gap* e de “regra de pares” na região posterior (Choe, Miller and Brown, 2006; Fu et al., 2012; Ansari et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que, em quelicerados, como a aranha *Cupiennius salei*, uma via de sinalização importante para a geração de segmentos em vertebrados, a via de sinalização de Notch, também seria essencial para a geração dos segmentos, a partir da zona posterior nesta aranha (Stollewerk, Schoppmeier and Damen, 2003). É importante ressaltar ainda, que a região posterior nestes animais dá origem aos precursores comuns do ectoderma e do mesoderma, simultaneamente. Estudando o papel da via de sinalização de Notch na aranha *P. tepidariorum*, outros autores concluíram que Notch estaria envolvido na decisão dos precursores entre a diferenciação em mesoderma e ectoderma e não no processo de segmentação propriamente dito (Oda et al., 2007). Mais recentemente, novas tecnologias, tais como o sequenciamento de RNA de uma única célula (*single-cell RNA-seq*) e a detecção de sequências regulatórias (*ATAC-seq*) foram utilizadas para compreender o processo de determinação do disco germinal, da ativação do genoma zigótico, da segmentação e da determinação das camadas germinativas em aranhas (Iwasaki-Yokozawa et al., 2022). Esse estudo indicou que um fator de transcrição novo da família *GATA-like*, que evoluiu após a duplicação e a divergência de um membro *GATA* canônico, é responsável pela ativação zigótica do genoma da aranha, contribuindo para a formação do endoderma. Esse artigo também revela o potencial de abordagens genômicas e transcriptômicas não direcionadas (*non-biased*) para o estudo da embriologia comparativa molecular, bem como estudos em diferentes organismos, que demonstram que os estágios iniciais do desenvolvimento parecem ter o controle molecular mais variável do que inicialmente esperado.

Estudos recentes têm discutido que os processos de formação dos segmentos em embriões de banda curta e banda longa não seriam tão distintos

assim. Por exemplo, Clark and Peel (2018) demonstraram que os genes *caudal*, *dichaete* e *odd-paired* são expressos sequencialmente e de uma forma comum em *Drosophila* e *Tribolium*. Entretanto, enquanto na mosca-das-frutas esses três genes são expressos ao longo de todo tronco do embrião, no besouro são expressos em “frentes de ondas”, que se expandem e se retraem ao longo do tempo. Considerando outras similaridades na utilização de genes de “regras de pares” primários (*eve*, *runt*, *odd*) e secundários (*prd*, *slp*) entre ambos os organismos, estes autores propõem que boa parte das diferenças nos modos de segmentação poderiam refletir mudanças heterocrônicas no desenvolvimento, isto é, mudanças no tempo e no local da expressão destes genes, ao longo da evolução.

Mais recentemente, Diaz-Cuadros, Pourquié e El-Sherif (2021) compararam os processos de segmentação entre vertebrados e insetos de banda curta, propondo que os processos possuiriam diversas similaridades, incluindo a padronização sequencial, utilizando oscilações de expressão gênica reguladas pela via de Wnt. Por outro lado, diferenças nos processos de regionalização entre insetos de banda curta são evidentes. Salientando-se, por exemplo, que os insetos padronizam seus segmentos dois a dois (*double-segmental patterning*), enquanto vertebrados têm seu padrão de segmentação individual. Não existem também, em vertebrados, genes equivalentes aos genes do tipo *gap*, observados em insetos.

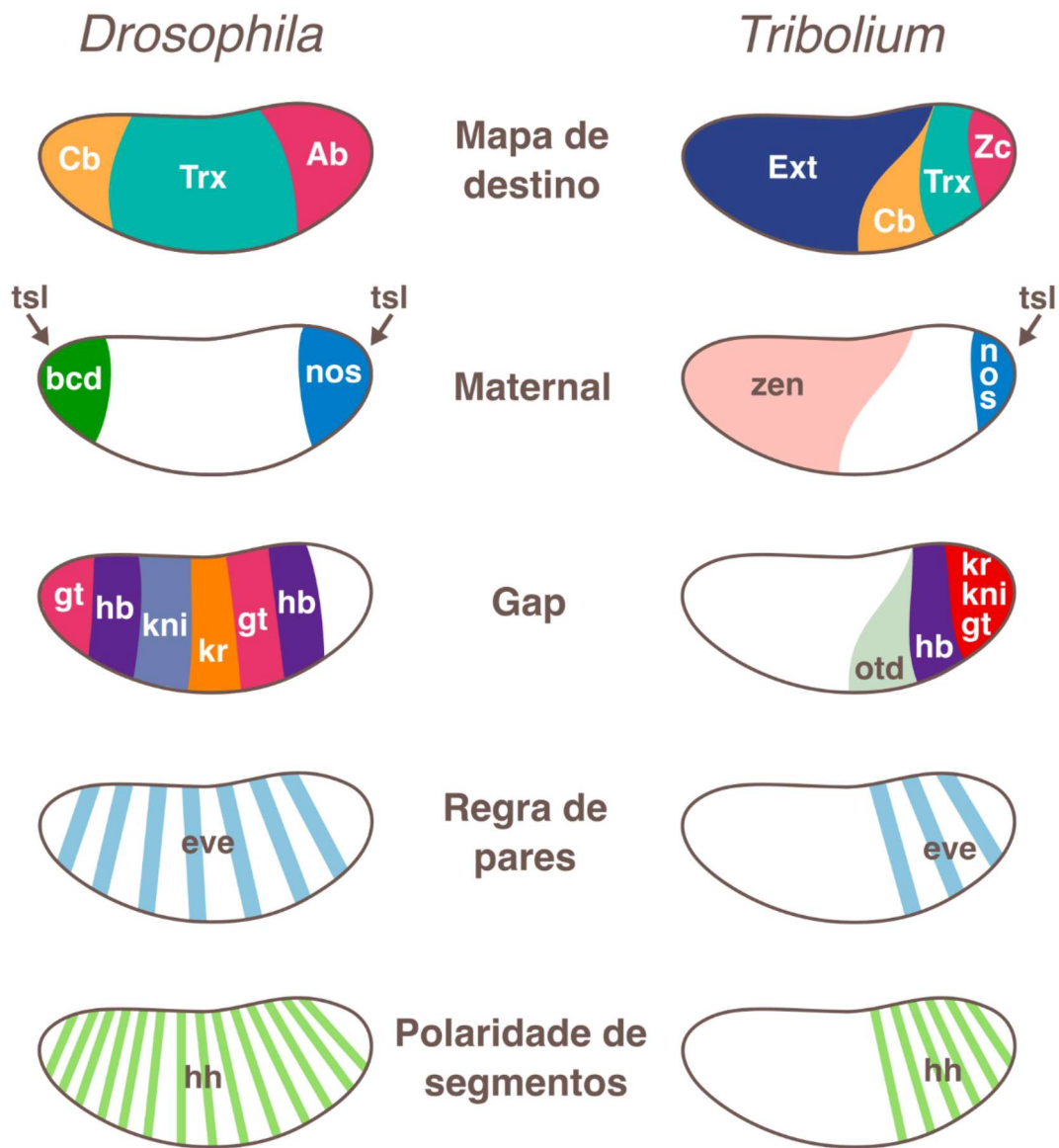


Figura 7: Embriogênese de *Drosophila*, inseto banda longa, e *Tribolium*, de banda curta. Cb (cabeça), Trx (tórax), Ab (abdômen), Zc (zona de crescimento) e Ext (células extraembrionárias da serosa).

Enquanto a cabeça localiza-se, aproximadamente, no meio do ovo em embriões de banda-curta, em embriões de banda longa, ela se localiza na região anterior. Nomes dos genes cujas abreviações aparecem na figura são detalhados ao longo do texto.

Fonte: Arquivo pessoal

Formação do eixo dorsoventral

Estudos do início da segunda metade do século XX demonstraram a existência de mecanismos autorregulatórios em ovos de insetos pertencentes a grupos que divergiram mais próximos da base desta classe. O embriologista alemão Klaus Sander demonstrou que, ao separar mecanicamente as futuras regiões ventrais e dorsais de um ovo do Orthoptera *Eucelis*, dois embriões eram gerados. Tal resultado demonstrou que algumas espécies com características pertencentes a grupos ancestrais possuíam, portanto, capacidade de se autorregular (Sander, 1971, 1976). Experimentos similares com embriões de *D. melanogaster* demonstraram pouca capacidade autorreguladora. Assim, esses estudos clássicos em dípteros derivados demonstraram que os destinos celulares seriam determinados bastante precocemente, a partir de gradientes maternos e de forma irreversível no desenvolvimento.

O estudo da formação do eixo dorsoventral e do seu controle molecular em insetos tem avançado bastante, ao longo dos últimos anos. Inicialmente, estudos de indução de mutações no inseto-modelo *D. melanogaster* demonstraram que a padronização DV é, em grande parte, controlada por fatores maternos. A informação fundamental para a formação DV encontra-se na região ventral do embrião, sendo transmitida através da via de sinalização de Toll, que, em vertebrados e insetos, também está envolvida com a resposta imune (revisado em Moussian and Roth, 2005; Hetru and Hoffmann, 2009). Outra via maternal, a via de Dpp, também influencia a via de sinalização de Toll (Araujo and Bier, 2000; Carneiro et al., 2006; Fontenele et al., 2009; Negreiros et al., 2010). Durante a embriogênese de *Drosophila*, essas duas vias de sinalização estabelecem, pelo menos, quatro regiões, ao longo do eixo DV: i) o mesoderma, localizado ventralmente; ii) o ectoderma neurogênico na região ventro , o iii) não neurogênico, na região dorsolaterais; e iv) a amnioserosa na região mais dorsal do ovo. A geração do sinal ventralizante, isto é, o que é responsável por determinar qual região será a ventral, envolve, pelo menos, 17 fatores maternos associados à via de Toll e, no mínimo, mais nove fatores à via de Dpp. Esses últimos são responsáveis por modular a via Toll.

As informações fundamentais para a formação do eixo DV são originadas durante a ovogênese, na camada de células foliculares. Fatores derivados das células foliculares, tais como as proteínas intracelulares Pipe (Pip), Slalom (Sll) e Windbeutel (Wbl), reguladores da síntese de proteoglicanos, e a protease secretada Nudel (Ndl) são requeridos para ativar uma cascata de proteases, incluindo Gastrulation Defective (Gd), Snake (Snk) e Easter (Ea). Estas proteases são secretadas como precursores inativos pelo ovócito ou durante os estágios

iniciais de clivagem. Sua ativação culmina com a geração do gradiente do morfógeno Spätzle (Spz), com maiores níveis na região ventral do espaço perivitelínico. Spz, então, se liga ao receptor transmembranar Toll (TI), presente de forma uniforme no embrião recém depositado de *Drosophila*. O sinal é transferido para o interior do embrião, a partir da ação das proteínas adaptadoras Krapfen/dMyd88, Tube (Tub) e da quinase Pelle (Nie et al., 2018). Esta cascata intracelular leva à fosforilação e à degradação do inibidor homólogo de IκB, Cactus (Cact) (Daigneault, Klemetsaune and Wasserman, 2013). Isso permite ao fator de transcrição Dorsal, da superfamília NFκB, entrar no núcleo e ativar ou inibir a expressão de genes zigóticos requeridos para a especificação dos destinos celulares ao longo do eixo dorsoventral (revisado em Moussian and Roth, 2005, Figura 8).

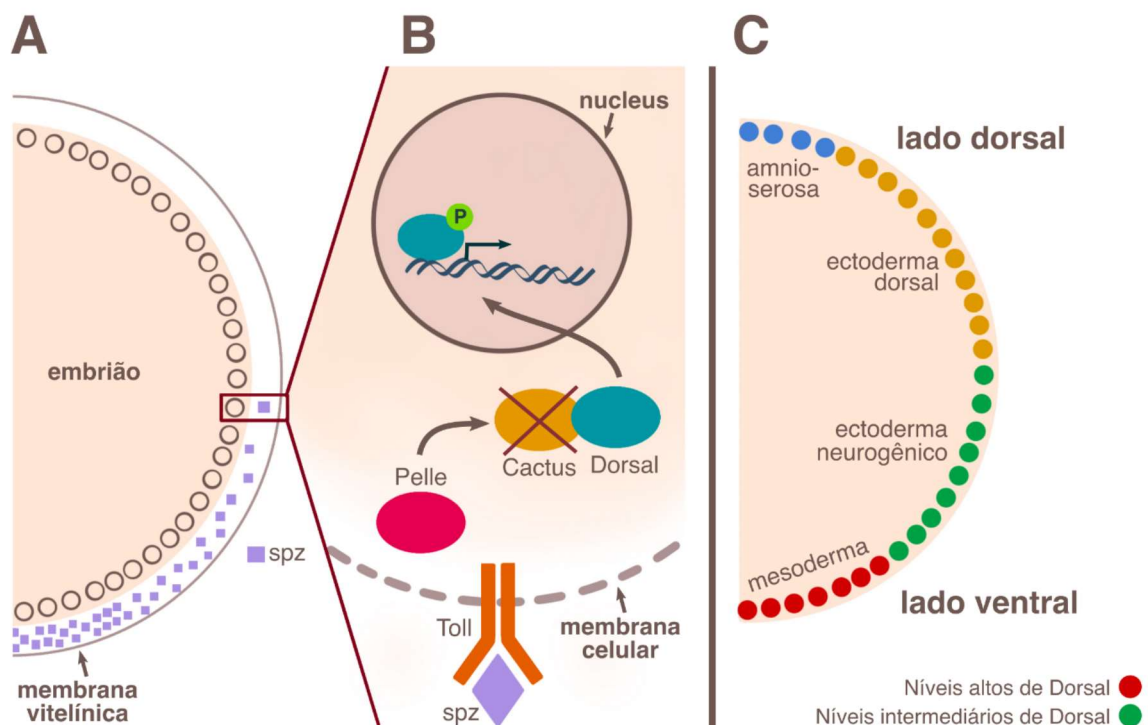


Figura 8: Principais passos envolvidos na via de sinalização de Toll e na formação do eixo dorsoventral.

De acordo com a figura, os principais passos envolvidos na via de sinalização de Toll e na formação do eixo dorsoventral são: a) a representação esquemática da embriogênese sincicial, quando o ligante de Toll, Spätzle é encontrado em grandes quantidades na futura região ventral; b) no embrião, a ativação da via de Toll, na região ventral, leva a degradação de Cactus e a importação de Dorsal para o núcleo; c) na região mais ventral, altos níveis de Dorsal são responsáveis por ativar genes mesodermiais, tais como *twist* e *snail*. No ectoderma neurogênico (verde), níveis intermediários de Dorsal são responsáveis por ativar *vnd* e *ind*, bem como outros genes neurogênicos.

Fonte: Arquivo pessoal

Análises realizadas nos últimos anos demonstraram que a via maternal de Dpp também tem papel crucial no estabelecimento do eixo DV (Araujo and Bier, 2000; Negreiros et al., 2010). Os fatores secretados Sog, Tld, Tlr, e Tsg atuam durante a ovogênese, modulando a distribuição de Dpp (Araujo and Bier, 2000; Carneiro et al., 2006; Negreiros et al., 2010, 2018) e seus efeitos sobre o estabelecimento do eixo DV do embrião. A Dpp é depositada no espaço perivitelínico do futuro embrião (Carneiro et al., 2006), ativando sua via de sinalização através de componentes maternos. A hipótese corrente é de que esta ação de Dpp maternal na padronização de regiões ventrais e laterais do embrião seja um remanescente evolutivo de sua ação central na padronização DV em Bilateria, como detalhado a seguir (Bressan and Araujo, 2022).

A questão que tem sido mais recentemente abordada é a de quanto o conhecimento obtido em *D. melanogaster* pode ser aplicado a outros insetos. Um dos passos cruciais para a padronização DV em *D. melanogaster* é a migração do núcleo haploide do ovócito, em desenvolvimento, para o córtex anterior, numa posição assimétrica ao longo do futuro eixo DV. Como relatado anteriormente, durante a ovogênese, o ligante de EGF, chamado Gurken, é secretado para as células foliculares localizadas na região anterior do folículo. Gurken ativa, então, a via de sinalização de EGF nestas células e atua inibindo a transcrição da sulfotransferase Pipe, que, dessa forma, é somente expressa nas células foliculares ventrais. Lynch e colaboradores (2010) demonstraram que a migração do núcleo para a região dorso-anterior do folículo e a sinalização pela via de EGF são características típicas de insetos, uma vez que as várias ordens estudadas se utilizam desta via para a padronização DV.

Por outro lado, até recentemente acreditava-se que *pipe* parecia não estar envolvido nesse processo nos demais insetos estudados, particularmente pela falta de expressão deste gene em epitélios foliculares do besouro *Tribolium* e do hemíptera *Oncopeltus*, sugerindo modificações nas vias maternas requeridas para a formação do eixo DV. Entretanto, um artigo recente, que averiguou a padronização DV em *G. bimaculatus*, demonstrou que *pipe* é expresso no epitélio folicular durante a ovogênese deste Orthoptera, sendo o mecanismo de padronização DV bastante similar ao de *Drosophila* (Pechmann et al., 2021). Dados recentes do nosso grupo demonstram que a via de Dpp também é importante, maternamente, no hemiptera *R. prolixus* (Berni et al., 2023).

Durante a embriogênese, o sinal ventralizante de Spätzle ativa Toll na região ventral e lateral, fazendo com que altos níveis de Dorsal sejam definidos em núcleos ventrais, estabelecendo o mesoderma presuntivo. A região lateral conta com concentrações progressivamente menores de Dorsal ao longo do eixo DV, determinando, assim, as regiões do ectoderma neurogênico e não-neurogênico

(revisado em Moussian and Roth, 2005). Interações entre genes zigóticos são fundamentais para a correta padronização e refinamento desses tecidos.

Estudos genômicos determinaram que Dorsal, como fator de transcrição, se liga diretamente a cerca de 80 genes zigóticos, que são diferencialmente expressos ao longo do eixo DV (Sandmann et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). Por este motivo, os fatores de transcrição *twist* e *snail* são essenciais para a formação do mesoderma, enquanto *ventral nervous defective (vnd)*, *intermediate nervous defective (ind)* e *muscle segment homeobox (msh)* são fundamentais para as regiões ventral, lateral e dorsal do sistema nervoso. Na região do ectoderma dorsal, a concentração nuclear de Dorsal é bastante baixa, e, nessa região, Dorsal atua como um repressor (Jiang et al., 1992). Na região mais dorsal do ovo, onde a amnioserosa é especificada, a via zigótica de sinalização de Dpp é responsável por prover a informação posicional (revisado em Araujo, Fontenele and da Fonseca, 2011, Figura 8).

Assim, o modelo mais aceito acerca da regulação dos genes-alvo de Dorsal é que eles possuem sequências regulatórias, contendo sítios de ligação aos quais esse fator de transcrição se liga. Em regiões ventrais, onde a quantidade de Dorsal é bastante grande, genes responsivos a Dorsal apresentam, em sua sequência, sítios de ligação de baixa afinidade, enquanto genes expressos em regiões laterais apresentam sítios regulatórios com maior afinidade para Dorsal. Logo, na região dorsal do embrião, pequenas mudanças na concentração de Dorsal podem ter efeitos muito importantes para a ativação de genes-alvo.

O vasto conhecimento das sequências regulatórias destes genes, nos últimos anos, tem transformado a rede regulatória gênica (*gene regulatory network*) responsável pela padronização DV em um dos principais processos em que a morfogênese e as interações moleculares são profundamente conhecidas (revisado em Stathopoulos and Levine, 2005). Análises quantitativas e modelagem matemática desse processo estabelecem que a regulação dinâmica da translocação nuclear de Dorsal é fundamental para definir um gradiente nuclear apropriado e, assim, estabelecer, de forma precisa, os padrões espaciais de expressão de genes-alvo (Reeves et al., 2012; Cardoso et al., 2017; Carrell et al., 2017; Barros et al., 2021). Desse modo, é possível que mudanças nessa dinâmica, através de alterações na ação da I κ B codificada por *cactus*, por exemplo, possam levar a alterações no gradiente de Dorsal nuclear, como as encontradas em espécies com diferentes tamanhos de embrião (Chahda, Sousa-Neves and Mizutani, 2013; Garcia et al., 2013; Ambrosi et al., 2014).

Quanto desse processo de padronização DV dependente de Toll é conservado em outros artrópodes? Aparentemente, as duas vias de sinalização

de Toll e Dpp estão envolvidas na padronização DV, pelo menos no ancestral comum dos insetos hemi e holometábolos, que viveu há cerca de 300 milhões anos. Todavia, a importância de cada uma dessas vias parece diferir, quando comparamos as diversas ordens de insetos. No besouro *T. castaneum*, a via de Dpp é fundamental para a padronização do sistema nervoso, ao contrário de *D. melanogaster*, na qual a via de Toll é a principal responsável por padronizar esta região (Nunes da Fonseca et al., 2008).

Outra diferença bastante clara obtida por análises comparativas é o maior papel do genoma zigótico em insetos pertencentes a grupos que divergiram há mais tempo na filogenia, e.g. *T. castaneum*, em relação ao extenso controle maternal existente em dípteros derivados, como *D. melanogaster*. Demonstramos que interações em nível zigótico de moduladores de Dpp e Toll são responsáveis pela padronização do eixo DV em *T. castaneum* (revisado em Fonseca, Lynch and Roth, 2009). Nos últimos anos, a análise da padronização DV foi estendida para diversos outros insetos, majoritariamente pelos grupos de Siegfried Roth na Alemanha, Jeremy Lynch nos EUA (Lynch and Roth, 2011; Özüak et al., 2014a, 2014b; Sachs et al., 2015; Pers et al., 2016; Pechmann et al., 2021) e pelos grupos de Helena Araujo e de Rodrigo Nunes da Fonseca no Brasil (Berni et al., 2014; Nunes-da-Fonseca et al., 2017; Bressan and Araujo, 2022. Berni et al., 2023).

De forma resumida, esses estudos têm demonstrado que ambas as vias Toll e Dpp são ativas e envolvidas na padronização DV, nas diferentes espécies estudadas. Todavia, existe uma variação na importância de cada via para o processo nas diferentes ordens de insetos investigadas. Por exemplo, na padronização do eixo DV do embrião da vespa *Nasonia vitripennis* e no hemiptera *O. fasciatus*, a via de BMPs (incluindo Dpp) é responsável por padronizar todo o eixo DV, enquanto que em *G. bimaculatus* é a via de Toll que exerce esse papel. Entre as diferentes ordens de insetos é também observada a utilização diferencial de moduladores extracelulares da via de Dpp, como Twisted gastrulation (Tsg)/Crossveinless (Cv), Short gastrulation (Sog) e Tolloid (Tld), incluindo a perda do gene de *sog* do genoma de algumas espécies como o grilo *G. bimaculatus* ou a vespa *Nasonia vitripennis* (Özüak et al., 2014a; Pechmann et al., 2021). Como existem variações nos números de parálogos e no tipo de moduladores de Dpp entre as diferentes espécies, bem como na sua expressão, é possível que as variações nos gradientes destas moléculas expliquem, pelo menos parcialmente, as diferenças na padronização DV observada entre elas (Nunes da Fonseca, Van der Zee and Roth, 2010; Araujo, Fontenele and da Fonseca, 2011).

Assim, parece haver diferenças importantes, quando se compara a padronização DV em diferentes espécies, as quais se tornam mais evidentes quando se inclui, nessa análise, embriões de artrópodes pertencentes a grupos

basais, tais como quelicerados (aranhas, carrapatos, etc). Nesses animais, acredita-se que a padronização DV dependa largamente do genoma zigótico e que a perda da simetria e o estabelecimento do eixo DV envolvam, de forma acentuada, a via de sinalização de Dpp. Na aranha *P. tepidariorum*, Dpp e em seus moduladores são, aparentemente, responsáveis pela padronização de todas as regiões DV (Akiyama-Oda and Oda, 2006; Fonseca, Lynch and Roth, 2009).

Logo, uma hipótese plausível seria que, ancestralmente, os artrópodes utilizariam um sistema para padronização DV, envolvendo a via de sinalização de Dpp. Além disso, na evolução dos insetos, a via de sinalização de Toll teria sido cooptada de sua função original na imunidade para a padronização DV (Fonseca, Lynch and Roth, 2009). Assim, embora estudos iniciais tenham proposto que a padronização DV envolve uma rede regulatória de moléculas evolutivamente conservadas, em particular a via de sinalização de Dpp, tem se tornado claro que existem diversas diferenças entre artrópodes (Oda and Akiyama-Oda, 2008). Essas diferenças podem ser correlacionadas, por exemplo, com a extensa diversidade dos ovos de artrópodes, bem como com a existência de camadas envoltórias e protetoras dos ovos de insetos, as membranas extraembrionárias.

Formação das membranas extraembrionárias em insetos

As duas membranas extraembrionárias, a serosa e o âmnion, podem ser consideradas uma novidade evolutiva dos insetos possuidores de asas (pterigotos). Quelicerados, como carrapatos, não possuem membranas extraembrionárias envolvendo o embrião. Insetos primitivamente sem asas (apterigotos) muitas vezes possuem apenas uma membrana extraembrionária: a serosa ou o âmnion, e dípteros derivados e de desenvolvimento embrionário rápido, como *D. melanogaster*, possuem somente uma membrana bastante reduzida, a amnioserosa, localizada na região dorsal do embrião (revisado em Panfilio, 2008).

Embora não se tenha uma visão completa de muitos grupos informativos para a origem dessas membranas extraembrionárias, foi proposto que a formação do âmnion e a serosa seriam, simplesmente, consequência de forças físicas que ocorrem durante a embriogênese. Assim que formadas, várias funções relevantes podem ser realizadas por essas membranas. É importante ressaltar que cada um dos dois maiores grupos de animais com simetria lateral dos deuterostômios e protostômios, os vertebrados amniotos (mamíferos e répteis) e os insetos, respectivamente, foram os mais bem sucedidos no ambiente terrestre, com relação ao número de espécies e habitats ocupados. Essas membranas

extraembrionárias têm origem independente, ou seja, não possuem um ancestral comum em amniotos e insetos (revisado em Panfilio, 2008).

Parece que o desenvolvimento das membranas extraembrionárias é correlacionado com o aparecimento e a diversificação de um programa genético, envolvendo o surgimento de um gene *Hox3* derivado, o gene *zerknüllt* (*zen*). Em artrópodes pertencentes a grupos basais, que não possuem membranas extraembrionárias, apenas o gene *Hox3* encontra-se no genoma (Damen and Tautz, 1998; Hughes and Kaufman, 2002). Em insetos, uma duplicação do gene *Hox3* levou ao aparecimento do gene *zen*, que parece ser responsável pela especificação das membranas extraembrionárias em todas as ordens de insetos estudadas até hoje (Stauber, Jäckle and Schmidt-Ott, 1999). Os movimentos e a biomecânica das células extraembrionárias foram estudados recentemente no hemiptera *O. fasciatus* e demonstraram que essas membranas são essenciais para a sua embriogênese (Panfilio, 2009; Panfilio and Roth, 2010). Embriões de *T. castaneum* quanto em *O. fasciatus* silenciados para *zen1* através de RNAi, não desenvolvem a serosa (Van der Zee et al., 2005; Panfilio et al., 2006). É interessante, ainda, notar que, em condições de laboratório, os embriões de *T. castaneum* conseguem se desenvolver e eclodir, mesmo na ausência de serosa. Porém, não se sabe se, em condições extremas no ambiente natural, eles se desenvolveriam.

Durante o desenvolvimento embrionário precoce, logo após a formação do disco blastodermal, tipicamente nos insetos, acontece a diferenciação dos dois envelopes protetores ou membranas: uma serosa externa, que se diferencia diretamente do disco blastodermal, e o âmnion interno, que se diferencia das regiões adjacentes ao disco germinal. À vista disso, durante o desenvolvimento embrionário típico dos insetos, o embrião é envolvido pelo âmnion, criando a cavidade amniótica, e pela serosa, que o envolve o embrião e o âmnion. Este processo em que o embrião é envolto pela serosa e pelo âmnion, ocorre, concomitantemente, com o processo de gastrulação (descrito abaixo). Em várias ordens, tais como Hymenoptera, que incluem vespas e abelhas, o âmnion começa a se formar; porém, se degenera cedo, ao longo do desenvolvimento, ou apenas possui uma estrutura que recobre o vitelo ao invés do embrião. Dípteros derivados, incluindo a mosca-das-frutas *D. melanogaster*, possuem uma única membrana extraembrionária, que recobre apenas a região dorsal do embrião. Assim, dentre os artrópodes vetores, temos os carrapatos, tais como *R. microplus*, que não possuem membranas extraembrionárias, e hemípteras, como *R. prolixus* e mosquitos, como o *Ae. aegypti*, com serosa e âmnion evidentes. A presença ou ausência de membranas extraembrionárias possui extensa correlação com a estrutura do córion que reveste o ovo. A camada do córion contendo lipídeos, e

outros componentes parecem ser de fundamental importância no habitat natural dos ovos (Hinton, 1981; Panfilio, 2008).

Dois processos importantes acontecem com as membranas extraembrionárias. Primeiro, deve existir uma correta fusão do âmnion com a serosa, que geralmente começa a acontecer na região da cabeça. Na falta da fusão correta, como em embriões silenciados por RNAi para *zen2* em *Tribolium*, o embrião pode se fechar de forma invertida, com o sistema nervoso permanecendo na região externa e a epiderme internamente (Van der Zee et al., 2005). Um segundo evento é o fechamento dorsal, que envolve a extensa morte celular das membranas extraembrionárias, em particular a serosa (Panfilio and Roth, 2010). Esse fechamento é fundamental para a internalização dos órgãos, bem como para a manutenção da epiderme intacta. Estudos funcionais dessas membranas em insetos vetores, nos últimos anos, têm demonstrado que, particularmente, a serosa parece ser importante para secretar uma cutícula protetora chamada de cutícula serosa, que possui papel fundamental no fenômeno da resistência à dessecação (Goltsev et al., 2009; Papatsenko, Levine and Goltsev, 2011). O estudo do mecanismo genético envolvido com a padronização dessa cutícula é uma área promissora de interface entre a investigação da embriologia de vetores e possíveis ações de controle, através do desenho de inibidores específicos.

Nos últimos anos, está havendo um grande avanço nos estudos das membranas extraembrionárias, a partir de *live imaging*, particularmente utilizando linhagens transgênicas do besouro *T. castaneum*, como modelo para entender as propriedades mecânicas da serosa. Nesse besouro, a serosa envolve completamente o embrião durante a embriogênese. Por exemplo, foi demonstrado que a migração e o fechamento da serosa ventral, envolvendo epibolia, são facilitados pela fluidização de cabos de actina e miosina nas células da ponta, que participam mais ativamente dos processos de migração (*leading edge cells*) (Jain et al., 2020). Também foi demonstrado que a serosa, nesse besouro, é fundamental para o processo de resposta imune durante o período embrionário. Após uma infecção bacteriana, embriões do tipo selvagem são capazes de secretar peptídeos antimicrobianos e montar uma resposta imune, enquanto que embriões sem serosa (*Tc-zen1/RNAi*) não conseguem montar uma resposta imune efetiva, demonstrando que as células da serosa são necessárias para proteção ativa contra patógenos, durante a embriogênese (Jacobs and van der Zee, 2013; Jacobs, Spaink and van der Zee, 2014). A serosa também é requerida em insetos, para a secreção de uma cutícula protetora, a cutícula serosa. Essa cutícula, uma camada de matriz extracelular encontrada abaixo da casca do ovo (*eggshell*) é essencial para a resistência à dessecação dos ovos de insetos vetores, evitando, portanto, a perda de água (Farnesi et al., 2017). Em

Collembola (*springtails*), uma ordem de hexápodes (três pares de pernas) não-insetos, a cutícula serosa é secretada pelas células do blastoderma, tendo sido proposto, portanto, que o surgimento da serosa e da secreção da sua cutícula tenha sido fundamental para o processo de terrestrialização, que ocorreu durante a evolução dos insetos (Vargas et al., 2021).

Gastrulação em artrópodes: a formação do mesoderma

Um dos principais eventos da embriogênese em organismos multicelulares é a separação dos grupos celulares em três camadas germinativas, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Esse processo é denominado gastrulação. Em geral, tanto em vertebrados quanto em invertebrados, células derivadas do ectoderma darão origem às regiões externas do corpo (epiderme) e ao sistema nervoso, do mesoderma a músculos e sangue e do endoderma ao tubo digestório e seus anexos. Em artrópodes, originalmente quase todo conhecimento do processo celular e molecular envolvido na formação do mesoderma e do tubo digestório é proveniente do inseto-modelo *D. melanogaster*. O desenvolvimento de *D. melanogaster* é bastante diferente dos demais insetos, sendo de banda longa, conforme descrito acima.

Dentre essas diferenças da embriogênese de *D. melanogaster*, se comparada com outros insetos, destaca-se o modo de invaginação do mesoderma (Tipo I na Figura 9, revisado em Roth 2004). Em *D. melanogaster*, a invaginação do mesoderma é controlada pelo sistema dorsoventral, principalmente pelos fatores de transcrição *dorsal*, *twist* e *snail* (revisado em Fonseca, Lynch and Roth, 2009). O gene *twist* pode ser considerado um controlador-mestre para o desenvolvimento do mesoderma em *D. melanogaster*, uma vez que embriões mutantes para *twist* não desenvolvem mesoderma. O mecanismo de invaginação do mesoderma é excelente para estudos comparativos em insetos, devido à existência de um vasto conhecimento ao nível celular e molecular, incluindo filmagens em tempo real de todo processo em *D. melanogaster* (McMahon et al., 2008).

Uma das principais justificativas para a análise da formação do mesoderma em diferentes artrópodes é a grande variação morfológica deste processo em seus diferentes grupos. Enquanto em *D. melanogaster* existe uma completa inibição de mitoses na região do mesoderma e um movimento coordenado dessas células, durante a invaginação, descrições morfológicas na era pré-molecular demonstraram a existência de, pelo menos, dois outros tipos de formação do mesoderma, em insetos filogeneticamente basais (Tipo II e Tipo III). Na formação do mesoderma tipo II, observada em *N. vitripennis* (vespa) e *Apis mellifera*

(abelha), o mesoderma se dissocia do ectoderma adjacente, como uma placa contínua, sem modificar a morfologia de suas células (Figura 9, revisado em Roth 2004). Na formação do mesoderma do tipo III, observado em insetos de grupos que divergiram bem no início do grupo como libélulas (Odonata – *dragonflies*), a ingressão de células ocorre através de um processo estocástico, em que células aparentemente proliferam e ingressam no interior do embrião, individualmente (Figura 9, revisado em Roth 2004). Foi demonstrado, ainda, que a aranha *P. tepidariorum* (quelicerado) não forma o mesoderma como estrutura mais ventral do embrião e sob o controle da cascata molecular dorsoventral, embora *twist* seja requerido para a formação do mesoderma em aranhas (Akiyama-Oda and Oda, 2006; Feitosa et al., 2017). Isso indica que esse processo é diferente, ao nível de controle molecular, em aranhas e mosca-das-frutas. Concluindo, existe uma aparente flexibilidade no controle molecular da formação do mesoderma, em artrópodes e a investigação de como esta camada germinativa é padronizada em nível molecular e celular nos ajudará a entender as tendências macroevolutivas que ocorreram no filo com o maior número de espécies do Reino Animal.

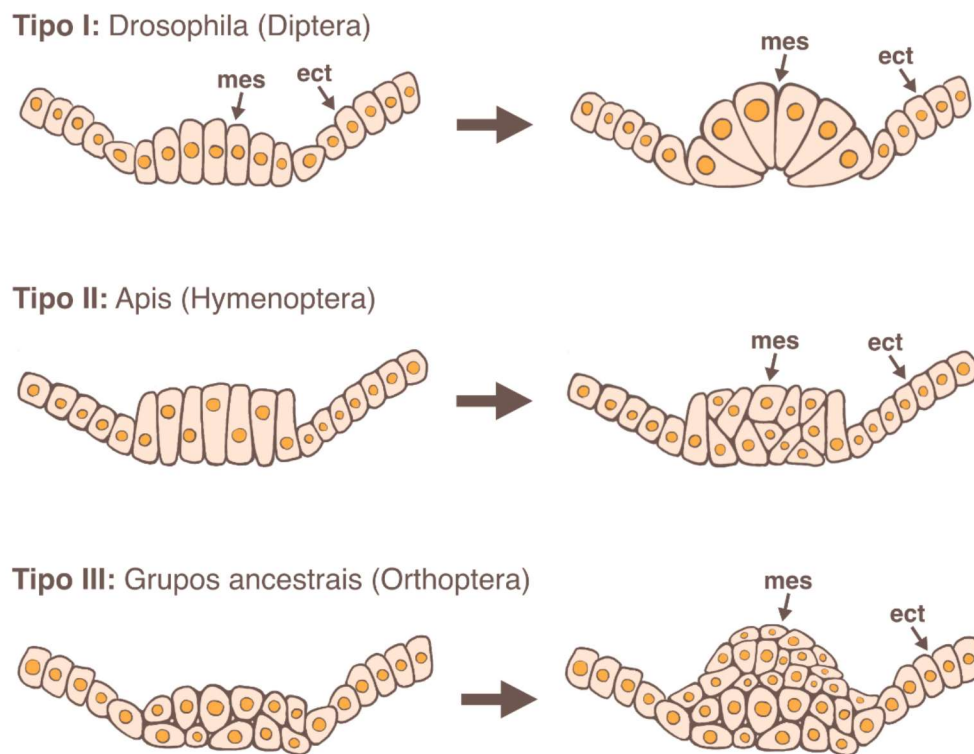


Figura 9: Tipos de invaginação do mesoderma em insetos. Ectoderma (ect), Mesoderma (mes). Em grupos basais (Orthoptera), a internalização do mesoderma ocorre de forma estocástica e aparentemente desorganizada numa aparente ingressão, o chamado Tipo III. Em *Apis mellifera* a internalização do mesoderma ocorre como uma placa única (Hymenoptera-Tipo II) e o ectoderma recobre o mesoderma na região ventral. Em *Drosophila melanogaster* a internalização do mesoderma ocorre em forma de invaginação de uma roseta em uma população única ao longo de todo eixo anteroposterior (AP).

Fonte: Arquivo pessoal

Estudos moleculares do controle da gastrulação, no caso da invaginação do mesoderma, foram realizados em diversas espécies de insetos (Urbansky et al., 2016; Benton et al., 2019). No Chironomidae *Chironomus riparius*, o processo de formação do mesoderma é por ingressão e não por invaginação, como em *D. melanogaster*. Em *C. riparius*, esse processo para a invaginação do mesoderma não envolve dois genes essenciais e, em *D. melanogaster*, os genes *folded gastrulation* e *T48* estão envolvidos. Com base nessas evidências, foi proposto que o modo de formação de mesoderma por ingressão (Tipo III) seria o ancestral em Diptera e em outros insetos e não envolveria esses dois ligantes. Todavia, estudos mais detalhados e recentes utilizando *live imaging* em embriões de *T. castaneum* (*Tc*) demonstraram que a via de sinalização de *folded gastrulation* (*fog*) é fundamental para diversos processos das células epiteliais, tais como a celularização, e a internalização do mesoderma e da região posterior do embrião (Benton et al., 2019). Na região posterior, localizam-se as células germinativas, que, em embriões *Tc-fog* RNAi, não são internalizadas. Assim, o estudo dos aspectos comparativos da gastrulação parecem indicar que, enquanto a expressão do fator de transcrição *twist* é compartilhada por todos os artrópodes investigados até o momento, os genes das vias de sinalização (ex. *fog*, *T48*) abaixo desse fator, bem como os movimentos e forma como células envolvidas são internalizadas, parecem variar.

Formação do tubo digestório e endoderma em artrópodes

O tubo digestório em *D. melanogaster* é formado por uma porção ectodermal e uma porção endodermal. São considerados componentes ectodermis do tubo digestório o estomodeu, o proctodeu e os túbulos de Malpighi (excreção), uma vez que estes componentes apresentam caráter epitelial, assim como a epiderme, e nunca demonstram características mesenquimais (Reuter, 1994). O endoderma, propriamente dito, é composto pelas regiões anteriores e posteriores do intestino médio, que são inicialmente localizadas adjacientemente ao proctodeu e o estomodeu. O endoderma é internalizado concomitantemente com o proctodeu e o estomodeu, estruturas ectodermis (Reuter, 1994, Figura 10). O endoderma passa por uma transição ectomesenquimal e, somente ao final do seu processo de diferenciação, suas células adquirem novamente seu caráter epitelial. Os chamados núcleos vitelínicos (*yolk nuclei*), ou vitelófagos primários, também têm função digestória, embora não façam parte do tubo digestório propriamente dito em *D. melanogaster* (Walker et al., 2000). Foi proposto por vários autores que os vitelófagos seriam integrados ao tubo digestório, em insetos primitivos e quelicerados, embora não exista prova conclusiva (revisado em Roth 2004).

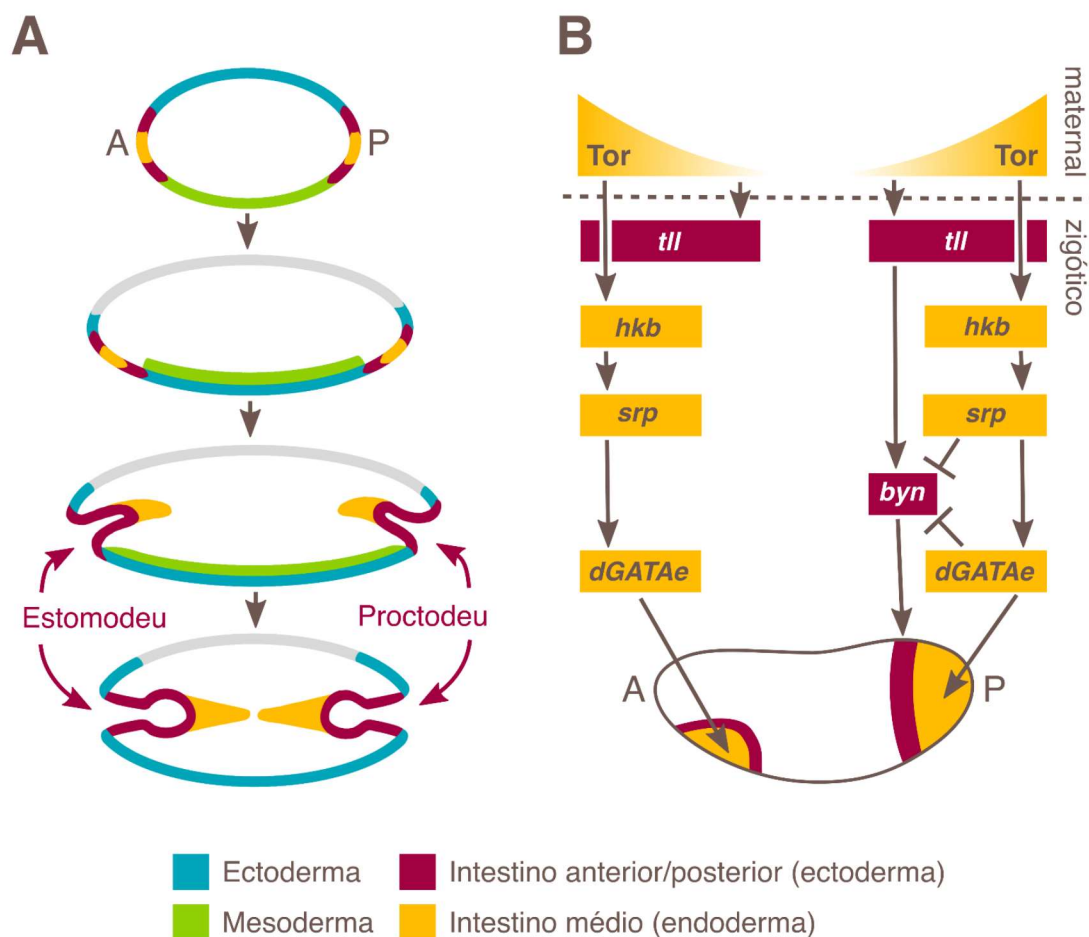


Figura 10: (A) Formação do intestino em *D. melanogaster* envolve a migração do ectoderma e do endoderma das regiões anterior e posterior. (B) Cascata de fatores envolvidos na padronização do endoderma de *Drosophila*. (A) Adaptado a partir de e (B) Adaptado a partir de Murakami.

Fonte: Arquivo pessoal

Em *D. melanogaster*, o controle genético da formação do tubo digestório envolve a cascata maternal, que ativa a via de sinalização do receptor tirosinaquinase Torso (Figura 7, Figura 10) nas regiões anterior e posterior do embrião, o chamado sistema terminal (St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992). Essa cascata leva à ativação no embrião dos fatores de transcrição zigóticos *tailless (tll)* e *huckebein (hkb)*, que são, por sua vez, responsáveis pela ativação de vários outros genes-alvo envolvidos na padronização do tubo digestório. O gene *fog*, necessário para a invaginação do mesoderma, também é requerido nas células do proctodeu para esse mesmo processo, uma vez que mutantes para *fog* não realizam a invaginação do proctodeu. Vários fatores de transcrição são requeridos nas porções do proctodeu (ectoderma), como os transcritos pelos genes *brachyury (byn)* e *forkhead (fkh)*, sendo esse último também requerido no ectoderma anterior para a correta especificação do estomodeu (Murakami, Okumura and Uchiyama, 2005). Outros fatores de transcrição, como os da família

GATA, entre eles *Serpent (srp)* e *GATAe*, são fundamentais para a padronização do endoderma (intestino médio). Concluindo, a cascata de fatores envolvidos na formação do tubo digestório é bem conhecida em *D. melanogaster*, mas poucos estudos investigaram esse processo ao nível molecular em outros artrópodes.

Ao contrário de vertebrados, em *D. melanogaster* o endoderma e o mesoderma são especificados antes da gastrulação por gradientes maternos, fato que é correlacionado com o desenvolvimento bastante rápido da mosca. Por outro lado, artrópodes mais basais têm, em geral, embriogênese mais longa, sendo possível que genes zigóticos tenham maior participação na especificação do tubo digestório. Análises preliminares utilizando o besouro *T. castaneum* demonstraram diferenças importantes no mecanismo de padronização do tubo digestório (Schroder et al., 2000), tais como distinções entre a padronização da região anterior e posterior do tubo digestório. Em *T. castaneum*, a região mais anterior do ovo não dá origem ao estomodeu, mas, sim, à serosa. Por esse motivo, a sua padronização, caracterizada pela expressão de *Tc-fkh*, ocorre somente zigoticamente, após o processo de gastrulação. Portanto, é possível concluir que o controle molecular do processo de formação do sistema digestório envolvendo suas populações endodermas e ectodermas, durante a embriogênese, sofreu modificações ao longo da evolução dos artrópodes.

Análises da formação do sistema digestório na aranha *Parasteatoda tepidariorum (Pt)* indicam que o padrão de expressão dos genes ectodermas *Pt-wingless (Pt-wg)* e *Pt-hedgehog (Pt-hh)*, dos genes endodermas, *Pt-serpent (Pt-srp)* e *Pt-hepatocyte-nuclear factor-4 (Pt-hnf4)*, e do gene mesodermal *Pt-twist (Pt-twi)* são conservados nas mesmas camadas germinativas que *D. melanogaster*. Por outro lado, o gene *Pt-forkhead (Pt-fkh)* possui expressão e função diferentes entre a mosca-das-frutas e as aranhas. *Pt-fkh* é expresso antes da gastrulação, em uma população celular que dá origem à endoderma e à mesoderma. Embriões silenciados para *Pt-fkh* por RNAi não desenvolveram um tubo digestório, nem as células mesodermas que expressam *Pt-twi* (Feitosa et al., 2017). Assim, em aranhas, *Pt-fkh* especifica as camadas germinativas do endoderma e do mesoderma, ao contrário de insetos, em que o mesoderma é uma camada germinativa especificada na região ventral do embrião, sob controle da via Dorsal/Toll. Logo, a evolução e o desenvolvimento da formação das camadas germinativas em Ecdysozoa é um importante tópico para futuros estudos.

Considerações finais

As discussões apresentadas durante o presente capítulo sobre a embriogênese de artrópodes demonstram a vasta literatura e o amplo

conhecimento destes processos no inseto-modelo *D. melanogaster* e todo o grande e inexplorado campo da embriogênese molecular dos artrópodes vetores. Nos últimos 10 anos, o avanço do sequenciamento de genomas, transcriptomas, das técnicas de perda de função (RNAi) e de imageamento *in vivo*, a partir de linhagens transgênicas via vetores piggyBAC (transposases), ou, mais recentemente, Cas9/CRISPR, têm aumentado consideravelmente a compreensão dos aspectos morfofuncionais das espécies não-modelo, incluindo os insetos vetores e as pragas agrícolas de interesse nacional.

Agradecimentos

Os autores correspondentes gostariam de agradecer a todos os ex-alunos e colaboradores, que permitiram a realização da pesquisa em Evo-Devo de artrópodes, em particular à Vitória Tobias-Santos, pela confecção de todas as figuras do presente capítulo. As agências financiadoras das pesquisas, aqui resumidas em: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) e o European Research Council (ERC).

Referências

- Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. (2006) 'Axis specification in the spider embryo: dpp is required for radial-to-axial symmetry transformation and sog for ventral patterning', *Development*, 133(12), pp. 2347–2357.
- Alvarenga, A.D.S. de *et al.* (2016) 'Biologia evolutiva do desenvolvimento de artrópodes: uma visão brasileira', *Acta Scientiae et Technicae*. doi:10.17648/uezo-ast-v4i2.152.
- Ambrosi, P. *et al.* (2014) 'Modeling of the dorsal gradient across species reveals interaction between embryo morphology and Toll signaling pathway during evolution', *PLoS computational biology*, 10(8), p. e1003807.
- Ansari, S. *et al.* (2018) 'Double abdomen in a short-germ insect: Zygotic control of axis formation revealed in the beetle *Tribolium castaneum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 1819–1824. doi:10.1073/pnas.1716512115.
- Araujo, H. (2017) 'Genesis special issue: New models for arthropod research', *Genesis*, 55(5). doi:10.1002/dvg.23037.
- Araujo, H. and Bier, E. (2000) 'sog and dpp exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo', *Development*, 127(16), pp. 3631–3644.
- Araujo, H., Fontenele, M.R. and da Fonseca, R.N. (2011) 'Position matters: variability in the spatial pattern of BMP modulators generates functional diversity', *Genesis*, 49(9), pp. 698–718.
- Baroux, C. D. *et al.* (2008) 'The maternal to zygotic transition in animals and plants', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, pp. 89–100.
- Barros, C.D.T. *et al.* (2021) 'A reaction-diffusion network model predicts a dual role of Cactus/I κ B to regulate Dorsal/NF κ B nuclear translocation in *Drosophila*', *PLoS computational biology*, 17(5), p. e1009040.
- Bastock, R. and St Johnston, D. (2008) '*Drosophila* oogenesis', *Current biology: CB*, 18(23), pp. R1082–7.
- Benton, M.A. *et al.* (2019) 'Fog signaling has diverse roles in epithelial morphogenesis in insects', *eLife*, 8. doi:10.7554/eLife.47346.
- Berni, M. *et al.* (2014) 'Toll signals regulate dorsal-ventral patterning and anterior-posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*', *EvoDevo*, 5, p. 38.
- Berni, M., *et al.* (2023). "A pro-BMP function exerted by *Rhodnius prolixus* Short gastrulation reveals great diversity in the role of BMP modulators during embryonic patterning." *Open Biology*, in press.

- Beukeboom, L.W., Kamping, A. and van de Zande, L. (2007) 'Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): a critical consideration of models and evidence', *Seminars in cell & developmental biology*, 18(3), pp. 371–378.
- Biedler, J.K. *et al.* (2012) 'Identification of early zygotic genes in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and discovery of a motif involved in early zygotic genome activation', *PloS one*, 7(3), p. e33933.
- Blondel, L., Jones, T.E. and Extavour, C.G. (2020) 'Bacterial contribution to genesis of the novel germ line determinant', *eLife*, 9. doi:10.7554/eLife.45539.
- Bressan, D. and Araujo, H.M. (2022) 'Evolution of the dorsoventral axis in insects: the changing role of Bone Morphogenetic Proteins', *Current opinion in insect science*, 49, pp. 1–7.
- Brito, T. *et al.* (2018) 'Transcriptomic and functional analyses of the piRNA pathway in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*', *PLoS neglected tropical diseases*, 12(10), p. e0006760.
- Calvo, E. *et al.* (2005) 'Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*', *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), pp. 789–798.
- Calvo, L. *et al.* (2022) 'The embryonic transcriptome of *Parhyale hawaiiensis* reveals different dynamics of microRNAs and mRNAs during the maternal-zygotic transition', *Scientific reports*, 12(1), p. 174.
- Campos, E. *et al.* (2006) 'Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development', *Veterinary Parasitology*, pp. 349–357. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.004.
- Campos-Ortega, J.A. and Hartenstein, V. (1985) 'The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*'. doi:10.1007/978-3-662-02454-6.
- Cardoso, M.A. *et al.* (2017) 'A novel function for the I κ B inhibitor Cactus in promoting Dorsal nuclear localization and activity in the embryo', *Development*, 144(16), pp. 2907–2913.
- Carneiro, K. *et al.* (2006) 'Graded maternal short gastrulation protein contributes to embryonic dorsal-ventral patterning by delayed induction', *Developmental biology*, 296(1), pp. 203–218.
- Carrell, S.N. *et al.* (2017) 'A facilitated diffusion mechanism establishes the Dorsal gradient', *Development*, 144(23), pp. 4450–4461.
- Chahda, J.S., Sousa-Neves, R. and Mizutani, C.M. (2013) 'Variation in the dorsal gradient distribution is a source for modified scaling of germ layers in *Drosophila*', *Current biology: CB*, 23(8), pp. 710–716.
- Chang, C.-C. *et al.* (2006) 'Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Vasa and Nanos as markers', *The International journal of developmental biology*, 50(4), pp. 413–421.

- Chang, C.-C. *et al.* (2007) 'Apvasa marks germ-cell migration in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea)', *Development genes and evolution*, 217(4), pp. 275–287.
- Chapman, R.F. (1998) 'The Insects'. doi:10.1017/cbo9780511818202.
- Choe, C.P., Miller, S.C. and Brown, S.J. (2006) 'A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germ insect *Tribolium castaneum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), pp. 6560–6564.
- Church, S.H. *et al.* (2019) 'Insect egg size and shape evolve with ecology but not developmental rate', *Nature*, pp. 58–62.
- Cinnamon, E. *et al.* (2004) 'Capicua integrates input from two maternal systems in *Drosophila* terminal patterning', *The EMBO journal*, 23(23), pp. 4571–4582.
- Clark, E. and Peel, A.D. (2018) 'Evidence for the temporal regulation of insect segmentation by a conserved sequence of transcription factors', *Development* [Preprint]. doi:10.1242/dev.155580.
- Cridge, A.G. *et al.* (2017) 'The honeybee as a model insect for developmental genetics', *genesis*, p. e23019. doi:10.1002/dvg.23019.
- Daigneault, J., Klemetsaune, L. and Wasserman, S.A. (2013) 'The IRAK homolog Pelle is the functional counterpart of I κ B kinase in the *Drosophila* Toll pathway', *PloS one*, 8(9), p. e75150.
- Dallacqua, R.P. and Bitondi, M.M.G. (2014) 'Dimorphic Ovary Differentiation in Honeybee (*Apis mellifera*) Larvae Involves Caste-Specific Expression of Homologs of Ark and Buffy Cell Death Genes', *PLoS ONE*, p. e98088. doi:10.1371/journal.pone.0098088.
- Damen, W.G. and Tautz, D. (1998) 'A Hox class 3 orthologue from the spider *Cupiennius salei* is expressed in a Hox-gene-like fashion', *Development genes and evolution*, 208(10), pp. 586–590.
- Davis, G.K. and Patel, N.H. (2002) 'Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation', *Annual review of entomology*, 47, pp. 669–699.
- Dearden, P. and Akam, M. (1999) 'Developmental evolution: Axial patterning in insects', *Current biology: CB*, 9(16), pp. R591–4.
- Dearden, P.K. *et al.* (2006) 'Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes', *Genome Research*, pp. 1376–1384. doi:10.1101/gr.5108606.
- De Renzis, S. *et al.* (2007) 'Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo', *PLoS biology*, 5(5), p. e117.
- Diaz-Cuadros, M., Pourquié, O. and El-Sherif, E. (2021) 'Patterning with clocks and genetic cascades: Segmentation and regionalization of vertebrate versus insect body plans', *PLoS genetics*, 17(10), p. e1009812.

Dönitz, J. *et al.* (2015) 'iBeetle-Base: a database for RNAi phenotypes in the red flour beetle *Tribolium castaneum*', *Nucleic acids research*, 43(Database issue), pp. D720–5.

Donoughe, S. *et al.* (2022) 'Nuclear speed and cycle length co-vary with local density during syncytial blastoderm formation in a cricket', *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-022-31212-8.

Driever, W. and Nüsslein-Volhard, C. (1988a) 'A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos', *Cell*, 54(1), pp. 83–93.

Driever, W. and Nüsslein-Volhard, C. (1988b) 'The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner', *Cell*, 54(1), pp. 95–104.

Drummond-Barbosa, D. (2019) 'Local and Physiological Control of Germline Stem Cell Lineages in', *Genetics*, 213(1), pp. 9–26.

Duan, J. *et al.* (2021) 'CLAMP and Zelda function together to promote *Drosophila* zygotic genome activation', *eLife*. doi:10.7554/elife.69937.

Ephrussi, A., Dickinson, L.K. and Lehmann, R. (1991) 'Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos', *Cell*, 66(1), pp. 37–50.

Ewen-Campen, B. *et al.* (2011) 'The maternal and early embryonic transcriptome of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*', *BMC genomics*, 12, p. 61.

Extavour, C.G. (2011) 'Long-Lost Relative Claims Orphan Gene: oskar in a Wasp', *PLoS Genetics*, p. e1002045. doi:10.1371/journal.pgen.1002045.

Farnesi, L.C. *et al.* (2017) 'Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors', *PLoS neglected tropical diseases*, 11(10), p. e0006063.

Feitosa, N.M. *et al.* (2017) 'Molecular control of gut formation in the spider *Parasteatoda tepidariorum*', *Genesis*, 55(5). doi:10.1002/dvg.23033.

Finkelstein, R. and Boncinelli, E. (1994) 'From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx', *Trends in genetics: TIG*, 10(9), pp. 310–315.

Foe, V.E. and Alberts, B.M. (1983) 'Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis', *Journal of Cell Science*, pp. 31–70. doi:10.1242/jcs.61.1.31.

Fonseca, R.N. da, Lynch, J.A. and Roth, S. (2009) 'Evolution of axis formation: mRNA localization, regulatory circuits and posterior specification in non-model arthropods', *Current opinion in genetics & development*, 19(4), pp. 404–411.

Fontenele, M. *et al.* (2009) 'The Ca²⁺-dependent protease Calpain A regulates Cactus/I κ B levels during *Drosophila* development in response to maternal Dpp signals', *Mechanisms of Development*, pp. 737–751.
doi:10.1016/j.mod.2009.04.005.

Friend, W.G., Choy, C.T. and Cartwright, E. (1965) 'The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae)', *Canadian journal of zoology*, 43(6), pp. 891–904.

Fu, J. *et al.* (2012) 'Asymmetrically expressed axin required for anterior development in *Tribolium*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), pp. 7782–7786.

Gallot, A. *et al.* (2012) 'Sexual and asexual oogenesis require the expression of unique and shared sets of genes in the insect *Acyrtosiphon pisum*', *BMC genomics*, 13, p. 76.

Garcia, M. *et al.* (2013) 'Size-dependent regulation of dorsal-ventral patterning in the early *Drosophila* embryo', *Developmental biology*, 381(1), pp. 286–299.

Gaskill, M.M. *et al.* (2021) 'GAF is essential for zygotic genome activation and chromatin accessibility in the early *Drosophila* embryo', *eLife*.
doi:10.7554/elife.66668.

Goltsev, Y. *et al.* (2004) 'Different combinations of gap repressors for common stripes in *Anopheles* and *Drosophila* embryos', *Developmental biology*, 275(2), pp. 435–446.

Goltsev, Y. *et al.* (2009) 'Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo', *Developmental biology*, 330(2), pp. 462–470.

Gomes, J.E., Azambuja, P. and Garcia, E.S. (1990) 'Comparative studies on the growth and reproductive performances of *Rhodnius prolixus* reared on different blood sources', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(3), pp. 299–304.

Grimaldi, D. *et al.* (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
Hakeemi, M.S. *et al.* (2022) 'Screens in fly and beetle reveal vastly divergent gene sets required for developmental processes', *BMC biology*, 20(1), p. 38.

Harris, R.E. *et al.* (2011) 'Brat promotes stem cell differentiation via control of a bistable switch that restricts BMP signaling', *Developmental cell*, 20(1), pp. 72–83.

Harris, R.E. and Ashe, H.L. (2011) 'Cease and desist: modulating short-range Dpp signalling in the stem-cell niche', *EMBO reports*, 12(6), pp. 519–526.

Heffer, A. and Pick, L. (2013) 'Conservation and variation in Hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field', *Annual review of entomology*, 58, pp. 161–179.

- Heras, J.M. de las, de las Heras, J.M. and Casanova, J. (2006) 'Spatially distinct downregulation of *Capicua* repression and *tailless* activation by the Torso RTK pathway in the *Drosophila* embryo', *Mechanisms of Development*, pp. 481–486. doi:10.1016/j.mod.2006.03.009.
- Hetru, C. and Hoffmann, J.A. (2009) 'NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), p. a000232.
- Hinton, H.E. (1981) *Biology of Insect Eggs*. Pergamon Press.
- Ho, K., Dunin-Borkowski, O.M. and Akam, M. (1997) 'Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation', *Development*, pp. 2761–2768. doi:10.1242/dev.124.14.2761.
- Huebner, E. (1981) 'Nurse cell-oocyte interaction in the telotrophic ovarioles of an insect, *Rhodnius prolixus*', *Tissue & cell*, 13(1), pp. 105–125.
- Hughes, C.L. and Kaufman, T.C. (2002) 'Exploring the myriapod body plan: expression patterns of the ten Hox genes in a centipede', *Development*, 129(5), pp. 1225–1238.
- Humann, F.C. and Hartfelder, K. (2011) 'Representational Difference Analysis (RDA) reveals differential expression of conserved as well as novel genes during caste-specific development of the honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 602–612. doi:10.1016/j.ibmb.2011.03.013.
- Iwasaki-Yokozawa, S. *et al.* (no date) 'Lineage-specific, fast-evolving GATA-like gene regulates zygotic gene activation to promote endoderm specification and pattern formation in the Theridiidae spider'. doi:10.1101/2022.06.10.495620.
- Jacobs, C.G.C., Spaink, H.P. and van der Zee, M. (2014) 'The extraembryonic serosa is a frontier epithelium providing the insect egg with a full-range innate immune response', *eLife*, 3. doi:10.7554/eLife.04111.
- Jacobs, C.G.C. and van der Zee, M. (2013) 'Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa', *Developmental and comparative immunology*, 41(2), pp. 263–269.
- Jaeger, J. (2011) 'The gap gene network', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(2), pp. 243–274.
- Jain, A. *et al.* (2020) 'Regionalized tissue fluidization is required for epithelial gap closure during insect gastrulation', *Nature communications*, 11(1), p. 5604.
- Jiang, J. *et al.* (1992) 'Individual dorsal morphogen binding sites mediate activation and repression in the *Drosophila* embryo', *The EMBO Journal*, pp. 3147–3154. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05387.x.
- Juhn, J. and James, A.A. (2006) 'oskar gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*', *Insect molecular biology*, 15(3), pp. 363–372.

- Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. (2010) 'Early embryonic development in the spider *Achaearanea tepidariorum*: Microinjection verifies that cellularization is complete before the blastoderm stage', *Arthropod structure & development*, 39(6), pp. 436–445.
- Kaneuchi, T. *et al.* (2015) 'Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), pp. 791–796.
- Keenan, S.E. *et al.* (2020) 'Rapid Dynamics of Signal-Dependent Transcriptional Repression by *Capicua*', *Developmental cell*, 52(6), pp. 794–801.e4.
- Kemph, A. and Lynch, J.A. (2022) 'Evolution of germ plasm assembly and function among the insects', *Current opinion in insect science*, 50, p. 100883.
- Kobayashi, S. *et al.* (1996) 'Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*', *Nature*, 380(6576), pp. 708–711.
- Koromila, T. *et al.* (2020) 'Odd-paired is a pioneer-like factor that coordinates with *Zelda* to control gene expression in embryos', *eLife*. doi:10.7554/eLife.59610.
- Kulkarni, A. and Extavour, C.G. (2017) 'Convergent evolution of germ granule nucleators: A hypothesis', *Stem cell research*, 24, pp. 188–194.
- Little, S.C. *et al.* (2011) 'The formation of the *Bicoid* morphogen gradient requires protein movement from anteriorly localized mRNA', *PLoS biology*, 9(3), p. e1000596.
- Lutz, D.A. and Huebner, E. (1981) 'Development of nurse cell-oocyte interactions in the insect telotrophic ovary (*Rhodnius prolixus*)', *Tissue & cell*, 13(2), pp. 321–335.
- Lu, X. *et al.* (2009) 'Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the *Drosophila* mid-blastula transition', *Development*, 136(12), pp. 2101–2110.
- Lynch, J.A. *et al.* (2010) 'EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects', *Current biology: CB*, 20(11), pp. 1042–1047.
- Lynch, J.A. *et al.* (2011) 'The Phylogenetic Origin of *oskar* Coincided with the Origin of Maternally Provisioned Germ Plasm and Pole Cells at the Base of the Holometabola', *PLoS Genetics*, p. e1002029. doi:10.1371/journal.pgen.1002029.
- Lynch, J.A., Olesnick, E.C. and Desplan, C. (2006) 'Regulation and function of *tailless* in the long germ wasp *Nasonia vitripennis*', *Development genes and evolution*, 216(7-8), pp. 493–498.
- Lynch, J.A. and Roth, S. (2011) 'The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects', *Genes & development*, 25(2), pp. 107–118.
- McMahon, A. *et al.* (2008) 'Dynamic analyses of *Drosophila* gastrulation provide insights into collective cell migration', *Science*, 322(5907), pp. 1546–1550.

Moussian, B. and Roth, S. (2005) 'Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient', *Current biology: CB*, 15(21), pp. R887–99.

Murakami, R., Okumura, T. and Uchiyama, H. (2005) 'GATA factors as key regulatory molecules in the development of *Drosophila* endoderm', *Development, growth & differentiation*, 47(9), pp. 581–589.

Negreiros, E. *et al.* (2010) 'alphaPS1betaPS integrin receptors regulate the differential distribution of Sog fragments in polarized epithelia', *Genesis*, 48(1), pp. 31–43.

Negreiros, E. *et al.* (2018) 'N-linked glycosylation restricts the function of Short gastrulation to bind and shuttle BMPs', *Development*, 145(22). doi:10.1242/dev.167338.

Nestorov, P. *et al.* (2013) 'The maternal transcriptome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis* is inherited asymmetrically to invariant cell lineages of the ectoderm and mesoderm', *PloS one*, 8(2), p. e56049.

Neuman-Silberberg, F.S. and Schüpbach, T. (1993) 'The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein', *Cell*, 75(1), pp. 165–174.

Nie, L. *et al.* (2018) 'Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals', *Frontiers in immunology*, 9, p. 1523.

Nunes da Fonseca, R. *et al.* (2008) 'Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*', *Developmental cell*, 14(4), pp. 605–615.

Nunes-da-Fonseca, R. *et al.* (2017) 'Rhodnius prolixus: From classical physiology to modern developmental biology', *Genesis*, 55(5). doi:10.1002/dvg.22995.

Nunes-da-Fonseca, R. (2022) 'Editorial overview: Development and regulation: Lessons from a multispecies approach', *Current opinion in insect science*, 51, p. 100917.

Nunes da Fonseca, R., van der Zee, M. and Roth, S. (2010) 'Evolution of extracellular Dpp modulators in insects: The roles of *tolloid* and *twisted-gastrulation* in dorsoventral patterning of the *Tribolium* embryo', *Developmental biology*, 345(1), pp. 80–93.

Oda, H. *et al.* (2007) 'Progressive activation of Delta-Notch signaling from around the blastopore is required to set up a functional caudal lobe in the spider *Achaearanea tepidariorum*', *Development*, 134(12), pp. 2195–2205.

Oda, H. and Akiyama-Oda, Y. (2008) 'Differing strategies for forming the arthropod body plan: lessons from Dpp, Sog and Delta in the fly *Drosophila* and spider *Achaearanea*', *Development, growth & differentiation*, 50(4), pp. 203–214.

- Olesnicky, E.C. *et al.* (2006) 'A caudal mRNA gradient controls posterior development in the wasp *Nasonia*', *Development*, 133(20), pp. 3973–3982.
- Özhan-Kizil, G., Havemann, J. and Gerberding, M. (2009) 'Germ cells in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on Vasa protein for their maintenance but not for their formation', *Developmental Biology*, pp. 230–239. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.028.
- Özüak, O. *et al.* (2014a) 'Ancient and diverged TGF- β signaling components in *Nasonia vitripennis*', *Development genes and evolution*, 224(4-6), pp. 223–233.
- Özüak, O. *et al.* (2014b) 'Dorsoventral polarity of the *Nasonia* embryo primarily relies on a BMP gradient formed without input from Toll', *Current biology: CB*, 24(20), pp. 2393–2398.
- Panfilio, K.A. *et al.* (2006) 'Oncopeltus fasciatus zen is essential for serosal tissue function in katanaproliferation', *Developmental Biology*, pp. 226–243. doi:10.1016/j.ydbio.2005.12.028.
- Panfilio, K.A. (2008) 'Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis', *Developmental biology*, 313(2), pp. 471–491.
- Panfilio, K.A. (2009) 'Late extraembryonic morphogenesis and its zen(RNAi)-induced failure in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*', *Developmental biology*, 333(2), pp. 297–311.
- Panfilio, K.A. and Roth, S. (2010) 'Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a hemimetabolous insect', *Developmental biology*, 340(1), pp. 100–115.
- Papagianni, A. *et al.* (2018) 'Capicua controls Toll/IL-1 signaling targets independently of RTK regulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), pp. 1807–1812.
- Papathanos, P.A. *et al.* (2009) 'The vasa regulatory region mediates germline expression and maternal transmission of proteins in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: a versatile tool for genetic control strategies', *BMC molecular biology*, 10, p. 65.
- Papatsenko, D., Levine, M. and Goltsev, Y. (2011) 'Clusters of temporal discordances reveal distinct embryonic patterning mechanisms in *Drosophila* and *anopheles*', *PLoS biology*, 9(1), p. e1000584.
- Parry, H., McDougall, A. and Whitaker, M. (2005) 'Microdomains bounded by endoplasmic reticulum segregate cell cycle calcium transients in syncytial *Drosophila* embryos', *The Journal of cell biology*, 171(1), pp. 47–59.
- Pechmann, M. *et al.* (2021) 'Striking parallels between dorsoventral patterning in *Drosophila* and *Gryllus* reveal a complex evolutionary history behind a model gene regulatory network', *eLife*. doi:10.7554/elife.68287.
- Peri, F., Technau, M. and Roth, S. (2002) 'Mechanisms of Gurken-dependent pipe regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*', *Development*, 129(12), pp. 2965–2975.

- Pers, D. *et al.* (2016) 'Global analysis of dorsoventral patterning in the wasp *Nasonia* reveals extensive incorporation of novelty in a regulatory network', *BMC biology*, 14, p. 63.
- Rafiqi, A.M., Rajakumar, A. and Abouheif, E. (2020) 'Origin and elaboration of a major evolutionary transition in individuality', *Nature*, 585(7824), pp. 239–244.
- Reeves, G.T. *et al.* (2012) 'Dorsal-ventral gene expression in the *Drosophila* embryo reflects the dynamics and precision of the dorsal nuclear gradient', *Developmental cell*, 22(3), pp. 544–557.
- Reuter, R. (1994) 'The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut', *Development*, 120(5), pp. 1123–1135.
- Ribeiro, L. *et al.* (2017) 'Evolution and multiple roles of the Pancrustacea specific transcription factor *zelda* in insects', *PLoS genetics*, 13(7), p. e1006868.
- Roth, S. (2004). *Gastrulation in other insects*. *Gastrulation*. C. Stern, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 105-121.
- Roth, S. and Lynch, J.A. (2009) 'Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), p. a001891.
- Sachs, L. *et al.* (2015) 'Dynamic BMP signaling polarized by Toll patterns the dorsoventral axis in a hemimetabolous insect', *eLife*, 4, p. e05502.
- Saito, K.C. *et al.* (2005) 'Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)', *Veterinary parasitology*, 129(3-4), pp. 299–311.
- Sample, C. and Shvartsman, S.Y. (2010) 'Multiscale modeling of diffusion in the early *Drosophila* embryo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), pp. 10092–10096.
- Sander, K. (1971) 'Pattern formation in longitudinal halves of leaf hopper eggs (Homoptera) and some remarks on the definition of "Embryonic regulation"', *Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen*, 167(4), pp. 336–352.
- Sander, K. (1976) 'Specification of the basic body pattern in insect embryogenesis', in *Advances in Insect Physiology*. Elsevier (Advances in insect physiology), pp. 125–238.
- Sandmann, T. *et al.* (2007) 'A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*', *Genes & development*, 21(4), pp. 436–449.
- Santos, I.K.F. de M. *et al.* (2004) 'Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, pp. 242–246.
- Santos, V.T. *et al.* (2013) 'The embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: The establishment of a new chelicerate model system', *genesis*, pp. 803–818. doi:10.1002/dvg.22717.

Schmidt-Ott, U. and Yoon, Y. (2022) 'Evolution and loss of β -catenin and TCF-dependent axis specification in insects', *Current opinion in insect science*, 50, p. 100877.

Schmitt-Engel, C. *et al.* (2015) 'The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology', *Nature communications*, 6, p. 7822.

Schoppmeier, M. and Schröder, R. (2005) 'Maternal torso signaling controls body axis elongation in a short germ insect', *Current biology: CB*, 15(23), pp. 2131–2136.

Schroder, R. *et al.* (2000) 'Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6591–6596.

Schröder, R. (2003) 'The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*', *Nature*, 422(6932), pp. 621–625.

Schulz, C. and Tautz, D. (1995) 'Zygotic caudal regulation by hunchback and its role in abdominal segment formation of the *Drosophila* embryo', *Development*, 121(4), pp. 1023–1028.

Semotok, J.L. and Lipshitz, H.D. (2007) 'Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early *Drosophila* development', *Differentiation; research in biological diversity*, 75(6), pp. 482–506.

Shravage, B.V. *et al.* (2007) 'The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila*', *Development*, 134(12), pp. 2261–2271.

Simpson-Brose, M., Treisman, J. and Desplan, C. (1994) 'Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*', *Cell*, 78(5), pp. 855–865.

Small, S., Blair, A. and Levine, M. (1992) 'Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo', *The EMBO journal*, 11(11), pp. 4047–4057.

Smits, C.M. and Shvartsman, S.Y. (2020) 'The design and logic of terminal patterning in *Drosophila*', *Current topics in developmental biology*, 137, pp. 193–217.

Stathopoulos, A. and Levine, M. (2005) 'Localized repressors delineate the neurogenic ectoderm in the early *Drosophila* embryo', *Developmental biology*, 280(2), pp. 482–493.

Stauber, M., Jäckle, H. and Schmidt-Ott, U. (1999) 'The anterior determinant bicoid of *Drosophila* is a derived Hox class 3 gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp. 3786–3789.

Stauber, M., Prell, A. and Schmidt-Ott, U. (2002) 'A single Hox3 gene with composite bicoid and *zerknüllt* expression characteristics in non-Cyclorhaphan flies', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), pp. 274–279.

- St Johnston, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) 'The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo', *Cell*, 68(2), pp. 201–219.
- Stollewerk, A., Schoppmeier, M. and Damen, W.G.M. (2003) 'Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation', *Nature*, 423(6942), pp. 863–865.
- Struhl, G., Struhl, K. and Macdonald, P.M. (1989) 'The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator', *Cell*, 57(7), pp. 1259–1273.
- Tadros, W., Timothy Westwood, J. and Lipshitz, H.D. (2007) 'The Mother-to-Child Transition', *Developmental Cell*, pp. 847–849. doi:10.1016/j.devcel.2007.05.009.
- Tobias-Santos, V. *et al.* (2021) 'Embryonic Development of the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*', *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*, pp. 101–121. doi:10.1007/978-3-030-64548-9_5.
- Twombly, V. *et al.* (1996) 'The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis', *Development*, 122(5), pp. 1555–1565.
- Urbansky, S. *et al.* (2016) 'Folded gastrulation and T48 drive the evolution of coordinated mesoderm internalization in flies', *eLife*, 5. doi:10.7554/eLife.18318.
- Vargas, H.C.M. *et al.* (2021) 'Increase in egg resistance to desiccation in springtails correlates with blastodermal cuticle formation: Eco-evolutionary implications for insect terrestrialization', *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 336(8), pp. 606–619.
- Walker, J.J. *et al.* (2000) 'The *Drosophila melanogaster* sex determination gene *sisA* is required in yolk nuclei for midgut formation', *Genetics*, 155(1), pp. 191–202.
- Wang, Z. and Lin, H. (2004) 'Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation', *Science*, 303(5666), pp. 2016–2019.
- Weisbrod, A., Cohen, M. and Chipman, A.D. (2013) 'Evolution of the insect terminal patterning system--insights from the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*', *Developmental biology*, 380(1), pp. 125–131.
- Whitaker, M. (2006) 'Calcium at Fertilization and in Early Development', *Physiological Reviews*, pp. 25–88. doi:10.1152/physrev.00023.2005.
- Wilcockson, S.G. and Ashe, H.L. (2019) 'Drosophila Ovarian Germline Stem Cell Cytocensor Projections Dynamically Receive and Attenuate BMP Signaling', *Developmental cell*, 50(3), pp. 296–312.e5.
- Wu, Y. *et al.* (2018) 'Pure early zygotic genes in the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*', *Parasites & vectors*, 11(Suppl 2), p. 652.
- Yoon, Y. *et al.* (2019) 'Embryo polarity in moth flies and mosquitoes relies on distinct old genes with localized transcript isoforms', *eLife*, 8. doi:10.7554/eLife.46711.

Zee, M. van der *et al.* (2005) 'Distinct Functions of the Tribolium zerknu"lt Genes in Serosa Specification and Dorsal Closure', *Current Biology*, pp. 624–636. doi:10.1016/j.cub.2005.02.057.

Zeitlinger, J. *et al.* (2007) 'Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the Drosophila embryo', *Genes & development*, 21(4), pp. 385–390.

Zimyanin, V.L. *et al.* (2008) 'In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization', *Cell*, 134(5), pp. 843–853.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 3

Vitelogeninas e vitelogênese: novos rumos na era pós-genômica

Carlos E. Winter¹
Hatisaburo Masuda²
Isabela Ramos²

¹Universidade de São Paulo, São Paulo.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Considerações iniciais

Em 1935, um jovem pesquisador polonês, Michael Laskowski, trabalhando no Departamento de Fisiologia Animal da Faculdade de Agricultura de Varsóvia, resolveu investigar o transporte de cálcio no sangue de galinhas poedeiras (Laskowski, 1974). Como resultado, descobriu uma proteína, que ele denominou de *sorovitelina*, pelas propriedades químicas semelhantes às proteínas da gema do ovo (Laskowski, 1935a e b). Independente de Laskowski, Roepke e Hughes (1935), trabalhando nos Estados Unidos, chegaram às mesmas conclusões, ao estudar fosfoproteínas do plasma de galinhas poedeiras. Em 1936, Laskowski mostrou que as fêmeas, em idade reprodutiva de diversos vertebrados ovíparos, possuíam proteínas com propriedades semelhantes à sorovitelina descrita em galinhas (Laskowski, 1936). Posteriormente, mostrou-se que uma proteína exclusiva de fêmeas, com propriedades semelhantes à sorovitelina de Laskowski, também existia em lepidópteros (Telfer, 1954). Em 1969, Pan e colaboradores propuseram o nome vitelogenina para essas proteínas exclusivas de fêmeas vitelogênicas de insetos. Mais tarde, o nome é estendido a todos os animais ovíparos, vertebrados e invertebrados (Wallace, 1985).

Desde esses primeiros trabalhos, a vitelogenina tem se tornado objeto de estudos em campos que vão dos mecanismos de controle hormonal de sua biossíntese à estrutura 3D da sua molécula, além de sua utilização como marcador de contaminação do ambiente com xenoestrógenos (Matozzo et al., 2008). Inicialmente, portanto, pretendemos examinar alguns aspectos relacionados a funções não-canônicas das vitelogeninas de insetos e nematoides para, em seguida, apresentar os progressos obtidos neste campo, utilizando abordagens pós-genômicas, especialmente em insetos.

Vitelogenina: as muitas funções de uma proteína de reserva, ou as funções clandestinas das vitelogeninas

Na versão anterior deste livro, publicada em 2012, tratamos em pormenores os aspectos relacionados à função canônica da vitelogenina como precursora das proteínas do vitelo do ovo de nematoides e insetos (Masuda et al., 2012).

Aqui, faremos uma breve análise dos outros papéis que a vitelogenina desempenha na fisiologia, bem como o desenvolvimento e o comportamento de invertebrados, tomando como exemplos alguns artrópodes e nematoides. Esses aspectos incluem um fenômeno, já observado em outras proteínas (Piatigorsky,

2007) e que foi denominado de *moonlighting* (Jeffery, 2017), termo que, em inglês, descreve pessoas que possuem um segundo emprego, além de sua atividade principal. Não há uma palavra em português que descreva esse tipo de atitude; portanto, resolvemos manter o termo em inglês, até que alguém sugira outro mais adequado.

A estrutura da vitelogenina

Com o advento do sequenciamento de genes eucarióticos e posteriormente de genomas inteiros, as estruturas primárias de centenas de vitelogeninas foram disponibilizadas nos bancos de dados. Isso permitiu a inferência de sua evolução e também de sua classificação como uma apolipoproteína da classe das LLTPs (*large lipid transfer proteins*) (Hayward et al., 2010). No entanto, somente a lipovitelina de lampreia pôde ser cristalizada (Thompson & Banaszak, 2002) e tem servido de molde para estudos de modelagem baseada em homologia das vitelogeninas de outros animais ovíparos (Leipart et al., 2022). Todos esses estudos permitiram mostrar que a estrutura primária das vitelogeninas é composta de dois domínios principais: um domínio presente em todas as LLTPs na região N-terminal (LPD-N) e um domínio rico em cisteínas característico do fator de von Willebrand na região C-terminal (vWD) (Hayward et al., 2010). Além disso, possuem um domínio com funções desconhecidas (DUF = *domain of unidentified function*) (DUF1943) presente em todas as vitelogeninas analisadas (Hayward et al., 2010). A expressão desses domínios em sistemas heterólogos e em estudos funcionais esclareceram as funções de alguns deles, como descrito a seguir.

As vitelogeninas, além de transportarem lipídeos, possuem açúcares ligados covalentemente a sua estrutura, bem como fosfato e cálcio. Além disso, as vitelogeninas de vertebrados e, provavelmente, as de invertebrados, possuem dois átomos de zinco associados a elas (Montorzi et al., 1995). Outros grupos prostéticos também já foram encontrados associados às vitelogeninas. A vitelogenina dos fugus, baiacus que habitam águas salobras ou doces do noroeste do Pacífico possuem tetrodotoxina¹ ligada ao domínio vWD (Yin et al., 2017; Qian et al., 2021). A expressão recombinante dos domínios DUF1942 e vWD de crustáceos mostrou que ambos são capazes de se ligar a LTA (ácido lipoteicoico) e LPS (lipopolissacarídeo), sugerindo que, *in vivo*, a vitelogenina desses artrópodes interaja com bactérias gram-positivas e gram-negativas (Sun

¹ A tetrodotoxina (TTX) é uma potente toxina bloqueadora de canais de sódio, produzida por bactérias simbióticas dos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio* e outros (Chau et al., 2011).

et al., 2021). No entanto, somente a r-vWD é capaz de inibir o crescimento de bactérias *in vitro* (Sun et al., 2021). No hemíptero *Laodelphax striatellus*, a transmissão vertical de *Wolbachia* está associada com a vitelogenina do hospedeiro (Guo et al., 2018). Podemos especular que a interação da vitelogenina de *L. striatellus* com *Wolbachia* ocorre através de VWD ou de DUF1942.

Os genes da vitelogenina

Todos os animais ovíparos analisados até o momento apresentam mais de uma cópia dos genes de vitelogenina. A única exceção são os mamíferos monotremados, como *Platypus* sp. e equídnas, que possuem somente um gene funcional de vitelogenina (Zhou et al., 2021). Todos esses genes estão sob controle de promotores que são, geralmente, transcritos em órgãos não ovarianos (tubo digestório de nematoides e corpo gorduroso de insetos) somente em fêmeas com ovócitos em maturação. No entanto, há exceções em que genes de vitelogenina são expressos fora desses períodos e em órgãos não usuais (Kitano et al., 2017; Zhang et al., 2022).

No inseto hematófago *Rhodius prolixus*, um dos vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, a detecção dos transcritos dos dois genes de vitelogeninas foi, recentemente, observada por PCR quantitativo no corpo gorduroso, intestino e ovários e, também, em machos (Isabela Ramos, comunicação pessoal). Esses dados ajudam a compreender melhor as observações anteriores, que já mostravam a presença de diferentes populações de vitelogeninas (purificadas por cromatografia de troca iônica) de amostras derivadas da hemolinfa e de ovócitos desses insetos (Salerno et al., 2002). Isso sugere que esses genes estavam sendo transcritos e traduzidos e as diferentes vitelogeninas estavam sendo secretadas para a hemolinfa e captadas pelos ovócitos vitelogênicos. Os genes de vitelogeninas de insetos possuem de 12 a 20 Kbp, e são transcritos em RNAs, que variam de 5 a 7 Kb. Os transcritos de vitelogeninas codificam polipeptídeos em torno de 200 kDa, que sofrem proteólise limitada, dando origem às subunidades maduras (Chen et al., 1976; Raikhel, 1987 e Valle et al., 1993).

Além dessas vitelogeninas extra ovarianas, a biossíntese de vitelogenina pelo epitélio folicular maduro de *R. prolixus* sugere que essa molécula é a última a ser depositada no interior do ovócito, marcando o final da vitelogênese e o início da coriogênese (Melo et al., 2000). Em relação aos machos, a presença de vitelogeninas na hemolinfa de *R. prolixus* (Coles, 1965 e Chalaye & Lauverjat, 1985) já havia sido reportada, mas não compreendida, pois, à época, as

vitelogeninas eram consideradas proteínas específicas de fêmeas, e suas funções, nos machos, continuam desconhecidas, até os dias de hoje. As novas tecnologias “ômicas”, tais como a genômica, proteômica, metabolômica, entre outras estão nos ajudando a reconhecer e compreender, paulatinamente, outras funções associadas a este grupo de moléculas.

Funções não canônicas da vitelogenina

A vitelogenina e a resposta imune em insetos

Both reproduction and immune responses are energetically costly, and the trade-off between them is likely due to alternative allocation of limiting energetic resources (Schwenke et al., 2016).

Inicialmente a vitelogenina foi considerada uma proteína exclusiva de fêmeas (ver discussão anterior). No entanto, a sua biossíntese em menor quantidade também ocorre em machos e em animais sexualmente imaturos (Engelmann, 1979; Piulacks et al., 2003). Isso sugere que a vitelogenina pode ter outras funções, além do seu papel na reprodução.

A discussão mencionada sobre a ligação de domínios específicos das vitelogeninas a moléculas existentes em patógenos unicelulares mostra claramente que ela pode estar envolvida na resposta imune como um sensor (ou PRR, *pattern recognition receptor*) capaz de reconhecer padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) (Zhang et al., 2015). Em peixes, a vitelogenina e as vitelinas possuem atividades relevantes do ponto de vista imune e como antioxidantes (Sun & Zhang, 2015).

No mosquito *Anopheles gambiae*, a vitelogenina e a lipoforina interferem na resposta imune frente à infecção por *Plasmodium berghei*. A presença de vitelogenina e/ou lipoforina na hemolinfa de *An. gambiae* reduz a atividade do fator antiparasitário TEP1 (*thioester-conjugating protein 1*) sobre os oocinetos de *P. berghei* (Rono et al., 2010).

Em *Apis mellifera*, a vitelogenina é responsável pelo reconhecimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, no processo de interação com lipopolissacarídeos e peptidoglicanos. Ao transportar porções da parede celular de bactérias para o interior de ovócitos, a vitelogenina age na imunoprevenção (*immune-priming*) da próxima geração (Salmela et al., 2015).

A vitelogenina e o envelhecimento dos nematoides

Nos nematoides, a vitelogênese tem sido mais estudada em *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae* (ver Masuda et al., 2012). Por sua vez, o envelhecimento de *C. elegans* tem sido extensivamente analisado do ponto de vista molecular. Nos nematoides, o envelhecimento é desencadeado pela via de sinalização homóloga à insulina (IIS), que é a mesma via que ativa a produção de vitelogenina (Perez & Lehner, 2019). Quando essa via é comprometida por mutação em algum de seus membros, a síntese de vitelogenina é diminuída ou não existe, e os indivíduos afetados têm a longevidade aumentada.

Um dos primeiros resultados que sugeriam o envolvimento das vitelogeninas de *C. elegans* com o envelhecimento foi publicado em 1999, por Nakamura e colaboradores. Esses pesquisadores mostraram que um dos polipeptídeos que compõem a vitelogenina (YP110) é a principal proteína carbonilada em vermes velhos. Essa observação sugeriu que a YP110 serve como um marcador do envelhecimento em nematoides e pode estar diretamente envolvida no processo, como acontece com as vitelogeninas de abelhas, que reduzem o estresse oxidativo (Seehus et al., 2006). Uma das patologias viscerais que marcam o período pós-reprodutivo e o envelhecimento de *C. elegans* envolve a síntese continuada de vitelogeninas, que se acumulam extracelularmente em agrupamentos lipoproteicos pseudocelômicos (*Pseudocoelomic Lipoprotein Pools*, PLP), uma forma de esteatose do envelhecimento (Benedetto et al., 2019). Para isso, o verme desencadeia um processo de autofagia dos enterócitos e os lipídeos resultantes são utilizados, entre outras coisas, para produção da vitelogenina (Benedetto et al., 2019). Aparentemente essa não se trata de uma produção fútil de lipoproteínas com alto teor energético.

Recentemente, esse mesmo grupo mostrou que a vitelogenina exportada para o pseudoceloma como PLP acaba sendo eliminada, através da vulva, e é utilizada para alimentar as larvas, como se fosse uma lactação primitiva (Kern et al., 2021). Fenômeno semelhante acontece nos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (ver Almenara et al., 2012), em que o intestino das fêmeas é consumido pelos juvenis de primeiro estágio, num fenômeno conhecido como endotoquia matricida (Luc et al., 1979). Esse fenômeno também possibilita a transmissão das bactérias simbiotes desses nematoides de uma geração para a seguinte (Ciche et al., 2008).

A vitelogenina nos insetos sociais

Em insetos, a sobrevivência também depende de IIS e está conectada à produção de vitelogenina, havendo um balanço que equilibra a reprodução bem como o seu envelhecimento e morte (Rodrigues & Flatt, 2016). A questão que permanece é: como as fêmeas reprodutoras de insetos sociais podem viver tanto tempo e mesmo assim produzir tantos descendentes? A hipótese proposta é de que esses insetos eussociais evoluíram um sistema que desacopla o controle de ambos os fenômenos (sobrevivência e reprodução) (Rodrigues & Flatt, 2016).

Os principais estudos sobre o papel das vitelogeninas, em insetos eussociais, foram realizados em membros da ordem Hymenoptera e, mais recentemente, em espécies sociais dos Blattodea. Em *A. mellifera* foram encontrados quatro genes homólogos aos genes de vitelogenina de outros insetos. Um deles é ortólogo às vitelogeninas de outros insetos e foi denominado de *vg*. Os outros são *vg-like-A*, *vg-like-B* e *vg-like-C* (Richards, 2019). Os genes *vg*, *vg-like-A* e *vg-like-B* são encontrados em todos os insetos, enquanto *vg-like-C* é encontrado somente nos himenópteros (Richards, 2019). Utilizando RNA de interferência (RNAi), foi possível mostrar que a presença de vitelogenina estimula o comportamento de forrageamento das operárias de *A. mellifera* e influencia sua longevidade (Nelson et al., 2007). Recentemente, transcritos de *vg* foram detectados em células da glia do cérebro de rainhas de *A. mellifera*. Quando submetidas a tratamento com RNAi para *vg*, as larvas de não se desenvolvem em rainhas, sugerindo que esse gene esteja envolvido na regulação da diferenciação dessa casta (Zhang et al., 2022).

Na formiga *Temnothorax longispinosus*, a expressão do gene *vg-like-A* está fortemente associada a mudanças comportamentais dos indivíduos dentro da colônia (Kohlmeier et al., 2018). O *knockdown* deste gene por RNAi desencadeia uma redução dos cuidados com a sua prole e um aumento nos cuidados com as companheiras, quando são operárias jovens. Esse tipo de comportamento só é exibido por operárias mais velhas, sugerindo que a mudança observada está associada com os níveis de expressão de *Vg-like-A* (Kohlmeier et al., 2018).

Recentemente, um estudo com as vitelogeninas de térmitas mostrou que dos quatro genes de vitelogenina presentes no genoma, somente um (*Termite-vg-4*, homólogo a *vg-like-B* de himenópteros) é altamente expresso em operárias e fêmeas não reprodutoras (ninfas e adultos alados), sugerindo sua participação na vida social desses insetos (Yaguchi et al., 2022).

Estudos recentes (Yan et al., 2022) da via IIS da formiga *Harpegnathos saltator* mostraram que, mesmo com o aumento do potencial reprodutivo das rainhas, essas eram mais longevas que as operárias não reprodutivas. Isso se deve à ativação no corpo gorduroso dessas formigas do ramo que leva à fosforilação de MAPK na via IIS, sem ativar a fosforilação de AKT. Esse cenário produz a ativação dos genes de vitelogenina e a inibição do gene *Hpd-1* (que codifica a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, envolvida na via de degradação da tirosina) e está envolvido no aumento de longevidade em *Drosophila* (Parkhitko et al. 2020). O cenário é mais complexo do que parece e ainda não se sabe por que a fosforilação de AKT é reduzida nas rainhas, mas não a de MAPK.

Vitelogênese em foco sob o olhar de uma nova era

Como já discutido anteriormente, as funções canônicas da vitelogenina, como precursora das proteínas do vitelo do ovo de nematoides e insetos (Masuda et al., 2012), envolvem atividades bastante complexas, que incluem diversos órgãos e tecidos, cujas funções precisam estar finamente coordenadas, para que todo o processo seja minimamente eficiente. No caso de insetos vetores, em particular em *Rhodnius prolixus*, a vitelogênese é desencadeada pela obtenção de sangue de um hospedeiro vertebrado (ou ingestão e digestão de solução de proteínas), seguida da absorção de peptídeos na presença de Hormônio Juvenil (HJ) (Garcia e Azambuja, 1985). Sob o controle hormonal, ocorrem mudanças teciduais e celulares mediadas por complexos sistemas de comunicação inter e intracelulares. É nesse quadro de transformações complexas que os diferentes parasitas, quando presentes no sangue ingerido, se instalam nestes insetos e, de alguma forma, conseguem contornar as reações de defesa disparadas por eles. Portanto, conhecer detalhes deste mundo em transformação pode se tornar uma arma eficaz para o combate às inúmeras doenças mediadas por vetores. Se, de um lado, os insetos procuram se multiplicar, os parasitas fazem o mesmo. Compreender os detalhes desta interação pode se tornar útil para a elaboração de estratégias de controle de doenças mediadas por vetores.

A biologia molecular da vitelogênese como base de conhecimento para a compreensão dos processos que regem a reprodução dos insetos

A interferência em populações naturais de insetos vetores continua sendo uma das principais estratégias para o controle de doenças transmitidas por

artrópodes. Nos últimos 50 anos, as políticas de controle de vetores se basearam na utilização de ferramentas à base de inseticidas. Porém, a seleção de populações resistentes a inseticidas representa uma grande ameaça ao sucesso contínuo dos atuais programas de controle de pragas e vetores (Wilson et al., 2020).

Embora os insetos sejam o maior e mais diversificado grupo de animais do planeta, a maioria das espécies possui alta capacidade reprodutiva. As fêmeas geralmente podem produzir um grande número de ovos, em um curto período, e as altas taxas de viabilidade embrionária aumentam suas populações naturais. A alimentação sanguínea (hematofagia) é necessária para a maioria dos vetores de doenças humanas, para obter a energia e os nutrientes necessários para uma ovogênese eficiente, permitindo as altas taxas de oviposição mencionadas (Attardo et al., 2005a). Dentro de um ciclo reprodutivo, o processo geral de conversão de proteínas do repasto sanguíneo em precursores de proteínas do vitelo, como as vitelogeninas, assim como a coordenação da sua entrega aos ovócitos em desenvolvimento, é uma etapa bastante complexa da reprodução e requer a coordenação de intrincadas vias metabólicas e neuroendócrinas na fêmea adulta. Como resultado, uma compreensão abrangente da complexidade da produção de ovos pode ser considerada um conhecimento *sine qua non* para projetar futuras ferramentas seguras na interferência da reprodução de insetos vetores.

A fisiologia molecular da ovogênese é altamente conservada dentro dos diferentes insetos vetores (Attardo et al., 2005b; Shaw et al., 2015; Lange et al., 2022). Em resumo, a ovogênese é desencadeada por sinais do estado nutricional e do repasto sanguíneo. Os níveis do HJ (Rivera-Pérez et al., 2020) secretado pela *corpora allata* no cérebro, aumentam ao longo dos períodos iniciais de maturidade do inseto, desencadeando alterações no corpo gorduroso, que se tornam sensíveis ao ovário, produzindo o hormônio esteroide ecdisona (Zou et al., 2013). Após o repasto sanguíneo, o cérebro interrompe a síntese de HJ e libera o hormônio ecdisiotrópico ovariano, sinalizando para os ovários que devem produzir ecdisona. No corpo gorduroso, a ecdisona é hidroxilada a 20-hidroxiecdisona (20E) e se liga ao receptor 20E EcR/USP para desencadear a vitelogênese, ou seja, a produção dos precursores das proteínas de vitelo, tendo como principal membro em insetos a vitelogenina. As vitelogeninas são, então, secretadas para a hemolinfa e entregues aos ovócitos, em desenvolvimento nos ovários, via endocitose mediada por receptores. Assim, além do enorme desafio metabólico de transformar o repasto sanguíneo em um grande número de ovos, a capacidade máxima de produção de ovos também depende do sucesso do

acasalamento, fertilização e condições adequadas para o desenvolvimento embrionário (Davey, 1967, 1987a, 1987b; Davey et al., 1986; Klowden & Chambers, 1991; Klowden, 1993; Borovsky et al., 1994; Clifton et al., 2014; Shaw et al., 2015).

Nos últimos 10 anos, diversos projetos genômicos e transcritômicos foram completados, gerando uma enorme quantidade de informação molecular sobre diferentes espécies, em variadas condições. Apenas sobre o inseto *R. prolixus*, por exemplo, o projeto genoma (Mesquita et al., 2015; Marchant et al., 2016) e cinco transcritomas de diferentes tecidos (Medeiros et al., 2011, Ribeiro et al., 2014, Leyria et al., 2020a, 2020b, Coelho et al., 2021, Pascual et al., 2022) foram publicados e disponibilizados para a comunidade científica (via plataforma VectorBase - <https://vectorbase.org/vectorbase/app/>).

Nas próximas seções, descreveremos alguns resultados recentes decorrentes de estudos moleculares pós-genômicos sobre biologia reprodutiva de insetos vetores e discutiremos seu potencial para a elaboração de novas intervenções eficazes para seu controle.

Novos achados sobre os mecanismos moleculares da vitelogênese e ovogênese em insetos vetores

Em insetos vetores, a conversão das proteínas da alimentação com sangue em proteínas precursoras de vitelo para a biogênese dos ovos é um componente vital do ciclo reprodutivo. Logo, entender como esse processo é regulado é necessário para projetar maneiras seguras, específicas e eficazes de bloquear a reprodução em vetores. A 20E de mosquito tem sido bastante estudada e desempenha vários papéis nos mosquitos *Anopheles*. Além de regular a monogamia, a 20E transferida pelos machos mostrou-se importante na manutenção da viabilidade do esperma ao longo da vida feminina, através da indução da proteína heme peroxidase 15 (HPX15) (Shaw et al., 2014). Como consequência desse mecanismo, o *knockdown* de HPX15 resultou em um aumento da proporção de ovos inférteis, devido à inviabilidade dos espermatozoides. Além disso, após a inseminação, a 20E transferida dos machos resulta no aumento da expressão do gene Estimulador de Ovogênese Induzido por Acasalamento (MISO) feminino e induz um aumento na fecundidade, aumentando a expressão de lipoforina e o número de ovócitos (Baldini et al., 2013; Gabrieli et al., 2014b).

Vários genes que são, de alguma forma, essenciais para a ovogênese e geram embriões inviáveis foram identificados e testados funcionalmente em *R.*

prolixus. O ortólogo de Bicaudal C (BicC), um gene originalmente identificado em *D. melanogaster*, envolvido na padronização embrionária, mostrou-se expresso maternalmente e essencial para o arranjo das células foliculares, ao longo da ovogênese e para a viabilidade dos ovócitos (Pascual et al., 2021). O controle da homeostase do ferro e do heme é, particularmente, crítico para insetos hematófagos, especialmente para os triatomíneos estritamente hematófagos, como *R. prolixus*. Neste modelo, o silenciamento de vários genes relacionados ao ferro, a saber, ferritina, proteína responsiva ao ferro 1 (IRP1), heme oxigenase (HO) e o receptor C do vírus da leucemia felina (FLVCR) exportador de heme prejudica a ovogênese e a viabilidade embrionária (Walter- Nuno et al., 2013, 2018).

O papel da endocitose, mediada por receptor na captação de proteínas do vitelo, tem sido investigado em ovócitos de muitas espécies de insetos. A sua internalização, através da presença de um córtex endocítico especializado nos ovócitos, que inclui microvilosidades proeminentes, depressões revestidas, vesículas revestidas e endossomos, foi demonstrada em várias espécies, incluindo *Ae. aegypti* e *R. prolixus* (Postlethwait e Giorgi, 1985; Ferenz, 1990; Raikhel et al., 1990; Raikhel & Dhadialla, 1992; Anderson & Woodruff, 2001; Richard et al., 2001; Brooks & Woodruff, 2004; Roy et al., 2018, Vieira et al., 2018). Porém, as regulações que direcionam as vias endocíticas em locais específicos do córtex do ovócito e os sinais que governam a maturação endossômica sempre foram pouco explorados. Em *R. prolixus*, os complexos ATG6/Beclin1 classe-III PI3K I e II mostraram-se essenciais para a captação de proteínas precursoras de vitelo. Insetos silenciados para os genes presentes em ambos os complexos produzem ovos deficientes em vitelo, originando embriões inviáveis, devido à falta de fosfatidilinositol-3P (PI₃P) gerado para recrutar a maquinaria endocítica em ovócitos vitelogênicos (Vieira et al., 2018, 2021).

Coriogênese como alvo emergente para intervenções seguras

O *checkpoint* final da ovogênese, antes da fertilização, é o desencadeamento do programa de coriogênese, no qual as múltiplas camadas do córion são secretadas pelas células foliculares, que envolvem os ovócitos em desenvolvimento. Notavelmente, enquanto a função protetora primária do córion é conservada em todos os insetos, sua composição geral e estrutura evoluíram de maneira altamente específica para cada espécie, dando origem a uma ampla gama de morfologias e adaptações funcionais. As principais proteínas do córion em insetos foram identificadas em modelos, como a mariposa da seda *Bombyx*

mori, *D. melanogaster* e *Ae. aegypti*, e revelaram-se amplamente não relacionadas com suas contrapartes em cada uma dessas espécies (Marinotti et al., 2014; Papantonis et al., 2015). As proteínas que são conservadas em uma ampla variedade de organismos não são moléculas-alvo ideais como agentes de controle de vetores, devido aos efeitos deletérios em organismos não-alvo, como vertebrados, insetos agrícolas polinizadores e predadores benéficos. Como resultado, estudos sobre a biologia molecular da biogênese do córion em insetos vetores são biotecnologicamente estratégicos, pois podem desvendar alvos moleculares específicos para cada espécie.

A casca do ovo de *Ae. aegypti* é composta por diferentes proteínas estruturais, enzimas, proteínas de ligação a odorantes, bem como muitas proteínas não caracterizadas e, portanto, com função desconhecida. Além disso, proteínas de melanização e enzimas da casca do ovo também foram identificadas (Ferdig et al., 1996; Han et al., 2000; Johnson et al., 2001; Fang et al., 2002; Kim et al., 2005; Li & Li, 2005, 2006), e estudos de proteômica foram realizados (Marinotti et al., 2014). Isoe e colegas (Isoe et al., 2019) projetaram análises *in silico* para identificar genes específicos de mosquitos, que são essenciais para o desenvolvimento embrionário bem-sucedido. Após a triagem funcional sistemática por RNAi de mais de 40 genes selecionados, os autores identificaram uma proteína relacionada ao córion denominada fator de organização da casca de ovo 1 (EOF1), que é essencial para a biogênese da casca do ovo e para o desenvolvimento embrionário. A sequência da EOF1 inclui um motivo funcional F-box, que é caracterizado pela interação com a proteína SKP1 no complexo SCF E3 ubiquitina ligase (Wang et al., 2014). Embora sua função exata, na casca do ovo, não tenha sido elucidada, tais achados são muito promissores em termos de elaboração de estratégias seguras para o controle de vetores.

Em *R. prolixus*, alguns aspectos das propriedades de ultraestrutura e permeabilidade do córion foram previamente explorados (Beament, 1946; Dias et al., 2013; Bomfim et al., 2017). Além disso, a identificação das proteínas específicas do córion Rp30 e Rp45, essa última associada à atividade antifúngica, também foi descrita (Bouts et al., 2007). Nesse modelo, foi explorada a biologia celular das células foliculares (CFs) e o tecido que produz os componentes do córion. A análise inicial do transcriptoma mostrou que as CFs estão comprometidas com a transcrição, tradução e tráfego vesicular (Medeiros et al., 2011a). Já uma análise por microscopia eletrônica evidenciou que as CFs possuem morfologia típica de células secretoras, com alto teor de retículo endoplasmático rugoso vesiculado (Bomfim e Ramos, 2020; Rios et al., 2021). Fenótipos particulares de malformações do córion foram observados em

experimentos sistêmicos de RNAi de genes relacionados à autofagia ULK1/ATG1 da enzima conjugadora de E2 dedicada à autofagia ATG3 (Bomfim e Ramos, 2020; Santos e Ramos, 2021) e das enzimas de ubiquitina ativadoras de E1 e conjugadoras de E2 (Pereira et al., 2022). Esses efeitos ocorrem devido a alterações na homeostase geral das proteínas das CFs, durante a coriogênese e resultam em taxas extremamente baixas de viabilidade embrionária. Em conjunto, os dados apontam para um alto grau de complexidade no programa de biogênese do córion, em *R. prolixus*, tornando o processo extremamente sensível a alterações na proteostase das CFs e, portanto, um alvo interessante para intervenções leves, mas eficazes.

A resistência à dessecação é outro alvo potencial de intervenção. Embora os ovos dos mosquitos sejam colocados na água, eles são suscetíveis à desidratação nas primeiras horas de desenvolvimento. Assim, essa propriedade afeta diretamente sua reprodução. Em *Ae. aegypti*, a secreção da cutícula serosa (uma camada interna do córion secretada durante a embriogênese) coincide com o aumento da resistência à dessecação, além do da presença de quitina, como um dos componentes da cutícula serosa (Moreira et al., 2007; Rezende et al., 2008; Farnesi et al., 2015). Em *R. prolixus*, a quitina foi detectada nos ovários e na cutícula embrionária (Mansur et al., 2010; Souza-Ferreira et al., 2014). Além disso, a exposição ao lufenuron (um inibidor da síntese de quitina) e experimentos de RNAi da quitina sintase reduziram a oviposição e a viabilidade do embrião (Mansur et al., 2014). Portanto, a síntese e a deposição de quitina ou componentes semelhantes à quitina nas cascas dos ovos também são alvos promissores para intervenções reprodutivas.

Em conjunto e combinado com o alto grau de especificidade de espécie das proteínas do córion mencionadas, a coriogênese tem o potencial de emergir como o principal alvo para a geração de novas estratégias ambientalmente seguras para alcançar o controle de vetores.

Controle neuroendócrino molecular da vitelogênese e produção de ovos

Grandes avanços foram alcançados na compreensão do controle neuro-hormonal da produção de ovos. Historicamente, *R. prolixus* tem sido um modelo importante, em que os fundamentos da fisiologia dos insetos foram determinados (Buxton, 1930; Wigglesworth, 1934, 1951; Wigglesworth, 1979). Um modelo detalhado que descreve o controle da ovogênese, ovulação e oviposição nessa espécie foi projetado e, elegantemente, revisado por Lange e colegas (Lange et

al., 2022). A pós-genômica permitiu a identificação e a caracterização funcional de dezenas de famílias de receptores de neuropeptídeos relacionados à reprodução, enzimas de processamento e neuroquímicos. A integração das descobertas pós-genômicas com os primeiros experimentos de fisiologia inteligentemente projetados permitiu a elucidação e a descrição de muitos aspectos da integração endócrina global neste vetor.

Crosstalk entre a reprodução e imunidade

A relação entre o potencial reprodutivo e o estado imunológico de insetos tem sido descrita em insetos, nos últimos 20 anos. Coletivamente, esses estudos sugerem uma troca entre ativação imune e produção de ovos, refletida pela identificação de atresia folicular e de outras vias de morte celular durante a ovogênese (Ahmed & Hurd, 2006; Medeiros et al., 2011b). Avanços recentes estão, agora, destacando o papel das vias de detecção de nutrientes e do imunometabolismo de vetores (Samaddar et al., 2020). Além disso, estudos futuros fornecerão mais informações sobre o modo como as vias de sinalização, entre elas as vias TOR e da insulina, e reguladores vitelogênicos e imunológicos bem conhecidos coordenam o equilíbrio energético durante a infecção. Curiosamente, trabalhos anteriores, usando combinações naturais de vetor-parasita sugeriram que a coevolução pode ter minimizado o impacto da infecção, podendo induzir uma resposta imune menos dispendiosa e com menor gasto energético (Mitchell & Catteruccia, 2017), resultando na ausência ou em um baixo custo ao fitness reprodutivo.

Sabe-se, também, que o reencaminhamento dos componentes de vitelo pode ser usado como fator nutricional para o desenvolvimento do parasita. Por exemplo, foi demonstrado que a lipoforina de mosquitos é incorporada ao oocisto de *Plasmodium*, como fonte de lipídios durante a infecção (Atella et al., 2009). Embora o desenvolvimento do parasita tenha sido acelerado pela entrega de lipoforina, essa manipulação não induziu nenhum custo reprodutivo detectável ao vetor (Werling et al., 2019). Curiosamente, os lipídios do mosquito influenciaram o número total de parasitas e também a virulência dos esporozoítos de *Plasmodium* na transmissão para hospedeiros vertebrados (Costa et al., 2018). Da mesma forma, a vitelogenina também é um componente chave para a sobrevivência do *Plasmodium*, de modo que uma interação entre proteínas precursoras de vitelo e a resposta imune foi demonstrada. Demonstrou-se, ainda, que a presença de lipoforina e vitelogenina reduz a eficiência da ligação da TEP1, envolvida na resposta de defesa e que leva à morte do parasita (Rono et al., 2010), aumentando, assim, sua sobrevivência, após a infecção do mosquito.

Considerações finais

Nesse capítulo, foram abordados alguns achados recentes, provenientes da chamada era pós genômica, referentes a aspectos moleculares que envolvem os mecanismos funcionais de produção dos ovos. Com essa abordagem, almejou-se complementar as informações previamente informadas na primeira edição deste livro (Masuda et al., 2012). A recente conclusão de projetos de sequenciamento de genoma e transcriptomas aliada à viabilidade de estudos funcionais, especialmente via RNAi e CRISPR-Cas9, têm permitido estudos moleculares e mecanísticos comparativos, que não apenas aumentam nosso conhecimento sobre processos reprodutivos, mas também facilitam a identificação das peculiaridades entre as diferentes espécies e a interação com parasitas.

Muitos grupos e projetos têm procurado integrar os achados pós-genômicos com os conhecimentos adquiridos pela abordagem da fisiologia, obtidos em diferentes modelos de estudo. Essas estratégias configuram caminhos seguros para desvendar informações baseadas em evidências e gerar novos conhecimentos que permitam interferir na reprodução de diferentes insetos ou nas suas relações com diferentes parasitas, permitindo, desta forma, o controle de doenças que afetam tanto populações humanas como veterinárias.

Referências

- Ahmed, A. M. and Hurd, H. (2006). Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. 8, 308–315.
- Almenara, D.P., Rossi, C., Neves, M.R.C, Winter CE (2012) Nematoides Entomopatogênicos. in: Tópicos avançados em entomologia molecular - edits. Termignoni C, Winter CE, Silva-Neto, MAC - INCT Entomologia Molecular - pp. 1-40 - <https://bit.ly/3vXh67v>.
- Anderson, K. L. and Woodruff, R. I. (2001). A gap junctionally transmitted epithelial cell signal regulates endocytic yolk uptake in *Oncopeltus fasciatus*. Dev. Biol. 239, 68–78.
- Atella, G. C., Bittencourt-Cunha, P. R., Nunes, R. D., Shahabuddin, M. and Silva-Neto, M. A. C. (2009). The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite. Acta Trop. 109, 159–162.
- Attardo, G. M., Hansen, I. A. and Raikhel, A. S. (2005a). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 661–675.
- Attardo, G. M., Hansen, I. A. and Raikhel, A. S. (2005b). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 661–675.
- Baldini, F., Gabrieli, P., South, A., Valim, C., Mancini, F. and Catteruccia, F. (2013). The Interaction between a Sexually Transferred Steroid Hormone and a Female Protein Regulates Oogenesis in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. PLOS Biol. 11, e1001695–e1001695.
- Beament, J. W. L. (1946). The waterproofing process in eggs of *Rhodnius prolixus* Ståhl. Proc. R. Soc. London. Ser. B-Biological Sci. 133, 407–418.
- Benedetto A., Gems D. (2019) Autophagy promotes visceral aging in wild-type *C. elegans*. Autophagy15:4, 731-732, DOI:10.1080/15548627.2019.1569919.
- Bomfim, L. and Ramos, I. (2020). Deficiency of ULK1/ATG1 in the follicle cells disturbs ER homeostasis and causes defective chorion deposition in the vector *Rhodnius prolixus*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 34, 13561–13572.
- Bomfim, L., Vieira, P., Fonseca, A. and Ramos, I. (2017). Eggshell ultrastructure and delivery of pharmacological inhibitors to the early embryo of *R. prolixus* by ethanol permeabilization of the extraembryonic layers. PLoS One 1–14.
- Borovsky, D., Carlson, D. A., Hancock, R. G., Rembold, H. and Van Handel, E. (1994). De novo biosynthesis of juvenile hormone III and I by the accessory glands of the male mosquito. Insect Biochem. Mol. Biol. 24, 437–444.

Bouts, D. M. D., Melo, A. C. do A., Andrade, A. L. H., Silva-Neto, M. A. C., Paiva-Silva, G. de O., Sorgine, M. H. F., da Cunha Gomes, L. S., Coelho, H. S., Furtado, A. P., Aguiar, E. C. M., et al. (2007). Biochemical properties of the major proteins from *Rhodnius prolixus* eggshell. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1207–1221.

Brooks, R. A. and Woodruff, R. I. (2004). Calmodulin transmitted through gap junctions stimulates endocytic incorporation of yolk precursors in insect oocytes. *Dev Biol* 271, 339–349.

Buxton, P. A. (1930). The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Entomol. Soc. London* 78.

Chalaye D, Lauverjat S (1985). Stimulation de la synthèse de vitellogénine chez le mâle de *Rhodnius prolixus* (Stål) par un mimétique de l'hormone juvénile. *Can. J. Zool.* 63, 790-798.

Chau R, Kalaitzis JA, Neilan BA (2011). On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic Toxicology* 104, 61–72.

Chen, T.T; Couble, P; de Lucca, F.L; & Wyatt, G.R., 1976. Juvenile Hormone control of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria*. In *The Juvenile Hormones* (ed. By Gillbert, L.I) p. 505-529 Plenum Press, New York.

Ciche, T.A.; Kim, K.S.; Kaufmann-Daszczuk, B.; Nguyen, K.C.Q.; Hall, D.H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photobacterium luminescens* transmission by *Heterorhabdus bacteriophora* nematodes. *Applied Environmental Microbiology*. 74, 2275-2287.

Clifton, M. E., Correa, S., Rivera-Perez, C., Nouzova, M. and Noriega, F. G. (2014). Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 64, 40–47.

Coelho, V. L., de Brito, T. F., de Abreu Brito, I. A., Cardoso, M. A., Berni, M. A., Araujo, H. M. M., Sammeth, M. and Pane, A. (2021). Analysis of ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Sci. Rep.* 11, 1918.

Coles, G.C., (1965) Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stål. *J. Exp. Biol.* 43: 425-431.

Costa, G., Gildenhard, M., Eldering, M., Lindquist, R. L., Hauser, A. E., Sauerwein, R., Goosmann, C., Brinkmann, V., Carrillo-Bustamante, P. and Levashina, E. A. (2018). Non-competitive resource exploitation within mosquito shapes within-host malaria infectivity and virulence. *Nat. Commun.* 2018 91 9, 1–11.

Davey, K. G. (1967). Some consequences of copulation in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 13, 1629–1636.

Davey, K. G. (1987a). Effect of the brain and corpus cardiacum on egg production in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4, 243–249.

- Davey, K. G. (1987b). Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82, 103–108.
- Davey, K. G., Maimets, I.-K. and Ruegg, R. P. (1986). The relationship between crop size and egg production in *Rhodnius prolixus*. Can. J. Zool. 64, 2654–2657.
- Dias, F. A., Gandara, A. C. arolin. P., Queiroz-Barros, F. G., Oliveira, R. L. L., Sorgine, M. H. F., Braz, G. R. C. and Oliveira, P. L. (2013). Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. J. Biol. Chem. 288, 35058–35067.
- Engelmann F. (1979) Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and the role in vitellogenesis. Adv. Insect Physiol. 14, 49–108.
- Fang, J., Han, Q., Johnson, J. K., Christensen, B. M. and Li, J. (2002). Functional expression and characterization of *Aedes aegypti* dopachrome conversion enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 287–293.
- Farnesi, L. C., Menna-Barreto, R. F. S., Martins, A. J., Valle, D. and Rezende, G. L. (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. J. Insect Physiol. 83, 43–52.
- Ferdig, M. T., Li, J., Severson, D. W. and Christensen, B. M. (1996). Mosquito dopa decarboxylase cDNA characterization and blood-meal-induced ovarian expression. Insect Mol. Biol. 5, 119–126.
- Ferenz, H.-J. (1990). Receptor-Mediated Endocytosis of Insect Yolk Proteins. In Molecular Insect Science (ed. Hagedorn, H. H.), Hildebrand, J. G.), Kidwell, M. G.), and Law, J. H.), pp. 131–138. Boston, MA: Springer US.
- Gabrieli, P., Kakani, E. G., Mitchell, S. N., Mameli, E., Want, E. J., Mariezcurrena Anton, A., Serrao, A., Baldini, F. and Catteruccia, F. (2014). Sexual transfer of the steroid hormone 20E induces the postmating switch in *Anopheles gambiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 16353–16358.
- Guo Y, Hoffmann AA, Xu X-Q, Mo P-W, Huang H-J, Gong J-T, Ju J-F, Hong X-Y (2018) Vertical transmission of Wolbachia is associated with hot vitellogenin in *Laodelphax striatellus*. Front. Microbiol.9(2016):1-12, DOI:10.3389/fmicb.2018.02016.
- Han, Q., Li, G. and Li, J. (2000). Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs. Arch. Biochem. Biophys. 378, 107–115.
- Hayward A., Takahashi T., Bendena W.G., Tobe S.S. & Hui J.H. 2010. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in meta-zoans. FEBS Lett. 584: 1273–1278.
- Isoe, J., Koch, L. E., Isoe, Y. E., Rascón, A. A., Brown, H. E., Massani, B. B. and Miesfeld, R. L. (2019). Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes. PLoS Biol. 17, 1–23.

Jeffery C.J. (2017) Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Phil. trans. R. Soc. B373*:20160523.

Johnson, J. K., Li, J. and Christensen, B. M. (2001). Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1125–1135.

Kern CC, Townsend SJ, Salzmann A, Rende NB, Taylor GW, Comisel RM, Foukas LC, Bähler J, Gems D (2021) *C. elegans* feed yolk to their young in a form of primitive lactation. *Nature Comm.*12:5801, DOI:10.1038/s41467-021-25821-y.

Kim, S. R., Yao, R., Han, Q., Christensen, B. M. and Li, J. (2005). Identification and molecular characterization of a prophenoloxidase involved in *Aedes aegypti* chorion melanization. *Insect Mol. Biol.* 14, 185–194.

Kitano H, Nagano N, Skaguchi K, Matsuyama M (2017) Two vitellogenins in the loliginid squid *Uroteuthis edulis*: identification and specific expression in ovarian follicles. *Mol. Reprod. Develop.*84, 363-375, DOI:10.1002/mrd.22786.

Klowden, M. J. (1993). Mating and nutritional state affect the reproduction of *Aedes albopictus* mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 169–173.

Klowden, M. J. and Chambers, G. M. (1991). Male accessory gland substances activate egg development in nutritionally stressed *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 37, 721–726.

Kohlmeier P, Feldmeyer B, Foitzik S (2018) Vitellogenin-like A-associated shifts in social cue responsiveness regulate behavioral task specialization in an ant. *PLoS Biol*16(6):e2005747. DOI:10.1371/journal.pbio.2005747.

Lange, A. B., Leyria, J. and Orchard, I. (2022). The hormonal and neural control of egg production in the historically important model insect, *Rhodnius prolixus*: A review, with new insights in this post-genomic era. *General and Comparative Endocrinology.* 321-322, 114030, DOI:10.1016/j.ygcen.2022.114030.

Laskowski Sr., M. (1974) – A turbulent Life – in: Bayer Symposium V «Proteinase inhibitors» (eds. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit), p. 3-10, Springer-Verlag, New York.

Laskowski, M. (1935a) – Über die Phosphorverbindungen im Blutplasma der Legebenne. *Biochemische Zeitschrift* 275, 293-300.

Laskowski, M. (1935b) – Darstellungsmethode des Serumvitellins. *Biochemische Zeitschrift* 278, 345-348.

Laskowski, M. (1936) – Über das Vorkommen des Serumvitellins in Blute der Wirbeltiere. *Biochemische Zeitschrift* 284, 318-321.

Leipart V, Montserrat-Canals M, Cunha ES, Luecke H, Herrero-Galán E, Halskau O, Amdam GV (2022) Structure prediction of honeybee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*12, 51-70.

- Leyria, J., Orchard, I. and Lange, A. B. (2020a). What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008516.
- Leyria, J., Orchard, I. and Lange, A. B. (2020b). Transcriptomic analysis of regulatory pathways involved in female reproductive physiology of *Rhodnius prolixus* under different nutritional states. *Sci. Rep.* 10, 1–16.
- Li, J. S. and Li, J. (2005). Characterization of N-linked oligosaccharides in chorion peroxidase of *Aedes aegypti* mosquito. *Protein Sci.* 14, 2370–2386.
- Li, J. S. and Li, J. (2006). Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 954–964.
- Luc M, Taylor DP, Netscher C (1979) On *endotokia matricida* and intra-uterine development and hatching in nematodes. *Nematologica* 25, 268-274.
- Mansur, J. F., Alvarenga, E. S. L., Figueira-Mansur, J., Franco, T. A., Ramos, I. B., Masuda, H., Melo, A. C. A. and Moreira, M. F. (2014). Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *InsectBiochem. Mol. Biol.* 51, 110–121.
- Mansur, J. F., Figueira-Mansur, J., Santos, A. S., Santos-Junior, H., Ramos, I. B., de Medeiros, M. N., Machado, E. a., Kaiser, C. R., Muthukrishnan, S., Masuda, H., et al. (2010). The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 59–67.
- Marchant, A., Mougél, F., Mendonça, V., Quartier, M., Jacquín-Joly, E., da Rosa, J. A., Petit, E. and Harry, M. (2016). Comparing de novo and reference-based transcriptome assembly strategies by applying them to the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 25–33.
- Marinotti, O., Ngo, T., Kojin, B. B., Chou, S. P., Nguyen, B., Juhn, J., Carballar-Lejarazú, R., Marinotti, P. N., Jiang, X., Walter, M. F., et al. (2014). Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. *BMC Dev. Biol.* 14, 1–11.
- Masuda H, Ramos IB, Winter, CE (2012) Vitelogenese nos Ecdisozoa: nematoides e insetos como exemplos. in: Tópicos avançados em entomologia molecular - edits. Termignoni C, Winter CE, Silva-Neto, MAC – INCT Entomologia Molecular - pp. 1-45.
- Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environm. Internat.* 34, 531-543.
- Medeiros, M. N., Logullo, R., Ramos, I. B., Sorgine, M. H. F., Paiva-Silva, G. O., Mesquita, R. D., Machado, E. A., Coutinho, M. A., Masuda, H., Capurro, M. L., et al. (2011a). Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *InsectBiochem. Mol. Biol.* 41, 823–831.

Medeiros, M. N., Logullo, R., Ramos, I. B., Sorgine, M. H. F., Paiva-Silva, G. O., Mesquita, R. D., Machado, E. A., Coutinho, M. A., Masuda, H., Capurro, M. L., et al. (2011c). Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 823–831.

Medeiros, M. N., Ramos, I. B., Oliveira, D. M. P., da Silva, R. C. B., Gomes, F. M., Medeiros, L. N., Kurtenbach, E., Chiarini, L. B., Masuda, H., de Souza, W., et al. (2011b). Microscopic and molecular characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* Stål under immune challenge. *J. Insect Physiol.* 57, 945–53.

Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., Spieth, J., Carvalho, A. B., Panzera, F., Lawson, D., et al. (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.

Mitchell, S. N. and Catteruccia, F. (2017). Anopheline Reproductive Biology: Impacts on Vectorial Capacity and Potential Avenues for Malaria Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, a025593–a025593.

Montorzi M, Falchuk KH, Vallee BL (1995) Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*34:10851-10858.

Moreira, M. F., dos Santos, A. S., Marotta, H. R., Mansur, J. F., Ramos, I. B., Machado, E. A., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., Kaiser, C. R., Kramer, K. J., et al. (2007). A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1249–1261.

Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii, N, Goto S (1999) Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*264, 580-583.

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE Jr, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol*5(3):e62 DOI:10.1371/journal.pbio.0050062.

Pan M.L., Bell W.J., Telfer W.H. (1969) Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body, *Science*165, 393-394.

Papantonis, A., Swevers, L. and Iatrou, K. (2015). Chorion genes: A landscape of their evolution, structure, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 177–194.

Pascual, A. and Rivera-Pomar, R. (2022). Dynamics of maternal gene expression in *Rhodnius prolixus*. *Sci. Rep.* 12, 1–17.

Pascual, A., Vilardo, E. S., Taibo, C., Sabio y García, J. and Pomar, R. R. (2021). Bicaudal C is required for the function of the follicular epithelium during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Dev. Genes Evol.* 231, 33–45.

Pereira, J., Dias, R. and Ramos, I. (2022). Knockdown of E1- and E2-ubiquitin enzymes triggers defective chorion biogenesis and modulation of autophagy-related genes in the follicle cells of the vector *Rhodnius prolixus*. *J. Cell. Physiol.* 1, 12.

Perez MF, Lehner B (2019) Vitellogenins - Yolk gene function and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Front. Physiol.*10(1067):1-17, DOI: 10.3389/fphys.2019.01067.

Piatigorsky J. (2007) Gene sharing and evolution - the diversity of protein functions - Harvard University Press - Cambridge - xvi + 320 pp.

Piulacks MD, Guidugli KR, Cruz J, Simões ZIP, Belles X. (2003) The vitellogenin of the honeybee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression study. *Insect Biochem. Mol Biol.* 33, 459–65.

Postlethwait, J. H. and Giorgi, F. (1985). Vitellogenesis in insects. *Dev Biol (N Y 1985)* 1, 85–126.

Qian K, Jiang C, Xu M, Chen B, Qiu W, Su Y, Hao H, Lin Z, Cai S, Su J, Liu Z, Huang W (2021) Molecular characterization of the von Willebrand factor type D domain of vitellogenin from *Takifugu flavidus*. *Marine Drugs*19:181, DOI:10.3390/md19040181.

Raikhel, A. S. and Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217–251.

Raikhel, A. S., Dhadialla, T. S., Cho, W.-L., Hays, A. R. and Koller, C. N. (1990). Biosynthesis and Endocytosis of Yolk Proteins in the Mosquito. In *Molecular Insect Science* (ed. Hagedorn, H. H.), Hildebrand, J. G.), Kidwell, M. G.), and Law, J. H.), pp. 147–154. Boston, MA: Springer US.

Raikhel, A.S. 1987. The cell biology of mosquito vitellogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82 (suppl III): 93-101.

Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A. and Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev. Biol.* 8, 1–14.

Ribeiro, J. M. C., Genta, F. A., Sorgine, M. H. F., Logullo, R., Mesquita, R. D., Paiva-Silva, G. O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W. R., et al. (2014). An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 27.

Richard, D. S., Gilbert, M., Crum, B., Hollinshead, D. M., Schelble, S. and Scheswohl, D. (2001). Yolk protein endocytosis by oocytes in *Drosophila melanogaster*. Immunofluorescent localization of clathrin, adaptin and the yolk protein receptor. *J. Insect Physiol.* 47, 715–723.

Richards MH (2019) Vitellogenin and vitellogenin-like genes: not just for egg production. *Insectes Sociaux* 66, 505-506.

Rios, T., Bomfim, L. and Ramos, I. (2021). The transition from vitellogenesis to choriogenesis triggers the downregulation of the UPR sensors IRE1 and PERK and alterations in the ER architecture in the follicle cells of the vector *Rhodnius prolixus*. *Cell Tissue Res.* 387, 63-74.

Rivera-Pérez, C., Clifton, M. E., Noriega, F. G. and Jindra, M. (2020). Juvenile hormone regulation and action. In *Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology*, pp. 1–76. Apple Academic Press.

Rodrigues MA, Flatt T (2016) Endocrine uncoupling of the trade-off between reproduction and somatic maintenance in eusocial insects. *Curr. Opin Insect Sci.* 16, 1-8, DOI:10.1016/j.cois.2016.04.013.

Roepke R.R., Hughes J.S. (1935) Phosphorous partition in the blood serum of laying hens. *J. Biol. Chem.* 108, 79-83.

Rono, M. K., Whitten, M. M. A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E. A. and Marois, E. (2010). The Major Yolk Protein Vitellogenin Interferes with the Anti-Plasmodium Response in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* 8, e1000434–e1000434.

Roy, S., Saha, T. T., Zou, Z. and Raikhel, A. S. (2018). Regulatory Pathways Controlling Female Insect Reproduction. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 489–511.

Salmela H, Amdam GV, Freitak D (2015) Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog* 11(7), e1005015. doi:10.1371/journal.ppat.1005015.

Samaddar, S., Marnin, L., Butler, L. R. and Pedra, J. H. F. (2020). Immunometabolism in Arthropod Vectors: Redefining Interspecies Relationships. *Trends Parasitol.* 36, 807–815.

Santos, A. and Ramos, I. (2021). ATG3 Is Important for the Chorion Ultrastructure During Oogenesis in the Insect Vector *Rhodnius prolixus*. *Front. Physiol.* 12, 1–11.

Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF (2016) Reproduction-Immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 239-256.

Seehuus S-C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honeybee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 962-967.

Shaw, W. R., Attardo, G. M., Aksoy, S. and Catteruccia, F. (2015). A comparative analysis of reproductive biology of insect vectors of human disease. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 142–148.

Shaw, W. R., Teodori, E., Mitchell, S. N., Baldini, F., Gabrieli, P., Rogers, D. W. and Catteruccia, F. (2014). Mating activates the heme peroxidase HPX15 in the sperm storage organ to ensure fertility in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201401715.

Souza-Ferreira, P. S., Mansur, J. F., Berni, M., Moreira, M. F., Dos Santos, R. E., Araújo, H. M. M., De Souza, W., Ramos, I. B. and Masuda, H. (2014). Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: The reduction of CHS transcripts by CHS-dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 101–109.

Sun C, Zhang S (2010) Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients* 7, 8818–8829.

Sun W, Li H, Zhao Y, Bai L, Qin Y, Wang Q, Li W (2021) Distinct vitellogenin domains differentially regulate immunological outcomes in invertebrates. *J. Biol. Chem.* 296, 100060, DOI:10.1074/jbc.RA120.015686.

Telfer WH (1954) Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm, *J. Gen. Physiol.* 37:539-558.

Thompson JR, Banaszak LJ (2002) Lipid-protein interactions in lipovitellin. *Biochemistry* 41, 9398-9409.

Valle, D. Vitellogenesis In Insects and Other Groups - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil*, v. 88, n.1, p. 1-26, 1993.

Vieira, P. H., Benjamim, C. F., Atella, G. C. and Ramos, I. (2021). VPS38/UVRAG and ATG14, the variant regulatory subunits of the ATG6/Beclin1-PI3K complexes, are crucial for the biogenesis of the yolk organelles and are transcriptionally regulated in the oocytes of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, 1.

Vieira, P. H., Bomfim, L., Atella, G. C., Masuda, H. and Ramos, I. (2018). Silencing of RpATG6 impaired the yolk accumulation and the biogenesis of the yolk organelles in the insect vector *R. prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–19.

Wallace RA (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. in: *Developmental Biology*, vol. 1 - Ooogenesis (ed. Browder LW) - pp. 127-177.

Walter-Nuno, A. B., Oliveira, M. P., Oliveira, M. F., Gonçalves, R. L., Ramos, I. B., Koerich, L. B., Oliveira, P. L. and Paiva-Silva, G. O. (2013). Silencing of maternal heme-binding protein causes embryonic mitochondrial dysfunction and impairs embryogenesis in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 288, 29323–29332.

Walter-Nuno, A. B., Taracena, M. L., Mesquita, R. D., Oliveira, P. L. and Paiva-Silva, G. O. (2018). Silencing of iron and heme-related genes revealed a paramount role of iron in the physiology of the hematophagous vector *Rhodnius prolixus*. *Front. Genet.* 9, 1–21.

Wang, Z., Liu, P., Inuzuka, H. and Wei, W. (2014). Roles of F-box proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 233–247.

Werling, K., Shaw, W. R., Itoe, M. A., Westervelt, K. A., Marcenac, P., Paton, D. G., Peng, D., Singh, N., Smidler, A. L., South, A., et al. (2019). Steroid Hormone Function Controls Non-competitive *Plasmodium* Development in *Anopheles*. *Cell* 177, 315-325.e14.

Wigglesworth, V. B. (1934). Factors Controlling Moulting and 'Metamorphosis' in an Insect. *Nature* 133, 725–726.

Wigglesworth, V. B. (1951). Source of Moulting Hormone in *Rhodnius*. *Nature* 168, 558.

Wigglesworth, V. B. (1979). *The principles of insect physiology*. Springer Science & Business Media.

Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J. and Lindsay, S. W. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases.

Yaguchi H, Suzuki S, Kanasaki N, Mssuoka Y, Suzuki R, Suzuki RH, Hayashi Y, Shigenobu S, Maekawa K (2022) Evolution and functionalization of vitellogenin genes in the termite *Reticulitermes speratus*. *J. Exp. Zool B*2022:1-13 - DOI:10.1002/jez.b.23141.

Yin X, Kiriake A, Ohta A, Kitani Y, Ishizaki S, Nagashima Y (2017) A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish *Takifugu pardalis* ovary. *Toxicon*136:56-66.

Zhang S, Wang S, Li H, Li L (2015) Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 303-305.

Zhang W, Wang L, Zhao Y, Wang Y, Chen C, Hu Y, Zhu Y, Sun H, Cheng Y, Sun O, Zhang J, Chen D (2022) Single-cell transcriptomic analysis of honeybee brains identifies vitellogenin as caste differentiation-related factor. *iScience*25:104643 DOI:10.1016/j.isci.2022.104643.

Zhou Y, Shearwin-Whyatt L, Li J, Song Z, Hayakawa T, Stevens D, Fenelon JC, Peel E, Cheng Y, Pajpach F, Bradley N, Suzuki H, Nikaido M, Damas J, Daish T, Perry T, Zhu Z, Geng Y, Rhie A, Sims Y, Wood J, Haase B, Mountcastle J, Fedrigo O, Li Q, Yang H, Wang J, Johnston SD, Phillippy AM, Howe K, Jarvis ED, Ryder OA, Kaessmann H, Donnelly P, Korlach J, Lewin HA, Graves J, Belov K, Renfree MB, Grutzner F, Zhou Q, Zhang G (2021) Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature*592:756-766.

Zou, Z., Saha, T. T., Roy, S., Shin, S. W., Backman, T. W. H., Girke, T., White, K. P. and Raikhel, A. S. (2013). Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2173–E2181.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Sistemas





Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 4

O Sistema Neuroendócrino de Insetos

Cecília S. Vieira¹
Marcela B. Figueiredo²
Marcelo S. Gonzalez¹
Patrícia Azambuja¹
Eloi S. Garcia³
Daniele P. Castro³

¹Universidade Federal Fluminense, Niterói.

²Institute of Life Science, Swansea University Medical School, Reino Unido.

³Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Cecília S. Vieira, Marcela B. Figueiredo, Marcelo S. Gonzalez, Patrícia Azambuja, Eloi S. Garcia, Daniele P. Castro]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Os insetos desempenharam um papel histórico importante enquanto modelos biológicos para estudos sobre as funções endócrinas do sistema nervoso. A existência de um controle do sistema endócrino, em insetos, foi, primeiramente, descrito, em 1917, por Kópec. O autor dissecou cérebros de larvas da traça cigana *Lymantria dispar* e demonstrou que essas larvas, sem cérebros, eram incapazes de passar do estágio de pupa (Kópec 1917; 1922). Mais tarde, por volta de 1930, Sir Vincent Wigglesworth inovou o estudo da fisiologia de insetos, quando começou a utilizar ninfas e adultos do triatomíneo *Rhodnius prolixus* como modelo. Por meio de técnicas cirúrgicas, como a decapitação, o transplante, a denervação e a parabiose, Wigglesworth demonstrou que o desenvolvimento e o crescimento dos insetos era orquestrado por meio de um controle hormonal (Wigglesworth, 1934a, b, 1935 e 1936). A partir de seus achados, foram estabelecidos os princípios básicos da endocrinologia de insetos e as interações entre os hormônios produzidos durante os processos de muda, metamorfose e reprodução. Em insetos, a primeira descrição da presença de células neurosecretoras (CNS) foi feita no cérebro de abelhas, por Weyer, em 1935. Em Lepidoptera, Williams (1948) descobriu que as CNS cerebrais produzem um fator, que controla a regulação da diapausa pupal. Pouco tempo depois, Thomsen (1952) foi o primeiro a expor a função das CNS no desenvolvimento ovariano de insetos dípteros. Muitos trabalhos seguiram até os dias de hoje e as funções das CNS, bem como de todos os componentes do sistema neuroendócrino nos insetos, tornaram-se bem conhecidas, como iremos explorar no decorrer do capítulo.

O sistema neuroendócrino – interação entre os sistemas nervoso e endócrino

Juntos, os sistemas nervoso e endócrino compõem o sistema neuroendócrino em insetos, proporcionando a comunicação necessária entre todas as células que constituem um animal multicelular. O sistema endócrino é interligado ao sistema nervoso através de centros neuronais, glandulares ou mistos (neuroglandulares). Ele envolve a secreção de hormônios definidos, enquanto substâncias químicas que atuam como sinalizadores celulares, exercendo suas funções em células alvos distantes do seu local de síntese. Grande parte dos hormônios produzidos e secretados em insetos são neuro-hormônios ou hormônios peptídicos, denominados neuropeptídeos. Estão

envolvidos, na comunicação celular, tecidos e órgãos que coordenam as respostas fisiológicas, de acordo com o estímulo recebido (Hartenstein, 2006; Klowden, 2007; Gullan e Cranston, 2014).

Já o sistema nervoso é composto por: i) neurônios; ii) CNS; iii) cérebro; iv) cordão nervoso e v) gânglios nervosos, que se comunicam através de sinais elétricos. Como as CNS são neurônios especializados que respondem a estímulos, produzindo e secretando moléculas específicas que atuam como mensageiros químicos, estas são a conexão inicial entre os sistemas nervoso e endócrino. Dessa forma, os dois sistemas atuam coordenadamente, formando o sistema neuroendócrino, de forma a regular diversas funções dos insetos, tais como a muda, a reprodução e a morfogênese (Hartenstein, 2006; Klowden, 2007; Magoski, 2017).

Essa conexão entre os dois sistemas, nervoso e hormonal, é fundamental para o seu bom funcionamento. O sistema nervoso é certamente capaz de enviar mensagens elétricas rapidamente (em milissegundos), com precisão espacial, pois os sinais elétricos são enviados através das junções sinápticas dos neurônios. Porém, ter uma rede de nervos conectada a cada célula do organismo, coordenando suas atividades, ocuparia um enorme espaço dentro do corpo. Já no sistema endócrino, a mensagem leva mais tempo para chegar ao alvo (de segundos a horas). Nesse sistema, os mensageiros químicos (neuromoduladores, neuro-hormônios ou hormônios) são transportados pela hemolinfa, e sinalizam para diversos tecidos de uma maneira mais difusa. Assim, esses tecidos podem receber a mensagem, desde que tenham receptores que lhes permitam reconhecê-la. Esses receptores podem apresentar formas distintas e serem expressos em condições celulares e fisiológicas diversas, não necessariamente estando presentes em todos os tipos de tecidos. Além disso, durante todo o ciclo de vida do inseto, alguns podem variar sua expressão em qualquer momento do dia (Klowden, 2007; Chapman, 2013).

O processo de muda em muitos insetos requer horas para a sua conclusão. Entretanto, poderia ocorrer, mais rapidamente, se fosse coordenado pelo sistema nervoso, no qual cada célula epidérmica envolvida na muda teria uma terminação nervosa. Isso torna o ambiente interno do corpo imerso num mar de neurônios, ocupando espaço de outros órgãos. O controle hormonal contorna esse problema, mas torna o processo mais lento.

Já alguns processos, como a alimentação e a fuga, não podem depender da lentidão do sistema endócrino e, por isso, são regulados pelo sistema nervoso. Se a informação relativa a alguma ameaça no ambiente, como um predador, fosse transmitida pelo sistema endócrino para iniciar um comportamento de fuga, o

inseto seria, provavelmente, predado muito antes de a mensagem chegar. Ao selecionar hormônios como mensageiro para alguns sistemas, os insetos fizeram uma troca entre a velocidade da resposta e a complexidade do sistema. Essa troca seria necessária para a sua implementação.

Em geral, os hormônios são transportados aos tecidos, influenciando uma série de processos fisiológicos, tais como: a reprodução, o comportamento alimentar, a digestão, a síntese e o armazenamento de carboidratos e lipídios. Nos animais com simetria bilateral, o sistema endócrino envolve populações celulares especializadas e compactadas em glândulas, conhecidas como glândulas endócrinas, que podem ser encontradas em várias partes do corpo. Nos insetos, os hormônios são sintetizados pelos centros neuronais, neuglandulares ou glandulares, como as CNS, as *corpore cardíaca* (CC), as *corpore allata* (CA) e as glândulas protorácicas (GP) (Hartenstein, 2006). São denominadas *corpore cardíaca* ou *corpore allata* quando as glândulas são dispostas em pares glandulares, como em mosquitos, ou *corpus cardíacum* ou *corpus allatum* quando elas estão fundidas, como em triatomíneos (Klowden, 2013; Gullan e Cranston, 2014), como é possível verificar na Figura 1.

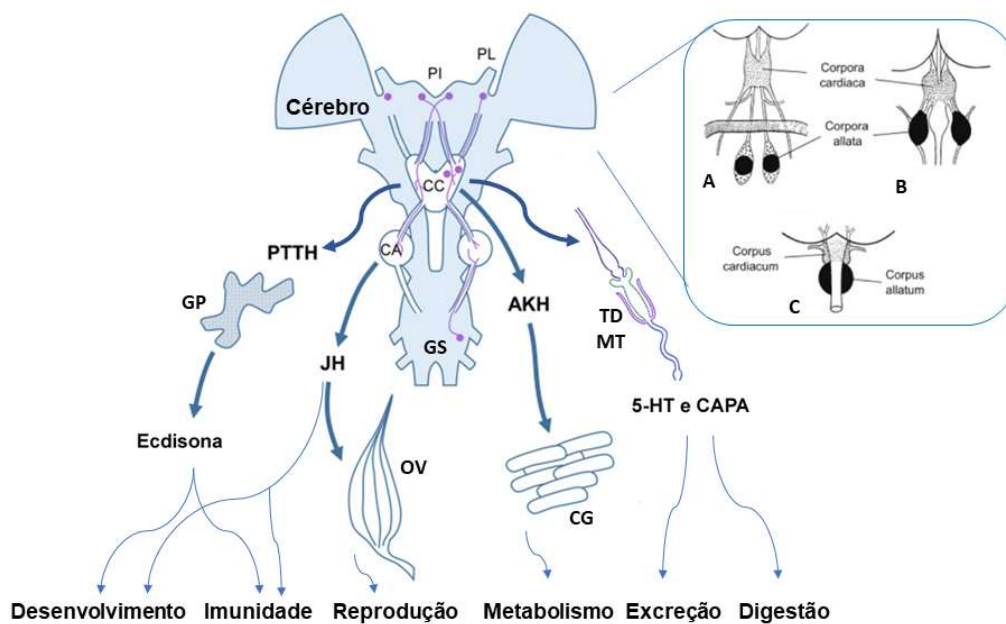


Figura 1: Principais componentes e hormônios do sistema neuroendócrino de insetos e sistemas fisiológicos modulados por este. Células neurosecretoras (roxo) situadas na “pars lateralis” (PL) e na “pars intercerebralis” (PI) no cérebro e no gânglio subesofágico (GS) que inervam o complexo retrocerebral, constituído de corpore cardíaca (CA) e corpore allata (CA). Localização da CA e CC no sistema nervoso central de mosquitos (A), baratas (B) e hemípteros (C) (dentro do retângulo azul). Hormônios: PTTH- hormônio protorácicotrópico; ecdisona; JH – hormônio juvenil; AKH - hormônio adipocinético; 5-HT - 5-hidroxitriptamina ou serotonina; CAPA ou CAP-2b- peptídeo cardioacelerador 2b. Órgãos/tecidos: GP – glândula protorácicotrópica; OV- ovário; CG – corpo gorduroso; TD – trato digestório; TM – túbulos de Malpighi. Sistemas fisiológicos modulados pelos hormônios: desenvolvimento; imunidade; reprodução; metabolismo; excreção; digestão.

Fonte: Adaptado de Cymborowski, 1991; Heinrich e Wirmer, 2021.

Os órgãos e glândulas neuroendócrinas se concentram na região cefálica e podem se distribuir, também, ao longo do corpo. As GP estão localizadas no tórax, próximo à região cefálica, e são responsáveis pela produção de ecdisteroides, como a ecdisona. Um dos principais centros neuroglândulares é representado pela CC, que está localizada atrás do cérebro. CNS de centros superiores no cérebro do inseto projetam axônios para a área neurohemal da CC, denominada lobo de armazenamento, onde os terminais liberam vários hormônios peptídicos, como o protocotrópico (PTTH). A CC também possui CNS intrínsecas, que secretam o hormônio adipocinético (AKH) na hemolinfa, importante para regular a quantidade de lipídeos durante o voo (Nassel, 2002; Hartenstein, 2006; Altstein e Nässel, 2010; Strand et al., 2016).

A CA e a CC fazem parte do complexo retrocerebral e, geralmente, se localizam na região posterior do cérebro. A morfologia da CA é bastante diversa e o órgão pode estar localizado na região da aorta ou no intestino, dependendo da espécie de inseto. A CA é responsável por produzir o hormônio alostatina (AST) e o hormônio juvenil (JH) (Sedlak, 1985; Klowden, 2008; Gullan e Cranston, 2014).

As CNS são encontradas ao longo de todo o sistema nervoso dos insetos, em sua maioria em aglomerados no cérebro e no gânglio ventral. Ao contrário dos neurônios típicos, estas células não estabelecem contato sináptico com outros neurônios, mas formam estruturas vesiculares no axônio terminal, que se assemelham a estruturas pré-sinápticas e são responsáveis pela produção e pela liberação de material neurosecretado. A maioria das CNS apresentam colorações azul e branca opalescentes sob a luz refletida, uma característica citológica única que facilita distingui-la dos corpos celulares de neurônios e da glia (Dogra, 1973; Orchard e Loughton, 1985; Raabe, 1989; Shiga, 2003).

As CNS podem ser classificadas por sua localização, número, tamanho e afinidades tintoriais. Alguns grupos importantes de CNS são: (a) CNS laterais anteriores (LANS) e dorsais (DNS), presentes no cérebro, contendo fatores relacionados à orquestração circadiana; (b) CNS mediais (MNS), no cérebro, contendo hormônios relacionados à ovulação; (c) CNS laterais posteriores (PL) e neurônios mediais dorsais não pareados (DUM) (contendo hormônios diuréticos); e (d) CNS ventromediais (VM) (contendo fatores antidiuréticos). A região mediana dorsal do protocérebro também é conhecida como *pars intercerebralis* (PI), e a região lateral como *pars lateralis* (PL) (Davey, 1967; Kriger e Davey, 1982; Steel e Vafopoulou e Steel, 2006; De Velasco et al., 2007; Coast 2009; Ons et al., 2017).

Além das CNS cerebrais, existem as células enteroendócrinas, localizadas no intestino médio dos insetos e responsáveis pela produção de diversos peptídeos enteroendócrinos (PE) relacionados, principalmente, com o sistema

digestório e excretor (Wegener e Veenstra, 2015). Há também as células Inka, localizadas nas glândulas epitraqueais, capazes de produzir hormônios relacionados à metamorfose, como o hormônio precursor de ecdise (ETH) (Klowden, 2008; Gullan e Cranston, 2014).

Neuropeptídeos e hormônios

Os neuropeptídeos ou hormônios peptídeos são produzidos em neurônios e as células neuroendócrinas do sistema nervoso central, células endócrinas no intestino ou em vários locais periféricos, em células sensoriais e, em alguns casos específicos, em células gliais, musculares, progenitoras embrionárias, entre outras. Em organismos multicelulares, os neuropeptídeos são, de longe, o maior e mais diversificado grupo de moléculas de sinalização, tanto estruturalmente como funcionalmente (Nassel, 2002; Strand et al., 2016; Magoski, 2017).

São moléculas antigas importantes na regulação de uma multiplicidade de processos. O seu pequeno carácter proteico permitiu-lhes evoluir e irradiar, rapidamente, em diversas moléculas diferentes. Em média, centenas de neuropeptídeos distintos estão presentes em animais, por vezes com classes únicas, que não ocorrem em espécies não relacionadas. Atuando como neurotransmissores, neuro-moduladores, hormônios, ou fatores de crescimento, estão envolvidos no controle do crescimento, no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, na ecdise, na reprodução, na digestão, no comportamento, polimorfismo, no balanço hídrico, na imunidade e em muitos mais processos fisiológicos (Nassel, 2002; Klowden, 2007).

Esses peptídeos são produzidos por ativação transcricional de genes específicos, que codificam proteínas precursoras maiores, na forma de pré-pró-hormônios. Estes não possuem atividade e passarão por modificações pós-traducionais, por processamento por enzimas proteolíticas no retículo endoplasmático, e por clivagem das regiões pré e pró-peptídeo. Em muitos casos, os peptídeos são processados pós-tradução para obter, por exemplo, a amidação C-terminal ou a ciclização do piroglutamato N-terminal, a formação de pontes de dissulfeto, as sulfatações, as glicosilações ou outras modificações. Os neuropeptídeos maduros ou hormônios peptídeos são armazenados em grandes vesículas nas terminações axonais ou perto de locais de liberação em células endócrinas, como a CC, e são liberados com a despolarização da célula. A ação endócrina no órgão-alvo ocorre por meio da ligação desses neuropeptídeos com receptores específicos de membrana e, através da transdução de sinal, resulta em respostas intracelulares. A maioria dos receptores mencionados está acoplada à

proteína G, como é o caso da guanilato ciclase nas células Inka, que interage com o hormônio de eclosão (EH) (Klowden, 2007; Chang et al., 2009; Altstein e Nässel, 2010; Caers et al., 2012).

As duas primeiras estruturas neuropeptídicas dos insetos foram determinadas em meados dos anos 70, cerca de 50 anos após a publicação de Kopec sobre um hormônio cerebral. Um desses hormônios é o proctolin, um peptídeo da barata *Periplaneta americana*, com atividades de contração do músculo visceral do inseto. Um ano mais tarde, foi identificado em gafanhotos o AKH, que estimula o consumo de lipídeos pelos músculos de voo, prolongando sua atividade. Hoje sabemos que o AKH é sintetizado pelas CNS da CC, como observado na Figura 1 (Brown, 1967; Stone et al., 1976).

A partir dos anos 90, com a associação de técnicas inovadoras como as cromatografias mais sensíveis, a espectrometria de massa, a ressonância magnética nuclear de alto campo e a genômica, o conhecimento sobre neuropeptídeos de insetos aumentou dramaticamente (Baggerman et al., 2002; Boonen et al., 2008, Hummon et al., 2006). Hoje em dia, são conhecidas estruturas primárias de várias centenas de neuropeptídeos (Nassel e Zandawala, 2019).

No genoma de *Drosophila melanogaster* existem registros de, ao menos, 30 genes que codificam precursores neuropeptídicos e mais de 40 receptores neuropeptídicos. Os neuropeptídeos são onipresentes no sistema nervoso dos insetos e são, de longe, as substâncias de sinalização mais diversas, tanto estruturalmente como funcionalmente. Os processos regulados por neuro-hormônios podem ser agrupados em quatro grandes categorias funcionais: i) crescimento e desenvolvimento; ii) comportamento e reprodução; iii) metabolismo e homeostase; e iv) movimento muscular (Altstein e Nässel, 2010; Nässel e Zandawala, 2019).

Os dados obtidos até a presente data indicam que o sistema neuroendócrino de *R. prolixus* contém 41 genes precursores de neuropeptídeos (ver na tabela 1 em Ons et al., 2017), para a maioria dos quais foram identificados receptores de proteína G. Os genes precursores de neuropeptídeos podem codificar de um a dezenas de peptídeos maduros, geralmente de vários membros da mesma família (Ons et al., 2016; Ons et al., 2017).

Múltiplos neuropeptídeos precisam trabalhar em sintonia para coordenar certos comportamentos, como a excreção, a contração muscular, o voo e até a agressividade em insetos sociais (Pratavieira et al., 2018). Além disso, a maioria dos neuropeptídeos já estudados apresentam mais de uma função, como destacamos a seguir. As alatotropinas (AT) e ASTs, duas famílias de

neuropeptídeos inicialmente descobertas nas baratas, devido ao seu papel regulador da secreção do hormônio juvenil da CA, também estão envolvidas no comportamento alimentar, diminuindo a busca por alimentação. Para que a ecdise funcione corretamente em *Manduca sexta*, são necessários cinco neuropeptídeos por ordem sequencial (hormônio precursor da pré-ecdise (PETH), ETH e HE, peptídeo cardioativo de crustáceo (CCAP) e bursicon. Além disso, outros neuropeptídeos, tais como cininas, corazonina e peptídeos mioinibidores, podem também atuar na ecdise. Park e colaboradores (2008) mostraram que o SNC das larvas de *D. melanogaster* abriga 24 neuropeptídeos diferentes, cada um com um padrão de expressão único. Os autores afirmam, ainda, que tais neuropeptídeos mostraram pouca sobreposição, com algumas células a expressarem dois a três neuropeptídeos diferentes (Brown, 1967; Chang et al., 2009; Caers et al., 2012; Hergarden et al., 2012; Kaneko e Hiruma, 2014; White e Ewer, 2014; Schoofs et al., 2017).

Os insetos possuem uma vasta gama de neuropeptídeos, alguns dos quais apresentam uma grande semelhança com os neuropeptídeos de vertebrados, tais como neuropeptídeos F (NPF), taquicininas (TK) e sulfakininas (SK). Outros neuropeptídeos de insetos, tais como proctolin ou hormônio de eclosão, são exclusivos dos artrópodes. Esses últimos e os seus receptores são alvos promissores para uma nova geração de agentes inseticidas, oferecendo níveis de seletividade e compatibilidade ambiental, ausentes dos inseticidas convencionais neurotóxicos. Do ponto de vista químico, a interferência da ligação ao alvo ou à transdução do sinal por pequenas moléculas orgânicas parecem ser as estratégias mais simples a respeito da aplicação prática de um inseticida à base de neuropeptídeos (Scherkenbeck, 2009; Audsley e Down, 2015).

Hormônio protoracicotrópico e hormônio ecdisona

Wigglesworth observou que as fases de ninfa e a metamorfose dos insetos eram controladas por diferentes hormônios, tais como o HPTT, o HJ e a ecdisona, por ele denominados “hormônio cerebral”, “hormônio inibidor” e “hormônio da muda”, respectivamente (Wigglesworth, 1972).

O HPTT é sintetizado por duas largas células neurosecretoras laterais, dispostas na PI, que se ramificam até a CC, órgão de armazenamento do HPTT (Figura 1). A liberação do neuropeptídeo ocorre em determinados estágios de desenvolvimento e está sob o controle de uma série de fatores fisiológicos, estímulos nervosos e estímulos ambientais, que podem incluir fotoperíodo, temperatura e ciclo circadiano. Em *Rhodnius*, no qual a muda segue-se à ingestão

de sangue, a distensão abdominal desencadeia receptores de estriamento, que enviam uma mensagem ao cérebro para libertar PTTH. No lepidóptera *M. sexta*, a liberação de PTTH é regulada por fotoperíodo, ocorrendo durante uma janela circadiana. Em alguns lepidópteros, a falha da liberação de PTTH é decorrente da diapausa da pupa (Klowden, 2013).

Uma vez na hemolinfa, o PTTH se liga ao Torso, um receptor tirosina quinase expresso na membrana das GP, que reconhece o PTTH, estimulando as GP de estágios imaturos (larvas, pupas ou ninfas) a sintetizar e secretar o hormônio ecdisona. Esse hormônio é, finalmente, convertido em sua forma biologicamente ativa, a 20-hidroxiecdisona (20E), pela enzima mono-oxigenase P450, expressa em tecidos periféricos às GP (Figura 1) (Dogra, 1973; Marchal et al., 2009; Rewitz et al., 2009; Yamanaka et al., 2013; Magoski, 2017).

Vários hormônios e neuropeptídeos estão envolvidos no controle das transições entre as fases de desenvolvimento dos insetos; entretanto, a ecdisona pode ser considerada o hormônio regulador mestre desses processos. A ecdisona é um hormônio esteroide hidroxilado, que apresenta estrutura similar aos esteroides presentes em vegetais e animais. Os ecdisteroides possuem estrutura com 27 átomos de carbono, função cetona localizada no anel B e grande polaridade, características que diferenciam os ecdisteroides dos hormônios esteroides de mamíferos. Os ecdisteroides constituem o primeiro grupo de compostos isolados que apresentam atividade indutora da muda em insetos. Por esse motivo, são reconhecidos como ecdisteroides todos os compostos que possuem estrutura similar a ecdisona (Goodwin, 1978; Stoka, 1987).

Os ecdisteroides, normalmente, são carregados das GP até o tecido receptor periférico, através de proteínas transportadoras. Nos tecidos periféricos, a ecdisona é convertida em 20-E, composto capaz de ativar as células hipodérmicas, com a restauração da sua capacidade de crescimento e síntese protéica. Permite, ainda, a formação de uma nova cutícula, resultando na liberação da cutícula antiga (apólise) (Wigglesworth, 1972; Yamanaka et al., 2013; Ou et al., 2016).

A liberação de ecdisteroides ocorre na forma de pulsos antes de cada muda, e é controlada, principalmente, pelo HPTT. Em *R. prolixus*, é necessária a presença desse hormônio com atividade protoracicotrópica por alguns dias após o repasto sanguíneo, para que o nível de ecdisona seja adequado para a realização da muda. Em experimentos de radioimunoensaios para medição de ecdisteróides de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, foram observados dois períodos de liberação do HPTT. O primeiro ocorre poucas horas após o repasto sanguíneo e o segundo entre o quinto e sexto dias após a alimentação, em um período conhecido como “período crítico da cabeça” ou período crítico cerebral (PCC).

Já em relação a ecdisona, também são observados dois períodos de liberação do hormônio, com atividade protoracicotrópica no cérebro das ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, antes de cada muda. O primeiro ocorre um dia após a alimentação, com um pequeno aumento da concentração de ecdisona na hemolinfa, enquanto que o segundo, bem maior, ocorre no meio do processo de muda, entre 5 e 6 dias após o repasto. Os efeitos organizacionais ocorrem durante o PCC, criando mudanças permanentes nos substratos neurais que sustentam o comportamento, sendo irreversíveis. Essas mudanças incluem a reorganização de vias neurais pelo estabelecimento de novas sinapses e alteração do limiar de excitação, dada a resposta neural (Wigglesworth, 1972; Knoblock e Steel, 1989; Vafopoulou e Steel, 1989; Elekonich e Robinson, 2000).

Estudos em *D. melanogaster* exploraram vários aspectos sobre como as respostas individuais dos tecidos, frente à síntese de ecdisona, são coordenadas de forma global no inseto. A muda em insetos consiste em uma série de eventos, que se inicia com a apólise, ou seja, a separação da cutícula antiga da epiderme, e termina com a ecdise, a queda da cutícula antiga. Aqui, utilizaremos a ecdise como um exemplo de como a ecdisona orquestra um dos vários comportamentos durante o processo de muda. A ecdisona inicia uma cascata de sinalização neuropeptídica nas células endócrinas peritraqueais, chamadas células Inka, estimulando a expressão de genes que codificam para ETH e que podem gerar dois produtos por *splicing* alternativo, ETH-1 e ETH-2, ou PETH e ETH, no caso das mariposas. Esses produtos possuem, em comum, a região C-terminal e demonstraram diferentes funções e intensidades na ecdise nos diversos estágios de desenvolvimento de *M. sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) e *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Park et al., 1999; Zhu et al., 2019; Caers et al., 2012).

Após liberação na hemolinfa, o ETH é reconhecido pelo receptor ETHR (receptor de ETH), expresso em neurônios peptidérgicos centrais, que modulam a sequência de comportamentos durante a ecdise. Altos títulos de ecdisona bloqueiam a liberação de ETH e o início da ecdise, dando tempo suficiente para que outros tecidos respondam à ecdisona, antes que a ecdise seja, finalmente, iniciada pela liberação de ETH, em resposta à queda de ecdisona. Essa liberação desencadeada por baixos títulos de ecdisona é mediada por β FTZ-F1, um fator de transcrição relacionado à cascata de sinalização da ecdisona, cuja expressão é induzida apenas quando o título de ecdisona cai (Rewitz et al., 2010; Zitnan et al., 2007; Yamanaka et al., 2013).

Hormônio juvenil

Os HJ são uma família de sesquiterpenoides acíclicos de insetos, produzidos pela CA (Figura 1). O HJ tem papel essencial sobre a resposta ao estresse, à diapausa, à determinação de castas, ao desenvolvimento, especialmente sobre a morfogênese, bem como sobre o comportamento e o processo reprodutivo. Em relação à reprodução, o HJ está relacionado com o desenvolvimento de ovário, a produção de vitelogenina e a sua captação para dentro do ovócito, o acasalamento e a oviposição (Figura 1). Em *R. prolixus*, o fator allatotrópico é estimulador do CA, que é liberado pelo CC, após a alimentação de fêmeas adultas. Através de ensaios com eletrocoagulações de células neurosecretoras localizadas na PI, foi analisada a fisiologia da muda em triatomíneo, confirmando que o cérebro tem atividade estimuladora do CA (Baehr, 1973). Neste caso, a “parsectomia” resultou na supressão do HJ, um efeito semelhante ao encontrado quando o inseto é submetido à allatectomia (Davey, 2000; Nouzova et al., 2018).

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

Na era pós-genômica, análises abrangentes através de tecnologias ômicas funcionais, como a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, resultaram num aumento expressivo no conhecimento sobre a atividade da CA e do HJ. Se, por um lado, a titulação do HJ é feita através da determinação da síntese do HJ, a identificação de todos os genes que atuam na cascata de biossíntese do HJ abriu portas para o maior entendimento da CA na regulação e síntese do HJ em *Bombyx mori*, *Aedes aegypti* e *Schistocerca gregaria*. Os transcritos, para a maioria das enzimas da rota de síntese do HJ, são quase que exclusivamente expressos na

CA, e coordenados, majoritariamente, pelos títulos do HJ. O amplo conhecimento sobre fatores que regulam enzimas da síntese de HJ tem impacto diretamente no desenvolvimento de ferramentas, como o RNA de interferência (RNAi) e a tecnologia CRISPR-Cas9, de modo que atuem em alvos moleculares específicos que interrompam ou aumentem a síntese de HJ, visando ao controle de vetores e de pragas (Kinjoh et al., 2007; Marchal et al., 2011; Rivera-Perez et al., 2014; Kistler et al., 2015; Duvall et al., 2017; Nouzova et al., 2018.)

Hormônios diurético e antidiurético

Um dos pesquisadores que mais estudou o mecanismo de excreção em insetos, utilizando o modelo *R. prolixus*, foi Simon Maddrell, que iniciou seu trabalho no laboratório de Vincent Wigglesworth, ainda como estudante, em 1959. Maddrell focou sua investigação nos túbulos de Malpighi, que produzem a urina via soluto e solvente transportados através das células desses túbulos. Os sais transportados pela urina são reabsorvidos pelo intestino posterior, levando o inseto a excretar grandes volumes de fluidos para manter seu balanço osmótico. Maddrell explorou a identificação dos hormônios responsáveis pelo processo. Em 1960, identificou o hormônio diurético, 5-hidroxitriptamina (5-HT, mais conhecido como serotonina), e o hormônio antidiurético, CAP_{2b}, que encerra a diurese de 3 a 4 horas após a alimentação (Figura 1) (Maddrell, 1963; Wigglesworth, 1972; Quilan et al., 1997).

Os hormônios diuréticos, como o 5-HT, atuam sobre a excreção. Cada estágio de ninfa de *R. prolixus* pode realizar um repasto sanguíneo, que atinge até 10 vezes seu peso corporal, o que limita drasticamente a sua mobilidade. Torna-se, assim, imperativa a redução do fluido alimentar, particularmente da água e dos sais, através da excreção. A diurese, muitas vezes, sessa antes do término do repasto sanguíneo. A alimentação em *R. prolixus* induz a liberação de 5-HT da massa ganglionar mesotorácica, que foi demonstrada por ensaios imunocitoquímicos, com a diminuição na imunorreatividade a 5-HT em áreas específicas do tecido neurohemal. Essa mudança coincide com o aumento na concentração de 5-HT na hemolinfa após a alimentação.

O aumento desse hormônio diurético, por liberação do sistema nervoso periférico na circulação, estimula a secreção dos túbulos de Malpighi cerca de mil vezes, e o fluido secretado é rico em NaCl. A liberação de hormônio diurético é induzida pela distensão do abdômen, o qual é detectado por receptores existentes nos músculos dorsais. A resposta é rápida, sendo o hormônio diurético detectado na circulação em apenas 15 segundos após o início da alimentação. O inseto

adulto tem elevado teor de 5-HT na hemolinfa nos primeiros três minutos após início da alimentação (Barret et al., 1993; Orchard, 2006).

À medida que ocorre, o abdômen volta ao seu estado basal, o hormônio desaparece da hemolinfa e é excretado pelos túbulos de Malpighi do inseto. Em *R. prolixus*, além da remoção de 5-HT contribuir para o término da diurese, temos o neuropeptídeo CAP_{2b}, reconhecido como fator antidiurético (Figura 1). Os nervos abdominais podem ser sítios de produção e/ou liberação dos hormônios diurético e antidiurético. Adicionalmente, já foram encontrados genes que codificam peptídeos antidiuréticos (Rhopr CAPA) no genoma de *R. prolixus*. Estudos funcionais mostraram que esses genes regulam o término da diurese (Quilan et al., 1997; Orchard, 2006; Paluzzi et al., 2008; 2010; Ons, 2017).

Em *Ae. aegypti*, já foi visto que o hormônio antidiurético atua na inibição de fatores diuréticos, como o peptídeo natriurético, essencial para a diurese pós-prandial, rica em sódio, que ocorre logo após a alimentação sanguínea pelas fêmeas. Também foi visto que a atividade antidiurética dos neuropeptídeos CAPA em larvas de *Ae. aegypti* ocorre através da sinalização, envolvendo GMP cíclico como segundo mensageiro. Além de sua ação antidiurética, os neuropeptídeos CAPA também atuam no processo de dessecação. O estresse hídrico ocorrido nesse processo em *D. melanogaster* leva a um aumento da regulação do mRNA do peptídeo CAPA, que, por sua vez, eleva os seus níveis nas CNS, evitando a perda hídrica. Os neuropeptídeos CAPA são mais abundantes nos neurônios ventrais abdominais especializados dos gânglios abdominais e armazenados nos órgãos periviscerais abdominais, facilitando a liberação de neuro-hormônios na circulação para entrega aos órgãos alvo, que expressam receptores. Os neuropeptídeos CAPA de *Ae. aegypti*, juntamente com o seu receptor cognato, funcionam num sistema neuroendócrino que interrompe a atividade estimulante dos hormônios diuréticos e, se não forem regulados, comprometem a homeostase iônica e hídrica do mosquito (Coast e cols., 2005; Terhzaz e cols., 2012; Ionescu e Donini, 2012; Sajadi et al., 2018; Sajadi et al., 2020).

Vários peptídeos são conhecidos como *brain-gut peptides* ou PE, que são expressos e produzidos no cérebro e nos órgãos intestinais. Entre esses neuropeptídeos, estão o peptídeo de miossupressão (MIP – conhecido também como allatostatinas tipo B), o neuropeptídeo F (NPF), os peptídeos relacionados com taquicinina (TRP) e os peptídeos alatorreguladores. Esses peptídeos estão relacionados à digestão (liberação de enzimas, motilidade intestinal, pH, valor nutricional do conteúdo intestinal, comportamento alimentar), à excreção, ao comportamento sexual e ao estresse (Wegener e Veenstra, 2015; Matsumoto et al., 2019).

Hormônios eicosanoides

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

Os eicosanoides são metabólitos oxigenados, contendo em sua estrutura de ácido graxo 20 carbonos polinsaturados. Existem três grandes grupos de eicosanoides em insetos, incluindo as prostaglandinas, ácidos epoxieicosatrienóicos e os vários produtos da lipoxigenase. Cada grupo é gerado por vias específicas conhecidas como cicloxigenase, lipoxigenase e epoxigenase. Primeiramente, ocorre a liberação do ácido araquidônico através da atividade catalítica da fosfolipase A₂ sobre fosfolipídeos. Em seguida, o ácido araquidônico é oxidado por vias diferentes, formando os eicosanoides (Stanley et al., 2002; Stanley e Kim, 2019).

O envolvimento de eicosanoides na fisiologia de invertebrados tem despertado interesse, principalmente em relação à sua participação no controle de processos fisiológicos fundamentais, como imunidade, reprodução e metabolismo. Os eicosanoides do tipo prostaglandinas funcionam como hormônios autócrinos e mediadores parácrinos para uma variedade de processos fisiológicos intensamente estudados em mamíferos. A presença de eicosanoides no trato reprodutivo de invertebrados é bem conhecida; porém, sua função e mecanismo de ação são pouco descritos. Trabalhos demonstraram que as prostaglandinas estão envolvidas na ovogênese do grilo *Teleogryllus commodus* e, também, na regulação da vitelogênese em *R. prolixus*. Os eicosanóides estão ainda relacionados com a síntese de nucleotídeos cíclicos, como mensageiros secundários e AMPc, relacionados com a maturação de gametas (Loher, 1981; Meijer et al., 1986; Sagi et al., 1995; Funk, 2001; Medeiros et al., 2002; Medeiros et al., 2004; Cha et al., 2006; Stanley e Kim, 2019).

Os eicosanoides também são fundamentais para a sinalização da resposta imune de insetos. Eles são mediadores de respostas celulares, como fagocitose, microagregação, migração de células, coagulação, espraiamento celular, reações de nodulação e degranulação de hemócitos como os oenocitoides. Também podem mediar as respostas humorais, como a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP), de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de profenoloxidase (Stanley et al., 1997; Stanley e Miller, 2006; Büyükgüzel et al., 2007; Kim e Stanley, 2021).

As prostaglandinas atuam na imunidade intestinal de insetos, induzindo a expressão Duoxe produzindo moléculas antimicrobianas, como ROS. A inibição

da biossíntese de prostaglandinas no intestino médio de *Ae. aegypti* leva à diminuição da expressão de vários AMP. As prostaglandinas não são responsáveis pela ativação das respostas imunes, mas atuam na modulação da amplitude da resposta (Barletta et al., 2020; Kim e Stanley, 2021).

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado a importância da fosfolipase A₂, a enzima que desencadeia a formação dos eicosanóides, para a resposta imune dos insetos. Como essa enzima também participa da via de formação de plaquetas, alguns autores sugerem a participação de fatores de agregação de plaquetas (PAF) na sinalização celular de insetos. A fosfolipase A₂ tem sido relatada como atuante sobre a digestão de insetos, resposta imune, reprodução e metabolismo (Tunaz et al., 2003; Garcia et al., 2004; Machado et al., 2006; Figueiredo et al., 2008a, 2008b; Park e cols., 2005; Stanley, 2006b; Shresta e Kim, 2008; Stanley e Kim, 2019).

Sistema neuroendócrino e sua relação com o sistema imune

A fim de se defenderem contra a infecção por diferentes microrganismos, os insetos possuem um eficiente sistema de defesa, incluindo barreiras físicas (exoesqueleto de quitina), químicas (enzimas) e biológicas (sistema imune). O sistema imune dos insetos é composto por respostas do tipo humoral, compreendendo a secreção de fatores que atuam no organismo invasor, tais como a fenoloxidase, os AMPs e as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Paralelamente, a imunidade celular compreende as respostas mediadas por células, mais especificamente os hemócitos, como a fagocitose, a nodulação e a encapsulação. Cabe ressaltar, ainda, que essa divisão em imunidade celular e humoral é puramente didática, uma vez que ambos os tipos de respostas atuam de maneira integrada para minimizar e conter a proliferação de microrganismos invasores (Garcia et al., 2009; Ursic-Bedoya et al., 2009; Azambuja et al., 2017).

Com o avanço de técnicas de biologia molecular aplicadas à genética, foi possível explorar os mecanismos de reconhecimento de patógenos e a ativação da resposta imune em insetos, utilizando, majoritariamente, o modelo *D. melanogaster*. Hoje, sabe-se que a imunidade de insetos é bastante complexa e envolve um elegante sistema de sinalização, que culmina com a síntese de moléculas e de proteínas efetoras no combate à infecção. Além disso, as respostas imunológicas podem ser orquestradas de acordo com a classe do microrganismo invasor, confirmando a especificidade da resposta imune em invertebrados, como em drosófilas (Ferrandon et al., 2007; Ferrandon et al., 2007; Xi et al., 2008; Imler, 2014; Clayton et al., 2014; Vieira et al., 2016; Telleria et al., 2018; Vieira et al., 2018; Salcedo-Porras et al., 2019; Rolandelli et al., 2021).

Ainda, algumas evidências têm apontado que hormônios regulam a imunidade em animais, inclusive nos insetos. Nesse sentido, estudos têm focado, principalmente, no papel da ecdisona enquanto modulador da resposta imune humoral e celular (Figura 1). Um dos principais achados descreve como a ecdisona, ao se ligar no seu receptor nuclear (EcR), que está presente em praticamente em todos os tipos celulares dos insetos, desencadeia a expressão de genes canônicos envolvidos nas vias de sinalização Toll e IMD. Em *D. melanogaster*, o gene que codifica a proteína de reconhecimento PGRP-LC, receptor de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), da via IMD, tem sua expressão regulada pela ecdisona. A depleção do hormônio inibe a expressão gênica e a síntese do receptor, tornando a via IMD disfuncional, uma vez que ela é incapaz de reconhecer bactérias gram-negativas e outros microrganismos. A ligação ecdisona/EcR induz e potencializa a expressão gênica de alguns AMP em resposta à ativação da via IMD frente ao desafio microbiano. A ecdisona ativa a expressão gênica de AMP em outros insetos, independentemente de um desafio microbiano, através de um mecanismo chamado de *immune priming*. Dessa forma, podemos afirmar que a ecdisona, além de seu papel clássico como reguladora do desenvolvimento e da reprodução em insetos, também atua na construção molecular das vias de sinalização e no reforço positivo de proteínas efetoras da imunidade (Meister e Richards, 1996; Flatt et al., 2008; Zanarotti et al., 2009; Johnston et al., 2011; Regan et al., 2013; Rus et al., 2013; Wang et al., 2014; Han et al., 2017; Mai et al., 2017 e 2019; Reynolds et al., 2020; Vieira et al., 2021; Nunes et al., 2021).

Considerando os insetos vetores, poucos são os trabalhos que destacam a relação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune. No triatomíneo *R. prolixus*, o bloqueio da síntese de ecdisona inibe não só o desenvolvimento do inseto, mas também suprime as respostas imunes celulares e humorais, diminuindo a expressão de AMP e de lisozimas, dificultando a eliminação de patógenos invasores e a homeostase da microbiota intestinal. Juntas, essas alterações levam ao aumento da taxa de mortalidade dos triatomíneos (Azambuja et al., 1991; Figueiredo et al., 2006; Vieira et al., 2021).

Os efeitos da ecdisona, na regulação da imunidade inata, também já foram estudados no mosquito *Anopheles gambiae*, através da injeção do hormônio sintético, na hemolinfa, que levou ao aumento da atividade fagocítica dos hemócitos e da expressão gênica de vários AMP, além da diminuição da infecção por bactérias e por *Plasmodium berghei*. Foi proposto que a potencialização da sinalização da ecdisona pode servir de alvo potencial para interromper a transmissão de parasitas (Werling et al., 2019, Reynolds et al., 2020.1; 2020.2).

Já em *Ae. aegypti*, a relação entre o sistema neuroendócrino e a imunidade foi estudada sob o olhar de outro hormônio, o HJ. O HJ tem um efeito negativo na expressão gênica de AMP durante a fase pós-eclosão e no ciclo gonadotrópico em fêmeas. Mosquitos tratados com JH se mostraram mais susceptíveis à infecção microbiana. Por outro lado, o silenciamento por RNAi do receptor tolerante ao metopreno (Met), que reconhece HJ, induziu um aumento na expressão de vários AMP, reforçando o efeito negativo do HJ na imunidade humoral de *Ae. aegypti*. JH também exerce papel supressor na expressão de AMP, em *D. melanogaster*. Dessa forma, podemos dizer que, em geral, a ecdisona atua como um regulador endócrino positivo, no sistema imune, ao passo que o HJ atua como um supressor na imunidade de insetos (Figura 1) (Flatt et al., 2008; Chang et al., 2021 Nunes et al., 2021).

Aplicação

A utilização de variadas classes de produtos do metabolismo secundário de plantas para o controle de pragas agrícolas e vetores de doenças parasitárias tem sido amplamente explorada, como bioinseticidas ou reguladores do crescimento de insetos (IGRs).

A seleção de alvos para estratégias de controle específica para uma espécie ou grupos de insetos só pode ser alcançada através do conhecimento em fisiologia, endocrinologia, bioquímica e ecologia de insetos. A lógica por trás dessa abordagem é que, uma vez que os neuropeptídeos regulam os principais processos biológicos, esses "agentes especiais" ou seus análogos sintéticos, miméticos, agonistas ou antagonistas podem ser ferramentas eficazes no controle de insetos, de maneira ambientalmente mais saudável em comparação a inseticidas convencionais (Fónagy, 2006).

Azadiractina

A azadiractina (Aza) é um triterpeno da classe limonoide, que é extraído de plantas da família Meliaceae, como a *Azadirachta indica* e a *Melia azedarach*. Em *R. prolixus*, a Aza inibe o processo de muda por interferência sobre o sistema neuroendócrino, diminuindo os níveis de ecdisteroides na hemolinfa. Experimentos utilizando ninfas de quinto estágio, com transplantes de cabeça, entre decaptados e implantados controle ou tratados, mostraram que a Aza, além de interferir, bloqueando a produção de HPTT, também age diretamente nas glândulas protorácicas, diminuindo significativamente os níveis de ecdisteroides.

A aplicação simultânea de ecdisona reverte a inibição da ecdise causada pela Aza. Neste caso, a ação da ecdisona resulta na indução de mitose na epiderme, fenômeno básico para produção da nova cutícula e da muda (Garcia et al., 1989, 1990; Garcia e Azambuja, 1991; Brahmachari, 2004; Garcia e Azambuja, 2004).

Em fêmeas adultas de *R. prolixus*, a Aza causa redução do desenvolvimento dos ovócitos e, conseqüentemente, afeta a produção de ovos, porém, sem alterar a viabilidade ou a eclosão das ninfas. Esses efeitos foram correlacionados com os níveis de vitelogenina na hemolinfa e na vitelina nos ovários. Os títulos de ecdisteroides na hemolinfa e nos ovários, determinados por radioimunoensaios, foram menores em insetos tratados com Aza. Experimentos com análise de ovários isolados sugeriram que a Aza interfere diretamente na produção de ecdisteroides por esses órgãos (Feder et al., 1997).

Além das alterações fisiológicas de *R. prolixus*, o tratamento oral dos insetos com Aza reduz as respostas imunes de microagregação e a atividade fagocítica dos hemócitos. Ademais, facilita a proliferação de parasitas e bactérias na hemolinfa, resultando no aumento da mortalidade de insetos (Azambuja et al., 1991; Figueiredo et al., 2006).

Através de tratamento de *R. prolixus* com Aza, foi possível demonstrar que o sistema neuroendócrino do inseto regula as vias de sinalização TOLL e IMD, impactando a expressão gênica de AMP e de outros componentes relacionados às vias de sinalização e acarretando a alteração na homeostase da microbiota intestinal. Esses resultados contribuem para o entendimento sobre a relação entre o sistema imune e o neuroendócrino e do potencial da via da ecdisona, no controle do desenvolvimento de parasitos, em insetos vetores (Vieira et al., 2021).

Lignoides

Já foi demonstrado que lignanas e neolignanas podem afetar o sistema endócrino de insetos, utilizando o modelo *R. prolixus*. Após a suplementação do sangue alimentar com concentrações diferentes de seis lignoides (burchelina, podofilotoxina, pinosresinol, sesamina, licarina A e ácido nordiidroguaiarético – NDGA) foi demonstrado que pinosresinol e NDGA, semelhante à Aza, estão envolvidos no mecanismo de ação de hormônios pela via HPTT/ecdisona. A inibição da muda pode ser revertida pelo tratamento simultâneo com ecdisona adicionada à dieta dos insetos (Cabral et al., 1999; Garcia e Azambuja, 2004).

Por outro lado, observou-se que a adição de podofilotoxina e burchelina ao sangue alimentar diminui, drasticamente, a produção de urina em *R. prolixus*. Isso porque a rápida diurese após a alimentação é um processo coordenado,

necessitando a passagem de água e de sais através do epitélio do estômago para a hemolinfa e, desta, para as células dos túbulos de Malpighi, culminando na eliminação do excesso de fluido do sangue alimentar. A adição de burchelina ao sangue contendo 5-HT reverte a inibição da excreção causada por esse composto. A diminuição na produção de urina também foi observada em experimentos com tubos de Malpighi isolados em cultura e tratados diretamente com burchelina. Nesses experimentos, a inibição pode ser revertida pela aplicação de 5-HT e de homogeizados de massa ganglionar mesotorácica (fonte de hormônio diurético) (Wigglesworth, 1972; Garcia e Azambuja, 2004; Garcia et al., 2010).

O controle neuroendócrino sobre o desenvolvimento de patógenos em insetos

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

Como visto anteriormente, o HPTT, o HJ e a ecdisona são três hormônios que devem estar presentes em determinados momentos e em quantidades precisas, ao longo do ciclo de vida do inseto, para que seu desenvolvimento ocorra de forma satisfatória. Entre outros sistemas fisiológicos, esses hormônios regulam o processo de organização ultraestrutural do trato digestório e, por isso, podem afetar a suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* em triatomíneos. A adição de 20-E a culturas de células intestinais de *Calliphora erythrocephala* resultou em um marcante aumento da taxa de formação de membranas peritróficas. Por outro lado, o fornecimento de HJ obtido de *Hyalophora cecropia* levou à inibição da síntese das membranas neste sistema.

A ecdisona está também envolvida na organização ultraestrutural do intestino médio de *R. prolixus*. A simples distensão abdominal durante o processo de alimentação sanguínea induz a projeção das microvilosidades das células intestinais em direção ao espaço luminal, e também o início de formação da primeira camada da PMM, que ocorre nas primeiras 24 horas. Posteriormente, os sinais proprioceptivos enviados ao cérebro por receptores de distensão

abdominal associados a componentes sanguíneos, como a concentração de hemoglobina, determinam a produção de HPTT e da ecdisona, que modulam o pleno desenvolvimento da PMM durante o processo de digestão. Em *S. gregaria* e *L. migratoria*, foi demonstrado que a Aza altera a motilidade intestinal e bloqueia a mitose, resultando na redução do número de células regenerativas do epitélio e um intestino com pouca eficiência digestiva, bem como diminui a adesão do parasita. Esse processo é revertido pela ecdisona (Becker, 1978; Mordue et al., 1993; Nasiruddin e Mordue 1993; Gonzalez et al., 1999; 2006; Albuquerque-Cunha et al., 2004).

Em *R. prolixus*, a decapitação, antes ou durante o PCC, ou a administração de Aza por via alimentar afeta a organização ultraestrutural do intestino médio, reduzindo a plena expansão das microvilosidades, que se tornam agregadas, diminuindo também a produção do complexo de membranas formadoras da PMM. Além disso, ocorrem, nesses casos, alterações na morfologia dos esferócitos e no retículo endoplasmático das regiões apical e basal das células epiteliais do intestino médio. A arquitetura ultraestrutural do órgão, porém, pode ser restabelecida por transplante de cabeças de insetos doadores normais ou pela terapia com ecdisona. Substâncias químicas capazes de atuar sobre o delicado equilíbrio endócrino dos artrópodes são de especial interesse para elucidar aspectos ainda mal compreendidos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos parasitas em seus hospedeiros invertebrados.

A ecdisona exerce um efeito letal sobre protozoários habitantes do trato digestório de *Cryptocercus*, durante o período de muda. A aplicação tópica de análogos do HJ induziu uma diminuição da suscetibilidade de *Panstrongylus megistus* à infecção por *T. cruzi*. A injeção de Aza em larvas de *M. sexta* parasitadas por *Cotesia congregata* afeta, portanto, adversamente, o desenvolvimento do endoparasito (Cleveland e Nutting 1955; Perlowagora-Szumlewicz et al., 1975; Beckage et al., 1993; Nogueira et al., 1997, Garcia et al., 1998).

A administração de Aza antes, concomitantemente ou após a infecção por diferentes cepas e clones do *T. cruzi*, é capaz de inibir completamente o desenvolvimento do protozoário e promover a sua eliminação pelas excretas nos vetores *R. prolixus*, *Triatoma infestans* e *Dipetalogaster maximus*, por longos períodos. Embora a Aza não atue diretamente sobre o parasita em meio de cultura, e também não seja capaz de interferir nas principais atividades enzimáticas digestivas do vetor, sua atividade se restringe, de forma dose-dependente, ao desenvolvimento do flagelado em seus vetores. A administração de ecdisona à ninfas de *R. prolixus* decapitadas estimula o desenvolvimento das

formas esferomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi*. Os efeitos da Aza sobre a ultraestrutura do trato digestório de *R. prolixus* geram um microambiente intestinal hostil para o seu desenvolvimento, principalmente pela ausência da PMM e/ou do espaço perimicrovilar (Garcia et al., 1989a,b; 1991; Gonzalez e Garcia 1992; Gonzalez et al., 1999; Kollien e Schaub, 1999; Cortez et al., 2002).

Considerações finais

Neste capítulo, descrevemos que o sistema neuroendócrino é responsável por orquestrar e coordenar respostas fisiológicas dos insetos, de acordo com o estímulo recebido. Através de um sistema de neurônios, células neurosecretoras, glândulas e órgãos hemais, neuropeptídeos e hormônios são sintetizados e secretados na circulação do inseto, atuando como mensageiros aos mais diferentes tipos celulares. Em decorrência disso, os processos de desenvolvimento, reprodução, imunidade, metabolismo, excreção, digestão e comportamento podem ser moldados e sincronizados, de acordo com as características do ambiente e de suas variações, garantindo a sobrevivência dos insetos.

Em espécies de insetos vetores de patógenos causadores de doenças humanas, como *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *R. prolixus*, o sistema neuroendócrino pode modular a interação do inseto com seus patógenos, através da interferência de hormônios nas vias de sinalização da imunidade ou na ativação das respostas imunes, o que pode impactar o sucesso da infecção e a transmissão para novos hospedeiros vertebrados. Dessa forma, pesquisas destinadas a compreender os mecanismos através dos quais o sistema neuroendócrino regula a imunidade dos insetos vetores têm grande apelo, uma vez que podem gerar novas ferramentas de controle vetorial. Com isso, a ação de hormônios, regulados pelo sistema neuroendócrino, em diferentes processos fisiológicos de insetos podem ser, também, potenciais alvos para o desenvolvimento de bioinseticidas mais específicos para insetos.

Abreviações

20E: 20-hidroxicidisona

5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina

AKH: hormônio adipocinético

AMPc: adenosina 3,5-monofosfato cíclico

AMP: peptídeos antimicrobianos

AST: hormônio alostatina

AT: alatotropina
Aza: azadiractina
CA: "*corpora allata*"
CC: "*corpora cardíaca*" ou *corpus cardiacum*
CAP2b ou CAPA: peptídeo cardioacelerador 2b
CCAP: peptídeo cardioativo de crustáceo
CNS: células neurosecretoras
DNS: CNS dorsais
DUM: neurônios mediais dorsais não pareados
EcR ecdisona: receptor nuclear
EH: Hormônio de Eclosão
ETH: hormônio precursor de ecdise
ETHR: receptor de ETH
GMP: monofosfato cíclico de guanosina
GP: glândulas protorácicas
GPCRs: receptores de proteína G
IGRs: reguladores do crescimento de insetos
JH: hormônio juvenil
LANS: CNS laterais anteriores
MIP: peptídeo de miosupressão ou allatostatinas tipo B
MNS: CNS mediais
NDGA: ácido nordiidroguaiarético
NPF: neuropeptídeo F
NPF: neuropeptídeos F
PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos
PCC: período crítico cerebral
PE: peptídeos enteroendócrinos
PETH: hormônio precursor da pré-ecdise
PGRP-LC: proteína de reconhecimento
PI: *pars intercerebralis*
PL: *pars lateralis*
PL: CNS laterais posteriores
PMM: membrana perimicrovilar
PTTH: hormônio protociclotrópico
RNA: ácido ribonucleico
SKs: sulfakininas
TKs: taquicininas
TRP: peptídeo taquicinina
VM: CNS ventromediais

Referências

- Albuquerque-Cunha, J.M., Mello, C.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., Souza W., Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F., 2004. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 815-822.
- Altstein, M., Nässel, D.R. 2010. Neuropeptide signaling in insects. Adv Exp Med Biol. 692:155-65.
- Audsley, N., Down, R.E. 2015. G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. Insect Biochem Mol Biol.67:27-37.
- Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Warthen Jr, J.D., 1991. Immune depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, Azadirachtin. J. Insect Physiol. 37, 771-777.
- Azambuja, P., Garcia, E.S., Waniek, P.J., Vieira, C.S., Figueiredo, M.B., Gonzalez, M.S., Mello, C.B., Castro, D.P., Ratcliffe, N.A. 2017. *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. J Insect Physiol. 97:45-65.
- Baehr, J.C. 1973. Controle neuroendocrine du fonctionnement du corpus allatum chez *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol 19(5):1041-1049.
- Baggerman, G., Cerstiaens, A., De Loof, A., Schoofs, L., 2002. Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. J. Biol. Chem. 277, 40368– 40374.
- Barletta, A.B.F.; Silva, T.L.A.; Talyuli, O.A.C.; Luna-Gomes, T.; Sim, S.; Anglero-Rodriguez, Y.; Dimopoulos, G.; Bandeira-Melo, C.; Sorgine, M.H.F. 2020. Prostaglandins regulate humoral immune responses in *Aedes aegypti*. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008706.
- Beckage, N.E., Kanost, M.R., 1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 23, 643-653.
- Becker, B. 1978. Effects of 20-hydroxy-ecdysone, juvenile hormone, Dimilin, and Captan on in vitro synthesis of peritrophic membranes in *Calliphora erythrocephala*, J Insect Physiol, 24, 699-705.
- Billingsley, P.F, Downe, A.E., 1986. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. Acta Trop. 43, 355-366.
- Boonen, K., Landuyt, B., Baggerman, G., Husson, S.J., Huybrechts, J., Schoofs, L., 2008. Peptidomics: the integrated approach of MS, hyphenated techniques and bioinformatics for neuropeptide analysis. J. Sep. Sci. 31, 427–445.

- Brahmachari, G., 2004. Neem- an omnipotent plant: a retrospection. *Chembiochem.* 5, 408-421.
- Brown, B. E. 1967. Neuromuscular Transmitter Substance in Insect Visceral Muscle. *Science*, 155 (3762), 595.
- Büyükgüzel, E., Tunaz, H., Stanley, D., Büyükgüzel, K.J., 2007. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* 53, 99-105.
- Cabral, M.M., Azambuja, P., Gottlieb, O.R., Garcia, E.S., 1999. Neolignans inhibit *Trypanosoma cruzi* infection of its triatomine insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.* 85, 184-187.
- Caers, J.; Verlinden, H.; Zels, S.; Vanermissen, H.; Vuerinckx, K.; Shoofs, L. 2012. More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: an overview. *Frontiers in Endocrinology.*, v.3, 151.
- Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L., DuBois, R.N. 2006. Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol.* 289(2):263-72.
- Chang, M.M., Wang, Y.H., Yang, Q.T., Wang, X.L., Wang, M., Raikhel, A.S., Zou, Z. 2021. Regulation of antimicrobial peptides by juvenile hormone and its receptor, Methoprene-tolerant, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 128:103509.
- Chapman, R.F.; Simpson, S.J.; Douglas, A.E. The insects: structure and function. Fifth Edition. Stephen Simpson & Angela Douglas, Cambridge Press, 2013, 929 pages.
- Clayton, A.M., Dong, Y., Dimopoulos, G. 2014. The Anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. *J Innate Immun.* 6(2):169-81.
- Coast, G. M., Garside, C., Webster, S. G., Schegg, K. M. & Schooley, D. A. 2005. Mosquito natriuretic peptide identified as a calcitonin-like diuretic hormone in *Anopheles gambiae* (Giles). *J. Exp. Biol.* 208, 3281–3291.
- Coast, G.M., 2009. Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects. *J. Exp. Biol.* 212, 378–386.
- Cymborowski, B., in: *Hormones and Metabolism in Insect Stress*, p. 99. Eds J. Ivanovic and M. Janković-Hladni. CRS Press 1991.
- Davey, K. G. 2000. The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 663-669.
- Davey, K.G., 1967. Some consequences of copulation in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 13, 1629–1636.
- De Velasco, B., Erclik, T., Shy, D., Sclafani, J., Lipshitz, H., McInnes, R., & Hartenstein, V. 2007. Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. *Developmental Biology*, 302(1), 309–323.

- Dogra, G. S. 1973. Neurosecretion in *Rhodnius prolixus* and the problem of endocrine control of reproduction. *An. Entomol. Soc. Am.*, 66(5): 1011-1021.
- Duvall, L.B., Basrur, N.S., Molina, H., McMeniman, C.J., Vosshall, L.B. 2017. A peptide signaling system that rapidly enforces paternity in the *Aedes aegypti* mosquito. *Current Biology*, 27:3734–3742.
- Elekonich, M.M., Horodyski, F.M. 2003. Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla. *Peptides* 24, 1623-1632.
- Elekonich, M.M., Robinson, E.G. 2000. Organizational and activational effects of hormones on insect behavior *J Insect Physiol.* 46(12):1509-1515.
- F.M. Barrett, I. Orchard, V. Te Brugge. Characteristics of serotonin-induced cyclic AMP elevation in the integument and anterior midgut of the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus* *J. Insect Physiol.*, 39 (1993), pp. 581-587.
- Feder, D., Mello, C.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., 1997. Immune responses in *Rhodnius prolixus*: Influence of nutrition and ecdysone. *J. Insect Physiol.* 43, 513-519.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7, 862-874.
- Figueiredo, M.B., Castro, D.P., NF, S.N., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2006. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. *J Insect Physiol* 52, 711-716.
- Figueiredo, M.B., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2008a. Blockades of phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptors reduce the hemocyte phagocytosis in *Rhodnius prolixus*: In vitro experiments. *J. Insect Physiol.* 54, 344-350.
- Figueiredo, M.B., Genta, F.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2008b. Lipid mediators and vector infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis by modulation of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase activities. *J. Insect Physiol.* 54, 1528-1537.
- Flatt, T., Heyland, A., Rus, F., Porpiglia, E., Sherlock, C., Yamamoto, R., Garbuzov, A., Palli, S.R., Tatar, M., Silverman, N., 2008. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 211, 2712-2724.
- Fónagy, A. 2006. Insect Neuropeptides and their Potential Application for Pest Control, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 41, 137-152.
- Funk, C.D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Garcia, E.S., Azambuja, P., 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today* 7, 240-244.

- Garcia, E.S., Azambuja, P., 2004. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Toxicon* 44, 431- 440.
- Garcia, E.S., Cabral, M.M., Schaub, G.A., Gottlieb, O.R., Azambuja, P., 2000. Effects of lignoids on a hematophagous bug, *Rhodnius prolixus*: feeding, ecdysis and diuresis. *Phytochemistry* 55, 611-616.
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Genta, F.A., Azambuja, P. 2009. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors* 2, 33.
- Garcia, E.S., Feder, D., Gomes, J.E., Rembold, H. 1990. Short- and long-term effects of azadirachtin A on development and egg production of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 11-15.
- Garcia, E.S., Gonzalez, M.S., Azambuja, P., Rembold, H., 1989. Chagas' disease and its insect vector. Effect of azadirachtin A on the interaction of a triatomine host (*Rhodnius prolixus*) and its parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Z. Naturf.* 44, 317-322.
- Garcia, E.S., Machado, E.M., Azambuja, P. 2004. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.* 50, 157-165.
- Gonzalez, M.S., Garcia, E.S., 1992. Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: long-terms and comparative studies. *J. Inverteb. Pathol.* 60, 201-205.
- Gonzalez, M.S., Hamed, A., Albuquerque-Cunha, J.M., Nogueira, N.F., De Souza, W., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., Mello, C.B., 2006. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 114, 297-304.
- Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F., Mello, C.B., De Souza, W., Schaub, G.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., 1999. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 92, 100-108.
- Goodwin, T.W., Horn, D.H.S., Karlson, P., Koolman, J., Nakanishi, K., Robbins, W.E., Siddall, J.B., Takemoto, T., 1978. Ecdysteroids: a new generic term. 1978. *Nature* 272, 122-123.
- Gullan, P., Cranston, P. The insects. An outline of Entomology. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 2014.
- Han, P., Han, J., Fan, J., Zhang, M., Ma, E., Li, S., Fan, R., Zhang, J. 2017. 20-Hydroxyecdysone activates PGRP-SA mediated immune response in *Locusta migratoria*. *Dev Comp Immunol.* 72:128-139.

- Hartenstein, V. 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 190, 555-570.
- Heinrich R, Wirmer A. Chapter 2 - Regulation of acoustic sensory-to-motor processing in insects in *Neuroendocrine Regulation of Animal Vocalization, 2021. Mechanisms and Anthropogenic Factors in Animal Communication 2021*, Pages 13-29.
- Hergarden, A.C., Tayler, T.D., Anderson, D.J. 2012. Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(10):3967-72.
- Hummon, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E., Sweedler, J. V., 2006. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the Apis brain. *Science* 314, 647–649.
- Imler, J.L. 2014. Overview of *Drosophila* immunity: a historical perspective. *Dev Comp Immunol.* 42(1):3-15.
- Ionescu, A. & Donini, A. 2012. AedesCAPA-PVK-1 displays diuretic and dose dependent antidiuretic potential in the larval mosquito *Aedes aegypti* (Liverpool). *J. Insect Physiol.* 58, 1299–1306.
- Johnston, D.M., Sedkov, Y., Petruk, S., Riley, K.M., Fujioka, M., Jaynes, J.B., Mazo, A. 2011. Ecdysone- and NO-mediated gene regulation by competing EcR/Usp and E75A nuclear receptors during *Drosophila* development. *Mol Cell.* 44(1):51-61.
- Kaneko, Y., Hiruma, K. 2014. Short neuropeptide F (sNPF) is a stage-specific suppressor for juvenile hormone biosynthesis by corpora allata, and a critical factor for the initiation of insect metamorphosis. *Dev. Biol.* 393:312–19.
- Kataoka, H., Toschi A., Li J.P., Carney R.L., Schooley D.A., Kramer S.J. 1989. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* 243, 1481-1483.
- Kim, Y., Stanley, D. 2021. Eicosanoid Signaling in Insect Immunology: New Genes and Unresolved Issues. *Genes (Basel)*, 12(2):211.
- Kinjoh, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K., Shinoda, T. 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: Cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem Mol Biol*, 37: 807– 818.
- Kistler, K.E., Vosshall, L.B., Matthews, B.J. 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep* 2015, 11: 51–60.
- Klowden, M. J. 2013. Signaling Systems. *Physiological Systems in Insects – Third Edition*, 1–87. doi:10.1016/b978-0-12-415819-1.00001-5.
- Klowden, M.J. 2007. Physiological systems in Insects. In Elsevier/Academic, Press, London, pp 668.

Knoblock, C.A., Steel C.G.H. 1989. The timing of release of prothoracothropic hormone in relation to the head critical period during larval – adult development in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera): evidence from head transplantation experiments. *J. Insect Physiol.* 35, 459-464.

Kollien, A.H., Schaub, G.A. 1999. The effect of azadirachtin on *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* (Insecta, Hemiptera). *Int. J. Parasitol.* 29, 403-414.

Kópec, S. 1917. Experiments on metamorphosis of insects. *Bull. Int. Acad. Cracovie, B:* 57-60.

Kopeć, S. 1922. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *The Biological Bulletin*, 42(6), 323–342.

Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfune, Y., Numata, H. 2009. Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Org. Lett.* 19, 5234-5237.

Kruger, F.L., Davey, K.G., 1982. Ovarian motility in mated *Rhodnius prolixus* requires an intact cerebral neurosecretory system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 130–134.

Loher, W., Ganjian, I., Kubo, I., Stanley-Samuelson, D., Tobe, S.S. 1981. Prostaglandins: Their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 78, 7835-7838.

Ma, H., Abbas, M.N., Zhang, K., Hu, X., Xu, M., Liang, H., Kausar, S., Yang, L., Cui, H., 2019. 20-Hydroxyecdysone regulates the transcription of the lysozyme via Broad-Complex Z2 gene in silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol* 94, 66-72.

Machado E.M., Azambuja P., Garcia E.S. 2006. Web 2086, a platelet - activating factor antagonist, inhibits prophenoloxidase – activating system and hemocyte microaggregation reactions induced by *Trypanosoma rangeli* infection in *Rhodnius prolixus* hemolymph. *J. Insect Physiol.* 52, 685-692.

Maddrell, S.H.P. 1963. Control of ingestion in *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature Lond.*, 198: 210.

Magoski, N.S. Chapter 7 - Electrical Synapses and Neuroendocrine Cell Function, Editor(s): Jian Jing, Network Functions and Plasticity, Academic Press, 2017, Pages 137-160.

Mai, T., Chen, S., Lin, X., Zhang, X., Zou, X., Feng, Q., Zheng, S., 2017. 20-hydroxyecdysone positively regulates the transcription of the antimicrobial peptide, lebecin, via BmEts and BmBR-C Z4 in the midgut of *Bombyx mori* during metamorphosis. *Dev Comp Immunol* 74, 10-18.

Marchal, E., Zhang, J., Badisco, L., Verlinden, H., Hult, E.F., Van Wielendaele, P., Yagi, K.J., Tobe, S.S., Vanden Broeck, J. 2011. Final steps in juvenile hormone biosynthesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol*, 41: 219–227.

Matsumoto, S., Kutsuna, N., Daubnerová, I., Roller, L., Žitňan, D., Nagasawa, H., & Nagata, S. 2019. Enteroendocrine peptides regulate feeding behavior via controlling intestinal contraction of the silkworm *Bombyx mori*. PLOS ONE, 14(7), e0219050.

Medeiros, M.N., Mendonça, L.H., Hunter, A.L., Paiva-Silva, G.O., Mellom F.G., Henze, P., Masuda H., Maya-Monteiro, C.M., Machado, E.A. 2004. The role of lipoxigenase products on the endocytosis of yolk proteins in insects: participation of cAMP. Arch. Insect Biochem. Physiol. 55, 178-187.

Medeiros, M.N., Oliveira, D.M.P., Paiva-Silva, G.O., Silva-Neto, M.A.C., Romeiro-Bozza, A.M., Masuda, H., Machado, E.A. 2002. The role of eicosanoids on *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) endocytosis by *Rhodnius prolixus* ovaries. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 537-545.

Meijer, L., Maclouf, J., Bryant, R.W. 1986. Contrasting effects of fatty acids on oocyte maturation in several starfish species. Prostaglandins Med. 23, 179-184.

Meister, M., Richards, G. 1996. Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterin gene in *Drosophila* larvae. Insect Biochem Mol Biol. 26(2):155-60. doi: 10.1016/0965-1748(95)00076-3.

Nasirudian, M., Mordue, A.J. 1993. The effect of azadirachtin in the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Cell 25, 875- 884.

Nassel, D.R., 2002. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. Prog. Neurobiol. 68, 1e84.

Nassel, D.R., Zandawala, M. 2019. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. Prog Neurobiol. 179:101607.

Nogueira, N.F., Gonzales M.S., Garcia E.S., de Souza W. 1997. Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. J. Inverteb. Pathol. 69, 58-63.

Nouzova, M., Rivera-Pérez C., Noriega, F.G. 2018. Omics approaches to study juvenile hormone synthesis, *Current Opinion in Insect Science*, 29: 49-55.

Nunes, C., Sucena, É., Koyama, T. 2021. Endocrine regulation of immunity in insects. FEBS J. 288(13):3928-3947.

Ons, S. 2017. Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. J Insect Physiol ;97:77-92.

Ons, S., Lavore, A., Sterkel, M., Wulff, J.P., Sierra, I., Martinez Barnetche, J., Rodriguez, M.H., Rivera-Pomar, R., 2016. Identification of G protein coupled receptors for opsines and neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and transcriptomic analysis. Insect Biochem. Mol. Biol. 69, 34–50.

Orchard, I. 2006. Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Int. Physiol.* 144, 316-324.

Orchard, I., Loughton, B.G. 1985. Neurosecretion. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Vol. 7 Endocrinology I. Oxford: Pergamon Press. P 61–107.

Ou, Q., Zeng, J., Yamanaka, N., Brakken-Thal, C., O'Connor, M.B., King-Jones, K. 2016. The Insect Prothoracic Gland as a Model for Steroid Hormone Biosynthesis and Regulation. *Cell Rep.* 16(1):247-262.

Paluzzi, J.P., Orchard, I., 2010. A second gene encodes the anti-diuretic hormone in the insect, *Rhodnius prolixus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 317, 53–63.

Paluzzi, J.P., Russell, W.K., Nachman, R.J., Orchard, I., 2008. Isolation, cloning, and expression mapping of a gene encoding an antidiuretic hormone and other CAPA-related peptides in the disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Endocrinology* 149, 4638–4646.

Park, D., Veenstra, J.A., Park, J.H., Taghert, P.H. 2008. Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: whereDIMM fits in. *PLOS ONE* 3: e1896.

Park, Y., Aliza, A.R., Stanley, D. 2005. A secretory PLA₂ associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations act in cellular immune reactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 105-115.

Park, Y.; Zitnan, D., Gill, S.; Adams, M. 1999. Molecular cloning and biological activity of ecdysis-triggering hormones in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.*, V. 463, p. 133–138.

Perlowagora-Szumlewicz, A., Petana, W.B., Figueiredo, M.J. 1975. The evaluation of host efficiency and vector potential of laboratory juvenilized vectors of Chagas' disease. I. Effects of developmental changes included by juvenile hormone analogues in *Panstrongylus megistus* (hemipterareduviidae) on the susceptibility of the insects to gut infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 17, 97-102.

Pratavieira M, Menegasso ARDS, Esteves FG, Sato KU, Malaspina O, Palma MS. 2018. MALDI Imaging Analysis of Neuropeptides in Africanized Honeybee (*Apis mellifera*) Brain: Effect of Aggressiveness. *J Proteome Res.* 2018 Jul 6;17(7):2358-2369. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00098.

Quinlan, M.C., Tublitz, N.J., O'Donnell, M.J. 1997. Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J. Exp. Biol.* 100, 2363-2367.

Raabe, M. 1989. Recent developments in insect neurohormones. New York: Plenum Press.

Regan, J., Brandão, A.S., Leitão, A.B., Dias, A.R.M., Sucena, E., Jacinto, A., Zaidman-Rémy, A. 2013. Steroid hormone signaling is essential to regulate innate immune cells and fight bacterial infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 9: e1003720.

- Rewitz, K.F., Yamanaka, N., Gilbert, L.I., O'Connor, M.B. 2009. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science*, 326(5958):1403-5.
- Rewitz, K.F., Yamanaka, N., O'Connor, M.B. 2010. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Dev Cell*; 19:895–902.
- Reynolds, R.A. *et al.*, (2020) 20-Hydroxyecdysone Primes Innate Immune Responses That Limit Bacterial and Malarial Parasite Survival in *Anopheles gambiae*. *mSphere* 5.
- Rivera-Perez, C., Nouzova, M., Lamboglia, I., Noriega, F.G. 2014. Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology. *Insect Biochem Mol Biol*, 51: 1–9.
- Rolandelli, A., Nascimento, A.E.C., Silva, L.S., Rivera-Pomar, R., Guarneri, A.A. 2021. Modulation of IMD, Toll, and Jak/STAT Immune Pathways Genes in the Fat Body of *Rhodnius prolixus* During *Trypanosoma rangeli* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 10:598526.
- Rus, F. *et al.*, (2013) Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity. *EMBO J*. 32: 1626– 1638.
- Sagi, A., Silkovsky, J., Fleisher-Berkovich, S., Danon, A., Chayoth, R. 1995. Prostaglandin E₂ in previtellogenic ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: synthesis and effect on the level of cAMP. *Gen. Comp. Endocrinol*. 100, 308-313.
- Sajadi, F., Curcuruto, C., Al Dhaheri, A. & Paluzzi, J.-P. Anti-diuretic action of a CAPA neuropeptide against a subset of diuretic hormones in the disease vector *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol*. 221, (2018).
- Sajadi, F., Uyklu, A., Paputis, C., Lajevardi, A., Wahedi, A., Ber, L.T., Matei, A., Paluzzi, J.V. 2020. CAPA neuropeptides and their receptor form an anti-diuretic hormone signaling system in the human disease vector, *Aedes aegypti*. *Sci Rep*. 10(1):1755.
- Sajadi, F., Uyklu, A., Paputis, C., Lajevardi, A., Wahedi, A., Ber, L. T., Paluzzi, J.P. V. 2020. CAPA neuropeptides and their receptor form an anti-diuretic hormone signaling system in the human disease vector, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 10(1).
- Salcedo-Porras, N., Guarneri, A., Oliveira, P.L., Lowenberger, C., 2019. *Rhodnius prolixus*: Identification of missing components of the IMD immune signaling pathway and functional characterization of its role in eliminating bacteria. *PLoS One* 14, e0214794.
- Scherkenbeck, J., Zdobinsky, T. 2009. Insect neuropeptides: Structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. V.17, p. 4071-4084.

- Schoofs, L., De Loof, A., Van Hiel, M.B. 2017. Neuropeptides as Regulators of Behavior in Insects. *Annu Rev Entomol.* 62:35-52.
- Shiga, S., Davis, N.T., Hildebrand, J.G. 2003. Role of neurosecretory cells in the photoperiodic induction of pupal diapause of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J Comp Neurol.* 462(3):275-85.
- Shrestha, S., Kim, Y. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 99-112.
- Stanley D., Rana R.L., Pedibhotla V.K., Miller J.S., Jurenka R.A. 1997. Eicosanoids mediate microaggregation and nodulation responses to bacterial infections in black cutworms, *Agrotis ipsilon*, and true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Insect Physiol.* 43, 125-133.
- Stanley, D. 2006. The non-venom insect phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1383-1390.
- Stanley, D., Kim, Y. 2019. Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biosynthesis and Biological Actions. *Front Physiol.* 9:1927.
- Stanley, D.W., Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119, 1-13.
- Stanley, D.W., Nor Aliza, A.R., Tunaz, H., Putnam, S.M., Park, Y., Bedick, J.C. 2002. Eicosanoids in insect biology. *Neotropic Entomol.* 31, 341-350.
- Steel, C.G., Vafopoulou, X., 2006. Circadian orchestration of developmental hormones in the insect, *Rhodnius prolixus*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A. Mol. Integr. Physiol.* 144, 351–364.
- Stoka, A. 1987. Ecdysteroids, juvenils hormones and metamorphosis in triatominae. In: *Chagas Disease Vectors (Anatomic and Physiological aspects)*. Brenner RR, Stoka AM eds. 2, 71-99.
- Stone, J. V.; Mordue, W.; Batley, K. E.; Morris, H. R. 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*, 263, 207.
- Strand, M.R., Brown, M.R., Vogel, K.J. 2016. Mosquito peptide hormones: diversity, production, and function. *Adv Insect Physiol.* 51:145–88.
- Telleria, E.L., Martins-da-Silva, A., Tempone, A.J., Traub-Csekö, Y.M. 2018. Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10):1336-1353.
- Terhzaz, S. 2012. Mechanism and function of *Drosophila* capa GPCR: a desiccation stress-responsive receptor with functional homology to human neuromedinU receptor. *PLoS One* 7, e29897.
- Terra, W.R. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734.

Thomsen, E. 1948. Effect of Removal of Neurosecretory Cells in the Brain of Adult *Calliphora erythrocephala* Meig. *Nature* 161, 439–440.

Thomsen, E., 1952. Functional significance of the neurosecretory brain cells and the corpus cardiacum in the female blowfly, *Calliphora erythrocephala* Meig. *J. Exp. Biol.* 29, 137e172.

Tunaz H., Park Y., Büyükgüzel K., Bedick J.C., Nor Aliza A.R., Stanley D.W. 2003. Eicosanoids in insect immunity: bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A₂ activity in tobacco hornworms. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52, 1- 6.

Ursic-Bedoya, R., Buchhop, J., Lowenberger, C. 2009. Cloning and characterization of Dorsal homologues in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.* 18, 681- 689.

Vafopoulou, X. e Steel, C. 2006. Ecdysteroid hormone nuclear receptor (EcR) exhibits circadian cycling in certain tissues, but not others, during development in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Cell Tissue Res.* 323: 443-55.

Vafopoulou, X., Steel, C.G. 1989. Developmental and diurnal changes in ecdysteroid biosynthesis by prothoracic glands of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) in vitro during the last larval instar. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 484-493.

Vieira, C.S., Moreira, O.C., Batista, K.K.S., Ratcliffe, N.A., Castro, D.P., Azambuja, P., 2018. The NF-κB Inhibitor, IMD-0354, Affects Immune Gene Expression, Bacterial Microbiota and *Trypanosoma cruzi* Infection in *Rhodnius prolixus* Midgut. *Front Physiol* 9, 1189.

Vieira, C.S., Waniek, P.J., Castro, D.P., Mattos, D.P., Moreira, O.C., Azambuja, P., 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors* 9, 119.

Vieira, C.S.; Figueiredo, M. B.; Moraes, C. S.; Pereira S.B.; Dyson, P.; Mello, CB; Castro, DP; Azambuja, P. 2021. Azadirachtin interferes with basal immunity and microbial homeostasis in the *Rhodnius prolixus* midgut. *Developmental and Comparative Immunology.* 114:103864.

Wang, J.L., Chen, L., Tang, L., Zhao, H.B., Liu, X.S., Wang, Y.F. 2014. 20-hydroxyecdysone transcriptionally regulates humoral immunity in the fat body of *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol.* 23(6):842-56.

Weaver, R.J., Audsley, N. 2009. Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis: structures, functions, distribution, and unanswered questions. *Ann. New York Acad. Sc.* 1163, 316-329.

Wegener, C., & Veenstra, J. A. 2015. Chemical identity, function and regulation of enteroendocrine peptides in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 11, 8–13.

- Werling, K. *et al.*, 2019. Steroid Hormone Function Controls Non-competitive *Plasmodium* Development in *Anopheles*. *Cell* 177:315-325.
- Weyer, F., 1935. Ueber driisenartige nervenzellen im gehirn der honigbiene, *Apis mellifica* L. *Zool. Anz* 112, 137e141.
- White, B.H., Ewer J. 2014. Neural and hormonal control of postecdysial behaviors in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 59:363–81.
- Wigglesworth V.B. 1972. The principles of insect physiology. Ed. Chapman e Hall, 7thed., London, 827p.
- Wigglesworth, V. B., (1934a) - The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Quart. J. Micr. Sci.*, 77: 191-222.
- Wigglesworth, V. B., (1934b) - Factors controlling moulting and metamorphosis in an insect. *Nature* (London), 135: 725-726.
- Wigglesworth, V. B., (1935) - Function of the *corpus allatum* in insects. *Nature* (London), 137: 338.
- Wigglesworth, V. B., (1936) - The function of the *corpus allatum* in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Micr. Sci.*, 79: 91.
- Williams, C. M., 1948. Extrinsic control of morphogenesis as illustrated in the metamorphosis of insects. *Growth Symposium*, 12: 61-74.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G. 2008. The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 4(7): e1000098.
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F., O'Connor, M.B. 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol*; 58:497-516.
- Zhu, L.; Zhang, W.; Li, G.; Sun, Q.; Wang, J.; Smagghe, G. 2019. Molecular characterization of ecdysis triggering hormone and its receptor in citrus red mite (*Panonychus citri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 230, p. 100-105.
- Zitnan, D., Kim, Y.J., Zitnanova, I., Roller, L., Adams, M.E. 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen Comp Endocrinol* 153:88–96.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 5

Comunicação química: olfação

Nathália F. Brito^{1§}
Victória B. Lamim¹
Pamela Winnie C. Ramos¹
Daniele S. Oliveira¹
Gabrielle C. M. Cabo¹
Larissa S. Oliveira¹
Ana Claudia A. Melo¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

[§]Endereço atual: Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Nathália F. Brito, Victória B. Lamim, Pamela Winnie C. Ramos, Daniele S. Oliveira, Gabrielle C. M. Cabo, Larissa S. Oliveira, Ana Claudia A. Melo]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Apesar de não existir uma estimativa precisa da quantidade de moléculas de odor presentes na natureza (Gilbert, 2008), o sistema olfativo dos animais é capaz de discriminar semioquímicos de forma acurada. Os seres humanos, por exemplo, são capazes de identificar mais de 1 trilhão de estímulos olfativos (Bushdid et al., 2014). Os animais, por sua vez, conseguem distinguir um conjunto quase infinito de semioquímicos e, por este motivo, têm sido objeto de estudos em diversas áreas de pesquisa. A importância da pesquisa sobre os mecanismos moleculares envolvidos na percepção de odores foi reconhecida pela concessão do Prêmio Nobel de Medicina aos pesquisadores Richard Axel e Linda Buck, em 2004 (Belluscio et al., 1998; Buck & Axel, 1991; Buck et al., 1983; Chess et al., 1992; Ngai et al., 1993).

Para entender como um sinal químico, presente no ambiente, desencadeia um impulso elétrico na membrana de um neurônio sensorial olfativo (NSO), quatro princípios organizacionais foram propostos por Axel e Buck (2004): (i) existiria uma grande variação no número de genes que codificam receptores olfativos (OR), nas diferentes espécies. Tal questionamento foi comprovado com os dados oriundos dos projetos genomas, durante os quais foram identificados mais de 400 OR em humanos (Olender et al., 2012), em torno de 1.000, em camundongos (Niimura, 2012) e, em insetos, variando entre 10 (Phthiraptera) a mais de 400 (Hymenoptera) (Kirkness et al., 2010; Zhou et al., 2012); (ii) cada NSO expressaria um único OR, dentro de um vasto repertório; (iii) NSO que expressam o mesmo OR convergem para um mesmo glomérulo nas estruturas de processamento primário, tanto no lobo antenal de insetos quanto no bulbo olfatório de mamíferos, formando mapas odortópicos no cérebro; e (iv) cada odor é codificado de uma maneira combinatória: um odor pode ativar múltiplos OR e cada OR pode responder a múltiplos estímulos (Hallem & Carlson, 2006; Malnic et al., 1999). Porém, é relevante destacar que essa visão canônica do funcionamento do sistema olfativo em insetos, na qual o NSO expressaria um único OR definindo sua seletividade, não se aplica ao mosquito *Aedes aegypti*.

Recentemente, Herre e colaboradores (2022), usando registro eletrofisiológico, mostraram uma ampla sensibilidade dos NSO a diferentes ligantes, o que só seria possível pela expressão de vários OR. A redundância proporcionada por um sistema olfativo, no qual os NSO co-expressam múltiplos OR, aumentaria a robustez do sistema olfativo no mosquito. Segundo os autores, isso explicaria nossa incapacidade, de longa data, de interromper a detecção de voláteis produzidos por seres humanos pelo mosquito *Ae. aegypti* (Herre et al., 2022).

Morfologia do sistema olfativo periférico

Nos insetos, o processo de olfação é muito importante e ocorre, basicamente, nas antenas, que apresentam uma grande diversidade quanto à morfologia. (Figura 1). Os diferentes formatos das antenas refletem a adaptação de cada espécie ao seu meio ambiente (Figura 2). Entretanto, apesar da variedade morfológica, todas têm função semelhante, na qual a detecção de moléculas de odor é fundamental (Schneider, 1964). As antenas são estruturas segmentadas, em geral, apresentando três segmentos denominados: escapo, pedicelo e flagelo. Os diversos segmentos apresentam estruturas quitinosas, chamadas sensilas, que possuem morfologia variada. Apesar das suas diferentes formas, as sensilas compartilham certo grau de organização e função, sendo responsáveis por abrigar os dendritos dos NSO. As sensilas olfativas abrigam um número variável de NSO, entre 1 a 50 (Zacharuk, 1980).

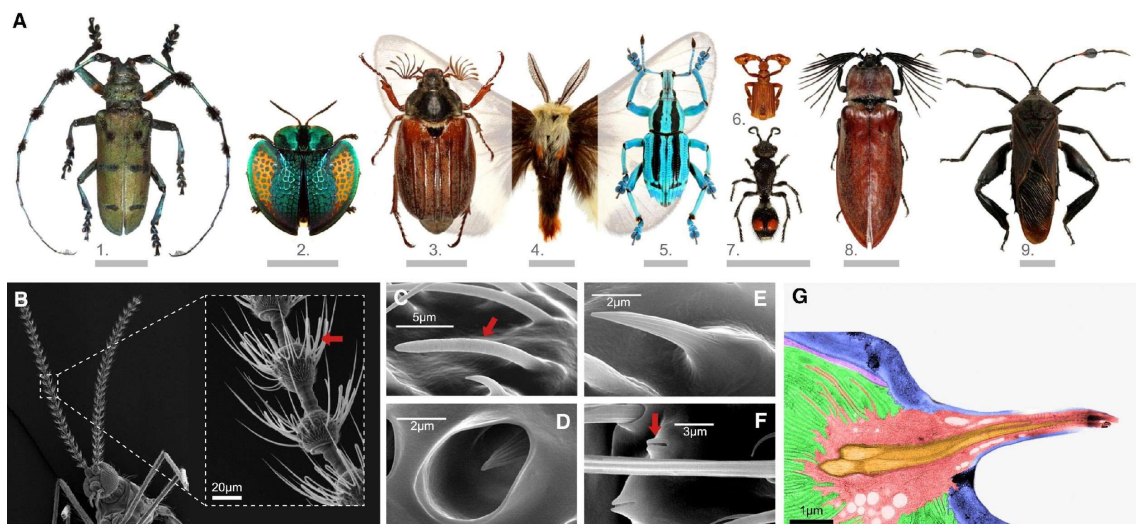


Figura 1: Diversidade de tipos de antenas em diferentes insetos. (1) *Diastocera wallichii* (Coleoptera; Cerambycidae); (2) besouro tartaruga, tribo Cassidini (Coleoptera: Chrysomelidae); (3) *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae); (4) *Hemileuca nevadensis* (Lepidoptera: Saturniidae); (5) *Euphotos bennetti* (Curculionidae), (6) besouro-do-chão, (Coleoptera: Paussidae); (7) formiga veludo (Hymenoptera; Mutillidae); (8) besouro do clique, (Coleoptera: Elateridae); e (9) percevejo foliar (Hemiptera: Coreidae).

Fonte: Adaptado de Hansson & Stensmyr 2011

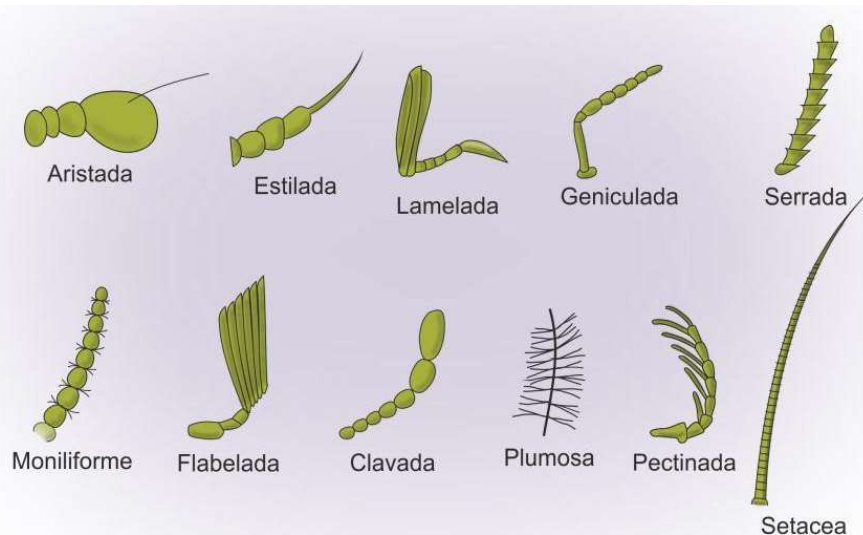


Figura 2: Desenho esquemático mostrando alguns tipos de antenas encontradas em diferentes grupos de insetos.

Fonte: Adaptado de <http://bugguide.net/node/view/110174>

Sensilas olfativas

As sensilas olfativas são responsáveis pela detecção de compostos orgânicos voláteis (COV) presentes no ar. São estruturas cuticulares originárias, a partir de células epidérmicas auxiliares, as células tricógenas, e abrigam os NSO. Schneider (1964) classificou as sensilas de acordo com a morfologia externa e com a forma de inserção, em 10 diferentes tipos: (1) tricoide, (2) caética, (3) basicônica, (4) celocônica, (5) ampulácea, (6) esquamiforme, (7) campaniforme, (8) placoide, (9) escolopidial e (10) estilocônica. As sensilas também são classificadas quanto à presença, quantidade, estrutura e posição de poros na parede cuticular, características determinantes para a sua função. Assim, quanto à presença de poros, as sensilas podem ser: (a) aporosas, basicamente mecanorreceptoras; (b) uniporosas, sensilas quimiorreceptoras ou com função mista, químico e mecanorreceptora; (c) multiporosas lisas de parede fina, essencialmente quimiorreceptoras; (d) multiporosas lisas de parede espessa e, (f) multiporosas sulcadas, ambas, basicamente, olfativas (Altner et al., 1977; Zacharuk, 1980).

Cada sensila olfativa apresenta uma cavidade distal, onde são encontrados os dendritos dos NSO, que são preenchidos por um líquido chamado linfa sensilar (Figura 4). Os poros, na superfície da cutícula, permitem a entrada das moléculas de odor, que, depois de dissolvidas na linfa sensilar, são apresentadas ao OR presente na membrana dos NSO. Os tipos mais comuns de

sensilas quimiorreceptoras são: (i) as tricoides, com longas cerdas, inervadas por pequeno número de NSO (1-3) e com dendritos não ramificados; (ii) as basicônicas, com cerdas curtas e robustas, inervadas por uma quantidade variável de NSO (1-50), apresentando cutícula fina, com alta densidade de poros; (iii) as placoides, sensilas com um número variável de células sensoriais (2-50), dendritos ramificados e situados embaixo de uma estrutura do tipo “placa cuticular”; (iv) as celocônicas, com uma estrutura externa pequena do tipo “pino”, usualmente situada em uma cavidade, com moderada quantidade de células sensoriais (3-5), apresentando dendritos ramificados e poros dentro de fendas longitudinais; e (v) as caéticas, em forma de longas cerdas, um poro apical, 4-5 células sensoriais, entre as quais uma pode ser mecanossensorial e quatro gustativas (Hallberg & Hansson, 1999).

Neurônios sensoriais olfativos (NSO)

Os NSO de insetos são, anatomicamente, semelhantes aos de mamíferos. Entretanto, eles não se encontram expostos ao ambiente na superfície de um epitélio, mas dentro das cerdas sensoriais especializadas chamadas sensilas, já descritas anteriormente (Stocker, 1994). Esses neurônios são bipolares, com um corpo celular grande, de onde se projeta um dendrito, que se estende dentro da projeção cuticular, e um axônio, que se prolonga pela antena, através do nervo antenal, até o cérebro do inseto (McIver, 1974; Slifer & Sekhon, 1977).

Células acessórias

Várias células epidérmicas especializadas embainham os neurônios nas sensilas. Existem quatro tipos celulares distintos: três que envolvem, sucessivamente, os dendritos e a parte distal do corpo celular e uma que envolve a parte restante do corpo celular e do axônio. Algumas sensilas apresentam de duas a cinco células acessórias, e são denominadas de células tricógenas, tormógenas, tecógenas, acessórias ou intermediárias, e neurilemas ou gliais. A Figura 3 apresenta um desenho esquemático das estruturas que compõem uma sensila olfativa.

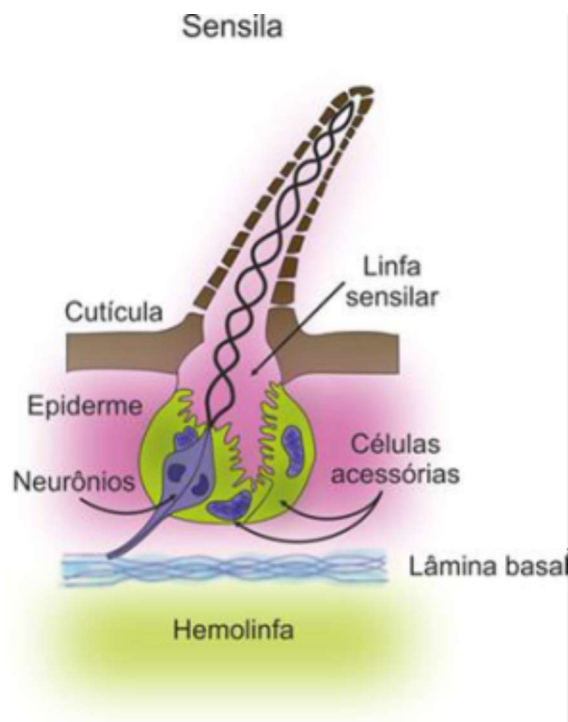


Figura 3: Desenho esquemático das estruturas que compõem uma sensila olfativa de inseto.

Fonte: Arquivo pessoal

Transdução do sinal olfativo

As sensilas apresentam poros pelos quais os COV adentram o organismo; porém, a maioria desses compostos são apolares. Para alcançar os OR, é necessário que sejam transportados, através da linfa sensilar, por proteínas transportadoras, que os protegem do contato com o ambiente hidrofílico e os transferem para o receptor na membrana do NSO (Brito et al., 2016).

A duração do percurso entre a chegada da molécula de odor (ao interior da sensila) e a sua interação com o receptor é crítica. Isso porque, é preciso garantir que a reação da célula, diante de mudanças na concentração do COV, seja quase imediata. Além disso, o sistema requer o rápido desaparecimento das moléculas de odor, de modo a deixar o receptor disponível para a detecção de novos estímulos. Tais condições são garantidas pela presença de uma série de proteínas, que são destinadas ao transporte (OBP, do inglês *odorant binding proteins* e CSP, *chemosensory proteins*), ao reconhecimento e desencadeamento do sinal elétrico (SNMP, *sensory neuron membrane proteins*, receptores olfativos-OR, receptores ionotrópicos-IR) e à degradação dos odores no espaço sensilar (ODE, enzimas degradadoras de odor).

A transformação do sinal químico em sinal elétrico é desencadeada no momento em que o odor se liga ao OR, causando uma mudança conformacional na estrutura do complexo heteromérico. Essa mudança é formada pelo OR e pelo correceptor olfativo (ORCO) e leva à abertura de canais iônicos e ao extravasamento de íons entre os ambientes intra e extracelular (Sato et al., 2008). A alteração na concentração de íons dispara uma série de sinais intracelulares, culminando na despolarização da membrana do NSO e na transmissão do impulso nervoso. A seguir, apresentaremos a descrição de cada um desses componentes do sistema de transdução do sinal olfativo.

Proteínas ligadoras de odor (OBP)

As OBP são pequenas proteínas solúveis de, aproximadamente, 14 kDa, com 130 a 140 aminoácidos, responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas, tais como as moléculas de odor. Além disso, são expressas com um peptídeo sinal, que é removido durante o seu processamento.

As OBP de insetos são compostas por seis α -hélices dobradas em estruturas globulares muito compactas (Brito et al., 2020). Muitas OBP possuem, em sua estrutura primária, seis resíduos de cisteína em um padrão assimétrico que as caracteriza estruturalmente. Essas cisteínas formam pontes de dissulfeto, que estabilizam a sua estrutura tridimensional, garantindo a sua função (Briand et al., 2001; Leal et al., 1999) (Figura 4).

As OBP envolvidas na detecção de odores são expressas e sintetizadas pelas células acessórias e secretadas na linfa sensilar, onde são encontradas em altas concentrações (Brito et al., 2016). Por isso, essas proteínas são responsáveis pela conexão entre o ambiente externo e os receptores olfativos. Uma vez que os odores penetram nos poros das sensilas, eles são solubilizados e transportados pelas OBP através da linfa sensilar e alcançam os dendritos, onde ativam OR ligados à membrana (Brito et al., 2016).

A primeira OBP caracterizada em insetos foi uma proteína de ligação de feromônio (PBP, do inglês *pheromone binding protein*) da antena de insetos machos do bicho-da-seda, *Antheraea polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981). Posteriormente, Kanaujia e Kaissling (1985) demonstraram que moléculas de feromônio eram facilmente solubilizadas na presença dessas proteínas, sugerindo que ocorria uma ligação entre a molécula de feromônio e a proteína.

Em 1995, Ozaki e colaboradores (1995) demonstraram que, na presença de anticorpo anti-OBP, a resposta eletrofisiológica de células gustativas era totalmente bloqueada na mosca *Phormia regina*. Isso evidenciou, mais uma vez,

que OBP estavam envolvidas no fenômeno de apresentação do estímulo ao neurônio. Estudos subsequentes mostraram que as OBP são importantes para o reconhecimento de COV e podem detectar e distinguir diversos odores (Mohl, Breer & Krieger, 2002; Xu et al., 2005; Laughlin et al., 2008; Biessmann et al., 2010; Pelletier et al., 2010). No barbeiro *Rhodnius prolixus*, por exemplo, o mapeamento proteômico das antenas mostrou a presença de 17 OBPs (Oliveira et al., 2017). Dentre elas, a OBP27, expressa especificamente em antenas de insetos machos, está envolvida na detecção de COV produzidos pelas fêmeas (Oliveira et al., 2018). Outra evidência da participação de OBP na apresentação de odores foi obtida a partir de mutantes de *Drosophila melanogaster* para a OBP-lush. Moscas com esse gene silenciado mostraram-se incapazes de responder à presença de etanol (Kim, Repp & Smith, 1998). Dessa forma, esses resultados reforçam a ideia de que a participação de OBP é essencial para a resposta correta de alguns estímulos olfativos em insetos.

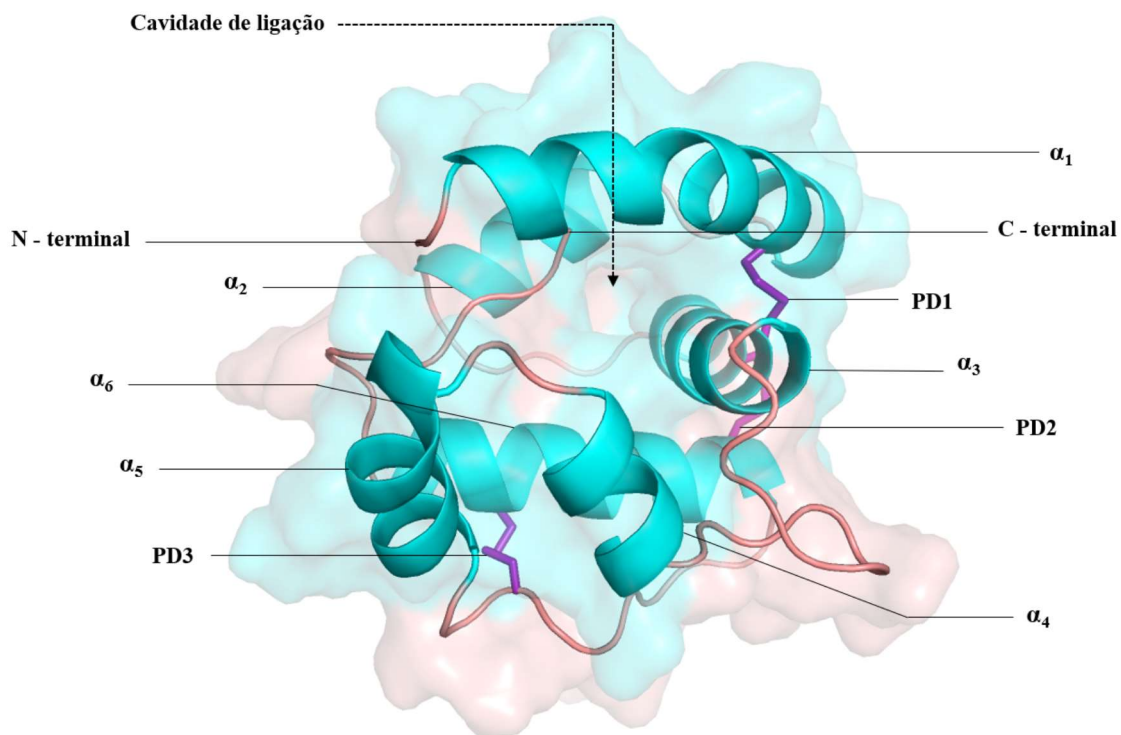


Figura 4: Modelo tridimensional da proteína ligadora de odor 17 de *R. prolixus* (RproOBP17). A estrutura foi determinada utilizando o servidor *online* Phyre2. Hélices são representadas em azul, *loops* em rosa e pontes de dissulfeto estão destacadas em violeta. A cavidade de ligação é observada na superfície construída para a proteína. as ilustrações foram elaboradas através do programa Pymol. A estrutura secundária predita para a RproOBP17 consiste em seis α -hélices: α_1 (resíduos 6 ao 23), α_2 (27 ao 34), α_3 (42 ao 54), α_4 (66 ao 72), α_5 (75 ao 89) e α_6 (96 ao 110). A análise da sequência também indicou a presença de três pontes de dissulfeto (PD) entre as posições Cys19-Cys50 (PD1), Cys46-Cys97 (PD2) e Cys88-Cys106 (PD3).

Fonte: Adaptado de Brito, 2021

Proteínas quimiosensoriais (CSP)

Além das OBP, outras proteínas solúveis pequenas também são encontradas na linfa sensilar, denominadas, de forma geral, de proteínas quimiosensoriais (CSP). Apesar de não relacionadas estruturalmente às OBP, as CSP apresentam função semelhante, ou seja, de transportar moléculas de odor (Pelosi et al., 2006). Existem algumas denominações para essas proteínas, entre elas: olfactory specific D ou OS-D (McKenna et al., 1994), proteínas quimiosensoriais ou CSP (Angeli et al., 1999; Mameli et al., 1996; Marchese et al., 2000; Picimbon et al., 2000) e sensory appendage proteins ou SAP (Robertson et al., 1999).

As CSP são pequenas proteínas ácidas solúveis com, aproximadamente, 12-13 kDa, que possuem 100 a 120 aminoácidos. Apesar de serem, funcionalmente, semelhantes, as CSP, diferem-se das OBP em relação à sua sequência primária. As CSP são caracterizadas por apresentarem uma estrutura terciária com seis alfa-hélices, um lado interno hidrofóbico e uma menor afinidade aos ligantes do que às OBP. Por serem mais flexíveis, podem realizar mudanças conformacionais para se adaptar a diferentes ligantes, com uma variedade maior de tamanhos e formas. Além disso, as proteínas apresentam 4 resíduos de cisteínas em posição conservada (C1-X 6-8 -C2-X 16-21 -C3-X 2 -C4), formando duas pontes de dissulfeto (Figura 5).

Curiosamente, além das antenas, as OBP e as CSP foram encontradas em outros tecidos, desempenhando diferentes funções. Nomura e colaboradores (1992) identificaram uma CSP funcionando como um regulador positivo na regeneração de pernas da barata americana, *Periplaneta americana*. Algumas CSP foram encontradas em glândulas de feromônios ou no órgão reprodutor de diferentes insetos, como *Mamestra brassicae* (Jacquin-Joly et al., 2001), *Bombyx mori* (Dani et al., 2011) e *Agrostis ipsilon* (Gu et al., 2013), todas envolvidos na liberação de semioquímicos para o meio ambiente. Por outro lado, a OBP10 de *Helicoverpa armigera* e *H. assulta* (Sun et al., 2012; Aniruddha, Liu & Xu 2021) e a OBP22 de *Aedes aegypti* (Li et al., 2008) foram encontradas no fluido seminal de machos e estão envolvidas na detecção de feromônios durante o acasalamento (Ban et al., 2013; Zhou et al., 2013).

No transcriptoma do intestino de *R. prolixus*, foram encontradas algumas OBP (Ribeiro et al., 2014) e, apesar da função nesse órgão ainda não estar totalmente clara, os autores sugerem a participação dessas proteínas no transporte de biomoléculas oriundas da digestão do sangue, principalmente lipídeos.

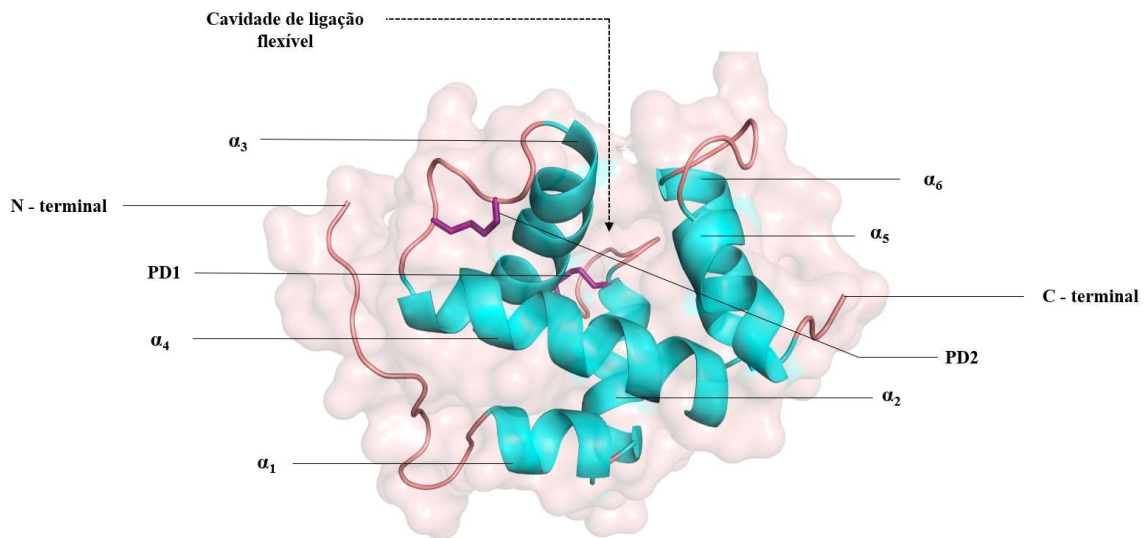


Figura 5: Modelo tridimensional da proteína quimiossensorial CSP RPRC007979-PA de *R. prolixus*. A estrutura foi determinada utilizando o servidor *online* Phyre2. Hélices são representadas em azul, *loops* em rosa e pontes de dissulfeto estão destacadas em violeta. A cavidade de ligação é observada na superfície construída para a proteína. As ilustrações foram elaboradas através do programa Pymol. A estrutura secundária predita para a CSP007979 consiste em seis α -hélices: α_1 (resíduos 14 ao 18), α_2 (21 ao 33), α_3 (39 ao 53), α_4 (61 ao 77), α_5 (79 ao 89) e α_6 (93 ao 104). A análise da sequência também indicou a presença de duas pontes dissulfeto (PD) entre as posições Cys35-Cys42 (PD1) e Cys61-Cys64 (PD2). Cys: cisteína.

Fonte: Arquivo pessoal

Receptores quimiosensoriais

Três tipos de receptores quimiosensoriais são conhecidos em insetos: (i) receptores olfativos (OR), que não apresentam homologia com os OR de vertebrados; (ii) receptores gustativos (GR), estruturalmente relacionados com os GR de vertebrados; e (iii) receptores ionotrópicos (IR), proteínas receptoras estruturalmente relacionadas aos receptores de glutamato das sinapses, que recebem estímulos de motoneurônios no sistema nervoso central. Os OR são expressos, basicamente, nas sensilas basicônicas e tricoides. Os GR são, normalmente, encontrados nas sensilas gustativas. Uma exceção importante é representada pelos receptores de CO², que, em dípteros e em alguns outros insetos, são formados pela dimerização de dois receptores gustativos, denominados GR21a e GR63a em *D. melanogaster* e GPRGR22 e GPRGR24 em *Anopheles gambiae* (Jones et al., 2007; Kwon et al., 2007). Finalmente, os RI são expressos, primariamente, nas sensilas celocônicas (Benton et al., 2009).

Receptores olfativos (OR)

Os OR de insetos são proteínas do tipo GPCR (receptor acoplado à proteína G), com sete domínios transmembranares. No entanto, possuem uma topologia na membrana celular distinta das GPCR clássicas, já que apresentam a porção aminoterminal voltada para região intracelular (Benton et al., 2006; Lundin et al., 2007). Além disso, não apresentam homologia com os OR acoplados à proteína G de vertebrados (Wistrand, Kall & Sonnhammer, 2006). Atuam, ainda, em conjunto com as proteínas transportadoras na detecção de semioquímicos presentes no meio ambiente. Em hemípteros hematófagos, como o *Triatoma brasiliensis*, esses receptores fazem parte do sistema olfativo periférico e são interligados aos neurônios olfativos (Liu et al., 2021).

O repertório de genes que codificam os OR é muito variável nas diferentes espécies de insetos estudadas até o momento. Por exemplo, foram identificados 49 OR em *Cimex lectularius* (Benoit et al., 2016), 62 em *D. melanogaster* (Robertson et al., 2003), 115 em *R. prolixus* (Mesquita et al., 2015), 259 em *Tribolium castaneum* (Engsontia et al., 2008) e 367 em *Linepithema humile* (Smith et al., 2011). A variação na quantidade de OR entre as espécies de insetos sugere que essas diferenças estejam relacionadas à complexidade dos locais onde vivem e ao estilo de vida de cada espécie. Por exemplo, espécies com baixa capacidade de dispersão no ambiente, como o percevejo de cama *Cimex lectularius*, que não tem asas e vive próximo aos seus hospedeiros, não precisam ter muitos OR (49). Já *R. prolixus*, que é capaz de transitar entre espaços em busca de parceiros, fontes de alimentação e locais para oviposição, tem uma quantidade maior de OR (115). Portanto, diferentes repertórios ambientais levariam a um maior ou menor número de ortólogos de OR expressos entre as espécies.

Os NSO presentes nas sensilas tricoides e basicônicas coexpressam dois tipos de receptor, um correceptor olfativo, denominado ORCO (Vosshall & Hansson, 2011), e um OR, que confere especificidade olfativa ao neurônio (Larsson et al., 2004). A primeira evidência de que os OR nos insetos funcionavam como heterodímeros foi obtida a partir da observação de que a coexpressão do ORCO mais um OR aumentava, consideravelmente, a resposta celular frente ao odor, quando comparada à resposta de células que expressavam apenas o OR. Essa capacidade de resposta consistente diante da coexpressão das duas subunidades sugeriu que o dímero seria a unidade funcional que conferiria à célula a capacidade olfativa (Nakagawa et al., 2005). A oligomerização permitiria que os OR se tornassem funcionais. Fenômeno semelhante foi observado nos

receptores gustativos GR21 e GR63, que formam juntos o receptor funcional de CO₂ nas sensilas basicônicas do tipo AB1, presentes na antena de *D. melanogaster*.

OR heteroméricos de insetos compreendem uma nova classe de receptores, que formam canais iônicos não seletivos ativados por um ligante, sugerindo que o mecanismo de transdução é do tipo ionotrópico. Sato e colaboradores (2008), utilizando um sistema de expressão heteróloga de OR de três espécies de insetos (bicho-da-seda, mosca-das-frutas e mosquito), demonstraram, de forma elegante, o influxo do Ca²⁺ extracelular e o aumento da condutância de cátions não seletiva pela molécula de odor nos neurônios olfativos. Esse resultado colocou em perspectiva, pela primeira vez, a ideia de que, em insetos, a transdução do sinal olfativo poderia ocorrer sem a participação direta da via de segundo mensageiro. Em paralelo, Wicher e colaboradores (2008) sugeriram que os heterodímeros formam complexos de unidades detectoras de odor e canais catiônicos não seletivos, ativados por nucleotídeos cíclicos. Segundo esses autores, além do canal iônico com propriedades semelhantes às apresentadas por Sato e colaboradores (2008), a expressão isolada do ORCO leva à formação de canais iônicos que não respondem a odores, mas são, diretamente, ativados por AMPc ou GMPc intracelular. Atualmente, considera-se a coexistência de duas vias de sinalização, sendo elas: a via ionotrópica, mais rápida, na qual o odor ativa a abertura do canal iônico; e a via metabotrópica, mais lenta, na qual o aumento da concentração do segundo mensageiro (cAMP) causa essa ativação (Carragher et al., 2015).

Existe pouca conservação entre as sequências dos OR de diferentes espécies. Por isso, a estrutura dessas proteínas se mantém nebulosa, já que elas não podem ser modeladas por homologia. Apenas em 2018, usando a técnica de microscopia eletrônica criogênica, foi confirmada a estrutura do ORCO da vespa *Apocrypta bakeri*. Segundo os autores, o AbakORCO é constituído de quatro domínios transmembranares ao redor do canal de condução iônica e de um pequeno domínio ancorado intracelularmente (Butterwick et al., 2018). Recentemente, Del Mármol e colaboradores (2021) mostraram que o receptor olfativo 5 do inseto primitivo *Machilis hrabei* é estruturalmente expresso como um homotetrâmero. Esses dois trabalhos foram pioneiros em revelar a estrutura tridimensional desses receptores, possibilitando elucidar o mecanismo de reconhecimento do sinal olfativo em insetos.

Filogeneticamente, o gene que codifica o ORCO apresenta-se conservado entre os insetos (Leal, 2012). O correceptor, apesar de não estar diretamente ligado ao reconhecimento do estímulo químico, possui papel importante no

desencadeamento do potencial de ação e na propagação do estímulo olfativo. O ORCO é o responsável por estabilizar e localizar os OR nas membranas celulares dos dendritos. Em *R. prolixus*, por exemplo, a falta do ORCO promove a perda da capacidade do inseto de localizar o hospedeiro, comprometendo a ingestão de sangue (Franco et al., 2016). Portanto, diferentemente do que ocorre em vertebrados, para que um semioquímico desencadeie um comportamento num inseto, é necessária a presença do complexo ORCO+ORx. Assim, métodos que visam deorfanizar um OR, ou seja, identificar seu ligante, necessariamente usam a coexpressão OR+ORCO. Esse processo foi demonstrado em *R. prolixus* por Franco et al., 2018. Tais autores, usando o sistema de registro eletrofisiológico em ovócito de *Xenopus*, que coexpressava o OR80+ORCO, mostraram que o OR80 respondia a 4 compostos: 2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona e 4-metilciclohexanol.

Receptores ionotrópicos (IR)

Em meados de 2009, Benton e colaboradores descreveram uma nova família de receptores olfativos em insetos e os denominaram “receptores ionotrópicos” (IR). Esses receptores constituem uma família de proteínas de membrana, estruturalmente relacionadas aos receptores do tipo glutamato, presentes nas regiões de pós-sinapses dos motoneurônios de insetos. Sendo assim, foram denominados de receptores olfativos ionotrópicos do tipo glutamato. A evolução desses receptores aconteceu independentemente dos OR, e é característica dos protostomados (Croset et al., 2010). Porém, diferentemente dos ORs, que possuem alto grau de divergência entre si, os IR apresentam sequências com elevado grau de conservação (Croset et al., 2010).

Os IR parecem ser expressos em sensilas de parede dupla, tais como as sensilas celocônicas (Benton et al., 2009), cujo papel fisiológico, sugerido pela literatura, é a detecção de compostos nitrogenados, de ácidos graxos de cadeia curta, de aldeídos e de ésteres (Diehl et al., 2003; Pophof, 1997; Qiu et al., 2006; Yao et al., 2005). Estudos sobre a função (Benton et al., 2009) e a arquitetura dos IR (Abuin et al., 2011) confirmaram a relação com a detecção desses tipos de compostos. Por sua vez, essa característica parece ser preservada desde a sua origem nos ancestrais da linhagem dos protostomados e, provavelmente, evidencia a relevância da detecção desses compostos relacionados com a atividade de microrganismos.

Enquanto os OR detectam apenas sinais químicos voláteis, os IR são uma família de genes multimodais. Além de seu papel olfativo, os IR estão envolvidos

na sensação gustativa e em estímulos ambientais, como a umidade e a sensação de temperaturas frias (Rimal & Lee, 2018; Wicher & Miazzi, 2021). Os IR formam heterotetrâmeros compostos por dois receptores ionotrópicos variáveis (IRX) e duas subunidades co-receptoras (IRcoY) (Abuin et al., 2011; 2019). Em *D. melanogaster*, por exemplo, as proteínas correceptoras são IR8a e IR25a (Abuin et al., 2011). Semelhante aos IR do tipo glutamato, os IR de insetos formam canais iônicos ativados por ligantes e possuem moléculas de odor como ligantes. Eles constituem canais de cátions não seletivos, que promovem o influxo de Na⁺ e K⁺ e, alguns deles, também de Ca²⁺ (Abuin et al., 2011; Rytz et al., 2013). Dentro dos complexos IRX/IRcoY, a especificidade do odor é determinada pelo IRX (Abuin et al., 2011).

Proteínas sensoriais de membrana neuronal (SNMP)

O processo de transformação do sinal químico em elétrico acontece em milissegundos. Ele ocorre no momento em que o odor se liga ao OR+ORCO, levando à abertura de canais iônicos e ao extravasamento de íons (Sato et al., 2008). A mudança na concentração de íons dispara uma série de sinais intracelulares, culminando na despolarização da membrana do NSO e na transmissão do impulso nervoso.

As proteínas sensoriais de membranas neuronais (SNMP, do inglês Sensory Neuron Membrane Proteins) são proteínas de membrana específicas de insetos. As SNMP foram identificadas, pela primeira vez, nos NSO de lepdópteros, mostrando ser indispensáveis para a detecção de feromônio (Rogers et al., 1997). As SNMP de insetos pertencem a uma superfamília de receptores transmembranares e transportadores classificados de acordo com a proteína CD36 de vertebrados (Rogers et al., 1997). Algumas funções das SNMP incluem o transporte transmembranar de compostos lipofílicos, que é o papel no acoplamento dos complexos OBP-feromônios à membrana e, até mesmo, de correceptor, mediando a transferência de feromônio para o OR (Vogt 2003). Seguida a descoberta das SNMP em mariposas, vários genes ortólogos foram identificados em bancos de dados de transcriptomas e genomas de diferentes ordens de insetos (Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2020), revelando a importância dessa família de proteínas no processo de olfação (Cassau & Krieger, 2021).

Enzimas degradadoras de odor (ODE)

As ODE são enzimas importantes na percepção e inativação de sinais químicos. Nas antenas, uma das suas principais funções é a degradação de COV produzidos pela pele humana, por plantas, feromônios e pelos próprios odores produzidos pelo inseto. A degradação dos COV tem como princípio manter a sensibilidade dos OR e proteger os NSO contra uma excitação contínua. Outra função importante das ODE é a desintoxicação de agroquímicos, como os compostos presentes nos inseticidas. As principais famílias de ODE envolvidas nesse mecanismo pertencem ao grupo do citocromo P450, das carboxilesterases (CXE) e glutathione S-transferases (GST). O mecanismo consiste em converter a molécula do composto tóxico numa molécula não tóxica através de reações de oxidação, redução e hidrólise (Wheelock et al., 2005). As ODE também desempenham papel importante na metabolização de substâncias heterólogas, na neurogênese e na regulação do desenvolvimento (Yi et al., 2021). Existem seis famílias de ODE, que podem atuar em conjunto na degradação de uma única molécula de odor, são elas: esterases/carboxilesterases (CXE), aldeído oxidases, álcool desidrogenases, citocromo P450, glutathione S-transferase e UDP-glucuronil transferase.

A principal família de ODE envolvida na degradação de odor faz parte das CXE, conhecidas por degradar ésteres carboxílicos. Essas enzimas possuem dois motivos conservados, que estão relacionados à sua atividade catalítica. O primeiro é o resíduo de serina, que faz parte da tríade catalítica, localizado em um penta peptídeo (G-X-S-X-G), o qual, geralmente, é encontrado entre uma fita- β e uma α -hélice. O segundo motivo está relacionado à cavidade do oxiânion (G-G-X), composta por dois resíduos de glicina, cuja função é doar prótons de sua cadeia amida para estabilizar o substrato no estado de transição (Figura 6). As CXE podem ter funções gerais, como degradar diferentes odores do tipo ésteres, ou específicas, atuando na degradação de apenas um composto, que pode ser um feromônio, por exemplo (Godoy et al., 2021; Wheelock et al., 2005).

Após iniciar a transdução do sinal olfativo, o COV deverá ser degradado. Portanto, imediatamente, as CXE irão hidrolisar o semioquímico. A hidrólise de ésteres pelas CXE ocorre em duas etapas. Primeiro, ocorre um ataque nucleofílico produzido pela hidroxila da serina no carbono do substrato. A reação é estabilizada pela histidina e, concomitantemente, esse aminoácido é estabilizado pelo ácido glutâmico. Por fim, uma molécula de álcool é liberada e a enzima é acetilada.

Na segunda etapa, a molécula de água tem afinidade pelo resíduo de histidina e, então, atua como um nucleófilo na enzima acetilada. Finalmente, um ácido carboxílico é liberado e a enzima fica livre para iniciar uma nova reação (Figura 7). É importante ressaltar que existem duas glicinas conservadas participando da estabilização dos estados de transição na cavidade de oxiânion (Figura 7).

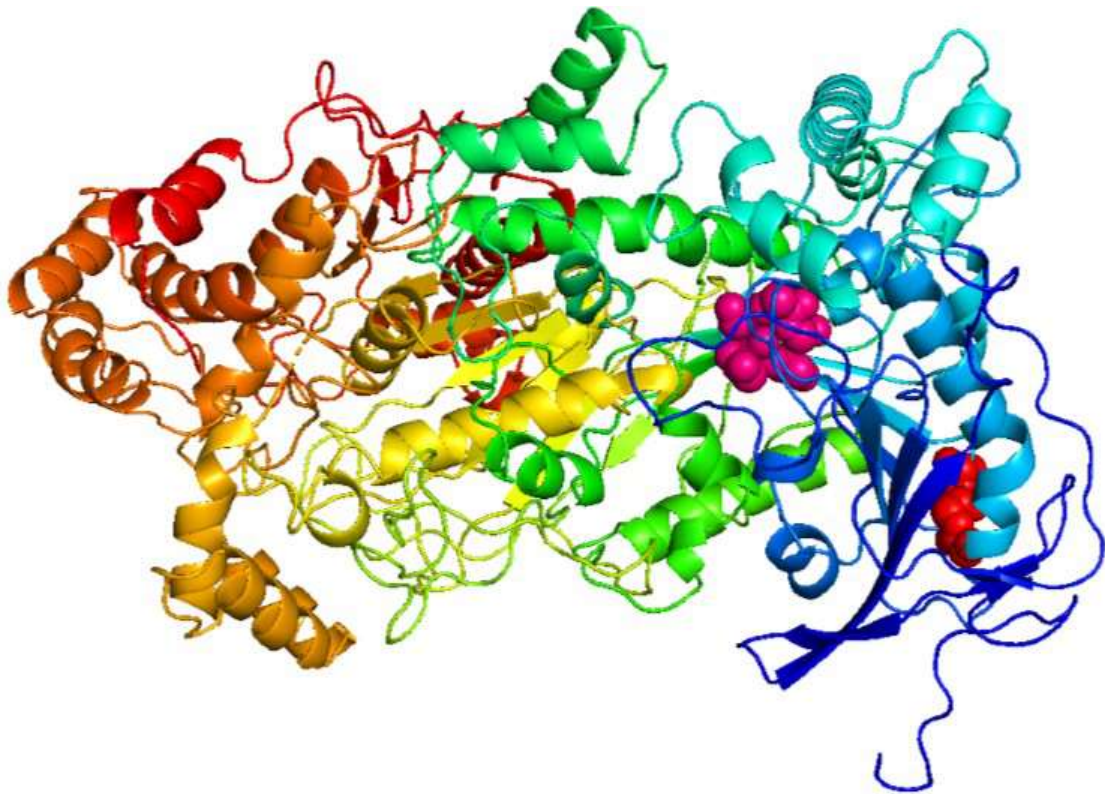


Figura 6: Modelo 3D da carboxilesterase RPRC001592-PA de *Rhodnius prolixus*. Modelagem 3D feita no software Phyre 2, em rosa, representa o pentapeptídeo e, em vermelho, representa a cavidade de oxiânion. A proteína RPRC001592-PA foi identificada no proteoma da antena (Oliveira et al., 2017).

Fonte: Arquivo pessoal

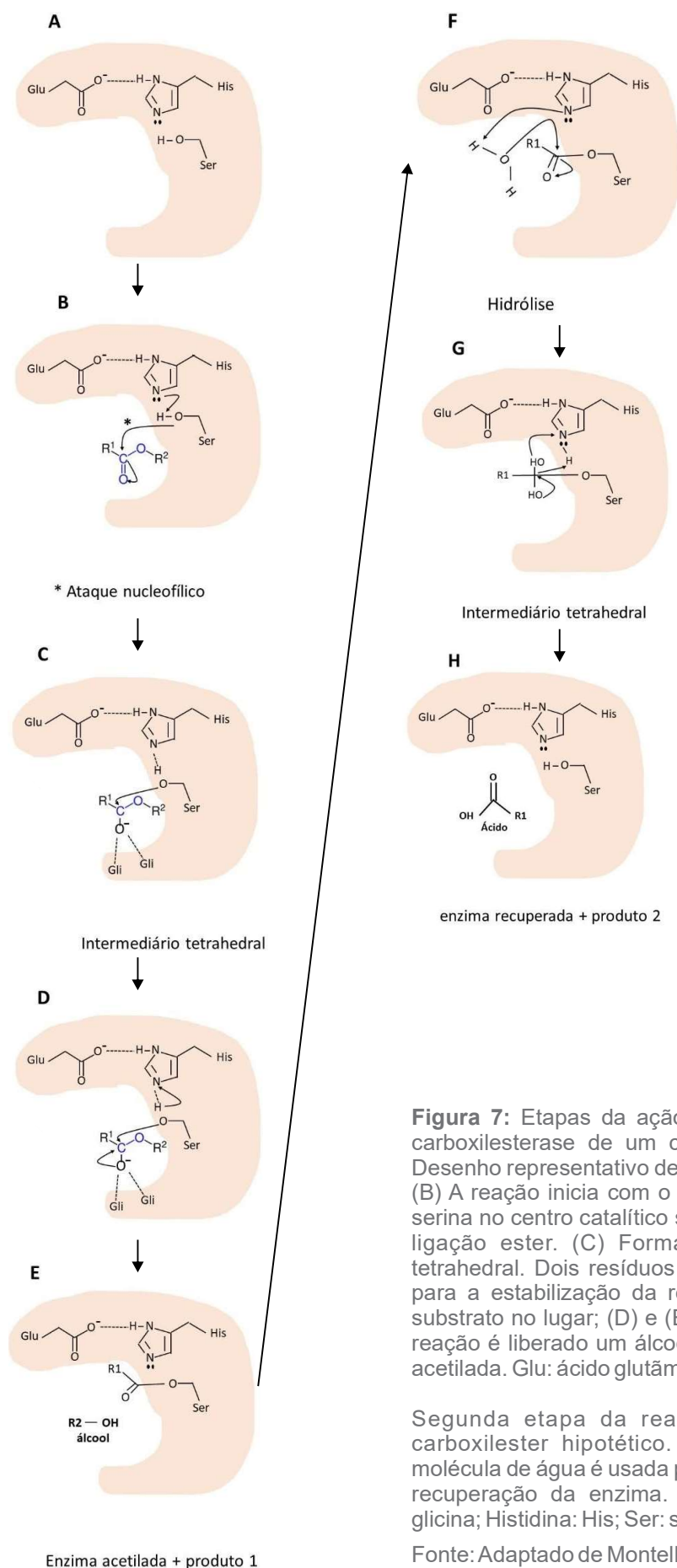


Figura 7: Etapas da ação de hidrólise mediada por carboxilesterase de um carboxilester hipotético. (A) Desenho representativo de uma CXEs e sítio catalítico. (B) A reação inicia com o ataque nucleofílico de uma serina no centro catalítico sobre o carbono carbonil na ligação ester. (C) Formação de um intermediário tetrahedral. Dois resíduos de glicina são importantes para a estabilização da reação e a manutenção do substrato no lugar; (D) e (E): Neste primeiro passo da reação é liberado um álcool e a enzima fica na forma acetilada. Glu: ácido glutâmico; Gli: glicina; Ser: serina.

Segunda etapa da reação de hidrólise de um carboxilester hipotético. (F-H) Nessa etapa uma molécula de água é usada para a liberação do ácido e a recuperação da enzima. Glu: ácido glutâmico; Gli: glicina; His: histidina; Ser: serina.

Fonte: Adaptado de Montella et al., 2012

A rápida recuperação do sistema olfativo dos insetos para receber novos estímulos, após a apresentação de um pulso de odor, sempre intrigou os pesquisadores da área. Por isso, tem sido sugerido que a meia-vida de uma molécula de feromônio na linfa sensilar é de 15 ms (Vogt et al., 1985). Ou seja, todo o processo de reconhecimento da molécula e sua degradação precisam ser muito rápidos (Godoy et al., 2021). A participação de enzimas neste processo tem sido demonstrada por diversos estudos (Durand et al., 2010a; Durand et al., 2010b; Ishida & Leal, 2005, 2008; Rybczynski et al., 1989; Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, Riddiford & Prestwich., 1985).

Enzimas responsáveis pela degradação de moléculas de feromônio foram descritas, inicialmente, em *Antheraea polyphemus* (Ishida & Leal, 2005; Vogt et al., 1985) e *Manduca sexta* (Rybczynski et al., 1989). De maneira interessante, dados obtidos de um conjunto de outros insetos parecem sugerir que esse fenômeno seja generalizado (Jacquin-Joly & Maïbèche-Coisne, 2009; Vogt, 2005). Não está totalmente claro como ocorre o processo nos diferentes insetos estudados, mas dois modelos têm sido propostos para explicar a cinética da detecção e degradação enzimática do odor (Kaissling, 2009).

Mapeamento topográfico do sistema olfativo: Lobo antenal e corpos pedunculados

O lobo antenal (LA) é uma estrutura anatômica situada no cérebro do inseto, para onde os NSO, que estão nas sensilas, projetam seus axônios. A arquitetura do lobo antenal é organizada de tal maneira que os neurônios da mesma natureza, por exemplo, que expressam receptores de membrana para um mesmo odor, convergem para estruturas específicas chamadas glomérulos. Assim, cada glomérulo representa um estágio, no qual ocorre um primeiro nível de integração das informações olfativas vindas de neurônios sensoriais, que expressam um mesmo tipo de receptor quimiosensorial (OR ou IR). Apesar do número de glomérulos no lobo antenal de uma determinada espécie ser fixo, a quantidade é extremamente variável. Formigas, por exemplo, apresentam mais de 450 glomérulos (Zube et al., 2008), enquanto apenas 1 lobo antenal aglomerular é encontrado em insetos homópteros (Kristoffersen et al., 2008). Na maior parte dos insetos, o número varia de 80 a 100 estruturas glomerulares.

Os glomérulos estão interconectados por neurônios chamados interneurônios locais (IL). Dessa maneira, há troca lateral de informações entre esses centros, onde existe abundância de sinapses, permitindo uma maior integração da informação relativa aos diferentes odores relevantes para o inseto.

Uma vez que os sinais são processados, a informação resultante é transferida para os centros de integração superiores, como os corpos pedunculados ou o chifre lateral, mediante interneurônios de projeção (IP). Nesses locais, a informação será integrada com aquelas recebidas de órgãos dedicados a outras modalidades sensoriais, tais como a audição e a visão, por exemplo. Os IL e os IP apresentam seus corpos celulares na periferia dos glomérulos no lobo antenal.

Processamento e integração da informação olfativa

Em síntese, as moléculas de odor presentes no meio ambiente atingem a cutícula das sensilas nas antenas, penetram através dos poros e, subsequentemente, se ligam aos OR, proteínas expressas nos dendritos dos NSO (Kaupp, 2010). A ligação das moléculas de odor aos OR desencadeia a cascata de transdução de sinal, levando à despolarização dos NSO. Os NSO respondem à presença dos odores, gerando potenciais de ação, cuja frequência dependerá da qualidade, da quantidade e da duração do estímulo olfativo (Hallem & Carlson, 2006). Abordaremos esse tópico, utilizando como exemplo *D. melanogaster*, o modelo de inseto mais bem estudado em relação ao mecanismo molecular da olfação. *D. melanogaster* apresenta, aproximadamente, 1.300 NSO distribuídos nas antenas e nos palpos maxilares (Davis, 2004). Cada NSO expressa um único OR dentre um repertório de 62 OR presentes nas antenas (Robertson et al., 2003), e o ORCO (Kaupp, 2010).

Como consequência do estímulo, os potenciais de ação dos NSO são propagados até o lobo antenal (LA). Nesse local, os NSO realizam sinapses com os interneurônios locais, excitatórios ou inibitórios, e com os interneurônios de projeção (Figura 7). Assim, formam estruturas esféricas chamadas glomérulos, que possuem uma grande densidade de sinapses, as quais contribuem para o processamento dos sinais. Todos os neurônios que expressam um mesmo OR projetam seus axônios para um mesmo glomérulo (Couto et al., 2005) (Figura 8). Assim, cada odor específico ativa uma região particular do LA, criando um padrão exclusivo de ativação glomerular no mesmo.

Em *D. melanogaster*, aproximadamente 180 IP projetam seus axônios do LA para os corpos pedunculados (CP), região pareada presente no protocérebro. Os axônios dos IP realizam sinapses basicamente com as regiões denominadas cálices. Adicionalmente, alguns IP atingem, com seus axônios, outra região pareada do protocérebro, denominado chifre lateral (*lateral horn*). A transferência da informação olfativa aos CP foi estudada, utilizando uma técnica conhecida como “microscopia por imagem de cálcio”. Essa técnica é baseada na

quantificação da fluorescência causada pelo influxo de Ca^{2+} , através da membrana durante a sua despolarização (Turner, Bazhenov & Laurent, 2008; Wang et al., 2004). A partir de dados desses e de outros estudos, foi sugerido que os CP são a principal estrutura de processamento e integração dos sinais oriundos dos diferentes órgãos sensoriais dos insetos (Gronenberg & López-Riquelme, 2004). Finalmente, como informações associadas aos estímulos não condicionados (de reconhecimento de alimento) e condicionados (odores desconhecidos que vêm se associar, temporalmente, à presença de um recurso), convergem para os CP, os quais são considerados responsáveis pela formação da memória nos insetos (Connolly et al., 1996; Heisenberg, 2003).

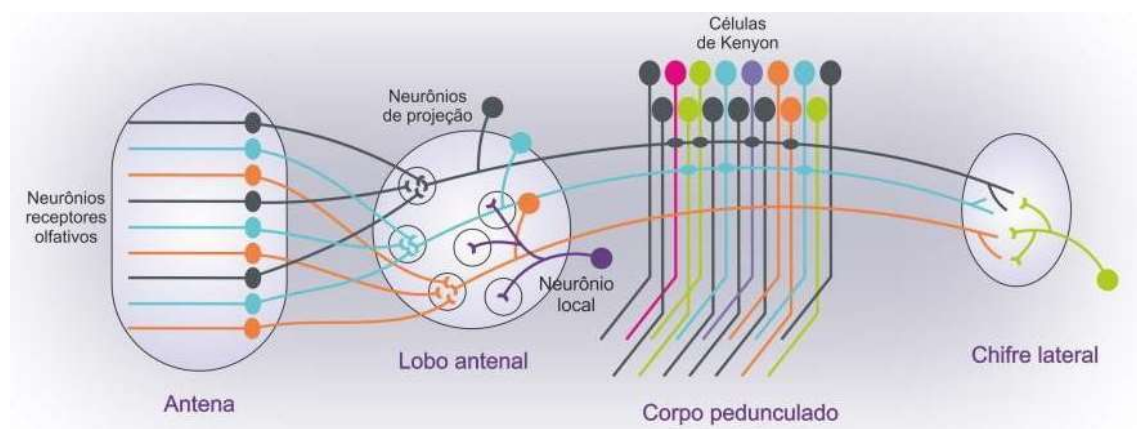


Figura 8: Desenho esquemático simplificado da representação topográfica das projeções dos neurônios sensoriais olfativos no lobo antenal (LA) e dos neurônios de projeção do LA para os corpos pedunculados.

Fonte: Adaptado de Masse et al., 2009

Ecologia química

Ecologia química é a ciência que busca conhecer os mecanismos da comunicação química e de interações intraespecíficas e interespecíficas, através da identificação dos compostos químicos envolvidos (Pinto-Zevallos et al., 2013; Leal, 2017). Substâncias químicas específicas (semioquímicos) medeiam uma ampla gama de interações ecológicas e comportamentais entre os insetos, particularmente a comunicação intraespecífica (feromônios) e o reconhecimento de fatores ambientais (aleloquímicos), como a detecção de alimentos (Cruz-Lopez et al., 2001). Os insetos, assim com todos os outros animais, necessitam perceber e interpretar as informações do meio ambiente obtidas por meio dos órgãos sensoriais (Jefferis, 2005). Dessa forma, eles podem executar atividades cruciais para sua sobrevivência, como a reprodução e a alimentação (Jefferis, 2005; Zwiebel & Takken, 2004).

De modo geral, os insetos reconhecem um indivíduo do mesmo gênero ou de gêneros diferentes através de feromônios sexuais e/ou de agregação. Em várias espécies de lepidópteros, por exemplo, os machos identificam e localizam as fêmeas, por meio de feromônios sexuais. Alguns feromônios, denominados de trilha, são usados pelas formigas para demarcar o percurso para os demais membros da colônia. Feromônios de agregação foram descritos em gafanhotos (Gadenne et al., 2016). Ademais, os insetos também são capazes de reconhecer sinais químicos emitidos por organismos de outras espécies, como plantas, predadores e de outras fontes de origem natural ou antropogênica (Gadenne et al., 2016). Em triatomíneos, os feromônios sexuais são produzidos pelas fêmeas adultas para atrair os machos da mesma espécie (Vitta & Lorenzo, 2009; Cruz-López et al., 2001). Em *R. prolixus*, o inseto macho é atraído pela fêmea (Velasquez-Antich, 1968) e, no momento do acasalamento, o casal libera compostos voláteis que atraem outros machos, os quais se agregam ao redor do casal (Baldwin et al., 1971). Nessa espécie, as fêmeas produzem e liberam os feromônios sexuais através das glândulas metasternais (Crespo & Manrique, 2007).

Os odores oriundos destas glândulas são, preferencialmente, emitidos durante a escotofase (Pontes et al., 2008). Esses sinais induzem os machos a saírem de seus abrigos (Pontes et al., 2014) e voarem (Zacharias et al., 2010) em direção às fêmeas, exibindo anemotaxia positiva (Vitta et al., 2009; May-Concha et al., 2013). Basicamente, substâncias como cetonas, álcoois, dioxanos e aldeídos (Manrique et al., 2006; Pontes et al., 2008; Vitta et al., 2009, May-Concha et al., 2013) estão presentes no sinal químico produzido pelas glândulas metasternais. O comportamento de agregação é comum em triatomíneos e pode ser mediado por semioquímicos presentes nas fezes (Schofield & Patterson, 1997; Figueiras, Kenigsten & Lazzari, 1994; Lorenzo & Lazzari, 1996; Figueiras & Lazzari, 2002; Vitta et al., 2002). O comportamento de agregação está relacionado tanto ao ato de buscar abrigos, como ao reconhecimento intraespecífico (Lorenzo & Lazzari, 1996; Pires et al., 2002). É bem conhecido que a cutícula de *T. infestans* produz um semioquímico que promove a agregação, via contato direto inseto-inseto (Figueiras & Lazzari, 1998). Mota et al. (2014) demonstraram que compostos voláteis presentes nas fezes (ácidos graxos de cadeia curta, um diol e uma amida) de *T. infestans*, *T. brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* são capazes de recrutar os insetos em abrigos.

A localização do hospedeiro vertebrado para a alimentação sanguínea é uma função crucial para a sobrevivência dos triatomíneos. Esses insetos demonstram uma resposta denominada anemotática, que se caracteriza pela

capacidade de se orientar quando confrontado com correntes de ar que transportam odores associados ao hospedeiro (Nunez 1982; 1987; Guerenstein et al., 1995; Barrozo et al., 2004). A localização do hospedeiro também é influenciada por sinais térmicos, que provocam, no inseto, o reflexo de extensão da probóscide, localizando vasos sanguíneos sob a superfície da pele do hospedeiro e, conseqüentemente, realizando a ingestão de sangue (Ferreira et al., 2007). Todos os sinais químicos (feromônios e outros semioquímicos) que desencadeiam resposta comportamental, seja de atração ou de repulsão, são processados pelo sistema olfativo.

Considerações finais

A sobrevivência de uma espécie de inseto depende da detecção de sinais químicos presentes no ambiente. No momento em que o semioquímico é captado pelas sensilas das antenas, uma série de proteínas serão recrutadas, iniciando com aquelas responsáveis por solubilizar este odor (OBP ou CSP) e transportá-lo através da linfa sensilar. A partir desse momento, a apresentação do sinal ao seu receptor (OR, IR, SNMP) desencadeará uma série de eventos moleculares, que culminará na resposta comportamental. Além disso, muitos eventos celulares que foram iniciados serão finalizados com a degradação do odor por enzimas específicas (ODE). Este processo é conhecido como olfação e determina se o inseto será atraído ou repelido pelo estímulo.

Estudos envolvendo anatomia, bioquímica, biologia molecular e fisiologia permitiram traçar um mapa do trajeto que a molécula de odor percorre, desde sua entrada pelos poros das antenas até o seu processamento no cérebro. As bases moleculares da olfação têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa em inúmeros modelos de insetos. O conhecimento acumulado sobre este tema, associado a novas tecnologias, estão sendo aplicados para o desenvolvimento de métodos de detecção de sinais químicos, usando as proteínas olfativas de insetos como contraparte biológica e aprimorando sistemas de detecção, como biossensores.

Referências

- Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M.H., Isacoff, E.Y., Kellenberger, S., Benton, R., 2011. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron* 69, 44-60.
- Abuin, L., Prieto-Godino, L.L., Pan, H.Y., Gutierrez, C., Huang, L., Jin, R.S., Benton, R., 2019. In vivo assembly and trafficking of olfactory ionotropic receptors. *BMC Biol* 17:34.
- Altner, H., Sass, H., Altner, I., 1977. Relationship between structure and function of antennal chemo-, hygro-, and thermoreceptive sensilla in *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* 176, 389-405.
- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., Petacchi, R., Pelosi, P. 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 262, 745-754.
- Aniruddha, A., Liu, N., Xu, W., 2021. Chemosensory Proteins (CSPs) in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Insects*. 13(1): 29.
- Baldwin, W.F.; Knight, A.G.; Lynn, K.R. 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can Entomol*, 103 (1): 18-22.
- Ban, L., Napolitano, E., Serra, A., Zhou, X., Iovinella, I., Pelosi, P. 2013. Identification of pheromone-like compounds in male reproductive organs of the oriental locust *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 620–624. doi:10.1016/j.bbrc.
- Barrozo, R.B.; Minoli, S.A.; Lazzari, C.R. 2004. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J Insect Physiol*, 50: 249-254.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., Axel, R., 1998. Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.
- Benoit, J. B., Adelman, Z. N., Reinhardt, K., Dolan, A. et al. 2016. Unique features of a global human ectoparasite identified through sequencing of the bed bug genome. *Nat Commun.* 7: 10165.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W., Vosshall, L.B., 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol* 4, e20.
- Benton, R., Vannice, K., Gomez-Diaz, C., Vosshall, L., 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136, 149-162.
- Biessmann, H., Andronopoulou, E., Biessmann, M.R., Douris, V., Dimitratos, S.D., et al, 2010. The *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. *PLoS ONE* 5(3): e9471.

Briand, L., Nespoulous, C., Huet, J.C., Pernellet, J.C., 2001. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L). *J Pept Res* 58, 540-545.

Brito, N. F. 2021. Proteína ligadora de odor 17 (RproOBP17) de *Rhodnius prolixus* como alvo molecular para o controle populacional da doença de Chagas. Tese de doutorado.

Brito, N.F., Moreira, M.F., Melo, A.C., 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *J Insect Physiol* 95:51-65.

Brito, N.F., Oliveira, D.S., Santos, T.C., Moreira, M.F., Melo, A.C.A., 2020. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(20):8631-8648.

Buck, L., Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.

Buck, L., Stein, R., Palazzolo, M., Anderson, D.J., Axel, R., 1983. Gene expression and the diversity of identified neurons. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 485-492.

Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., Keller, A. 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343(6177): 1370-1372. Doi: 10.1126/science.1249168.

Butterwick, J. A., Del Marmol, J., Kim, K. H., Kahlson, M. A., Rogow, J. A., Walz, T., Ruta, V. 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560: 447–452.

Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M. D., Christie, D. L., Newcomb, R. D. Kralicek, A. V. 2015. Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochem Mol Biol*. 66:31-41. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.09.010. Epub 2015 Sep 28

Cassau, S; Krieger, J. The role of SNMPs in insect olfaction. *Cell and tissue research*, v. 383, n. 1, p. 21-33, 2021.

Chess, A., Buck, L., Dowling, M.M., Axel, R., Ngai, J., 1992. Molecular biology of smell: expression of the multigene family encoding putative odorant receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 505-516.

Connolly, J.B., Roberts, I.J.H., Armstrong, J.D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., O’Kane, C.J., 1996. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274, 2104.

Couto, A., Alenius, M., Dickson, B.J., 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol* 15, 1535-1547.

Crespo, J. G.; Manrique, G. 2007. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley’s and metasternal glands. *J. Insect Physiol.* v. 53, no. 7, p. 708–714.

Croset, V., Rytz, R., Cummins, S.F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T.J., Benton, R., 2010. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of Insect taste and olfaction. *Plos Genetics* 6.

Cruz-Lopez, L.; Malo, E. A.; Rojas, J.C.; Morgan, E. D. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med Vet Entomol*, v. 15, n. 4, p. 351-7, 2001.

Dani, F.R., Michelucci, E., Francese, S., Mastrobuoni, G., Cappellozza, S., La Marca, G., et al. 2011. Odorant-binding proteins and Chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkmoth *Bombyx mori*. *Chem.Senses* 36, 335–344. doi:10.1093/chemse/bjq137.

Davis, R.L., 2004. Olfactory learning. *Neuron* 44, 31-48.

Del Mármol, J., Yedlin, M. A., Ruta, V. 2021. The structural basis of odorant recognition in insect olfactory receptors. *Nature*. 597(7874):126-131. doi: 10.1038/s41586-021-03794-8.

Diehl, P., Vlimant, M., Guerenstein, P., Guerin, P., 2003. Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Structure & Development* 31, 271-285.

Durand, N., Carot-Sans, G., Chertemps, T., Bozzolan, F., Party, V., Renou, M., Debernard, S., Rosell, G., Maibeche-Coisne, M., 2010a. Characterization of an antennal carboxylesterase from the pest moth *Spodoptera littoralis* degrading a host plant odorant. *PLoS One* 5, e15026.

Durand, N., Carot-Sans, G., Chertemps, T., Montagne, N., Jacquin-Joly, E., Debernard, S., Maibeche-Coisne, M., 2010b. A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Mol Biol* 19, 87 - 97.

Engsontia, P., Sanderson, A.P., Cobb, M., Walden, K.K., Robertson, H.M., Brown, S., 2008. The red flour beetle's large nose: an expanded odorant receptor gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 387-397.

Ferreira, R.A.; Lazzari, C.R.; Lorenzo, M.G.; Pereira, M.H. 2007. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? *PLoS One*, 2, e 932.

Figueiras, A.N.L., Lazzari C. 2002. Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v.97, p.569-571, 2002.

Figueiras, A.N.L., Lazzari, C. 1998. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol Entomol*, v.23, p.33-37.

Figueiras, A.N.L.; Kenigsten, A.; Lazzari, C.R. 1994. Aggregation in haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J Insect Physiol*. v.40, p.312-316.

Franco, T. A., Oliveira, D. S., Moreira, M. F., Leal, W. S., Melo, A. C. A. 2016. Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 69:82-90. doi: 10.1016/j.ibmb.

Franco, T.A., Xu, P., Brito, N.F., Oliveira, D.S., Wen, X., Moreira, M.F., Unelius C. R., Leal, W. S., Melo, A. C. A. 2018. Reverse chemical ecology-based approach leading to the accidental discovery of repellents for *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas diseases refractory to DEET. *Insect Biochem Mol Biol.* 103:46-52. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.10.004.

Gadenne, C.; Barrozo, R. B.; Anton, S. 2016. Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annu. Rev. Entomol.* v.61, p.317–333.

Gilbert, A.N., 2008. *What the nose knows: The science of scent in everyday life.* Crown, New York.

Godoy, R., Machuca, J., Venthur, H., Quiroz, A., Mutis, A. 2021. An overview of antennal esterases in Lepidoptera. *Front Physiol.*12:643281. doi: 10.3389/fphys.2021.643281.

Gronenberg, W., López-Riquelme, G., 2004. Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biologica Hungarica* 55, 31-37.

Gu, S.-H., Wu, K.-M., Guo, Y.-Y., Pickett, J.A., Field, L.M., Zhou, J.-J., et al. 2013. Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the blackcut-worm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics* 14:636. doi:10.1186/1471-2164-14-636

Guerenstein, P.G; Lorenzo, M.G.; Núñez, J.A.; Lazzari, C.R. 1995. Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia*, v.51, no.8, p.834-837.

Hallberg, E., Hansson, B.S., 1999. Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. *Microsc Res Tech* 47, 428-439.

Halle, E.A., Carlson, J.R., 2006. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* 125, 143-160.

Hansson, B. S. Stensmyr, M. C. 2011. Evolution of insect olfaction *Neuron* 72 (5, 8): 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>.

Heisenberg, M., 2003. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 266-275.

Herre, M., Goldman O. V., Lu, T-C., Caballero-Vidal, G., Qi, Y., Gilbert, Z. N., Gong, Z., Morita, T., Rahiel, S., Ghaninia, M., Ignell, R., Matthews, B.J., Li, H., Vosshall, L.B., Younger, M.A. 2022. Non-canonical odor coding in the mosquito. *Cell* 185(17):3104-3123.e28. doi: 10.1016/j.cell.2022.07.024.

Ishida, Y., Leal, W.S., 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14075-14079.

- Ishida, Y., Leal, W.S. 2008. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9076-9080.
- Jacquín-Joly, E., Maibèche-Coisne, M. 2009. Molecular mechanisms of sex pheromone reception in Lepidoptera, in: Chandrasekar, R. (Ed.), *Short Views on Insect Molecular Biology*. Bharathidasan University, Tamil Nadu, pp. 147–158.
- Jacquín-Joly, E., Vogt, R.G., François, M.C., Nagnan-Le Meillour, P. 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 26, 833–844. doi:10.1093/chemse/26.7.833
- Jefferis, G. S. 2005. Insect olfaction: a map of smell in the brain. *Curr Biol*, v. 15, n. 17, p. 668-70.
- Jones, W.D., Cayirlioglu, P., Kadow, I.G., Vosshall, L.B. 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445, 86-90.
- Kaissling, K.E., 2009. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model revised. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 895-922.
- Kanaujia, S., Kaissling, K.E., 1985. Interactions of pheromone with moth antennae - adsorption, desorption, and transport. *Journal of Insect Physiology* 31, 71-81.
- Kaupp, U.B., 2010. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci* 11, 188-200.
- Kim, M.S., Repp, A., Smith, D.P., 1998. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 150, 711-721.
- Kirkness, E.F., Haas, B.J., Sun, W.L., Braig, H. R., Perotti, M.A., Clark, J. M., Lee, S.H., Robertson, H.M., Kennedy, R.C., Elhaik, E., et al. 2010. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:12168-12173.
- Kristoffersen, L., Hansson, B.S., Anderbrant, O., Larsson, M.C., 2008. Agglomerular hemipteran antennal lobes basic neuroanatomy of a small nose. *Chem. Senses* 33, 771-778.
- Kwon, J.Y., Dahanukar, A., Weiss, L.A., Carlson, J.R., 2007. The molecular basis of CO₂ reception in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3574-3578.
- Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., Vosshall, L.B., 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703-714.

- Laughlin, J.D., Ha, T.S., Jones, D.N.M., Smith, D.P., 2008. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133:1255–1265.
- Leal, W. S. 2017. Reverse chemical ecology at the service of conservation biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.114, p.12094– 12096.
- Leal, W. S. et al. 2012. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol*, v. 58, n. 1, p. 373-391.
- Leal, W.S., Nikonova, L., Peng, G., 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. *FEBS Lett* 464, 85-90.
- Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R. 1996. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J Insect Physiol*, v.42, p. 903-907.
- Li, S., Picimbon, J.F., Ji, S.D., Kan, Y.C., Qiao, C.L., Zhou, J.J., et al. 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 372, 464–468. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.064.
- Liu, F., Chen, Z., Ye, Z., Liu, N. 2021. The Olfactory Chemosensation of Hematophagous Hemipteran Insects. *Front Physiol.* 9;12:703768. doi: 10.3389/fphys.2021.703768. eCollection 2021.
- Lundin, C., Kall, L., Kreher, S.A., Kapp, K., Sonnhammer, E.L., Carlson, J.R., Heijne, G., Nilsson, I., 2007. Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Lett* 581, 5601-5604.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B., 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723.
- Mameli, M., Tuccini, A., Mazza, M., Petacchi, R., Pelosi, P., 1996. Soluble proteins in chemosensory organs of phasmids. *Insect Biochem Mol Biol* 26, 875-882.
- Manrique, G.; Vitta, A. C. Ferreira, R. A.; Zani, C. L.; Unelius, C. R. Lazzari, C. R. Diotaiuti, L.; Lorenzo, M. G. 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.* v.32, p.2035–2052.
- Marchese, S., Angeli, S., Andolfo, A., Scaloni, A., Brandazza, A., Mazza, M., Picimbon, J., Leal, W.S., Pelosi, P., 2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insects, Phasmatodea). *Insect Biochem Mol Biol* 30, 1091-1098.
- Masse, N.Y., Turner, G.C., Jefferis, G.S.X.E. 2009. Olfactory information processing in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 19, R700–R713.
- May-Concha, I.; Rojas, J.C.; Cruz-Lopez, L.; Millar, J.G.; Ramsey, J.M. 2013. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. *Med Vet Entomol*, v.27, p.165–174.

Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C. et al. 2014. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(48):14936-41. doi: 10.1073/pnas.1506226112

Mclver, S.B., 1974. Fine structure of antennal grooved pegs of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res* 153, 327-337.

McKenna, M.P., Hekmat-Scafe, D.S., Gaines, P., Carlson, J.R., 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J Biol Chem* 269, 16340-16347.

Mohl, C., Breer, H., Krieger, J., 2002. Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. *Invert Neurosci* 4:165–174.

Montella, I. R., Schama, R., Valle, D. 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107(4). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>

Mota, T.; Vitta, A. C. R.; Lorenzo-Figueiras, A. N.; Barezani, C. P.; Zani, C. L.; Lazzari, C. R.; Diotaiuti, L.; Jeffares, L.; Bohman, B.; Lorenzo, M. G. 2014. A multi-species bait for Chagas disease vectors. *PLoS Negl Trop Dis* v. 8, e2677.

Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., Touhara, K., 2005. Insect Sex-Pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* 307, 1638-1642.

Ngai, J., Dowling, M.M., Buck, L., Axel, R., Chess, A., 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72, 657-666.

Niimura, Y. O. 2012. Olfactory receptor multigene family in vertebrates: From the viewpoint of evolutionary. *Current Genomics* 13 (2):103 – 114. DOI: 10.2174/138920212799860706.

Nomura, A., Kawasaki, K., Kubo, T., Natori, S. 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.* 36: 391 – 398.

Nunez, J. A. 1982. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Ent Res* v.72, p.252–262.

Nunez, J.A. Behaviour of Triatominae bugs. In: Brenner RR, Stoka AM, editores. *Chagas` disease Vectors*, vol II Anatomic and Physiological aspects. CRC Press, p 1-30, 1987.

Olender, T., Waszak, S. M., Viavant, M., Khen, M., Ben-Asher, E., Reyes, A., Nativ, N., Wysocki, C. J., Ge, D., Lancet, D. 2012. Personal receptor repertoires: olfaction as a model. *BMC Genomics* 13:414.

Oliveira, D.S., Brito, N.F., Nogueira, F.C.S., Moreira, M.F., Leal, W.S., Soares, M.R., Melo, A.C.A., 2017. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *J Insect Physiol* 100, 108-118, 2017.

- Oliveira, D.S., Brito, N.F., Franco, T.A., Moreira, M.F., Leal, W.S., Melo, A.C., 2018. Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from *Rhodnius prolixus* antennae. *Front. Physiol.* 9:1175.
- Ozaki, M., Morisaki, K., Idei, W., Ozaki, K., Tokunaga, F., 1995. A putative lipophilic stimulant carrier protein commonly found in the taste and olfactory systems. A unique member of the pheromone-binding protein superfamily. *Eur J Biochem* 230, 298-308.
- Pelletier, J., Guidolin, A., Syed, Z., Cornel, A.J., Leal, W.S., 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *J Chem Ecol* 36:245–248.
- Pelosi, P., Zhou, J., Ban, L., Calvello, M., 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 1658-1676.
- Picimbon, J.F., Dietrich, K., Breer, H., Krieger, J., 2000. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochem Mol Biol* 30, 233-241.
- Pophof, B., 1997. Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkmoth *Bombyx mori*. *Physiological Entomology* 22, 239-248.
- Pinto-Zevallos, D. M.; Martins, C. B. C.; Pellegrino, A. C.; Zarbin, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Quim. Nova.* v. 36, no. 9, p.1395-1405, 2013.
- Pires, H.H.R.; Lorenzo, M.G.; Diotaiuti, L.; Lazzari, C.R.; Lorenzo Figueiras, A.N. 2002. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. *Acta Trop*, v.81, no.1, p. 47-52.
- Pontes, G. B.; Bohman, B.; Unelius, C. R.; Lorenzo, M. G. 2008. Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Chem Ecol*, v. 34, no. 4, p. 450–457.
- Pontes, G.; Zacharias, C. A.; Manrique, G.; Lorenzo, M. G. 2014. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. *Med. Vet. Entomol*, v. 28, p. 257-263.
- Qiu, Y.T., van Loon, J.J.A., Takken, W., Meijerink, J., Smid, H.M., 2006. Olfactory coding in antennal neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chem. Senses* 31, 845-863.
- Ribeiro, J.M., Genta, F.A., Sorgine, M.H., Logullo, R. et al. 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 9;8(1):e2594. doi: 10.1371/journal.pntd.0002594. eCollection.
- Rimal, S., Lee, Y., 2018. The multidimensional ionotropic receptors of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology.* 27:1–7.

Robertson, H.M., Martos, R., Sears, C.R., Todres, E.Z., Walden, K.K., Nardi, J.B., 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol Biol* 8, 501-518.

Robertson, H.M., Warr, C.G., Carlson, J.R., 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 2, 14537-14542.

Rogers, M. E., Sun M., Lerner, M.R., Vogt, R. G. 1997. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *J Biol Chem* 272:14792–14799.

Rybczynski, R., Reagan, J., Lerner, M.R., 1989. A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* 9, 1341-1353.

Rytz, R., Croset, V., Benton, R., 2013. Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory ionotropic glutamate receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect Biochem Molec.* 43:888–897.

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., Touhara, K., 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002-1006.

Schneider, D., 1964. Insect Antennae. *Annual Review of Entomology* 9, 103-&.

Schofield, C.J. & Patterson, J.W. 1997. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*, v.13, p.727-734.

Slifer, E.H., Sekhon, S.S., 1977. Sense organs on the antennal flagellum of psocids (Insecta, Psocoptera). *J Morphol* 151, 315-323.

Sun, Y.L., Huang, L.Q., Pelosi, P., Wang, C.Z. 2012. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PLoS ONE* 7:e30040. doi:10.1371/journal.pone.0030040.

Smith, C.R., Smith, C.D., Robertson, H.M. et al. 2011. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5667-5672.

Stocker, R.F., 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275, 3-26.

Turner, G.C., Bazhenov, M., Laurent, G., 2008. Olfactory representations by *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurophysiol* 99, 734-746.

Velasquez-Antich, A. 1968. Atracción por olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus*. *Rev Inst Med Trop Parasitol* v.10, p.242-246.

- Vitta, A.C.R., Lorenzo, M.G. 2009. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*, v.46, no.4, p.789-795.
- Vitta, A.C.R.; Bohman, B.; Unelius, C.R.; Lorenzo, M.G. 2009. Behavioral and Electrophysiological Responses of *Triatoma brasiliensis* Males to Volatiles Produced in the Metasternal Glands of Females. *Journal of Chemical Ecology* v.35, i.10, p. 1212-1221.
- Vitta, A.C.R.; Figueiras, N.A.; Lazzari, C.R.; Diotaiuti, L.; Lorenzo, M.G. 2002. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 865-867.
- Vogt, R., 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects., in: Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*. Elsevier, London, pp. 753–804.
- Vogt, R. G. 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. In: *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Academic Press, 2003. p. 391-445.
- Vogt, R., Riddiford, L., 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293, 161 - 163.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M., Prestwich, G.D., 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8827-8831.
- Vosshall, L.B., Hansson, B.S., 2011. A Unified Nomenclature System for the Insect Olfactory Coreceptor. *Chem. Senses*.
- Wang, Y., Guo, H.F., Pologruto, T.A., Hannan, F., Hakker, I., Svoboda, K., Zhong, Y., 2004. Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca²⁺ imaging. *J Neurosci* 24, 6507-6514.
- Wheelock, C. E., Shan, G., Ottea, J. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75–83.
- Wicher, D., Schafer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H., Hansson, B.S., 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452, 1007-1011.
- Wicher, D., Miazzi, F., 2021. Functional properties of insect olfactory receptors: ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell Tissue Res*. 2021 Jan;383(1):7-19.
- Wistrand, M., Kall, L., Sonnhammer, E.L. 2006. A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein Sci* 15, 509-521.

Yao, C.A., Ignell, R., Carlson, J.R., 2005. Chemosensory Coding by Neurons in the Coeloconic Sensilla of the *Drosophila* Antenna. *J. Neurosci.* 25, 8359-8367.

Yi, J., Wang, S., Wang, Z., Wang, X., Li, G., Zhang, X., Pan, Y., Zhao, S., Zhang, J., Zhou, J. J., Wang, J., Xi, J. 2021. Identification of candidate carboxylesterases associated with odorant degradation in *Holotrichia parallela* antennae based on transcriptome analysis. *Frontiers in Physiology*, 1–10.

Xu, P.X., Atkinson, R., Jones, D.N.M., Smith, D.P. 2005. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron* 45:193–200.

Zacharias, C. A.; Pontes, G. B.; Lorenzo, M. G.; Manrique, G. 2010. Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. *J Chem Ecol* v.36, p. 449-451.

Zacharuk, R.Y., 1980. Ultrastructure and Function of Insect Chemosensilla. *Annual Review of Entomology* 25, 27-47.

Zhang, J, Liu, Y, Walker W. B., Dong, S. L., Wang, G. R. 2015. Identification and localization of two sensory neuron membrane proteins from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Sci* 22:399–408

Zhao, Y.J., Li, G.C., Zhu J.Y., Liu, N. Y. 2020. Genome-based analysis reveals a novel SNMP group of the Coleoptera and chemosensory receptors in *Rhaphuma horsfieldi*. *Genomics* 112:2713–2728

Zhou, X. F., Slone, J. D., Rokas, A., Berger, S. L., Liebig, J, Ray, A., Reinberg, D., Zwiebel, L. J. 2012. Phylogenetic and transcriptomic analysis of chemosensory receptors in a pair of divergent ant species reveals sex-specific signatures of odor coding. *PLoS Genet* 2012:8.

Zhou, X.H., Ban, L.P., Iovinella, I., Zhao, L.J., Gao, Q., Felicioli, A. et al. 2013. Diversity, abundance, and sex-specific expression of chemosensory proteins in the reproductive organs of the locust *Locusta migratoria manilensis*. *Biol.Chem.* 394, 43–54.doi:10.1515/hsz-2012-0114.

Zwiebel, L.J., Takken, W. 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochem Mol Biol*, 34: 645-52, 2004.

Zube, C., Kleineidam, C.J., Kirschner, S., Neef, J., Rössler, W., 2008. Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J Comp Neurol.* 506(3):425-41. doi: 10.1002/cne.21548.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 6

O sistema imune de carrapatos

Andréa C. Fogaça¹
Eliane Esteves^{1§}
Daniel B. Pavanelo^{1§§}
Sirlei Daffre¹

¹Universidade de São Paulo, São Paulo.

[§]Endereço atual: University of South Alabama, EUA.

^{§§}Endereço atual: Secretaria da Saúde, Porto Alegre.

Copyright: © 2024 [Andréa C. Fogaça, Eliane Esteves, Daniel B. Pavanelo, Sirlei Daffre]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Os carrapatos (subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida) são artrópodes ectoparasitas, que se alimentam obrigatoriamente do sangue de animais vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e, até mesmo, anfíbios. Atualmente, existem mais de 950 espécies de carrapatos descritas, as quais, de acordo com características morfológicas e fisiológicas, são classificadas em três famílias. A primeira e maior delas, denominada Ixodidae, compreende mais de 75% (731 espécies). A família Argasidae é composta por 216 espécies e, a terceira família, Nutalliellidae, é representada por apenas uma, *Nutalliella namaqua* (Dantas-Torres, 2018; Dantas-Torres; Fernandes Martins et al., 2019).

As peças bucais dos carrapatos, que incluem um par de palpos, um par de quelíceras e o hipostômio, estão reunidas em uma estrutura denominada capítulo (ou gnátossoma), que é utilizada para a aquisição de sangue. Quando tem acesso ao hospedeiro vertebrado, o carrapato perfura a pele do animal pela ação das quelíceras, ao mesmo tempo em que introduz o hipostômio. Essa ação causa a dilaceração do tecido conjuntivo e de pequenos vasos sanguíneos, propiciando a formação de uma poça de sangue subcutânea, através da qual o artrópode obtém seu alimento (telmatofagia ou *pool feeding*). A espoliação sanguínea decorrente da hematofagia pode causar anemia no hospedeiro, no caso de infestações maciças, uma vez que, dependendo da espécie de carrapato, uma única fêmea adulta pode ingerir mais do que um mililitro de sangue (Koch, 1984).

A anemia pode exercer impactos negativos na produtividade de bovinos. Além disso, a inserção das peças bucais dos carrapatos na pele do hospedeiro causa lesões permanentes, que diminuem o valor comercial do couro. Dessa forma, prejuízos econômicos elevados são registrados, anualmente, no mundo, como consequência do ectoparasitismo por carrapatos. No Brasil, por exemplo, é estimado um prejuízo anual de cerca de 3,24 bilhões de dólares, decorrente da redução da produtividade de carne e de leite causado apenas pelo carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus* (Grisi, Leite et al., 2014).

Durante a alimentação, além de ingerir sangue, os carrapatos injetam saliva – produzida pelas glândulas salivares – no hospedeiro. Essa saliva retorna para o hospedeiro o excesso de água e de íons provenientes da refeição sanguínea (Bowman and Sauer, 2004). É importante destacar, também, que a saliva dos carrapatos contém uma miríade de moléculas que modulam a hemostase e o sistema imune do hospedeiro, permitindo, assim, a aquisição de uma refeição sanguínea fluida durante todo o período de alimentação (Kazimirova

and Stibraniova 2013, Kotal, Langhansova et al., 2015). Além disso, a saliva de algumas espécies contém toxinas (Pienaar, Neitz et al., 2018) e alérgenos (van Nunen, 2018), que podem ocasionar paralisia e alergia no hospedeiro, respectivamente. As glândulas salivares também produzem uma substância adesiva, o cimento, que recobre as peças bucais do carrapato, selando a lesão provocada pela sua inserção na pele do hospedeiro e auxiliando a sua fixação, além de prevenir o contato com os componentes do sistema imune (Suppan, Engel et al., 2018). Por fim, ela é ainda utilizada como veículo por muitos microrganismos para o acesso ao hospedeiro vertebrado, de modo que os carrapatos são vetores versáteis de diversos patógenos, incluindo vírus, protozoários e bactérias (Dantas-Torres, Chomel et al., 2012; Wikel, 2018).

Os patógenos ingeridos com a refeição sanguínea chegam, primeiramente, ao intestino do carrapato, devendo colonizar e/ou atravessar o epitélio intestinal, e acessar a hemocele (cavidade corporal dos artrópodes) (Figura 1). A hemocele é preenchida pela hemolinfa, um fluido que irriga todos os tecidos e órgãos do artrópode. Através da hemolinfa, os patógenos alcançam as glândulas salivares, podendo ser transmitidos, via saliva, para outro hospedeiro, em um repasto sanguíneo subsequente. Alguns patógenos também são capazes de colonizar os ovários dos carrapatos, podendo ser transmitidos para a progênie (transmissão vertical ou transovariana). Em cada uma dessas etapas, os patógenos sofrem a ação de reações do sistema imune (Figura 1), às quais devem resistir ou evadir, de modo que possam colonizar os órgãos do vetor e que tenham sucesso na transmissão.

Neste capítulo, abordaremos alguns componentes do sistema imune de carrapatos, incluindo as principais vias de sinalização intracelular associadas ao sistema imune, os peptídeos antimicrobianos (AMP; do inglês, *antimicrobial peptides*), o metabolismo redox, as proteínas semelhantes às do sistema complemento (*complemento-like*), as reações celulares de defesa (fagocitose e formação de cápsulas e nódulos) e a morte celular regulada.

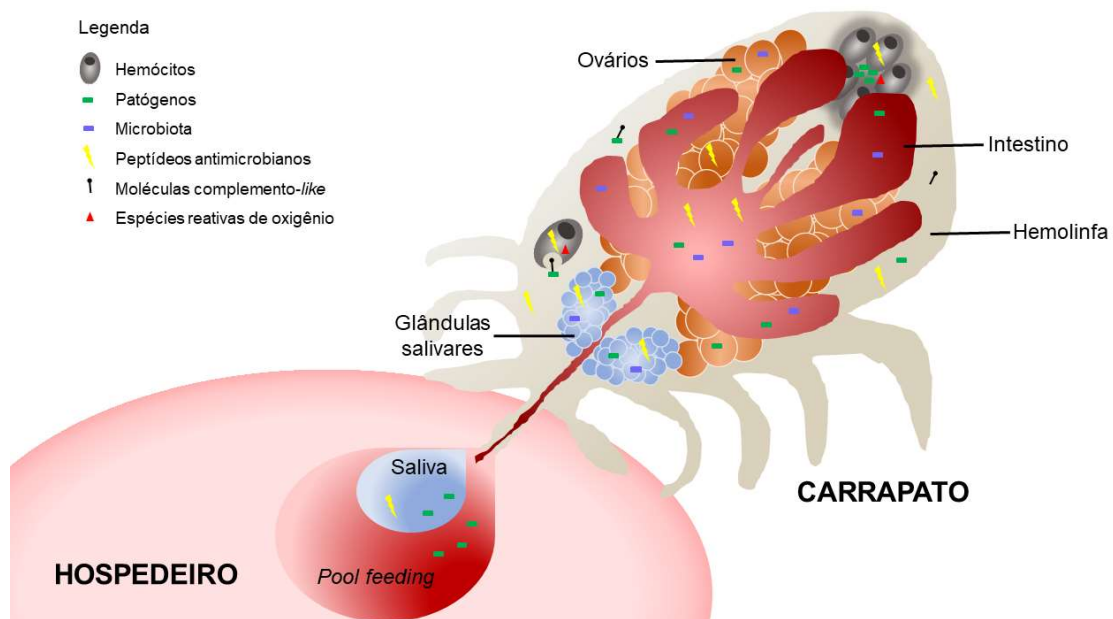


Figura 1: As principais interações entre os componentes do sistema imune de carrapatos, a microbiota e os patógenos. Os patógenos ingeridos com o sangue do hospedeiro chegam ao intestino do carrapato, onde interagem com componentes do sistema imune, tais como AMP e espécies reativas de oxigênio (ROS; do inglês, *reactive oxygen species*). Os patógenos precisam colonizar as células do epitélio intestinal ou atravessá-lo, de modo a alcançar as glândulas salivares, via hemolinfa. Na hemolinfa, as moléculas complemento-like interagem com os patógenos, que são fagocitados ou aprisionados em nódulos (processo de nodulação), ambos realizados pelos hemócitos. Ainda na hemolinfa, os microrganismos invasores sofrem o ataque de AMP, moléculas complemento-like e ROS. No caso de alcançarem as glândulas salivares, os patógenos devem chegar até a saliva do carrapato, através da qual serão transmitidos, em um repasto sanguíneo subsequente. Alguns patógenos conseguem colonizar os ovários, podendo ser transmitidos para a progênie. Em todas essas etapas, os patógenos também interagem com os membros da microbiota residente dos carrapatos. Estudos adicionais são necessários para preencher e esclarecer as dúvidas quanto à existência ou não dos processos de melanização e de coagulação em carrapatos.

Fonte: arquivo pessoal

Um breve histórico sobre os estudos do sistema imune de artrópodes

Até meados do século XIX, a França era um dos maiores produtores de seda do mundo. Porém, a partir de 1849, houve uma enorme queda na produção, decorrente da morte de um grande número de larvas do bicho-da-seda, cuja cutícula apresentava-se coberta de pontos escuros e de outros refringentes. Hoje em dia, sabe-se que essa doença, conhecida como pébrine, é causada pelo microsporídeo *Nosema bombysis*, e que os pontos refringentes são esporos do parasita. Já o processo molecular responsável pelo surgimento dos pontos escuros é conhecido como melanização. Esse processo foi completamente elucidado apenas no final do século XIX (Ashida 1990, Ashida and Brey, 1995).

A perda econômica decorrente da pébrine foi tamanha que levou o governo francês a criar um comitê para examinar o problema. Esse comitê nomeou Louis Pasteur, que havia acabado de finalizar seu trabalho sobre pasteurização, para identificar a causa da morte dos bichos-da-seda. Devido às informações contraditórias e confusas fornecidas pelos agricultores da região, Pasteur resolveu criar as larvas em sua casa para observá-las. Ele notou que havia dois tipos de pontos escuros na cutícula das larvas. Um deles era decorrente de injúrias, que podiam ser evitadas quando as larvas eram criadas individualmente, impedindo, dessa forma, que elas subissem umas nas outras. O outro tipo era decorrente da infecção. Com base nas observações de Pasteur, os sericultores passaram a selecionar somente os ovos postos por fêmeas saudáveis, que não possuísssem os pontos escurecidos, melhorando a produção de seda. O trabalho iniciado por Pasteur foi continuado no instituto que recebeu seu próprio nome, através dos estudos sobre a imunidade celular em insetos, realizados por Metchnikoff e por diversos outros pesquisadores (Brey, 1998).

A partir dos anos 1980, teve início uma fase bastante produtiva de estudos para a caracterização bioquímica e molecular de componentes do sistema imune dos artrópodes. Os primeiros estudos utilizaram artrópodes de grande dimensão corporal, tais como as larvas e as pupas de insetos das ordens Diptera e Lepidoptera, limulídeos e crustáceos, dos quais era possível obter-se um grande volume, da ordem de dezenas de microlitros, de hemolinfa. De fato, o primeiro AMP a ser caracterizado foi isolado de pupas da mariposa *Hyalophora cecropia*, pelo grupo do Dr. Hans Boman em 1981 (Steiner, Hultmark et al., 1981). Esse peptídeo, denominado cecropina (em referência ao grupo taxonômico do qual foi isolado), tem sua síntese induzida após uma infecção bacteriana. Além disso, depois da descoberta dos AMP em insetos, mostrou-se que eles também eram importantes efetores da imunidade dos mamíferos (Selsted, Brown et al., 1983; Selsted, Harwig et al., 1985).

Além do isolamento e da caracterização de AMP, os componentes da cascata da pró-fenoloxidase (que tem como produto final a melanina, o pigmento responsável pela melanização) foram elucidados em insetos (Ashida, 1990) e no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (Johansson and Soderhall, 1989). Os componentes da cascata da coagulação, outra importante reação do sistema imune, foram caracterizados anos mais tarde em *P. leniusculus* (Kopacek, Hall et al., 1993) e em limulídeos (Iwanaga, Miyata et al., 1992).

Nos anos 1990, iniciaram-se os estudos pioneiros sobre as vias de sinalização do sistema imune que regulam a produção dos AMP, utilizando a mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster*, como modelo (Lemaitre, Nicolas et

al., 1996, Hoffmann, Kafatos et al., 1999, Hultmark, 2003, Imler, 2014). Tais estudos levaram a importantes descobertas, das quais destacam-se: a) a identificação de uma região ligante de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) na região promotora de determinados genes codificadores de AMP (Engstrom, Kadalayil et al., 1993); e b) a identificação de receptores Toll, posteriormente identificados em mamíferos (Belvin and Anderson, 1996). Nos anos subsequentes, os estudos sobre a imunidade de artrópodes foram redirecionados àqueles de importância médica, em especial aos mosquitos, com o suporte financeiro de importantes agências de fomento à pesquisa, tais como a Fundação MacArthur (Michel and Kafatos, 2005). Através do sequenciamento de DNA, iniciado pelo método Sanger e mais recentemente por sequenciamento de última geração (NGS; do inglês *next-generation sequencing*), os genomas de diversos artrópodes de importância médica foram elucidados (Garcia, Maruyama et al., 2015).

Atualmente, mais de 40 genomas de artrópodes estão disponíveis no banco de dados VectorBase¹. A elucidação dos genomas permitiu a comparação, *in silico*, de componentes do sistema imune entre espécies. Vide, por exemplo, Christophides, Zdobnov et al., 2002; Smith and Pal, 2014; Palmer and Jiggins, 2015; Zumaya-Estrada, Martinez-Barnette et al., 2018, bem como propiciou que a resposta a diferentes estímulos microbianos fosse determinada por análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas, na assim chamada “Era Pós-Genômica” (Garcia, Maruyama et al., 2015). Essas análises em larga escala (ou *Discovery-driven Research*) revelaram fatores potencialmente envolvidos nas interações entre artrópodes e os patógenos por eles transmitidos. Subsequentemente, com o desenvolvimento das técnicas de RNA de interferência (RNAi) e CRISPR-Cas9, a caracterização funcional de tais genes (*Hypothesis-driven Research*) pôde, então, ser iniciada (Barnard, Nijhof et al., 2012; Sun, Guo et al., 2017).

As vias de sinalização do sistema imune de carrapatos

A maioria das espécies de carrapatos possui um ciclo de vida trioxeno, alimentando-se do sangue de um hospedeiro diferente em cada estágio (larva, ninfa e adulto), o que propicia a aquisição e/ou a transmissão de patógenos em cada uma dessas etapas (Sonenshine, 2013). Além disso, os carrapatos estão em contato íntimo com a microbiota da pele do hospedeiro, cujos componentes podem ser ingeridos juntamente com a refeição sanguínea (Verhulst, Boulanger et al., 2018) durante toda a alimentação. Os carrapatos estão, ainda, expostos a microrganismos do ambiente durante as fases não parasitárias, quando caem ao

¹<https://www.vectorbase.org/organisms>

solo para a realização da ecdise ou para a postura de ovos, de modo que seu sistema imune precisa estar continuamente ativado para controlar potenciais infecções, durante todo o seu ciclo de vida.

Em *D. melanogaster*, o artrópode sobre o qual mais se tem informações acerca das vias de sinalização do sistema imune, os microrganismos invasores são reconhecidos, principalmente, pelas vias Toll, IMD (*immune deficiency*), JNK (*Jun-N-terminal kinase*), JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) e pelo sistema de RNA de interferência (RNAi) (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

A via Toll

Em *D. melanogaster*, o reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs; do inglês, *microbe-associated molecular patterns*) da parede celular de bactérias Gram-positivas [peptidoglicanas (PGN) do tipo lisina] e de fungos (polímeros de β -glucanas) leva à ativação de cascatas de serino proteases, contendo domínio CLIP. Uma dessas proteases, SPE (*Spätzle processing enzyme*), cliva a citocina Spätzle, cujo fragmento C-terminal, conhecido como Spätzle C106, liga-se ao receptor Toll, ativando-o por dimerização. A ativação do receptor Toll, por sua vez, leva à formação do complexo de sinalização induzido por Toll, composto por três proteínas contendo domínio de morte (DD; do inglês, *death-domain*): MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), Tube (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4* ou IRAK4) e Pelle (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1* ou IRAK1). Por meio de um mecanismo ainda não completamente elucidado, o complexo leva à fosforilação de Cactus (I κ B), inibidor da via, que é rapidamente poliubiquitinado e degradado, liberando Dorsal, um fator de transcrição do tipo Rel/NF- κ B (fator nuclear kappa B). Dorsal, então, entra no núcleo celular, induzindo a expressão gênica de efetores, tais como o AMP drosomicina (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Lindsay and Wasserman, 2014) (Figura 2A). Análises genômicas e *in silico* revelaram que carrapatos codificam a maioria dos componentes da via Toll presentes em *D. melanogaster* (Figura 2A), com exceção do fator de transcrição NF κ B DIF (*dorsal-related immunity factor*), que não foi identificado em nenhuma das espécies estudadas até o momento (Smith and Pal, 2014; Gulia-Nuss, Nuss et al., 2016; Rosa, Capelli-Peixoto et al., 2016; Oliva Chavez, Shaw et al., 2017). O funcionamento dessa via em carrapatos, entretanto, foi pouco explorado.

Estímulos microbianos diferentes modulam de modo distinto a expressão de componentes da via Toll em células embrionárias de *R. microplus*, BME26

(Rosa, Capelli-Peixoto et al., 2016). Quando as células foram estimuladas com *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), *Enterobacter cloacae* (bactéria gram-negativa) ou *Micrococcus luteus* (bactéria gram-positiva) termo-inativados, a expressão da maioria dos componentes da via Toll foi induzida. No caso da infecção com *Rickettsia rickettsii*, que é uma bactéria intracelular obrigatória, alguns genes foram induzidos e outros reprimidos. Por outro lado, a infecção com *Anaplasma marginale*, também uma bactéria intracelular obrigatória, porém naturalmente transmitida por *R. microplus*, a expressão da maioria dos componentes da via Toll foi reprimida. Resultados semelhantes foram observados para os componentes das vias de sinalização IMD (incluindo o braço JNK) e JAK/STAT. Em conjunto, esses resultados sugerem uma adaptação coevolutiva de *A. marginale* com o seu carrapato vetor (Rosa, Capelli-Peixoto et al., 2016).

Em células embrionárias IRE/CTVM20 do carrapato *Ixodes ricinus*, a expressão de um gene homólogo ao gene *toll* ISCW022740 de *Ixodes scapularis* não foi alterada pela infecção com *Anaplasma phagocytophilum*, enquanto a expressão do gene *toll* ISCW00727 foi reprimida (Mansfield, Cook et al., 2017). Por outro lado, a expressão dos genes homólogos aos genes *toll* ISCW017724, ISCW007727 e ISCW007724 de *I. scapularis* foi reprimida pela infecção com TBEV (*tick-borne encephalitis vírus*) e LIV (*louping ill vírus*), enquanto o gene *toll* ISCW022740 foi induzido (Mansfield, Cook et al., 2017). Finalmente, a expressão do gene *myd88* foi reprimida pelos três agentes patogênicos (Mansfield, Cook et al., 2017).

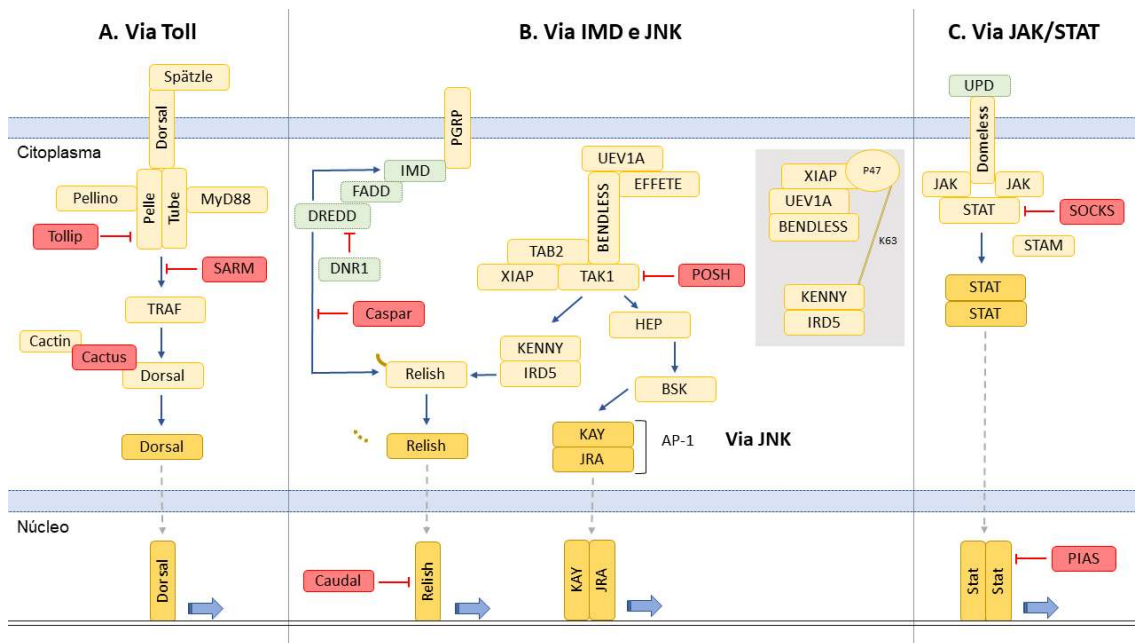


Figura 2: Componentes das vias (A) Toll, (B) IMD e (C) JAK/STAT identificados em carrapatos. (A) Os componentes da via Toll de artrópodos são conservados em carrapatos, tendo sido identificados: *extracellular cytokine Spätzle (Spz)*, *transmembrane cytokine receptor Toll*, *Toll-interacting protein (TOLLIP)*, *adaptor protein MyD88*, *kinase Tube (interleukin-1 receptor-associated kinase 4 ou IRAK4)*, *Pelle (interleukin-1 receptor-associated kinase 1 ou IRAK1)*, *Pelle-interacting protein Pellino*, *TNF receptor associated factors (TRAFs)*, *evolutionarily conserved signaling intermediate in toll pathway (ECSIT)*, *sterile alpha- e armadillo-motif-containing protein (SARM)*, *Rel/NF-kappa B transcription factor Dorsal*, *Dorsal inhibitor protein IkappaB Cactus (IkB)* e *interacting protein of the IkB Cactin*. O fator de transcrição **DIF** (*dorsal-related immunity factor*) não foi identificado em carrapatos até o momento. (B) Em relação aos componentes da via IMD, foram identificados membros *downstream* do ramo NF-kB/Relish e JNK (*Jun N-terminal kinase*): *peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)*, enzimas envolvidas na ubiquinação (**UEV1a**, **Effete/Ubc13** e **Bendless/Ubc5**), *X-linked inhibitor apoptosis protein (XIAP)*, reguladores negativos **Caspar** (*Fas-associating factor 1*) e **POSH** (*E3 ligase Plenty of SH3*), *transforming growth factor-beta activated kinase 1 (TAK1)*, *TAK1-binding protein 2 (TAB2)*, **IRD5** e **Kenny/NEMO (IKKγ)** e fator de transcrição NF-kB **Relish-like**. A proteína adaptadora **IMD** (*immune deficiency*), **FAAD** (*Fas associated protein with death domain*), a caspase **DREDD** (*death related ced-3/Nedd2-like*) e **Dnr1** (*defense repressor 1*) não foram identificadas em carrapatos até o momento. Componentes do ramo **JNK** identificados em carrapatos: *mitogen-activated protein (MAP)*, *kinase hemipterous (HEP)*, *Jun-kinase basket (BSK)*, *activator protein 1 (AP-1)* e os fatores de transcrição **JRA** (*Jun-related antigen*) e **KAY** (*Fos-related antigen Kayak*). Alguns componentes da via **IMD** foram caracterizados, funcionalmente, (Insero): após a ativação da via **IMD** por **PODAG** (*1-palmitoyl-2-oleoyl diacylglycerol*) ou **POPG** (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*), **XIAP** interage com o heterodímero **Bendless: UEV1a**, levando à ubiquinação de **p47** de forma **K63**-dependente. O **p47** poliubiquinado interage com **Kenny** (também conhecido como **NEMO**) e induz a fosforilação de **IRD5** e **Relish**. (C) Os componentes da via **JAK/STAT** (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) também são conservados em carrapatos: o receptor de citocina transmembranar **Domeless**, *tirosina-quinase JAK (Hopscotch)*, o fator de transcrição **STAT**, *signal transducing adaptor molecule (STAM)* e os inibidores **PIAS** (*protein inhibitor of activated STAT*) e **SOCS** (*suppressor of cytokine signaling*). O ligante do receptor **Domeless (UPD)** não foi identificado em carrapatos. Os fatores de transcrição estão representados em amarelo escuro e os inibidores em vermelho. Os componentes não identificados em carrapatos, em verde.

Fonte: Arquivo pessoal

Em carrapatos *R. microplus* adultos, o silenciamento gênico de *dorsal*, *relish* ou *STAT* levou a um aumento do número de *A. marginale* tanto no intestino quanto nas glândulas salivares (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017). Intrigantemente, apesar de não haver semelhança estrutural entre esses três fatores, o silenciamento de *dorsal* e de *STAT* também ocasionou uma diminuição da expressão de *relish*. Embora um efeito *off-target* não possa ser excluído, os resultados sugerem um possível *crosstalk* entre as vias de sinalização. Além disso, dado que apenas o silenciamento de *relish* foi específico, é provável que a via IMD seja responsável pelo controle da infecção de *R. microplus* por *A. marginale* (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017). Por outro lado, o silenciamento gênico de *toll* ISCW018193 não ocasionou qualquer efeito na infecção das glândulas salivares de ninfas de *I. scapularis* por *A. phagocytophilum* (Liu, Dai et al., 2012). No entanto, como a infecção do intestino não foi avaliada, não é possível descartar que a via Toll exerça um papel no controle da infecção.

A via IMD

Em *D. melanogaster*, peptidoglicanas do tipo DAP (ácido diaminopimérico) de bactérias gram-negativas e de algumas bactérias gram-positivas (por exemplo, do gênero *Bacillus*) são reconhecidas por PGRP (do inglês, *PGN recognition proteins*), que ativam o receptor IMD (Lemaitre and Hoffmann 2007; Kleino and Silverman, 2014). A sinalização intracelular requer a formação de um complexo que inclui IMD, FADD (*FAS-associated death domain*) e a caspase DREDD (*death-related ced-3/Nedd2-like protein*). DREDD é ativada por ubiquitinação via IAP-2 (*E3-ligase inhibitor of apoptosis 2*), que se associa com enzimas conjugadoras de ubiquitina E2 [UEV1a (*ubiquitin E2 variant 1A*), Bendless (Ubc13) e Effete (Ubc5)]. Uma vez ativada, DREDD cliva IMD, recrutando e ativando o complexo TAB2 (*TAK1-binding protein 2*)/TAK1 [*transforming growth factor- β (TGF β)-activated kinase 1*], responsável pela fosforilação e pela ativação do complexo IKK (*I κ B kinase*). Subsequentemente, o complexo IKK fosforila o fator de transcrição do tipo Rel/NF- κ B Relish, que é clivado e translocado para o núcleo celular, induzindo a expressão gênica de efetores, tais como os AMP dipterica e cecropina (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Kleino and Silverman, 2014) (Figura 2B).

Análises *in silico* de sequências depositadas em bancos de dados públicos evidenciaram a ausência de ortólogos de diversos componentes *upstream* da via IMD em carrapatos, incluindo PGRP transmembranares, FADD, IMD e DREDD (Smith and Pal, 2014; Gulia-Nuss, Nuss et al., 2016; Rosa, Capelli-Peixoto et al.,

2016; Shaw, Wang et al., 2017) (Figura 2B). A ausência de componentes da via IMD também foi descrita em outros aracnídeos e em insetos hemípteros (Palmer and Jiggins, 2015; Nishide, Kageyama et al., 2019). Interessantemente, uma análise de dados do genoma e do transcriptoma de *Rhodnius prolixus* por BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) associado ao modelo *Hidden Markov*, revelou a existência de componentes da via IMD (Salcedo-Porras, Guarneri et al., 2019). Também foi demonstrado que a via IMD é funcional no corpo gorduroso de *R. prolixus*, respondendo à infecção por bactérias gram-negativas (Salcedo-Porras, Guarneri et al., 2019). Esses resultados sugerem que exista uma grande divergência estrutural de componentes da via IMD, entre os artrópodes, o que pode prejudicar a sua identificação nas bases de dados.

Apesar da ausência de fatores *upstream*, a via IMD é funcional em *I. scapularis* (Shaw, Wang et al., 2017) e em *R. microplus* (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017). Recentemente, foi demonstrado que a via IMD de *I. scapularis* é ativada pela resposta a proteínas mal enoveladas [do inglês, *unfolded protein-response* (UPR)] (Sidak-Loftis, Rosche et al., 2022). Em situações de homeostasia, receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático [IRE1 α , PERK (do inglês, *PKR-like ER kinase*) e ATF6 (do inglês, *activating transcription factor 6*)] ficam inativos por estarem ligados ao sensor BiP (do inglês, *binding immunoglobulin protein*). Em condições de estresse, como no caso de infecções, tais receptores são ativados. Após a ativação do receptor IRE1 α , ele se autofosforila e pode levar tanto ao *splicing* do mRNA da xbp1 (do inglês, *X-box binding protein 1*) quanto ao recrutamento de TRAF2 (Sidak-Loftis, Rosche et al., 2022). Em células embrionárias ISE6 do carrapato *I. scapularis*, a infecção por *A. phagocytophilum* leva à fosforilação de IRE1 α , mas não ocasiona o *splicing* de mRNA xbp1. Por outro lado, o silenciamento gênico de *ire1 α* ou de *traf2* diminui a infecção dessas células e de ninfas de *I. scapularis* por *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi*. Também foi demonstrado que ativação da UPR por tapsigargina ou tunicamicina leva ao aumento da concentração de Relish em células ISE6. O silenciamento gênico de IRE1 α ou de TRAF2 tem o mesmo efeito sobre a infecção de *D. variabilis* por *A. marginale*, indicando que a conexão entre a UPR e a via IMD se estende a outras espécies de carrapatos (Sidak-Loftis, Rosche et al., 2022).

A via IMD de *I. scapularis* é ativada pelo reconhecimento de glicerofosfolípidos [POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphoglycerol) e PODAG (1-palmitoyl-2-oleoyl diacylglycerol)] da membrana bacteriana, por um receptor ainda desconhecido (Shaw, Wang et al., 2017) (Figure 2B), e não pelo reconhecimento de PGN do tipo DAP por PGRPs, como em *D. melanogaster* (Lemaitre and Hoffmann 2007; Kleino and Silverman, 2014). Também se mostrou que, no caso

de um estímulo microbiano, XIAP (*X-linked IAP*) é ativada e interage com o complexo Bendless:UEV1a, que ubiquitina o substrato p47 de maneira K63-dependente (Shaw, Wang et al., 2017). O substrato p47 poliubiquitinado interage com Kenny (também conhecido como NEMO) e induz a fosforilação de IKK β (também conhecido como IRD5) e Relish. Após a ativação, Relish é clivado e translocado ao núcleo (McClure Carroll, Wang et al., 2019) (Figure 2B, inserto). O silenciamento gênico de Bendless, UEV1a, Relish e Caspar por RNAi demonstrou que a via IMD controla a infecção de ninfas de *I. scapularis* por *A. phagocytophilum* e por *B. burgdorferi*, dois patógenos naturalmente transmitidos por essa espécie de carrapatos (Shaw, Wang et al., 2017). Por outro lado, o silenciamento de TAK1 e TAB1 não teve nenhum efeito na infecção (Liu, Dai et al., 2012). Os efetores da via IMD responsáveis pelo controle dessas duas bactérias ainda não foram identificados.

Em *D. melanogaster*, o complexo TAB2/TAK1, além de estar envolvido na ativação de Relish, ainda é responsável pela ativação do ramo JNK da via IMD, que está envolvido na resposta a estresses e reparação de injúrias (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Kleino and Silverman, 2014). No entanto, estudos adicionais são necessários para compreender a ativação e a função do ramo JNK em carrapatos (Liu, Dai et al., 2012; Shaw, Wang et al., 2017; McClure Carroll, Wang et al., 2019).

Como mencionado anteriormente no texto, o silenciamento gênico de *relish* aumentou a infecção de carrapatos *R. microplus* adultos por *A. marginale* (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017). Além disso, a expressão da microplusina foi menor em carrapatos tratados com as duplas-fitas de RNA (dsRNAs) específicas para *relish* do que nos carrapatos que não receberam dsRelish. Assim, sugeriu-se que esse AMP seja um efetor da via IMD e que possa ter uma ação contra *A. marginale* (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017).

Em alguns insetos, o sistema imune pode ser estimulado por microrganismos não-patogênicos, protegendo o animal de uma infecção subsequente com um microrganismo patogênico, que é um processo conhecido como *immune priming* (Cooper and Eleftherianos, 2017). Quando *I. scapularis* e *D. andersoni* são estimulados com POPG e PODAG, eles ficam protegidos da infecção por *A. phagocytophilum* e *A. marginale*, respectivamente. O efeito *immune priming* é, assim, abolido pelo silenciamento de componentes da via IMD, mas não das vias Toll ou JAK/STAT, excluindo um efeito *off-target* (Shaw, Wang et al., 2017). Até o momento, esse é o único relato de *immune priming* em carrapatos (Shaw, Wang et al., 2017).

A via JAK/STAT

A via JAK/STAT de *D. melanogaster* responde a infecções virais, além de ser complementar à ação das vias Toll e IMD contra infecções bacterianas e fúngicas (Dostert, Jouanguy et al., 2005). Após o ligante UPD (*Unpaired*) se associar ao receptor Domeless, HOP (*JAK tyrosine kinase Hopscotch*) se autofosforila e fosforila a porção citoplasmática de Domeless, criando sítios para a ligação de STAT. A proteína STAT é, então, fosforilada, se dimeriza com outra molécula de STAT e entra no núcleo, onde induz a expressão gênica de efetores. Essa via atua, ainda, no reparo e na renovação das células do epitélio intestinal das moscas (Osman, Buchon et al., 2012), uma função também descrita para carrapatos (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014) (Figure 2C).

A via JAK/STAT é bastante conservada em carrapatos (Smith and Pal 2014; Gulia-Nuss, Nuss et al., 2016; Rosa, Capelli-Peixoto et al., 2016; Oliva Chavez, Shaw et al., 2017) (Figure 2C), nos quais também é funcional (Liu, Dai et al., 2012; Narasimhan, Rajeevan et al., 2014; Smith, Navasa et al., 2016). Em *I. scapularis*, essa via é importante para o controle da infecção por *A. phagocytophilum* (Liu, Dai et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que o AMP 5.3-kDa é efetor da via JAK/STAT, controlando a infecção na hemolinfa e nas glândulas salivares dos carrapatos, mas não no intestino (Liu, Dai et al., 2012). No intestino de *I. scapularis*, o silenciamento gênico de *STAT* altera a atividade mitótica do epitélio intestinal e reduz a expressão de *peritrofina-1*, um efetor da via JAK/STAT e componente da matriz peritrófica. Esse processo tem como consequência a redução da sua espessura, o que prejudica o estabelecimento de *B. burgdorferi* (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014). Por outro lado, a redução da matriz peritrófica favorece o estabelecimento de *A. phagocytophilum* (Abraham, Liu et al., 2017). Os autores especulam que, por *A. phagocytophilum* ser uma bactéria intracelular obrigatória, a diminuição da espessura da matriz peritrófica pode facilitar o acesso e a colonização do epitélio intestinal (Abraham, Liu et al., 2017). No caso de *B. burgdorferi*, que é extracelular, a redução da matriz peritrófica pode propiciar um maior contato da bactéria com os componentes citotóxicos do sangue do hospedeiro, presentes no lúmen intestinal dos carrapatos (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014).

Não se sabe, ao certo, como a via JAK/STAT é ativada em carrapatos, uma vez que o ligante UPD está ausente. No entanto, foi demonstrado que *I. scapularis* utiliza INF- γ (interferon-gama), uma citocina do hospedeiro, para ativar seu próprio STAT (Smith, Navasa et al., 2016). Apesar do receptor de *I. scapularis* para a citocina do hospedeiro ainda não ter sido identificado, esse processo é

dependente da GTPase *Rho-like*, induzindo a síntese do AMP Dae2 (*domesticated amidase effector 2*), o qual, juntamente com outros fatores, limita a infecção por *B. burgdorferi* (Smith, Navasa et al., 2016). Em *R. microplus*, o silenciamento de *stat* levou a uma diminuição da expressão da ixodidina e da lisozima nas glândulas salivares e de defensina no intestino, apontando esses AMP como os potenciais efetores da via JAK/STAT (Capelli-Peixoto, Carvalho et al., 2017).

O sistema de RNAi

O sistema de RNAi é importante para a defesa de artrópodes contra infecções virais e para o controle de elementos transponíveis. Das quatro vias conhecidas desse sistema, três têm RNA endógeno como ativadores [miRNA (microRNA), endo-siRNA (*small interfering RNA*) e piRNA (*piwi-interacting RNA*)] (Karlikow, Goic et al., 2014). Por outro lado, a origem do RNA ativador da quarta via, denominada siRNA, é exógena.

O sistema siRNA tem sido apontado como a principal resposta antiviral de *D. melanogaster* e de mosquitos (Blair 2011). Após a infecção, as moléculas longas de RNA dupla fita (dsRNA) de vírus são reconhecidas e clivadas por Dicer-2 (Dcr-2), em moléculas pequenas de RNA dupla fita (siRNAs), de 21 nucleotídeos (nt), conhecidos como viRNAs (Blair 2011, Karlikow, Goic et al., 2014). Os viRNAs associam-se à proteína Argonata-2 (Ago2), que se acopla a outras proteínas, formando um complexo proteico denominado RISC (*RNAi-induced silencing complex*). Apenas uma fita do viRNA permanece associada ao RISC, guiando a degradação de moléculas de RNA mensageiros (mRNA) complementares a ela (Blair 2011, Karlikow, Goic et al., 2014). O funcionamento da via endógena de miRNA é similar; porém, envolve Dcr-1 e Ago-1 (Asgari, 2014).

Em carrapatos, análises genômicas demonstraram uma expansão do número de genes codificadores de componentes do sistema RNAi. No genoma de *I. scapularis* foram encontrados cinco genes codificadores de Argonata: *Ago-78*, homólogo à *Ago-1* de insetos, e *Ago-96*, *-68*, *-16* e *-30*, que são homólogos à *Ago-2* (Schnettler, Tykalova et al., 2014). Além disso, os genes *Dcr-89* e *-90* de *I. scapularis* possuem similaridade com *Dcr-2* e *-1* de *D. melanogaster*, respectivamente. No carrapato *Hyalomma asiaticum*, duas cópias de *Dcr-2* e cinco de *Ago-2* foram identificadas (Yuan, Wu et al., 2020).

Em células embrionárias IDE8 de *I. scapularis*, foi demonstrado que *Ago-16* e *Ago-30* são importantes para o controle do vírus Langat (LGTV) (Schnettler, Tykalova et al., 2014). Além disso, *Dcr-90* também se mostrou importante para o

controle de LGTV, apesar de apresentar similaridade com a Dcr-1 de inseto, um componente da via miRNA e não da via siRNA (Schnettler, Tykalova et al., 2014). A função anti-LGTV de Ago-30 e Dcr-90 em células IDE8 foi confirmada por Weisheit e colaboradores (2015), que observaram o mesmo efeito em células IRE/CTVM19 de *Ixodes ricinus* (Weisheit, Villar et al., 2015).

Diferentemente de *D. melanogaster* e dos mosquitos, cujos viRNAs possuem 21 nt (Blair 2011), em carrapatos os viRNAs têm 22 nt (Schnettler, Tykalova et al., 2014). Também foi demonstrado que em larvas, ninfas e adultos de *I. scapularis* infectados com o vírus Powassan (POWV), os viRNAs são originados das regiões UTR (do inglês, *untranslated region*) das fitas senso e antissenso do genoma (Grubaugh, Ruckert et al., 2016). Além disso, a diversidade genética de POWV, em carrapatos, é menor que em camundongos, sugerindo que exista um maior controle viral no vetor do que no hospedeiro vertebrado (Grubaugh, Ruckert et al., 2016).

Estudos recentes também demonstraram que vírus (Hermance, Widen et al., 2019) e bactérias (Artigas-Jeronimo, Alberdi et al., 2019) são capazes de modular o conjunto de miRNAs presentes nas células, o que pode estar envolvido no controle de infecções (Artigas-Jeronimo, Alberdi et al., 2019; Hermance, Widen et al., 2019). Em contrapartida, RNA subgenômicos (sfRNA) da região 3' UTR dos vírus LGTV e TBEV são expressos, representando uma possível estratégia de evasão viral do sistema RNAi (Schnettler, Tykalova et al., 2014). Até o momento, não existem relatos sobre o papel da via piRNA de carrapatos em resposta à infecção, apesar da sua importância ter sido anteriormente demonstrada em mosquitos (Morazzani, Wiley et al., 2012; Vodovar, Bronkhorst et al., 2012).

Os peptídeos antimicrobianos (AMP)

Os AMP são moléculas efectoras presentes em diferentes organismos, incluindo animais invertebrados e vertebrados, e possuem um amplo espectro de ação contra uma extensa lista de microrganismos (Bulet, Stocklin et al., 2004). Dentre os diversos AMP identificados em carrapatos (Kopacek, Hajdusek et al., 2010; Hajdusek, Sima et al., 2013; Smith and Pal, 2014; Sonenshine and Macaluso, 2017), destacamos as microplusinas (também conhecidas como hebraínas) como as mais amplamente caracterizadas. A microplusina é um AMP rico em resíduos de cisteína e histidina. Esse AMP foi isolado, pela primeira vez, da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* (Fogaca, Lorenzini et al., 2004). Simultaneamente, outro grupo de pesquisa identificou um AMP com 61% de identidade com a microplusina na hemolinfa de fêmeas de

Amblyomma hebraeum, o qual foi denominado hebraeína (Lai, Takeuchi et al., 2004). A microplusina também foi identificada nos ovários e nos ovos de *R. microplus* (Esteves, Fogaca et al., 2009), indicando que esse AMP, além de proteger a hemocele contra patógenos, também atua na proteção do embrião antes e depois da oviposição.

A microplusina possui a propriedade de quelar íons metálicos (Silva, Rezende et al., 2009), interferindo na respiração da bactéria *M. luteus* de maneira cobre-dependente (Silva, Rezende et al., 2009). O mesmo efeito foi observado sobre a levedura *Cryptococcus neoformans* (Silva, Rossi et al., 2011), na qual também afeta a melanização e a formação da cápsula, dois importantes fatores de virulência dependentes de cobre (Silva, Rossi et al., 2011). Em carrapatos *Amblyomma aureolatum*, vetor de *R. rickettsii*, o silenciamento da microplusina provocou um aumento da prevalência de carrapatos infectados e da carga bacteriana no intestino das fêmeas adultas (Martins, Malossi et al., 2019). Por outro lado, nenhum efeito foi observado sobre a transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado ou sobre o *fitness* do carrapato.

Outra classe de AMP descrita em várias espécies de carrapato são as defensinas (Kopacek, Hajdusek et al., 2010; Sonenshine and Macaluso 2017). Em *Dermacentor variabilis*, a neutralização da defensina-2 com IgG antidefensina-2 aumentou o nível de infecção do intestino dos carrapatos por *Rickettsia montanensis* (Pelc, McClure et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que esse AMP permeabiliza a membrana da bactéria, provocando extravasamento do conteúdo citoplasmático (Pelc, McClure et al., 2014).

Inibidores de serino proteinases com atividade antimicrobiana também foram identificados em carrapatos. A ixodidina, isolada dos hemócitos de *R. microplus*, foi o primeiro relato de um peptídeo com atividade inibitória sobre serino proteinases e atividade antibacteriana (Fogaca, Almeida et al., 2006). Um inibidor de serino proteinases Kunitz-type também apresentou a capacidade de controlar a infecção provocada por *R. montanensis* no intestino de carrapatos *D. variabilis* (Ceraul, Chung et al., 2011). Diferentemente da defensina-2, esse inibidor apresentou um efeito bacteriostático (Ceraul, Dreher-Lesnicks et al., 2008).

Dae2 é um AMP identificado em *I. scapularis*, que foi adquirido pela transferência horizontal de genes bacterianos (Chou, Daugherty et al., 2015). Embora não exerça uma ação direta sobre *B. burgdorferi* (Smith, Navasa et al., 2016), foi sugerido que o peptídeo atue no controle da proliferação do patógeno, em conjunto com outros agentes antimicrobianos (Chou, Daugherty et al., 2015). De fato, mais recentemente, foi demonstrado que Dae2 não é capaz de atravessar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, necessitando de fatores

permeabilizantes para apresentar uma ação anti-*B. burgdorferi* (Hayes, Radkov et al., 2020). Dae2 também está presente na saliva de *I. scapularis* e apresenta atividade contra bactérias usualmente encontradas na pele do hospedeiro, sugerindo que possa controlar a proliferação bacteriana no sítio de alimentação (Hayes, Radkov et al., 2020).

Além disso, carrapatos também se utilizam da hemoglobina presente no sangue do hospedeiro como fonte para geração de fragmentos com atividade antimicrobiana (Fogaca, da Silva et al., 1999; Nakajima, Ogihara et al., 2003; Sonenshine, Hynes et al., 2005; Belmonte, Cruz et al., 2012). Os AMPs derivados da hemoglobina são denominados hemocidinas (Dubin, Mak et al., 2005) e, em carrapatos, são produzidos pela ação de aspártico e cisteína (tipo catepsina-L) proteases presentes no intestino (Cruz, Fogaca et al., 2010). Até o momento, entretanto, não foi demonstrado se as hemocidinas atuam intracelularmente (células do epitélio) ou no lúmen do intestino dos carrapatos.

Apesar da natureza diversificada das moléculas utilizadas por carrapatos, como antimicrobianos, pouco ainda se sabe sobre a regulação da síntese dessas moléculas pelas vias de sinalização do sistema imune.

O metabolismo redox

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS; do inglês, *reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS; do inglês, *reactive nitrogen species*) também é uma reação de artrópodes a infecções (Ha, Oh et al., 2005). Além da ação direta contra patógenos, as ROS também desempenham um papel importante nos processos de sinalização, de reparação de injúrias teciduais e de regulação de proliferação, de diferenciação e de morte celular (Fang, 2004; Jones, 2006).

Foi descrito que os hemócitos do carrapato *R. microplus* respondem a estímulos bióticos (bactéria gram-positiva *M. luteus*) e abióticos (zymosan e *phorbol 12-myristate 13-acetate*), produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻) (Pereira, Oliveira et al., 2001). Por outro lado, o estímulo dos hemócitos com LPS (lipopolissacarídeo), um MAMP da membrana externa de bactérias gram-negativas não desencadeou a produção de ROS (Pereira, Oliveira et al., 2001).

Anaplasma marginale induz a expressão de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, tioredoxina, tioredoxina peroxidase e peroxirredoxina) em células BME26, que são derivadas de embriões de *R. microplus* (Kalil, Rosa et al., 2017). Além disso, o

silenciamento gênico simultâneo da catalase, da tiorredoxina e da glutathione peroxidase ou da OXR1 (do inglês, *oxidation resistance 1*), sendo essa última reguladora da expressão de enzimas antioxidantes, levou a uma diminuição da proliferação de *A. marginale* em células BME26 (Kalil, Rosa et al., 2017). O perfil de expressão de células BME26 ao estímulo com microrganismos não-patogênicos é contrário ao perfil deflagrado por *A. marginale*, sendo observada a indução da expressão de enzimas oxidantes e a diminuição da expressão de enzimas antioxidantes. Em conjunto, os resultados sugerem que *A. marginale* possa manipular o metabolismo redox em células BME26 (assim como previamente descrito para os componentes das vias de sinalização do sistema imune), criando um ambiente antioxidante favorável à sua sobrevivência e proliferação (Kalil, Rosa et al., 2017).

Um estudo funcional demonstrou que o silenciamento gênico da subunidade III da citrato sintase (*COXIII*) de *R. microplus*, um componente do complexo IV da cadeia respiratória, é capaz de bloquear a transmissão de *A. marginale* para bezerros (Bifano, Ueti et al., 2014). Como a cadeia respiratória está envolvida na geração de ATP, sendo também uma fonte importante da produção de ROS, é possível que o silenciamento da COXIII ocasione um desbalanço na produção de energia e/ou no metabolismo redox, exercendo um impacto negativo na transmissão de *A. marginale* para o hospedeiro (Bifano, Ueti et al., 2014).

O silenciamento gênico da peroxirredoxina Salp25D afetou negativamente a aquisição de *B. burgdorferi* por *I. scapularis* através da alimentação natural sobre camundongos infectados (Narasimhan, Sukumaran et al., 2007). Um efeito similar foi observado quando os carrapatos foram alimentados sobre camundongos imunizados com Salp25D. Porém, nenhum efeito sobre a transmissão da bactéria foi observado (Narasimhan, Sukumaran et al., 2007). Com base nos resultados encontrados, os autores sugerem que a peroxirredoxina exerça um papel na destoxificação de ROS no sítio da alimentação e no intestino de carrapatos, criando um ambiente favorável para a proliferação de *B. burgdorferi*.

Mais recentemente, foi demonstrado que a produção de ROS em células ISE6 é estimulada pela infecção com *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi*, um processo que requer a fosforilação IRE1 α e a ativação de Relish (Sidak-Loftis, Rosche et al., 2022).

Imunidade celular: os hemócitos e a fagocitose

A hemocele dos artrópodes é preenchida por um fluido, a hemolinfa, que banha todos os órgãos, sendo responsável pelo transporte de gases e de nutrientes (Sonenshine, 2013). A hemolinfa é composta por uma fração acelular, o plasma, e por uma fração celular, os hemócitos, que podem ser sésseis ou circulantes. Os hemócitos estão envolvidos em diversas reações do sistema imune, dentre elas: a fagocitose; a encapsulação; a nodulação [que envolve a cascata da PPO (do inglês, *prophenoloxidase*)]; a coagulação e a produção de diversos fatores do sistema imune, incluindo efetores, tais como AMP e ROS.

Em carrapatos, estudos com abordagens morfológicas e fisiológicas apontaram a existência de três tipos de hemócitos: plasmatócitos fagocíticos (que são células não granulares), granulócitos fagocíticos e granulócitos não-fagocíticos (Kuhn and Haug, 1994; Inoue, Hanada et al., 2001; Borovickova and Hypsa; 2005). Mais recentemente, estudos apontaram a existência de tipos adicionais de hemócitos, incluindo adipo-hemócitos em *Rhipicephalus sanguineus* (Feitosa, Alves et al., 2015), e esferulócitos e oenocitoides em *R. microplus* (Fiorotti, Menna-Barreto et al., 2019). Todos esses tipos celulares parecem se diferenciar a partir de pró-hemócitos, cuja ocorrência é extremamente rara (Borovickova and Hypsa, 2005; Fiorotti, Menna-Barreto et al., 2019).

Diversos estudos reportaram a fagocitose de bactérias – incluindo espiroquetas – fungos e partículas inertes por hemócitos de diferentes espécies de carrapatos (Pereira, Oliveira et al., 2001; Dunham-Ems, Caimano et al., 2009; Buresova, Hajdusek et al., 2011; Urbanova, Sima et al., 2015; Urbanova, Hajdusek et al., 2017). Em relação à encapsulação e à nodulação, até o momento, existe apenas um relato de cada processo na literatura, ambos em *D. variabilis* (Eggenberger, Lamoreaux et al., 1990; Ceraul, Sonenshine et al., 2002). A formação de uma camada circular de hemócitos, característica da encapsulação, foi observada ao redor de um implante de Epon-Araldite sob a cutícula dos carrapatos. Apesar de não ter sido avaliado se a encapsulação ocorre também em resposta a microrganismos (Eggenberger, Lamoreaux et al., 1990), agregados de hemócitos foram observados ao redor de bactérias *Escherichia coli*, sugerindo a ocorrência do processo de nodulação (Ceraul, Sonenshine et al., 2002).

As cascatas da PPO e da coagulação

Em insetos e crustáceos, os hemócitos produzem os componentes da cascata de ativação da PPO, a qual resulta na produção de melanina (Cerenius

and Soderhall, 2004; Nakhleh, El Moussawi et al., 2017). O processo da melanização pode ser localizado, ocorrendo no sítio de uma injúria da cutícula, por exemplo, ou sistemicamente, no caso de uma infecção. Não existem evidências genômicas e transcriptômicas que suportem a existência da cascata da PPO em carrapatos. Além disso, nenhuma atividade de PO (do inglês, *phenoloxidase*) foi detectada na hemolinfa dos carrapatos *Amblyomma americanum*, *D. variabilis* e *I. scapularis* (Zhioua, Browning et al., 1997). Intrigantemente, foi detectada uma atividade similar à atividade de PO nos carrapatos *R. sanguineus* (Feitosa, Chaves et al., 2018) e *Ornithodoros moubata* (Kadota, Satoh et al., 2002). Porém, além do controle com inibidor específico da PO (feniltioreia) não ter sido empregado nos ensaios, a(s) enzima(s) responsável(is) pela atividade não foi(foram) isolada(s) e caracterizada(s).

A cascata da coagulação, que tem como produto final um coágulo proteico, também corresponde a uma reação importante do sistema imune de artrópodes. Além de aprisionar microrganismos invasores, impedindo sua dispersão, a coagulação ainda previne a perda de hemolinfa no caso de uma injúria na cutícula (Jiravanichpaisal, Lee et al., 2006). Em limulídeos (quelicerados marinhos), a cascata da coagulação envolve a ativação em cadeia de uma série de serino proteases, que ocorre após o reconhecimento de MAMP. No passo final da via, o coagulogênio é convertido em coagulina pela ação da enzima da coagulação (Iwanaga and Lee, 2005). Transglutaminases também participam da etapa final da coagulação de limulídeos, realizando o *cross-linking* da coagulina com as proximas da superfície dos hemócitos (Osaki, Okino et al., 2002). Ademais, as transglutaminases também são as enzimas responsáveis pela coagulação em crustáceos, através do *cross-linking* de proteínas do plasma homólogas às vitelogeninas (Kopacek, Hall et al., 1993, Jiravanichpaisal; Lee et al., 2006). Apesar de a cascata da coagulação ainda não ter sido descrita em carrapatos, o genoma de *I. scapularis* codifica transglutaminases e precursores de enzimas da coagulação (Smith and Pal, 2014). Além disso, uma serino protease homóloga ao Fator C de limulídeos, responsiva à injúria, foi caracterizada em *I. ricinus* (Urbanova, Hartmann et al., 2014).

O sistema complemento

O sistema complemento corresponde a uma importante reação da imunidade celular e humoral, tanto de animais vertebrados quanto de invertebrados. Em vertebrados, os microrganismos invasores são reconhecidos, opsonizados e eliminados através da via clássica, da via das lectinas ou da via alternativa do sistema complemento (Ricklin, Hajishengallis et al., 2010).

Em artrópodes, o sistema complemento foi bem caracterizado em limulídeos (Iwanaga and Lee, 2005; Zhu, Thangamani et al., 2005; Kawabata, 2010). Nesses animais, as lectinas taquilectina-5 ou carconolectina-5 são responsáveis pelo reconhecimento de MAMP (Gokudan, Muta et al., 1999; Kawabata and Tsuda, 2002; Zhu, Ng et al., 2006). Uma lectina ortóloga à taquilectina-5 de limulídeos, denominada dorina M, foi isolada do plasma do carrapato *O. moubata* (Kovar, Kopacek et al., 2000; Rego, Kovar et al., 2006). Nos carrapatos *I. ricinus* e *I. scapularis*, dois tipos de lectinas estão presentes, as quais são denominadas ixoderinas A e B. A ixoderina A foi isolada do plasma de *I. scapularis* e apresentou a propriedade de hemaglutinar eritrócitos de camundongos (Honig Mondekova, Sima et al., 2017). Transcritos da ixoderina B foram detectados em transcriptomas de glândulas salivares de *I. ricinus* (Schwarz, von Reumont et al., 2013; Perner, Kropackova et al., 2018). Esse resultado sugere que a ixoderina B seja secretada na saliva, podendo exercer um papel no reconhecimento do hospedeiro.

A família TEP (do inglês, *thioester-containing protein*), previamente denominada superfamília das α_2 -macroglobulinas, desempenha um papel central no sistema complemento de animais vertebrados e invertebrados (Blandin, Marois et al., 2008; Ricklin, Hajjshengallis et al., 2010; Shokal and Eleftherianos, 2017). Em artrópodes, as TEP são classificadas em α_2 M (*panprotease inhibitors of the α_2 -macroglobulin type*), C3 (*C3-like complement components*), TEP (*insect-type TEP*) e MCR (*macroglobulin complement-related proteins*) (Stroschein-Stevenson, Foley et al., 2006; Buresova, Hajdusek et al., 2011; Sekiguchi and Nonaka, 2015). Buscas no genoma de *I. scapularis* (Buresova, Hajdusek et al., 2011) e de limulídeos (Simpson, Ramsdell et al., 2017; Zhou, Liang et al., 2020) revelaram a existência de genes codificadores de diferentes tipos de TEP. Ortólogos de nove TEP de *I. scapularis* (Buresova, Hajdusek et al., 2011) também foram identificados em *I. ricinus* (Urbanova, Sima et al., 2015). Assim como as lectinas, a expressão das TEP se mostrou órgão-dependente, sendo IrA2M-1, IrA2M-3, IrC3-1, IrC3-2 e IrC3-3 mais expressas no corpo gorduroso, IrA2M-2 e IrA2M-3 nos hemócitos, IrC3-2 e IrMcr-1 nas glândulas salivares e IrTEP nos ovários (Urbanova, Sima et al., 2015). Duas convertases identificadas em *I. ricinus*, IrC2/Bf (Urbanova, Hajdusek et al., 2018) e IrFC (Urbanova, Hartmann et al., 2014), também apresentam expressão diferencial em diferentes órgãos e em resposta a diferentes estímulos. IrC2/Bf, que é homóloga a convertases de limulídeos (Zhu, Thangamani et al., 2005; Tagawa, Yoshihara et al., 2012), é expressa, majoritariamente, no corpo gorduroso após o estímulo com a levedura *Candida albicans* e com espiroquetas do gênero *Borrelia* (Urbanova, Hajdusek et

al., 2018). IrFC é homóloga ao Fator C de *Limulus*, o qual apresenta uma função dupla, ativando a cascata da coagulação após o reconhecimento de MAMP de bactérias gram-negativas, e atuando como uma convertase do sistema complemento (Le Saux, Ng et al., 2008; Kawabata, 2010). A expressão da IrFC é induzida nos hemócitos por qualquer tipo de injúria, incluindo a administração de salina estéril, o que sugere que esteja envolvida com a coagulação da hemolinfa e com o reparo tecidual (Urbanova, Hartmann et al., 2014).

Estudos funcionais também mostraram que a IrFC, com a participação de IrC3-3, desempenha um papel na fagocitose da bactéria gram-negativa *Chryseobacterium indologenes* (Buresova, Franta et al., 2006). A fagocitose dessa bactéria, que é patogênica para carrapatos, também é mediada pelas α_2 M IrAM2-1 e IrAM2-2, provavelmente por uma ação sobre uma metaloprotease por ela secretada (Buresova, Franta et al., 2006). A convertase IrC2/Bf, por sua vez participa na fagocitose de *C. albicans* e *Borrelia*. A fagocitose de *C. albicans* também tem a participação de IrC3-1 e de IrMcr-2. Finalmente, as ixoderinas A e B estão relacionadas à fagocitose de todos os microrganismos avaliados, com exceção de *Borrelia* (Urbanova, Hajdusek et al., 2017).

A morte celular regulada

Na última década, os processos de morte celular regulada (RCD, do inglês, *regulated cell death*), tais como a autofagia e a apoptose, vêm sendo apontados como mecanismos importantes tanto para a regulação da resposta imune quanto para o controle de infecções (Ashida, Mimuro et al., 2011; Cooper and Mitchell-Foster, 2011; Steinert and Levashina, 2011).

Na autofagia, materiais endógenos, tais como proteínas dobradas erroneamente, agregados proteicos, organelas danificadas, ou materiais exógenos, como microrganismos invasores, são reconhecidos e internalizados em autofagossomos. Subsequentemente, os autofagossomos fundem-se aos lisossomos, levando à degradação do seu conteúdo (Kuo, Hansen et al., 2018). A autofagia é um processo altamente conservado em eucariotos, sendo executada por ATG (do inglês, *conserved autophagy-related proteins*) (Kuo, Hansen et al., 2018). Foi reportado que o jejum induz a expressão de genes codificadores de ATG, em diferentes espécies de carrapatos, incluindo *Haemaphysalis longicornis* (Umemiya, Matsuo et al., 2008; Kawano, Umemiya-Shirafuji et al., 2011), *I. scapularis* (Wang, Kurtti et al., 2020), *R. microplus* e *A. sculptum* (Moura-Martiniano, Machado-Ferreira et al., 2017). Embora esses estudos confirmem que a autofagia de carrapatos responda ao estresse, nenhum deles correlacionou esse processo com a resposta a infecções.

A apoptose é um RCD essencial para a remoção de células danificadas ou infectadas, garantindo a manutenção da homeostase. Esse processo é ativado por duas vias principais: i) a via extrínseca, ativada por fatores externos, que são reconhecidos por receptores de morte presentes na membrana plasmática; e ii) a via intrínseca, ativada por fatores intracelulares e na qual as mitocôndrias desempenham um papel central. Ambas levam à ativação de caspases executoras, cuja ação resulta na condensação da cromatina, na fragmentação do DNA, na degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, na reticulação de proteínas, na formação de corpos apoptóticos e na expressão de ligantes para receptores de células fagocitárias (Elmore, 2007). Um fator importante para o reconhecimento e a fagocitose de células apoptóticas é a translocação da fosfatidilserina da face interna para a face externa da membrana plasmática (Fadok, de Cathelineau et al., 2001, Segawa and Nagata, 2015).

A infecção de células IRE/CTVM20 de *I. ricinus* com a bactéria *A. phagocytophilum* ou com os flavivírus TBEV e LIV induziu a expressão de diversos genes codificadores de componentes das vias da apoptose, tais como: o citocromo c e FAS (do inglês, *fatty-acid synthase*) (Alberdi, Mansfield et al., 2016; Mansfield, Cook et al., 2017). Para subverter a apoptose, garantindo, assim, a sua sobrevivência e replicação nas células hospedeiras, alguns patógenos desenvolveram uma série de estratégias (Lamkanfi and Dixit, 2010). Por exemplo, a infecção com a bactéria *A. phagocytophilum* ocasiona uma diminuição dos níveis da porina nas glândulas salivares de *I. scapularis* e em células ISE6, que, por sua vez, diminuem a liberação do citocromo c das mitocôndrias, inibindo a via intrínseca da apoptose (Ayllon, Villar et al., 2013; Alberdi, Ayllon et al., 2015; Alberdi, Mansfield et al., 2016). Intrigantemente, ao mesmo tempo que a via intrínseca é inibida, a infecção inibe FAS, ativando a via extrínseca, possivelmente como uma tentativa de a célula hospedeira controlar a infecção (Ayllon, Villar et al., 2013; Ayllon, Villar et al., 2015). Também foi descrito que *R. rickettsii* inibe a apoptose em células BME26, prevenindo a fragmentação de DNA e reduzindo a atividade de caspase-3, bem como a exposição de fosfatidilserina. Importaneamente, o crescimento bacteriano é maior em células tratadas com um inibidor de caspase-3, sugerindo que a inibição da apoptose seja importante para garantir a colonização da célula hospedeira (Martins, Palmisano et al., 2020).

A apoptose é regulada por IAP (do inglês, *inhibitors of apoptosis proteins*) (Orme and Meier, 2009; Berthelet and Dubrez, 2013), que possuem pelo menos dois domínios altamente conservados: i) BIR (do inglês, *baculoviral IAP repeat*), com uma a três cópias *in tandem* na região N-terminal; e ii) RING (do inglês, *really interesting new gene*), presente na região C-terminal, que apresenta atividade de

E3-ligase. O silenciamento gênico da XIAP da via IMD de *I. scapularis* ocasionou o aumento da colonização do carrapato por *A. phagocytophilum* (Severo, Choy et al., 2013). O silenciamento gênico de uma IAP de *A. sculptum* similar à XIAP de *I. scapularis* levou ao aumento da atividade da caspase-3 e da exposição de fosfatidilserina, indicando que a IAP inibe a apoptose nessa espécie. Além disso, o silenciamento gênico da IAP, seguido da aquisição sanguínea, ocasionou uma elevada mortalidade de carrapatos, demonstrando que a expressão dessa IAP é fundamental para sua sobrevivência durante a alimentação (Nassar, Martins et al., 2023).

O papel da microbiota na competência vetorial de carrapatos

Os carrapatos, assim como outros animais metazoários, possuem uma microbiota composta por bactérias, arqueobactérias, vírus e fungos (Bonnet, Binetruy et al., 2017). Na última década, vários estudos têm se concentrado na determinação da composição bacteriana de diferentes gêneros de carrapatos e explorado a interação entre simbiontes não-patogênicos e patógenos transmitidos por carrapatos, de modo a compreender o papel da microbiota na competência vetorial (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014; Abraham, Liu et al., 2017; Duron, Binetruy et al., 2017; Narasimhan, Schuijt et al., 2017; Pavanelo, Schröder et al., 2020).

De todas as bactérias presentes na microbiota dos artrópodes, *Wolbachia pipientis* (a partir daqui, denominada somente de *Wolbachia*) é o simbionte com maior distribuição, pois está presente em 40% de todas as espécies terrestres (Zug and Hammerstein, 2012). Mesmo sendo a bactéria mais comum na microbiota dos insetos, *Wolbachia* foi relatada em apenas poucas espécies de carrapatos (Andreotti, Pérez de León et al., 2011; Duron, Binetruy et al., 2017; Cerutti, Modesto et al., 2018). Isso porque os gêneros de bactérias da microbiota mais comuns em carrapatos adultos são *Coxiella*, *Rickettsia*, *Francisella*, *Spiroplasma*, *Midichloria* e *Rickettsiella* (Bonnet, Binetruy et al., 2017; Duron, Binetruy et al., 2017). A maioria dessas bactérias é intracelular e não cultivável, de modo que a sua manipulação é dificultada, tendo um consequente impacto nos estudos para a determinação de seu papel no *fitness* dos carrapatos e/ou na interação com patógenos.

Algumas espécies de carrapatos, como *R. microplus* e *I. ricinus*, apresentam uma microbiota bastante escassa no intestino (Guizzo, Neupane et al., 2020). Por outro lado, essas duas espécies apresentam uma microbiota mais abundante e estável nos ovários, composta, principalmente, por bactérias dos

gêneros *Midichloria* spp. em *I. ricinus* (Guizzo, Neupane et al., 2020) e *Coxiella* spp. em *R. microplus* (Guizzo, Parizi et al., 2017). Contrariamente, estudos sobre a microbiota de larvas de *I. scapularis* (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014; Abraham, Liu et al., 2017; Narasimhan, Schuijt et al., 2017) mostraram uma grande variedade de gêneros bacterianos, incluindo bactérias extracelulares cultiváveis. Uma análise profunda de bioinformática dos dados brutos desses estudos sugeriu um núcleo taxonômico composto por 61 táxons bacterianos (Estrada-Peña, Cabezas-Cruz et al., 2020). No entanto, esse alto número de gêneros bacterianos foi questionado, devido ao levantamento da hipótese de uma provável contaminação (Ross, Hayes et al., 2018; Kurokawa, Lynn et al., 2020).

A microbiota de carrapatos pode exercer um efeito sobre a capacidade vetorial. Complementarmente, uma infecção bacteriana também pode modificar a microbiota de seu hospedeiro. Em *I. scapularis*, a perturbação na microbiota intestinal diminui a expressão do fator de transcrição STAT, que, por sua vez, reduz a expressão de peritrofina-1, uma proteína componente da matriz peritrófica. Uma vez que a integridade da matriz peritrófica é essencial para a colonização do intestino do carrapato por *B. burgdorferi*, como discutido anteriormente, a alteração na microbiota reduz a colonização por essa bactéria (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014). A infecção por *B. burgdorferi*, por sua vez, promove a expressão do gene *pixr* de *I. scapularis*, que codifica uma proteína secretada pelo intestino com funções importantes para a o carrapato, como a muda e a inibição da formação do biofilme (preferencialmente por bactérias gram-positivas), fatores que favorecem a colonização do vetor (Narasimhan, Schuijt et al., 2017). Por outro lado, *A. phagocytophilum* induz a expressão de uma proteína anticongelamento, que perturba a microbiota intestinal e reduz a integridade da matriz peritrófica (Abraham, Liu et al., 2017). Porém, ao contrário de *B. burgdorferi* (Narasimhan, Rajeevan et al., 2014), a redução da matriz peritrófica favorece a colonização do intestino por *A. phagocytophilum*, que é intracelular (Abraham, Liu et al., 2017).

Um estudo comparou a microbiota de dois carrapatos vetores de *R. rickettsii* no Brasil, sendo eles: *A. aureolatum* e *Amblyomma sculptum*, que apresentaram diferenças na suscetibilidade à infecção (Labruna, Ogrzewalska et al., 2008). *A. aureolatum* é altamente suscetível à infecção por *R. rickettsii* e apresenta uma microbiota intestinal proeminente, composta, principalmente, por bactérias do gênero *Francisella*, sugerindo uma endossimbiose. *A. sculptum*, por outro lado, é menos suscetível à *R. rickettsii* e apresenta uma microbiota intestinal escassa (Pavanelo, Schröder et al., 2020). Foi relatado que a resposta transcricional do intestino desses dois carrapatos à infecção por *R. rickettsii*

também é distinta: enquanto a maioria dos genes de *A. sculptum*, incluindo fatores do sistema imune, são induzidos em resposta à infecção, já os genes de *A. aureolatum* são reprimidos (Martins, Galletti et al., 2017). Outro estudo sobre a microbiota intestinal de *A. aureolatum* confirmou a presença majoritária de bactérias do gênero *Francisella*, incluindo em carrapatos coletados a campo em diferentes localidades (Dall'Agnol, McCulloch et al., 2021). Similarmente, a presença de *Francisella* endossimbionte impactou, positivamente, a colonização de *D. andersoni* pela bactéria patogênica *Francisella novicida* (Gall, Reif et al., 2016). Em conjunto, esses dados sugerem que *Francisella* endossimbionte possa dessensibilizar o sistema imune no intestino dos carrapatos, por um mecanismo ainda desconhecido, favorecendo a colonização por bactérias patogênicas, como *R. rickettsii* e *F. novicida*.

A alimentação de ninfas de *Haemaphysalis longicornis* sobre camundongos tratados com antibióticos causa a alteração da microbiota na fase adulta (Wei, Cao et al., 2021). Adultos provenientes de ninfas alimentadas sobre camundongos não tratados com antibiótico possuem *Ammoniphilus* e *Coxiella* como principais gêneros em seu intestino. O intestino daqueles provenientes de ninfas alimentadas sobre camundongos tratados com antibióticos, por outro lado, têm *Acinetobacter* e *Bacillaceae_Bacillus* como gêneros majoritários. O tratamento com antibiótico também impacta a transmissão transestadial de *Babesia microti*, da fase de ninfa para a fase adulta, alterando tanto a prevalência de carrapatos infectados quanto o número de parasitas em seus tecidos. Nesse contexto, os autores alertam sobre um possível aumento da transmissão de *B. microti* em áreas com uso intenso de antibióticos (Wei, Cao et al., 2021). A espessura da matriz peritrófica é menor no intestino dos carrapatos adultos provenientes de ninfas alimentadas sobre camundongos tratados com antibióticos. Esse resultado sugere que o aumento da permeabilidade dessa estrutura favoreça a infecção (Wei, Cao et al., 2021), assim como previamente reportado para a infecção de *I. scapularis* por *A. phagocytophilum* (Abraham, Liu et al., 2017).

Considerações finais

Os estudos sobre o sistema imune de carrapatos realizados até o momento mostraram que as vias de sinalização IMD e JAK/STAT são importantes para o controle da infecção de bactérias, incluindo *B. burgdorferi*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum*. Por outro lado, a via Toll e o sistema de RNAi parecem estar envolvidos no controle de infecções virais. Estudos adicionais são necessários

para uma melhor compreensão da ativação e do funcionamento dessas vias em carrapatos, bem como para a identificação dos efetores por elas regulados.

Da mesma forma, faz-se, ainda, necessário compreender o papel da coagulação, do metabolismo redox, dos processos de RCD e da microbiota no controle de patógenos. Assim, será possível apontar alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle, tanto de carrapatos quanto das doenças por eles transmitidas.

Referências

- Abraham, N. M., L. Liu, B. L. Jutras, A. K. Yadav, S. Narasimhan, V. Gopalakrishnan, J. M. Ansari, K. K. Jefferson, F. Cava, C. Jacobs-Wagner and E. Fikrig (2017). "Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(5): E781-E790.
- Alberdi, P., N. Ayllon, A. Cabezas-Cruz, L. Bell-Sakyi, E. Zweygarth, S. Stuenkel and J. de la Fuente (2015). "Infection of *Ixodes* spp. tick cells with different *Anaplasma phagocytophilum* isolates induces the inhibition of apoptotic cell death." *Ticks Tick Borne Dis* 6(6): 758-767.
- Alberdi, P., K. L. Mansfield, R. Manzano-Roman, C. Cook, N. Ayllon, M. Villar, N. Johnson, A. R. Fooks and J. de la Fuente (2016). "Tissue-specific signatures in the transcriptional response to *Anaplasma phagocytophilum* infection of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines." *Front Cell Infect Microbiol* 6: 20.
- Andreotti, R., A. A. Pérez de León, S. E. Dowd, F. D. Guerrero, K. G. Bendele and G. A. Scoles (2011). "Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing." *BMC Microbiol* 11(1): 6.
- Artigas-Jeronimo, S., P. Alberdi, M. Villar Rayo, A. Cabezas-Cruz, P. J. E. Prados, L. Mateos-Hernandez and J. de la Fuente (2019). "*Anaplasma phagocytophilum* modifies tick cell microRNA expression and upregulates *isc-mir-79* to facilitate infection by targeting the roundabout protein 2 pathway." *Sci Rep* 9(1): 9073.
- Asgari, S. (2014). "Role of microRNAs in arbovirus/vector interactions." *Viruses* 6(9): 3514-3534.
- Ashida, H., H. Mimuro, M. Ogawa, T. Kobayashi, T. Sanada, M. Kim and C. Sasakawa (2011). "Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival." *J Cell Biol* 195(6): 931-942.
- Ashida, M. (1990). "The prophenoloxidase cascade in insect immunity." *Res Immunol* 141(9): 908-910.
- Ashida, M. and P. T. Brey (1995). "Role of the integument in insect defense: prophenol oxidase cascade in the cuticular matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10698-10702.
- Ayllon, N., M. Villar, A. T. Busby, K. M. Kocan, E. F. Blouin, E. Bonzon-Kulichenko, R. C. Galindo, A. J. Mangold, P. Alberdi, J. M. Perez de la Lastra, J. Vazquez and J. de la Fuente (2013). "*Anaplasma phagocytophilum* inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells." *Infect Immun* 81(7): 2415-2425.
- Ayllon, N., M. Villar, R. C. Galindo, K. M. Kocan, R. Sima, J. A. Lopez, J. Vazquez, P. Alberdi, A. Cabezas-Cruz, P. Kopacek and J. de la Fuente (2015). "Systems biology of tissue-specific response to *Anaplasma phagocytophilum* reveals differentiated apoptosis in the tick vector *Ixodes scapularis*." *PLoS Genet* 11(3): e1005120.

- Barnard, A. C., A. M. Nijhof, W. Fick, C. Stutzer and C. Maritz-Olivier (2012). "RNAi in arthropods: insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface." *Genes (Basel)* 3(4): 702-741.
- Belmonte, R., C. E. Cruz, J. R. Pires and S. Daffre (2012). "Purification and characterization of Hb 98-114: a novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Peptides* 37(1): 120-127.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll-Dorsal pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 393-416.
- Berthelet, J. and L. Dubrez (2013). "Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)." *Cells* 2(1): 163-187.
- Bifano, T. D., M. W. Ueti, E. Esteves, K. E. Reif, G. R. Braz, G. A. Scoles, R. G. Bastos, S. N. White and S. Daffre (2014). "Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* Cytochrome c Oxidase Subunit III Gene Is Associated with a Failure of *Anaplasma marginale* Transmission." *PLoS One* 9(5): e98614.
- Blair, C. D. (2011). "Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission." *Future Microbiol* 6(3): 265-277.
- Blandin, S. A., E. Marois and E. A. Levashina (2008). "Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway." *Cell Host Microbe* 3(6): 364-374.
- Bonnet, S. I., F. Binetruy, A. M. Hernandez-Jarguin and O. Duron (2017). "The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 236.
- Borovickova, B. and V. Hypsa (2005). "Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*." *Exp Appl Acarol* 35(4): 317-333.
- Bowman, A. S. and J. R. Sauer (2004). "Tick salivary glands: function, physiology and future." *Parasitology* 129 Suppl: S67-81.
- Brey, P. T. (1998). The contributions of the Pasteur school of insect immunity. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. P. T. Brey and D. Hultmark. London, Chapman & Hall: 1-39.
- Bulet, P., R. Stocklin and L. Menin (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." *Immunol Rev* 198: 169-184.
- Buresova, V., Z. Franta and P. Kopacek (2006). "A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*." *J Invertebr Pathol* 93(2): 96-104.
- Buresova, V., O. Hajdusek, Z. Franta, G. Loosova, L. Grunclova, E. A. Levashina and P. Kopacek (2011). "Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system." *J Innate Immun* 3(6): 623-630.

Capelli-Peixoto, J., D. D. Carvalho, W. C. Johnson, G. A. Scoles, A. C. Fogaca, S. Daffre and M. W. Ueti (2017). "The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*." *Dev Comp Immunol* 74: 32-39.

Ceraul, S. M., A. Chung, K. T. Sears, V. L. Popov, M. Beier-Sexton, M. S. Rahman and A. F. Azad (2011). "A Kunitz protease inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits *Rickettsia montanensis* invasion." *Infect Immun* 79(1): 321-329.

Ceraul, S. M., S. M. Dreher-Lesnack, A. Mulenga, M. S. Rahman and A. F. Azad (2008). "Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*." *Infect Immun* 76(11): 5429-5435.

Ceraul, S. M., D. E. Sonenshine and W. L. Hynes (2002). "Resistance of the tick *dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae)." *J Med Entomol* 39(2): 376-383.

Cerenius, L. and K. Soderhall (2004). "The prophenoloxidase-activating system in invertebrates." *Immunol Rev* 198: 116-126.

Cerutti, F., P. Modesto, F. Rizzo, A. Cravero, I. Jurman, S. Costa, M. Giammarino, M. Mandola, M. Gorla, S. Radovic, F. Cattonaro, P. Acutis and S. Peletto (2018). "The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds." *PloS one* 13(8).

Chou, S., M. D. Daugherty, S. B. Peterson, J. Biboy, Y. Yang, B. L. Jutras, L. K. Fritz-Laylin, M. A. Ferrin, B. N. Harding, C. Jacobs-Wagner, X. F. Yang, W. Vollmer, H. S. Malik and J. D. Mougous (2015). "Transferred interbacterial antagonism genes augment eukaryotic innate immune function." *Nature* 518(7537): 98-101.

Christophides, G. K., E. Zdobnov, C. Barillas-Mury, E. Birney, S. Blandin, C. Blass, P. T. Brey, F. H. Collins, A. Danielli, G. Dimopoulos, C. Hetru, N. T. Hoa, J. A. Hoffmann, S. M. Kanzok, I. Letunic, E. A. Levashina, T. G. Loukeris, G. Lycett, S. Meister, K. Michel, L. F. Moita, H. M. Muller, M. A. Osta, S. M. Paskewitz, J. M. Reichhart, A. Rzhetsky, L. Troxler, K. D. Vernick, D. Vlachou, J. Volz, C. von Mering, J. Xu, L. Zheng, P. Bork and F. C. Kafatos (2002). "Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*." *Science* 298(5591): 159-165.

Cooper, D. and I. Eleftherianos (2017). "Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges." *Front Immunol* 8: 539.

Cooper, D. M. and K. Mitchell-Foster (2011). "Death for survival: what do we know about innate immunity and cell death in insects? ." *Invertebrate survival journal* 8: 162-172.

Cruz, C. E., A. C. Fogaca, E. S. Nakayasu, C. B. Angeli, R. Belmonte, I. C. Almeida, A. Miranda, M. T. Miranda, A. S. Tanaka, G. R. Braz, C. S. Craik, E. Schneider, C. R. Caffrey and S. Daffre (2010). "Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides." *Parasit Vectors* 3: 63.

Dall'Agnol, B., J. McCulloch, F. Mayer, U. Souza, A. Webster, P. Antunes, R. Doyle, J. Reck and C. Ferreira (2021). "Molecular characterization of bacterial communities of two neotropical tick species (*Amblyomma aureolatum* and *Ornithodoros brasiliensis*) using rDNA 16S sequencing." *Ticks and tick-borne diseases* 12(5).

Dantas-Torres, F. (2018). "Species Concepts: What about Ticks?" *Trends Parasitol* 34(12): 1017-1026.

Dantas-Torres, F., B. B. Chomel and D. Otranto (2012). "Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective." *Trends Parasitol* 28(10): 437-446.

Dantas-Torres, F., T. Fernandes Martins, S. Munoz-Leal, V. C. Onofrio and D. M. Barros-Battesti (2019). "Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys." *Ticks Tick Borne Dis* 10(6): 101252.

Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*." *Nat Immunol* 6(9): 946-953.

Dubin, A., P. Mak, G. Dubin, M. Rzychon, J. Stec-Niemczyk, B. Wladyka, K. Maziarka and D. Chmiel (2005). "New generation of peptide antibiotics." *Acta Biochim Pol* 52(3): 633-638.

Dunham-Ems, S. M., M. J. Caimano, U. Pal, C. W. Wolgemuth, C. H. Eggers, A. Balic and J. D. Radolf (2009). "Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks." *J Clin Invest* 119(12): 3652-3665.

Duron, O., F. Binetruy, V. Noël, J. Cremaschi, K. D. McCoy, C. Arnathau, O. Plantard, J. Goolsby, A. A. Pérez de León, D. J. A. Heylen, A. R. Van Oosten, Y. Gottlieb, G. Baneth, A. A. Guglielmone, A. Estrada-Peña, M. N. Opara, L. Zenner, F. Vavre and C. Chevillon (2017). "Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks." *Mol Ecol* 26(11): 2905-2921.

Eggenberger, L. R., W. J. Lamoreaux and L. B. Coons (1990). "Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*." *Exp Appl Acarol* 9(3-4): 279-287.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Engstrom, Y., L. Kadalayil, S. C. Sun, C. Samakovlis, D. Hultmark and I. Faye (1993). "kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*." *J Mol Biol* 232(2): 327-333.

Esteves, E., A. C. Fogaca, R. Maldonado, F. D. Silva, P. P. Manso, M. Pelajo-Machado, D. Valle and S. Daffre (2009). "Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis." *Dev Comp Immunol* 33(8): 913-919.

Estrada-Peña, A., A. Cabezas-Cruz and D. Obregón (2020). Resistance of Tick Gut Microbiome to Anti-Tick Vaccines, Pathogen Infection and Antimicrobial Peptides. *Pathogens*. 9.

Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson and D. L. Bratton (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." *J Biol Chem* 276(2): 1071-1077.

Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." *Nat Rev Microbiol* 2(10): 820-832.

Feitosa, A. P., L. C. Alves, M. M. Chaves, D. L. Veras, E. M. Silva, A. S. Alianca, I. R. Franca, G. G. Goncalves, J. L. Lima-Filho and F. A. Brayner (2015). "Hemocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae): characterization, population abundance, and ultrastructural changes following challenge with *Leishmania infantum*." *J Med Entomol* 52(6): 1193-1202.

Feitosa, A. P. S., M. M. Chaves, D. L. Veras, D. M. V. de Deus, N. C. J. Portela, A. R. Araujo, L. C. Alves and F. A. Brayner (2018). "Assessing the cellular and humoral immune response in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) infected with *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)." *Ticks Tick Borne Dis* 9(6): 1421-1430.

Fiorotti, J., R. F. S. Menna-Barreto, P. S. Golo, C. J. B. Coutinho-Rodrigues, R. O. B. Bitencourt, D. D. Spadacci-Morena, I. D. C. Angelo and V. Bittencourt (2019). "Ultrastructural and cytotoxic effects of *Metarhizium robertsii* infection on *Rhipicephalus microplus* hemocytes." *Front Physiol* 10: 654.

Fogaca, A. C., I. C. Almeida, M. N. Eberlin, A. S. Tanaka, P. Bulet and S. Daffre (2006). "Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases." *Peptides* 27(4): 667-674.

Fogaca, A. C., P. I. da Silva, Jr., M. T. Miranda, A. G. Bianchi, A. Miranda, P. E. Ribolla and S. Daffre (1999). "Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*." *J Biol Chem* 274(36): 25330-25334.

Fogaca, A. C., D. M. Lorenzini, L. M. Kaku, E. Esteves, P. Bulet and S. Daffre (2004). "Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile." *Dev Comp Immunol* 28(3): 191-200.

Fogaca, A. C., G. Sousa, D. B. Pavanelo, E. Esteves, L. A. Martins, V. Urbanova, P. Kopacek and S. Daffre (2021). "Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges." *Front Immunol* 12: 628054.

Gall, C. A., K. E. Reif, G. A. Scoles, K. L. Mason, M. Mousel, S. M. Noh and K. A. Brayton (2016). "The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility." *ISME J* 10(8): 1846-1855.

Garcia, G. R., S. R. Maruyama, T. Malardo, A. F. Zangirolamo and L. G. Gardinassi (2015). "The biology of hematophagous arthropods addressed by molecular high-throughput approaches." *Austin J Trop Med & Hyg* 1(1): 1004-1010.

Gokudan, S., T. Muta, R. Tsuda, K. Koori, T. Kawahara, N. Seki, Y. Mizunoe, S. N. Wai, S. Iwanaga and S. Kawabata (1999). "Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10086-10091.

Grisi, L., R. C. Leite, J. R. Martins, A. T. Barros, R. Andreotti, P. H. Cancado, A. A. Leon, J. B. Pereira and H. S. Villela (2014). "Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil." *Rev Bras Parasitol Vet* 23(2): 150-156.

Grubaugh, N. D., C. Ruckert, P. M. Armstrong, A. Bransfield, J. F. Anderson, G. D. Ebel and D. E. Brackney (2016). "Transmission bottlenecks and RNAi collectively influence tick-borne flavivirus evolution." *Virus Evol* 2(2): vew033.

Guizzo, M. G., S. Neupane, M. Kucera, J. Perner, H. Frantova, I. da Silva Vaz, P. L. de Oliveira, P. Kopacek and L. Zurek (2020). "Poor Unstable Midgut Microbiome of Hard Ticks Contrasts With Abundant and Stable Monospecific Microbiome in Ovaries." *Front Cell Infect Microbiol* 10: 211.

Guizzo, M. G., L. F. Parizi, R. D. Nunes, R. Schama, R. M. Albano, L. Tirloni, D. P. Oldiges, R. P. Vieira, W. H. C. Oliveira, M. d. S. Leite, S. A. Gonzales, M. Farber, O. Martins, I. d. S. Vaz and P. L. Oliveira (2017). "A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*." *Scientific Reports* 7(1): 17554.

Gulia-Nuss, M., A. B. Nuss, J. M. Meyer, D. E. Sonenshine, R. M. Roe, R. M. Waterhouse, D. B. Sattelle, J. de la Fuente, J. M. Ribeiro, K. Megy, J. Thimmapuram, J. R. Miller, B. P. Walenz, S. Koren, J. B. Hostetler, M. Thiagarajan, V. S. Joardar, L. I. Hannick, S. Bidwell, M. P. Hammond, S. Young, Q. Zeng, J. L. Abrudan, F. C. Almeida, N. Ayllon, K. Bhide, B. W. Bissinger, E. Bonzon-Kulichenko, S. D. Buckingham, D. R. Caffrey, M. J. Caimano, V. Croset, T. Driscoll, D. Gilbert, J. J. Gillespie, G. I. Giraldo-Calderon, J. M. Grabowski, D. Jiang, S. M. Khalil, D. Kim, K. M. Kocan, J. Koci, R. J. Kuhn, T. J. Kurtti, K. Lees, E. G. Lang, R. C. Kennedy, H. Kwon, R. Perera, Y. Qi, J. D. Radolf, J. M. Sakamoto, A. Sanchez-Gracia, M. S. Severo, N. Silverman, L. Simo, M. Tojo, C. Tornador, J. P. Van Zee, J. Vazquez, F. G. Vieira, M. Villar, A. R. Wespiser, Y. Yang, J. Zhu, P. Arensbarger, P. V. Pietrantonio, S. C. Barker, R. Shao, E. M. Zdobnov, F. Hauser, C. J. Grimmelhuijzen, Y. Park, J. Rozas, R. Benton, J. H. Pedra, D. R. Nelson, M. F. Unger, J. M. Tubio, Z. Tu, H. M. Robertson, M. Shumway, G. Sutton, J. R. Wortman, D. Lawson, S. K. Wikel, V. M. Nene, C. M. Fraser, F. H. Collins, B. Birren, K. E. Nelson, E. Caler and C. A. Hill (2016). "Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease." *Nat Commun* 7: 10507.

- Ha, E. M., C. T. Oh, Y. S. Bae and W. J. Lee (2005). "A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity." *Science* 310(5749): 847-850.
- Hajdusek, O., R. Sima, N. Ayllon, M. Jalovecka, J. Perner, J. de la Fuente and P. Kopacek (2013). "Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens." *Front Cell Infect Microbiol* 3: 26.
- Hayes, B. M., A. D. Radkov, F. Yarza, S. Flores, J. Kim, Z. Zhao, K. W. Lexa, L. Marnin, J. Biboy, V. Bowcut, W. Vollmer, J. H. F. Pedra and S. Chou (2020). "Ticks resist skin commensals with immune factor of bacterial origin." *Cell* 183(6): 1562-1571 e1512.
- Hermance, M. E., S. G. Widen, T. G. Wood and S. Thangamani (2019). "*Ixodes scapularis* salivary gland microRNAs are differentially expressed during Powassan virus transmission." *Sci Rep* 9(1): 13110.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* 284(5418): 1313-1318.
- Honig Mondokova, H., R. Sima, V. Urbanova, V. Kovar, R. O. M. Rego, L. Grubhoffer, P. Kopacek and O. Hajdusek (2017). "Characterization of *Ixodes ricinus* fibrinogen-related proteins (ixoderins) discloses their function in the tick innate immunity." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 509.
- Hultmark, D. (2003). "*Drosophila* immunity: paths and patterns." *Curr Opin Immunol* 15(1): 12-19.
- Imler, J. L. (2014). "Overview of *Drosophila* immunity: a historical perspective." *Dev Comp Immunol* 42(1): 3-15.
- Inoue, N., K. Hanada, N. Tsuji, I. Igarashi, H. Nagasawa, T. Mikami and K. Fujisaki (2001). "Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae)." *J Med Entomol* 38(4): 514-519.
- Iwanaga, S. and B. L. Lee (2005). "Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals." *J Biochem Mol Biol* 38(2): 128-150.
- Iwanaga, S., T. Miyata, F. Tokunaga and T. Muta (1992). "Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*." *Thromb Res* 68(1): 1-32.
- Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee and K. Soderhall (2006). "Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization." *Immunobiology* 211(4): 213-236.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1989). "Cellular immunity in crustaceans and the proPO system." *Parasitol Today* 5(6): 171-176.
- Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1865-1879.
- Kadota, K., E. Satoh, M. Ochiai, N. Inoue, N. Tsuji, I. Igarashi, H. Nagasawa, T. Mikami, F. G. Claveria and K. Fujisaki (2002). "Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*." *Parasitol Res* 88(8): 781-784.

Kalil, S. P., R. D. D. Rosa, J. Capelli-Peixoto, P. C. Pohl, P. L. Oliveira, A. C. Fogaca and S. Daffre (2017). "Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*." *Parasit Vectors* 10(1): 613.

Karlikow, M., B. Goic and M. C. Saleh (2014). "RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: setting up a systemic immune response." *Dev Comp Immunol* 42(1): 85-92.

Kawabata, S. (2010). "Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crabs." *Adv Exp Med Biol* 708: 122-136.

Kawabata, S. and R. Tsuda (2002). "Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins." *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 414-421.

Kawano, S., R. Umemiya-Shirafuji, D. Boldbaatar, K. Matsuoka, T. Tanaka and K. Fujisaki (2011). "Cloning and characterization of the autophagy-related gene 6 from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*." *Parasitol Res* 109(5): 1341-1349.

Kazimirova, M. and I. Stibraniova (2013). "Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission." *Front Cell Infect Microbiol* 3: 43.

Kleino, A. and N. Silverman (2014). "The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response." *Dev Comp Immunol* 42(1): 25-35.

Koch, H. G. S., J. R. (1984). "Quantity of Blood Ingested by Four Species of Hard Ticks (Acari: Ixodidae) Fed on Domestic Dogs." *Ann Entomol Soc Am* 77: 142-146.

Kopacek, P., O. Hajdusek, V. Buresova and S. Daffre (2010). "Tick innate immunity." *Adv Exp Med Biol* 708: 137-162.

Kopacek, P., M. Hall and K. Soderhall (1993). "Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*." *Eur J Biochem* 213(1): 591-597.

Kotal, J., H. Langhansova, J. Lieskovska, J. F. Andersen, I. M. Francischetti, T. Chavakis, J. Kopecky, J. H. Pedra, M. Kotsyfakis and J. Chmelar (2015). "Modulation of host immunity by tick saliva." *J Proteomics* 128: 58-68.

Kovar, V., P. Kopacek and L. Grubhoffer (2000). "Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*." *Insect Biochem Mol Biol* 30(3): 195-205.

Kuhn, K. H. and T. Haug (1994). "Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata)." *Cell Tissue Res* 277: 493-504.

Kuo, C. J., M. Hansen and E. Troemel (2018). "Autophagy and innate immunity: insights from invertebrate model organisms." *Autophagy* 14(2): 233-242.

Kurokawa, C., G. E. Lynn, J. H. F. Pedra, U. Pal, S. Narasimhan and E. Fikrig (2020). "Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks." *Nat Rev Microbiol*: 1-14.

Labruna, M. B., M. Ogrzewalska, T. F. Martins, A. Pinter and M. C. Horta (2008). "Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*." *J Med Entomol* 45(6): 1156-1159.

Lai, R., H. Takeuchi, L. O. Lomas, J. Jonczyk, D. J. Rigden, H. H. Rees and P. C. Turner (2004). "A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*." *FASEB J* 18(12): 1447-1449.

Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2010). "Manipulation of host cell death pathways during microbial infections." *Cell Host Microbe* 8(1): 44-54.

Le Saux, A., P. M. Ng, J. J. Koh, D. H. Low, G. E. Leong, B. Ho and J. L. Ding (2008). "The macromolecular assembly of pathogen-recognition receptors is impelled by serine proteases, via their complement control protein modules." *J Mol Biol* 377(3): 902-913.

Lemaitre, B. and J. Hoffmann (2007). "The host defense of *Drosophila melanogaster*." *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-983.

Lindsay, S. A. and S. A. Wasserman (2014). "Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling." *Dev Comp Immunol* 42(1): 16-24.

Liu, L., J. Dai, Y. O. Zhao, S. Narasimhan, Y. Yang, L. Zhang and E. Fikrig (2012). "*Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis." *J Infect Dis* 206(8): 1233-1241.

Mansfield, K. L., C. Cook, R. J. Ellis, L. Bell-Sakyi, N. Johnson, P. Alberdi, J. de la Fuente and A. R. Fooks (2017). "Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells." *Parasit Vectors* 10(1): 81.

Martins, L. A., M. F. B. M. Galletti, J. M. Ribeiro, A. Fujita, F. B. Costa, M. B. Labruna, S. Daffre and A. C. Fogaça (2017). "The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 129.

Martins, L. A., C. D. Malossi, M. Galletti, J. M. Ribeiro, A. Fujita, E. Esteves, F. B. Costa, M. B. Labruna, S. Daffre and A. C. Fogaça (2019). "The Transcriptome of the Salivary Glands of *Amblyomma aureolatum* Reveals the Antimicrobial Peptide Microplusin as an Important Factor for the Tick Protection Against *Rickettsia rickettsii* Infection." *Front Physiol* 10: 529.

Martins, L. A., G. Palmisano, M. Cortez, R. Kawahara, J. M. de Freitas Balanco, A. Fujita, B. I. Alonso, D. M. Barros-Battesti, G. R. C. Braz, L. Tirloni, E. Esteves, S. Daffre and A. C. Fogaca (2020). "The intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii* exerts an inhibitory effect on the apoptosis of tick cells." *Parasit Vectors* 13(1): 603.

McClure Carroll, E. E., X. Wang, D. K. Shaw, A. J. O'Neal, A. S. Oliva Chavez, L. J. Brown, V. M. Boradia, H. L. Hammond and J. H. F. Pedra (2019). "p47 licenses activation of the immune deficiency pathway in the tick *Ixodes scapularis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(1): 205-210.

Michel, K. and F. C. Kafatos (2005). "Mosquito immunity against *Plasmodium*." *Insect Biochem Mol Biol* 35(7): 677-689.

Morazzani, E. M., M. R. Wiley, M. G. Murreddu, Z. N. Adelman and K. M. Myles (2012). "Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma." *PLoS Pathog* 8(1): e1002470.

Moura-Martiniano, N. O., E. Machado-Ferreira, G. S. Gazeta and C. A. G. Soares (2017). "Relative transcription of autophagy-related genes in *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* ticks." *Exp Appl Acarol* 73(3-4): 401-428.

Nakajima, Y., K. Ogihara, D. Taylor and M. Yamakawa (2003). "Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae)." *J Med Entomol* 40(1): 78-81.

Nakhleh, J., L. El Moussawi and M. A. Osta (2017). "The melanization response in insect immunity." *Advances in Insect Physiology* 52: 83-109.

Narasimhan, S., N. Rajeevan, L. Liu, Y. Zhao, J. Heisig, J. Pan, R. Eppler-Epstein, K. Deponte, D. Fish and E. Fikrig (2014). "Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete." *Cell host & microbe* 15(1).

Narasimhan, S., N. Rajeevan, L. Liu, Y. O. Zhao, J. Heisig, J. Pan, R. Eppler-Epstein, K. Deponte, D. Fish and E. Fikrig (2014). "Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete." *Cell Host Microbe* 15(1): 58-71.

Narasimhan, S., T. Schuijt, N. Abraham, N. Rajeevan, J. Coumou, M. Graham, A. Robson, M. Wu, S. Daffre, J. Hovius and E. Fikrig (2017). "Modulation of the tick gut milieu by a secreted tick protein favors *Borrelia burgdorferi* colonization." *Nature communications* 8(1).

Narasimhan, S., B. Sukumaran, U. Bozdogan, V. Thomas, X. Liang, K. DePonte, N. Marcantonio, R. A. Koski, J. F. Anderson, F. Kantor and E. Fikrig (2007). "A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector." *Cell Host Microbe* 2(1): 7-18.

Nassar, M., L. A. Martins, J. B. de Assis, E. Esteves, A. Sa-Nunes, M. B. Labruna, S. Daffre and A. C. Fogaca (2023). "The survival of *Amblyomma sculptum* ticks upon blood-feeding depends on the expression of an inhibitor of apoptosis protein." *Parasit Vectors* 16(1): 96.

Nishide, Y., D. Kageyama, K. Yokoi, A. Jouraku, H. Tanaka, R. Futahashi and T. Fukatsu (2019). "Functional crosstalk across IMD and Toll pathways: insight into the evolution of incomplete immune cascades." *Proc Biol Sci* 286(1897): 20182207.

Oliva Chavez, A. S., D. K. Shaw, U. G. Munderloh and J. H. Pedra (2017). "Tick Humoral Responses: Marching to the Beat of a Different Drummer." *Front Microbiol* 8: 223.

Orme, M. and P. Meier (2009). "Inhibitor of apoptosis proteins in *Drosophila*: gatekeepers of death." *Apoptosis* 14(8): 950-960.

Osaki, T., N. Okino, F. Tokunaga, S. Iwanaga and S. Kawabata (2002). "Proline-rich cell surface antigens of horseshoe crab hemocytes are substrates for protein cross-linking with a clotting protein coagulin." *J Biol Chem* 277(42): 40084-40090.

Osman, D., N. Buchon, S. Chakrabarti, Y. T. Huang, W. C. Su, M. Poidevin, Y. C. Tsai and B. Lemaître (2012). "Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division." *J Cell Sci* 125(Pt 24): 5944-5949.

Palmer, W. J. and F. M. Jiggins (2015). "Comparative genomics reveals the origins and diversity of arthropod immune systems." *Mol Biol Evol* 32(8): 2111-2129.

Pavanelo, D. B., N. C. H. Schröder, N. D. Pin Viso, L. A. Martins, C. D. Malossi, M. F. B. M. Galletti, M. B. Labruna, S. Daffre, M. Farber and A. C. Fogaça (2020). "Comparative analysis of the midgut microbiota of two natural tick vectors of *Rickettsia rickettsii*." *Dev Comp Immunol* 106: 103606.

Pelc, R. S., J. C. McClure, K. T. Sears, A. Chung, M. S. Rahman and S. M. Ceraul (2014). "Defending the fort: a role for defensin-2 in limiting *Rickettsia montanensis* infection of *Dermacentor variabilis*." *Insect Mol Biol* 23(4): 457-465.

Pereira, L. S., P. L. Oliveira, C. Barja-Fidalgo and S. Daffre (2001). "Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*." *Exp Parasitol* 99(2): 66-72.

Perner, J., S. Kropackova, P. Kopacek and J. M. C. Ribeiro (2018). "Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands." *PLoS Negl Trop Dis* 12(4): e0006410.

Pienaar, R., A. W. H. Neitz and B. J. Mans (2018). "Tick Paralysis: Solving an Enigma." *Vet Sci* 5(2).

- Rego, R. O., V. Kovar, P. Kopacek, C. Weise, P. Man, I. Sauman and L. Grubhoffer (2006). "The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule." *Insect Biochem Mol Biol* 36(4): 291-299.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang and J. D. Lambris (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." *Nat Immunol* 11(9): 785-797.
- Rosa, R. D., J. Capelli-Peixoto, R. D. Mesquita, S. P. Kalil, P. C. Pohl, G. R. Braz, A. C. Fogaca and S. Daffre (2016). "Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge." *Dev Comp Immunol* 59: 1-14.
- Ross, B. D., B. Hayes, M. C. Radey, X. Lee, T. Josek, J. Bjork, D. Neitzel, S. Paskewitz, S. Chou and J. D. Mougous (2018). "Ixodes scapularis does not harbor a stable midgut microbiome." *ISME J* 12(11): 2596-2607.
- Salcedo-Porras, N., A. Guarneri, P. L. Oliveira and C. Lowenberger (2019). "*Rhodnius prolixus*: identification of missing components of the IMD immune signaling pathway and functional characterization of its role in eliminating bacteria." *PLoS One* 14(4): e0214794.
- Schnettler, E., H. Tykalova, M. Watson, M. Sharma, M. G. Sterken, D. J. Obbard, S. H. Lewis, M. McFarlane, L. Bell-Sakyi, G. Barry, S. Weisheit, S. M. Best, R. J. Kuhn, G. P. Pijlman, M. E. Chase-Topping, E. A. Gould, L. Grubhoffer, J. K. Fazakerley and A. Kohl (2014). "Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses." *Nucleic Acids Res* 42(14): 9436-9446.
- Schwarz, A., B. M. von Reumont, J. Erhart, A. C. Chagas, J. M. Ribeiro and M. Kotsyfakis (2013). "De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies." *FASEB J* 27(12): 4745-4756.
- Segawa, K. and S. Nagata (2015). "An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure." *Trends Cell Biol* 25(11): 639-650.
- Sekiguchi, R. and M. Nonaka (2015). "Evolution of the complement system in protostomes revealed by de novo transcriptome analysis of six species of Arthropoda." *Dev Comp Immunol* 50(1): 58-67.
- Selsted, M. E., D. M. Brown, R. J. DeLange and R. I. Lehrer (1983). "Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages." *J Biol Chem* 258(23): 14485-14489.
- Selsted, M. E., S. S. Harwig, T. Ganz, J. W. Schilling and R. I. Lehrer (1985). "Primary structures of three human neutrophil defensins." *J Clin Invest* 76(4): 1436-1439.
- Severo, M. S., A. Choy, K. D. Stephens, O. S. Sakhon, G. Chen, D. W. Chung, K. G. Le Roch, G. Blaha and J. H. Pedra (2013). "The E3 ubiquitin ligase XIAP restricts *Anaplasma phagocytophilum* colonization of *Ixodes scapularis* ticks." *J Infect Dis*.

Shaw, D. K., X. Wang, L. J. Brown, A. S. Chavez, K. E. Reif, A. A. Smith, A. J. Scott, E. E. McClure, V. M. Boradia, H. L. Hammond, E. J. Sundberg, G. A. Snyder, L. Liu, K. DePonte, M. Villar, M. W. Ueti, J. de la Fuente, R. K. Ernst, U. Pal, E. Fikrig and J. H. Pedra (2017). "Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods." *Nat Commun* 8: 14401.

Shokal, U. and I. Eleftherianos (2017). "Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response." *Front Immunol* 8: 759.

Sidak-Loftis, L. C., K. L. Rosche, N. Pence, J. K. Ujcz, J. Hurtado, E. A. Fisk, A. G. Goodman, S. M. Noh, J. W. Peters and D. K. Shaw (2022). "The Unfolded-Protein Response Triggers the Arthropod Immune Deficiency Pathway." *mBio* 13(4): e0070322.

Silva, F. D., C. A. Rezende, D. C. Rossi, E. Esteves, F. H. Dyszy, S. Schreier, F. Gueiros-Filho, C. B. Campos, J. R. Pires and S. Daffre (2009). "Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *J Biol Chem* 284(50): 34735-34746.

Silva, F. D., D. C. Rossi, L. R. Martinez, S. Frases, F. L. Fonseca, C. B. Campos, M. L. Rodrigues, J. D. Nosanchuk and S. Daffre (2011). "Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Microbiol Lett* 324(1): 64-72.

Simpson, S. D., J. S. Ramsdell, W. H. Watson Iii and C. C. Chabot (2017). "The draft genome and transcriptome of the atlantic horseshoe crab, *Limulus polyphemus*." *Int J Genomics* 2017: 7636513.

Smith, A. A., N. Navasa, X. Yang, C. N. Wilder, O. Buyuktanir, A. Marques, J. Anguita and U. Pal (2016). "Cross-Species Interferon Signaling Boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector." *Cell Host Microbe* 20(1): 91-98.

Smith, A. A. and U. Pal (2014). "Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*—perspectives from genome information." *Front Cell Infect Microbiol* 4: 116.

Sonenshine, D. E., W. L. Hynes, S. M. Ceraul, R. Mitchell and T. Benzine (2005). "Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control." *Exp Appl Acarol* 36(3): 207-223.

Sonenshine, D. E. and K. R. Macaluso (2017). "Microbial invasion vs. tick immune regulation." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 390.

Sonenshine, D. E. a. R., R. M. (2013). *Biology of ticks*. New York, Oxford University Press.

Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H. G. Boman (1981). "Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity." *Nature* 292(5820): 246-248.

Steinert, S. and E. A. Levashina (2011). "Intracellular immune responses of dipteran insects." *Immunol Rev* 240(1): 129-140.

Stroschein-Stevenson, S. L., E. Foley, P. H. O'Farrell and A. D. Johnson (2006). "Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*." PLoS Biol 4(1): e4.

Sun, D., Z. Guo, Y. Liu and Y. Zhang (2017). "Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods." Front Physiol 8: 608.

Suppan, J., B. Engel, M. Marchetti-Deschmann and S. Nurnberger (2018). "Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system." Biol Rev Camb Philos Soc 93(2): 1056-1076.

Tagawa, K., T. Yoshihara, T. Shibata, K. Kitazaki, Y. Endo, T. Fujita, T. Koshiba and S. Kawabata (2012). "Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or -independent manner." PLoS One 7(5): e36783.

Umemiya, R., T. Matsuo, T. Hatta, S. Sakakibara, D. Boldbaatar and K. Fujisaki (2008). "Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*." Autophagy 4(1): 79-81.

Urbanova, V., O. Hajdusek, H. Honig Mondekova, R. Sima and P. Kopacek (2017). "Tick thioester-containing proteins and phagocytosis do not affect transmission of *Borrelia afzelii* from the competent vector *Ixodes ricinus*." Front Cell Infect Microbiol 7: 73.

Urbanova, V., O. Hajdusek, R. Sima, Z. Franta, H. Honig-Mondekova, L. Grunclova, P. Bartosova-Sojkova, M. Jalovecka and P. Kopacek (2018). "IrC2/Bf - A yeast and *Borrelia* responsive component of the complement system from the hard tick *Ixodes ricinus*." Dev Comp Immunol 79: 86-94.

Urbanova, V., D. Hartmann, L. Grunclova, R. Sima, T. Flemming, O. Hajdusek and P. Kopacek (2014). "IrFC - An *Ixodes ricinus* injury-responsive molecule related to *Limulus* Factor C." Dev Comp Immunol 46(2): 439-447.

Urbanova, V., R. Sima, I. Sauman, O. Hajdusek and P. Kopacek (2015). "Thioester-containing proteins of the tick *Ixodes ricinus*: gene expression, response to microbial challenge and their role in phagocytosis of the yeast *Candida albicans*." Dev Comp Immunol 48(1): 55-64.

van Nunen, S. A. (2018). "Tick-induced allergies: mammalian meat allergy and tick anaphylaxis." Med J Aust 208(7): 316-321.

Verhulst, N. O., N. Boulanger and S. J. (2018). Impact of skin microbiome on attractiveness to arthropod vectors and pathogen transmission. Skin and Arthropod Vectors. N. Boulanger, Academic Press: 55-81.

Vodovar, N., A. W. Bronkhorst, K. W. van Cleef, P. Miesen, H. Blanc, R. P. van Rij and M. C. Saleh (2012). "Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells." PLoS One 7(1): e30861.

Wang, X. R., T. J. Kurtti, J. D. Oliver and U. G. Munderloh (2020). "The identification of tick autophagy-related genes in *Ixodes scapularis* responding to amino acid starvation." Ticks Tick Borne Dis 11(3): 101402.

Wei, N., J. Cao, H. Zhang, Y. Zhou and J. Zhou (2021). "The Tick Microbiota Dysbiosis Promote Tick-Borne Pathogen Transstadial Transmission in a *Babesia microti*-Infected Mouse Model." *Front Cell Infect Microbiol* 11: 713466.

Weisheit, S., M. Villar, H. Tykalova, M. Popara, J. Loecherbach, M. Watson, D. Ruzek, L. Grubhoffer, J. de la Fuente, J. K. Fazakerley and L. Bell-Sakyi (2015). "Ixodes scapularis and Ixodes ricinus tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis." *Parasit Vectors* 8: 599.

Wikel, S. K. (2018). "Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions." *Vet Sci* 5(2).

Yuan, C., J. Wu, Y. Peng, Y. Li, S. Shen, F. Deng, Z. Hu, J. Zhou, M. Wang and Z. Zou (2020). "Transcriptome analysis of the innate immune system of *Hyalomma asiaticum*." *J Invertebr Pathol* 177: 107481.

Zhioua, E., M. Browning, P. W. Johnson, H. S. Ginsberg and R. A. LeBrun (1997). "Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)." *J Parasitol* 83(5): 815-818.

Zhou, Y., Y. Liang, Q. Yan, L. Zhang, D. Chen, L. Ruan, Y. Kong, H. Shi, M. Chen and J. Chen (2020). "The draft genome of horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* reveals its evolutionary scenario and well-developed innate immunity." *BMC Genomics* 21(1): 137.

Zhu, Y., P. M. Ng, L. Wang, B. Ho and J. L. Ding (2006). "Diversity in lectins enables immune recognition and differentiation of wide spectrum of pathogens." *Int Immunol* 18(12): 1671-1680.

Zhu, Y., S. Thangamani, B. Ho and J. L. Ding (2005). "The ancient origin of the complement system." *EMBO J* 24(2): 382-394.

Zug, R. and P. Hammerstein (2012). Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLoS One*. 7.

Zumaya-Estrada, F. A., J. Martinez-Barnetche, A. Lavore, R. Rivera-Pomar and M. H. Rodriguez (2018). "Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods." *Parasit Vectors* 11(1): 48.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 7

O relógio biológico endógeno e seus mecanismos moleculares em mosquitos vetores

Andresa Borges de Araujo Fonseca¹
Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra¹
Luciana Ordunha Araripe¹
Rafaela Vieira Bruno¹

¹Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Andresa Borges de Araujo Fonseca, Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra, Luciana Ordunha Araripe, Rafaela Vieira Bruno]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Desde os tempos mais remotos, os seres vivos, dos mais simples até os mais complexos, têm sido submetidos a processos rítmicos ambientais. O relógio circadiano é um marcapasso endógeno que recebe essa informação ambiental e coordena oscilações rítmicas na fisiologia e no comportamento desses organismos, dentro de um período de cerca de 24 horas.

Em insetos, as bases moleculares do relógio circadiano têm sido bastante estudadas na espécie modelo *Drosophila melanogaster*. Apesar de os principais genes de relógio já terem tido seu perfil de expressão caracterizados em insetos vetores e de existirem inúmeros estudos sobre os seus ritmos comportamentais, pouco ainda se sabe sobre o funcionamento desses genes, bem como sobre sua importância para a dinâmica de transmissão de patógenos.

Neste capítulo, serão abordados aspectos moleculares e comportamentais dos ritmos biológicos em mosquitos vetores de grande importância médica.

Histórico da cronobiologia e conceitos sobre relógios biológicos

Sempre que pensamos em algum evento biológico, fazemos as perguntas “O quê?”, “Para quê?” e “Como?”, mas raramente nos perguntamos quando tal evento ocorre. A importância do tempo nos processos biológicos é evidente, uma vez que, desde que a vida surgiu na Terra, as espécies são submetidas a ciclos diários causados pelos movimentos de rotação, e ciclos sazonais causados pelos movimentos de translação. No entanto, o estudo mais aprofundado desses eventos rítmicos é, relativamente, recente. Em 1969, Franz Halberg definiu a Cronobiologia como o “estudo sistemático das características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização” (Halberg, 1969 *apud* Marques et al., 2003), incluindo o estudo dos ritmos biológicos.

Ritmos biológicos são processos biológicos naturais, que variam periodicamente no tempo. Analogamente a ondas, os ritmos biológicos podem ser medidos pela amplitude de seus picos e vales e pelo tempo entre dois picos consecutivos (período). De acordo com o tamanho do período, os ritmos biológicos podem se dividir, dentre outras categorias, em: i) ciclos ultradianos, que são aqueles com duração muito menor que 24 horas, como as frequências de batimento de asas em insetos; ii) ciclos circadianos, cuja duração é próxima a 24 horas, como os ciclos de sono e vigília e iii) ciclos infradianos, que duram mais que 24 horas, como, por exemplo, os ciclos gonotróficos (Clements, 1992). Neste capítulo, abordaremos, principalmente, os ritmos circadianos.

Os primeiros relatos de investigações sobre os ritmos biológicos circadianos datam do ano de 325 a.C, por Andróstenes de Thasos, acompanhante de Alexandre, o Grande, que descreveu o movimento periódico diário foliar da espécie *Tamarindus indicus*, o tamarindo. A observação de tal movimento foi novamente relatada apenas por volta do ano de 1729, pelo astrônomo francês Jean Jacques de Mairan, desta vez com a espécie *Mimosa pudica*. De Mairan descreve os movimentos foliares em plantas mantidas em lugares isolados dos ciclos naturais de claro e escuro que, mesmo assim, continuavam a movimentar suas folhas. Nesse momento, era demonstrado o caráter endógeno do ritmo. Em 1853, o pesquisador Auguste de Candolle repetiu os ensaios do francês e observou que o movimento das folhas acontecia cerca de 1 hora mais cedo a cada dia, quando a planta era mantida em condições constantes (isto é, sem informações do ambiente).

Esses ensaios mostraram que, na natureza, o ritmo de claro/escuro, aparentemente, forçava um período de 24 horas exatas, enquanto em condições ambientais constantes, ou seja, em livre-curso, o período variava em torno (acima ou abaixo) de 24 horas, caracterizando o ritmo circadiano (*apud* Moore-Ede et al., 1982). Outros muitos ensaios foram realizados, descrevendo o caráter endógeno e genético dos ritmos, o que só foi demonstrado em 1953, quando o pesquisador Erwin Bünning realizou cruzamentos de plantas do feijão, que apresentavam períodos diferentes para os movimentos foliares. Nesse caso, a sua prole apresentou um período intermediário aos dos genitores (Marques et al., 2003).

Propriedades gerais dos ritmos circadianos

Para que um evento seja considerado um ritmo circadiano – e não uma resposta simples a um estímulo do ambiente – ele deve apresentar três características gerais:

i) A persistência em livre-curso

Os ritmos circadianos continuam a se expressar, mesmo quando isolados de indicadores ambientais, apresentando um período em livre curso, τ , próximo a 24 horas. O valor de τ é espécie-específico, mas pode apresentar variação intraespecífica e intraindividual (Daan e Pittendrigh, 1976). Modificações no τ também podem ser notadas ao longo do desenvolvimento de uma espécie. Além disso, ele pode, ainda, sofrer uma modulação em sua amplitude, caracterizando ritmos “fortes” (com grande amplitude) ou ritmos “fracos” (com baixa amplitude).

ii) A sincronização com ritmos ambientais

Embora os ritmos persistam em livre curso, eles podem ser sincronizados ou arrastados por indicadores ambientais. Esses indicadores foram chamados de *Zeitgebers* (do alemão: “doador de tempo”) por Jurgen Aschoff (Aschoff, 1951 e 1954) e sua principal função é ajustar o ritmo em livre-curso, gerado pelo oscilador interno, a um ou mais fatores ambientais. Os *Zeitgebers* podem ser fatores abióticos (por exemplo, a luz e a temperatura – os mais estudados, até então) ou bióticos (a disponibilidade de alimento e a organização social, como principais exemplos). Ademais, um ou mais *Zeitgebers* podem arrastar o ritmo de uma espécie, de acordo com uma hierarquia. No entanto, nem todos os processos que exibem um ritmo diário são controlados pelo relógio endógeno, pois algumas características podem ser plásticas e perdem a ritmicidade, caso os indicadores fiquem constantes. Quando um processo exibe um ritmo diário, mas não é regulado pelo relógio, essa característica recebe o nome de mascaramento (Figura 1).

iii) Compensação térmica

Apesar da maioria dos processos bioquímicos variarem muito com a temperatura, o período endógeno do relógio circadiano em livre-curso (τ) apresenta diferenças muito pequenas, quando é estudado em temperaturas variadas, dentro de uma faixa permissiva para cada espécie. Esse mecanismo de compensação térmica é muito importante para a homeostase dos organismos, pois permite que, em uma faixa com variação de 10 graus, a mais ou a menos, o relógio endógeno continue sincronizado corretamente com a passagem do tempo.

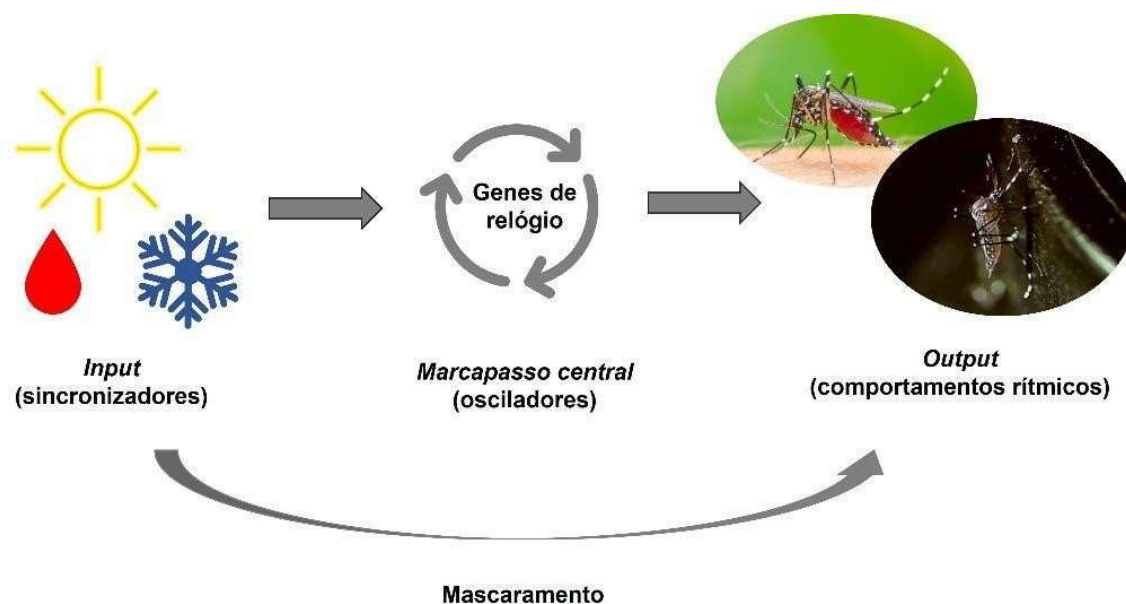


Figura 1: Esquema que representa os componentes do relógio circadiano. Fatores ambientais externos, como a luz, a temperatura ou o odor do hospedeiro atuam como sincronizadores do relógio. Estes estímulos são percebidos por receptores específicos e são interpretados pelas células osciladoras, presentes no relógio central. A partir daí, são enviadas respostas para as diferentes partes do organismo, que levam aos comportamentos rítmicos, tais como: a atividade locomotora, a oviposição, a hematofagia, entre outros. Porém, quando os estímulos geram respostas imediatas e independentes do marcador central, dizemos que houve um efeito de mascaramento.

Fonte: Fotos de Genilton Vieira/IOC-Fiocruz

O relógio circadiano na espécie modelo *Drosophila melanogaster*

Ritmos diários podem ser estudados em uma ampla variedade de insetos, que, geralmente, restringem suas atividades a determinados momentos do dia. Dessa forma, sob condições naturais ou artificiais de luz e temperatura, os insetos podem apresentar atividades diurnas, noturnas ou crepusculares. As atividades diárias de locomoção, alimentação, cópula, oviposição, eclosão, etc. têm importância fundamental na caracterização da biologia das espécies de insetos e na dinâmica de transmissão de doenças, no caso de insetos vetores (Saunders, 2002).

O modelo de organismo para estudo do relógio circadiano, assim como de várias funções biológicas, é a mosca-das-frutas *D. melanogaster*. Esses insetos são diurnos (Konopka e Benzer, 1971; revisado em Hardin, 2011), ou seja, exercem suas atividades de dia e repousam de noite. Além dos comportamentos associados às horas de atividade, eventos fisiológicos também ocorrem de maneira cíclica, e a regulação desses ciclos ocorre por um mecanismo molecular,

presente nas células neuronais do sistema nervoso central. Nas seções seguintes, veremos mais detalhes sobre os genes e proteínas que compõem essa "engrenagem" e que interagem, de modo a produzir os ritmos circadianos.

O controle molecular do relógio sob os ciclos de claro/escuro

Apesar das evidências da existência de um componente genético no ritmo circadiano terem surgido desde a década de 50, foi somente em 1971 que Ronald Konopka e Seymour Benzer descreveram o primeiro gene envolvido no ritmo circadiano, *period* (*per*). Dessa data até hoje, diversos outros genes relacionados no relógio circadiano de *D. melanogaster* foram descritos e caracterizados molecularmente, mostrando que o relógio central desse inseto é controlado por diversos genes interligados em alças regulatórias de retroalimentação negativa (revisado em Boothroyd e Young, 2008; Hardin 2011; Zhang e Kay, 2011; Patke et al., 2020). Os sincronizadores mais bem estudados são os ciclos de claro/escuro e os ciclos de temperatura. Apresentaremos o modelo de regulação do relógio sob estes ciclos em *Drosophila*, para realizarmos uma posterior discussão sobre o que se conhece em mosquitos.

Para a formação dos ciclos endógenos, genes e fatores de transcrição interagem em três alças de regulação interconectadas. Na primeira alça de regulação, os fatores de transcrição *CLOCK* (CLK) e *CYCLE* (CYC) se ligam na região E-box (CACGTG) dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) e ativam sua transcrição durante a fase diurna. Quando as proteínas PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM) são produzidas no citoplasma, elas são fosforiladas pelas quinases DOUBLETIME (DBT) e SHAGGY (SGG), respectivamente.

Entretanto, quando PER e TIM conseguem acumular em altos níveis no citoplasma, o heterodímero PER/TIM é formado, o que provoca a estabilização de PER e evita sua degradação. Durante a fase noturna, PER e TIM são translocados para o núcleo e atuam inibindo a atividade de CLK e CYC, o que, conseqüentemente, inibe a transcrição dos genes *per* e *tim*. Ao amanhecer, o heterodímero PER/TIM se desfaz, libera CLK e CYC e reinicia o processo (Stanewsky, 2003; Hardin, 2005, 2011; Doherty e Kay, 2011). A reinicialização do processo acontece por causa da proteína CRYPTOCHROME (CRY). CRY é uma fotoliase, que é ativada pela luz, modificando sua conformação. Após sua ativação, ela é capaz de recrutar as proteínas JETLAG (JET) e o complexo SCF, se ligar à TIM e marcá-la para degradação, via proteassomo (Stanewsky et al., 1998; Peschel et al., 2009). Com isso, PER e TIM levam um tempo para acumular novamente e formar o heterodímero PER/TIM.

A segunda alça de regulação é formada pelos genes *vri* (*vri*) e *Par domain protein 1* (*Pdp1ε*), que atuam como repressor e ativador transcricional de *Clk*, respectivamente. A ativação e a repressão, em horários diferentes, causam a expressão cíclica de *Clk*. Vale ressaltar, também, que a expressão de *cyc* em *Drosophila* é constitutiva, ao longo de todo o período (Rutila et al., 1998). As duas alças descritas se completam e regulam a expressão global das centenas de genes de *output* do relógio circadiano (Keegan et al., 2007; Doherty e Kay, 2011). Estudos posteriores mostraram que o gene *Pdp1ε* teria um papel mais importante na regulação dos genes de *output*, pois alterações nesse gene podem ter efeito sobre atividades rítmicas, sem, necessariamente, modificar o funcionamento do relógio central (Benito et al., 2007; Zheng et al., 2009). Outro aspecto interessante da regulação do relógio refere-se às alterações pós-traducionais da proteína CLK. O gene *Clk* é transcrito de forma rítmica, mas sua proteína não apresenta variação cíclica na sua abundância (Houl et al., 2006; Yu et al., 2006). Todavia, a fosforilação de CLK ocorre de maneira circadiana, uma vez que CLK está hiperfosforilado entre o final da noite e o início da manhã (Yu et al., 2006), justamente nos momentos de máxima repressão da transcrição de *per* e *tim*. Isso sugere que CLK seria mais ativo quando hipofosforilado (Kim et al., 2006; Yu et al., 2006).

Uma terceira alça inclui o gene *clockwork orange* (*cwo*), responsável por atuar como repressor transcricional. Esse gene é expresso ritmicamente e é ativado pelo heterodímero CLK-CYC, quando se liga à região E-box de seu promotor. Durante a fase noturna, a interação de PER/TIM com CLK-CYC diminui a afinidade de ligação de CLK-CYC, nas regiões E-box de alguns genes. Dessa forma, a proteína CWO ganha espaço e se liga, com maior afinidade, nessas regiões, atuando como um repressor transcricional de *per*, *tim* e *cwo* (Zhou et al., 2016). Essa alça de retroalimentação negativa é crucial para garantir a alta amplitude da oscilação circadiana (Tomioka e Matsumoto, 2010). Os processos descritos anteriormente podem ser observados de forma esquemática na Figura 2.

Etapas importantes da regulação do relógio acontecem no nível pós-traducional. Eventos de síntese de proteínas, sua consequente estabilidade e seu acúmulo garantem o tamanho do período do relógio circadiano, em exatas 24h, em sincronização com os ciclos de claro e escuro. MicroRNAs como *bantam*, *let-7* e *mir-276a* inibem a ativação de proteínas, como TIM, CLK e CWO. Por outro lado, se esses microRNAs são superexpressos, levam ao aumento do período ou, ainda, à arritmicidade (Kadener et al., 2009; Chen et al., 2014; Chen e Rosbash, 2016). Esses dados reforçam a complexidade e a precisão da regulação do

relógio, e permitem entender sua sincronização sob ciclos de claro e escuro. Podemos dizer, portanto, que a ritmicidade, gerada pelo relógio, na expressão de genes e de proteínas mantém sua própria oscilação e controla outros genes em diferentes vias de sinalização (Keegan et al., 2007; Doherty e Kay, 2011).

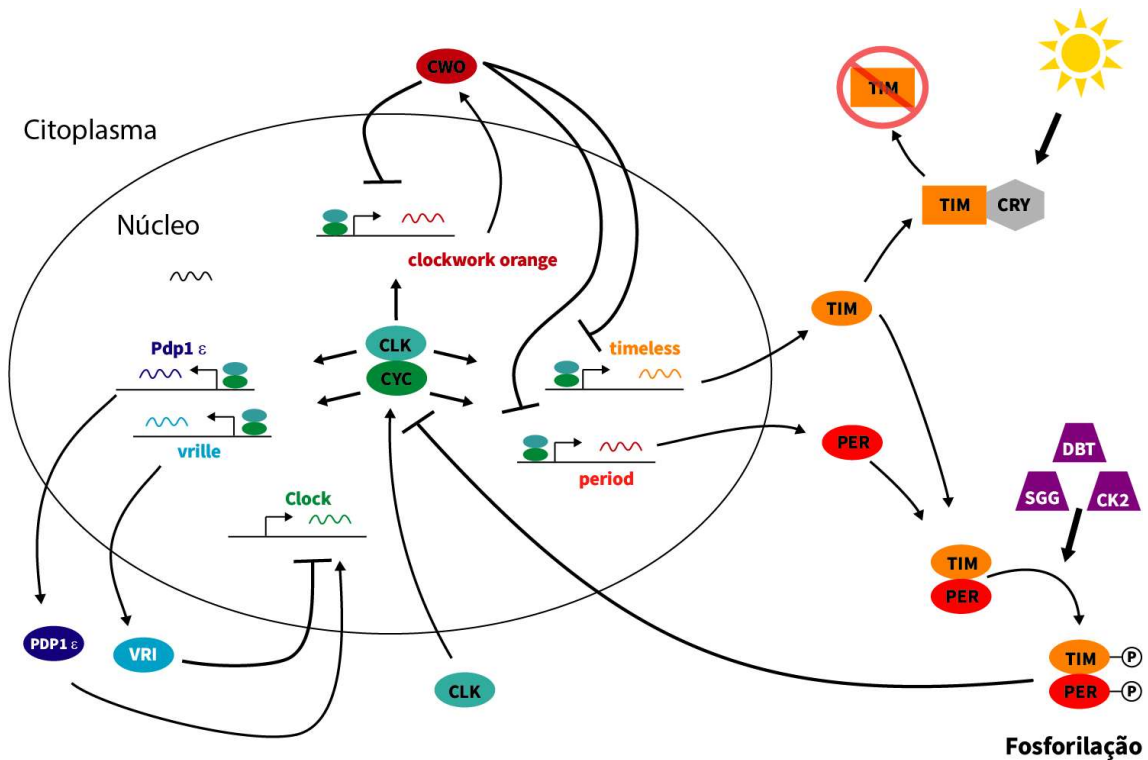


Figura 2: Representação esquemática das três alças de retroalimentação negativa regulatórias, que, interligadas, controlam o relógio circadiano de *D. melanogaster*. A primeira alça regulatória envolve a repressão da transcrição dos genes *per* e *tim* pelo heterodímero CLK-CYC. A segunda alça está relacionada à ativação da transcrição de *Clk* pelas proteínas PDP1 (ativador) e VRI (repressor) e a terceira alça é composta por CWO, que reprime a transcrição de genes do relógio, através da ligação ao domínio E-box do promotor destes genes. Estão representadas, também, as principais modificações pós-traducionais relacionadas à estabilidade e instabilidade das proteínas PER e TIM. Por fim, temos a representação da modificação sofrida pela proteína CRY na presença de luz, que leva à degradação de TIM e, conseqüentemente, à sincronização do relógio em ciclos de claro e escuro.

Fonte: Arquivo pessoal

O controle molecular do relógio sob os ciclos de temperatura

Os ciclos de claro e escuro e os ciclos de temperatura estão naturalmente em fase e atuam sinergicamente, sincronizando o relógio central. No entanto, os efeitos dos ciclos de claro e escuro ainda são muito mais conhecidos e estudados do que os efeitos dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio. Ao contrário da sincronização pela luz, em que fotorreceptores presentes nos olhos

são responsáveis pela recepção dos sinais externos, na sincronização por temperatura são os termorreceptores presentes nos diferentes tecidos do organismo que percebem os estímulos térmicos. Além disso, a sincronização de órgãos periféricos é um processo tecido-autônomo, ou seja, os diferentes tecidos são sincronizados independentemente (Glaser e Stanewsky, 2005; Sehadova et al., 2009).

Em moscas *Drosophila* selvagens, o padrão de atividade locomotora pode ser arrastado por ciclos de temperatura com variação de apenas 3°C entre a termofase (fase quente) e a criofase (fase fria) (Wheeler et al., 1993), evidenciando sua importância como *Zeitgeber*. Os ciclos de temperatura também são capazes de sincronizar o ritmo em mutantes arrítmicos para os genes de relógio, tais como *per⁰¹*, *Clk^{rk}*, *tim⁰¹* e *cyc⁰*. No entanto, esses mutantes, tal como em ciclos de luz, não recuperam a capacidade de antecipação¹ ao acender e apagar das luzes, tampouco a manutenção da ritmicidade em condições constantes (Yoshii et al., 2002). Entretanto, em uma diferença em relação aos ciclos de claro/escuro, ciclos de quente/frio são capazes de sincronizar o ritmo de moscas selvagens mesmo em claro constante (LL), condição na qual se observa arritmidade quando a luz é o principal *Zeitgeber* (Glaser e Stanewsky, 2005).

Em nível molecular, sabe-se que os acúmulos das proteínas PER e TIM oscilam em ciclos de quente/frio, e essas oscilações se mantêm em livre-curso (Glaser e Stanewsky, 2005). Além disso, a oscilação dos níveis dessas proteínas permanece, mesmo em claro constante, o que indica que o ciclo de temperatura, de alguma forma, deve substituir a degradação induzida pela luz de TIM por CRY.

Alguns genes foram descritos como participantes do relógio circadiano sincronizado por temperatura. O gene *no receptor potential A* (*norpA*) codifica a enzima fosfolipase C, que atua na cascata de reconhecimento de estímulos fóticos e promove o processamento do RNA de *per*. Breda e colaboradores (2020) usaram mutantes de *norpA*, que aumentam o processamento do 3' UTR do RNA de *per*, e identificaram que essa é uma via importante para mediar a adaptação de indivíduos de *Drosophila* às alterações sazonais. Essa mediação ocorre via rodopsinas dos olhos (em temperaturas mais quentes, o pico de atividade é mais atrasado para a fase escura) e neurônios dorsais (em temperaturas mais frias, o pico de atividade é adiantado) (Majercak et al., 1999, 2004; Collins et al., 2004).

O gene *no circadian temperature entrainment* (*nocte*) codifica uma proteína rica em glutamina com função desconhecida e as mutações nesse gene geram defeitos severos em estruturas receptoras chamadas órgãos cordotonais

¹ Antecipação é a capacidade que a espécie tem de organizar suas atividades antes do tempo necessário.

(Sehadova et al., 2009). Além disso, mutantes para os genes *nocte* e *norpA* são incapazes de sincronizar seu relógio por temperatura, embora a sincronização por ciclos de luz ocorra normalmente. Um modelo proposto por Sehadova e colaboradores, em 2009, sugere que neurônios dos órgãos cordotonais enviam informações sobre a temperatura para neurônios do relógio periférico na região torácica ou, ainda, para células sensíveis à temperatura presentes no próprio cérebro.

Recentemente, o canal iônico termo-sensível PYREXIA (PYX), da família TRPA, foi implicado como um importante fator para a sincronização por ciclos de temperatura. A proteína PYX interage com PER em grupos específicos de neurônios, e a diminuição ou aumento de PYX nestes neurônios compromete a sincronização do relógio central, por ciclos de temperatura (Roessing et al., 2020).

Apesar dos ciclos de claro e escuro serem os mais bem estudados em *Drosophila*, os ciclos de temperatura também vêm sendo implicados em processos importantes para a regulação do relógio biológico dos organismos. Um estudo mais detalhado do papel desses ciclos ambientais em outras espécies é importante, principalmente em vetores de patógenos nas regiões tropicais do globo.

Ritmos biológicos em mosquitos

Os mosquitos pertencem à subordem Nematocera e representam a Família Culicidae. Assim como todos os demais culicídeos, eles apresentam desenvolvimento holometabólico, compreendendo os estágios de ovo, larva e pupa – aquáticas – e adulto. A grande maioria das fêmeas das diferentes espécies de mosquito alimenta-se de sangue, ou seja, é hematófaga. No entanto, somente algumas espécies são vetores de importantes doenças humanas, como a dengue, a zika, a chikungunya e a malária, fazendo com que esses insetos tenham grande importância epidemiológica.

Assim como grande parte dos organismos, os mosquitos reconhecem pistas ambientais cíclicas, como a luz e a temperatura, e são capazes de antecipar as transições dessas condições, de modo a alinhar características comportamentais e fisiológicas a elas. Em mosquitos vetores, a busca por hospedeiros para alimentação sanguínea é uma atividade da qual depende a transmissão de patógenos causadores de doenças em populações humanas e animais, e está atrelada aos ritmos de atividade e de repouso de cada espécie. Uma vez que os ritmos biológicos de mosquitos podem determinar fatores cruciais para a dinâmica das doenças relacionadas a esses vetores, o entendimento do

relógio endógeno dessas espécies é de fundamental importância. No entanto, poucos estudos foram realizados, até o momento, e esforços ainda são necessários para a elucidação desses mecanismos.

A seguir, iremos descrever como os padrões rítmicos são identificados e quais comportamentos são reconhecidamente rítmicos em espécies de mosquitos vetores. Além disso, vamos abordar o que se sabe sobre os ciclos de expressão de genes envolvidos com funções sensoriais, importantes para a realização dos comportamentos rítmicos.

O relógio circadiano molecular em mosquitos

Apesar de sua importância médica, ainda são recentes os estudos sobre o relógio circadiano molecular em mosquitos. Em 2009, Gentile e colaboradores descreveram o padrão de expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos sete principais genes do relógio em *Ae. aegypti* e em *Cx. quinquefasciatus*, tanto da primeira quanto da segunda alça regulatória. Apesar de *Ae. aegypti* ser um mosquito diurno e *Cx. quinquefasciatus* ser um mosquito noturno, pode-se observar, de maneira geral, um perfil de expressão semelhante entre as duas espécies e ainda, alguns aspectos bastante semelhantes ao que é visto em *Drosophila*: os genes *per* e *tim* têm seu pico de expressão na escotofase e, em antifase, com os picos dos genes *Clk* e *cyc*. Esse gene, porém, ao contrário de *Drosophila*, apresenta padrão de expressão cíclico em tais espécies de mosquito. Os genes *vri* e *Pdp1* apresentam seus picos de expressão em fases distintas, o que sugere uma competição entre os dois genes pelos mesmos sítios de regulação, tal como em *Drosophila*. Outros estudos semelhantes em *Ae. aegypti*, feitos a partir de ensaios de microarranjos, corroboraram estes resultados (Ptitsyn et al., 2011).

Em *Anopheles gambiae*, principal vetor de parasitos causadores da malária na África (White et al., 1974), foi feito um grande *screening* em busca do perfil diário e circadiano dos genes de relógio e controlados pelo relógio (Rund et al., 2013). Apesar de *Ae. aegypti* ser um inseto diurno e *An. gambiae* ser noturno, foram observadas semelhanças temporais entre grandes grupos de genes, envolvidos, principalmente, nos sentidos da visão e da olfação (Ptitsyn et al., 2011; Rund et al., 2013). Também foram realizados estudos mostrando a relação entre os genes do relógio e a hematofagia. Foi observado que, em *An. gambiae*, pulsos curtos de luz (cerca de 2 a 5 minutos) na escotofase são capazes de inibir a alimentação sanguínea momentaneamente, enquanto pulsos de luz mais longos (cerca de 1 a 2 horas) causam um avanço na fase da alimentação sanguínea, de

maneira dependente do relógio circadiano (Das e Dimopoulos, 2008). Além disso, o relógio também regula a propensão à alimentação sanguínea, uma vez que alguns genes-chave do relógio (*tim*, *cry2* e *take out*), quando silenciados pela técnica de RNA de interferência, promovem um aumento desta característica em *An. gambiae* (Das e Dimopoulos, 2008).

Um ponto em comum entre mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* e outras ordens de insetos é a existência de duas formas do gene *cryptochrome*: uma semelhante ao fotorreceptor (*cry1*) de *Drosophila* e outra (*cry2*), que é ortóloga ao repressor transcricional encontrado em vertebrados (Yuan et al., 2007) e está ausente na mosca de frutas. A expressão do gene *cry1* foi bastante semelhante em *Ae. aegypti* e em *Cx. quinquefasciatus*. No entanto, a expressão do gene *cry2* apresentou uma diferença marcante entre as duas espécies: em *Culex*, há somente um pico de expressão do gene, na escotofase, enquanto em *Aedes*, a expressão de *cry2* apresenta um padrão bimodal, ou seja, dois picos de expressão gênica. Esta diferença sugere fortemente que a regulação desse gene seja diferente nas duas espécies e que isso esteja relacionado ao padrão de atividade locomotora – diurno vs noturno – observado nesses dois tipos de mosquitos (Gentile et al., 2009).

A presença ou não de *cry2* é, hoje, a base do modelo de relógio circadiano em insetos. O relógio ancestral seria aquele em que ambos os genes, *cry1* – como fotoliase – e *cry2* – como repressor transcricional – estão presentes. Possuem esse relógio ancestral mariposas e mosquitos. A perda de *cry1* gera um relógio derivado, visto em barbeiros e flebotomíneos (Mesquita et al., 2015; Labbé et al., 2023) e a perda de *cry2* dá origem ao relógio que conhecemos em *Drosophila* (Yuan et al., 2007). No entanto, a funcionalidade de *cry2* como repressor transcricional foi vista apenas em borboletas (Zhang et al., 2017), enquanto em outros grupos ainda são apenas funções putativas, baseadas em sequências do genoma. Em borboletas, o gene *cry2* é chamado de *mcry2* (*mammalian cry2*), por sua semelhança com o gene de mamíferos. Como os mosquitos carregam a mesma semelhança, é provável que *cry2* tenha função de repressor transcricional também neste grupo.

Ritmos circadianos em mosquitos

Estratégias de sobrevivência, busca por alimento, reprodução e oviposição são definidas por ciclos de atividade e repouso, que são característicos de cada espécie. Quando um mosquito está ativo, desempenhando alguma das funções mencionadas anteriormente, seus sentidos e seu metabolismo precisam estar

dirigidos para o sucesso dessa função, diferentemente de quando o indivíduo está em repouso. A identificação desses padrões cíclicos em mosquitos vetores é de grande importância para a proposição de mecanismos de controle de suas populações.

Os ritmos circadianos têm sido estudados nas principais espécies de mosquitos vetores: *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e espécies do gênero *Anopheles*. De acordo com seus hábitos, essas espécies podem ser classificadas como diurnas ou noturnas, mas, assim como em outros organismos, pode haver espécies crepusculares também. Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* são diurnos, com sua maior atividade ocorrendo nas primeiras horas de luz e nos períodos crepusculares, o que lhes confere um padrão bimodal (com dois picos de atividade) (Figura 3). Quando os ciclos de luz/escuro são suprimidos e sua atividade locomotora é analisada em escuro constante (livre-curso), apenas o pico de atividade crepuscular é mantido. Isso se repete com um período endógeno de, aproximadamente, 22 horas (Gentile et al., 2009). Por sua vez, os mosquitos da espécie *Cx. quinquefasciatus* são noturnos, com um padrão de atividade unimodal, e seu período endógeno é de, aproximadamente, 24 horas (Figura 3) (Gentile et al., 2009). Outro mosquito de importância epidemiológica, *An. gambiae*, mostra um padrão de atividade noturno, com um pico no início da fase escura (Araujo et al., 2020) (Figura 3). A partir do conhecimento dessas diferenças, é possível adaptar os mecanismos de controle e de repelência de mosquitos para as fases em que estão ativos. Por exemplo, a aplicação de repelentes tópicos para evitar picadas durante o dia terá eficácia contra mosquitos do gênero *Aedes*, enquanto mosquiteiros usados à noite, por cima das camas, terão eficácia contra picadas de *Anopheles sp.* e *Culex sp.*, mas não contra picadas de *Aedes sp.*

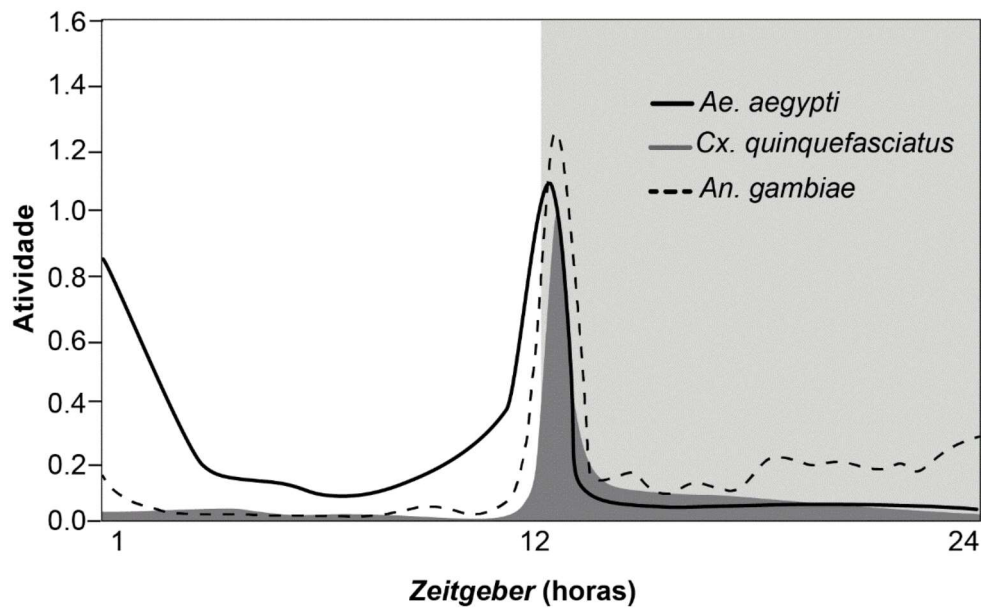


Figura 3: Esquema gráfico de perfis de atividade locomotora/voo médios em *Ae. aegypti* (espécie diurna), *Cx. quinquefasciatus* e *An. gambiae* (espécies noturnas).

Fonte: Arquivo pessoal

Embora a luz seja um indicador ambiental potente, o relógio circadiano de mosquitos também pode ser sincronizado pela temperatura. Em um estudo de Rivas e colaboradores (2018), os autores submetem fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Cx. quinquefasciatus* a ciclos de luz e escuro (LD: *light and darkness*) e a ciclos de temperatura (TC: *temperature cycle*) de 20° C e 30° C, por quatro dias. No quinto dia, as fêmeas foram expostas somente a ciclos de temperatura e escuro constante (DD) por mais 12 dias. Do quinto dia em diante, os autores observaram que, mesmo sem a exposição à alternância de luz, os ciclos de temperatura foram capazes de sustentar os picos de atividade locomotora nas duas espécies, assim como o período de 24 horas (Figura 4). Além disso, os autores observaram que fêmeas das duas espécies têm alterações diferentes no perfil de atividade quando submetidas a ciclos de luz e de temperatura conflitantes, ou seja, temperatura mais baixa (20° C) durante o dia e mais alta (30° C) durante a noite. Enquanto fêmeas de *Ae. aegypti* alteram a sua atividade da fase diurna para a fase noturna, seguindo a pista de aumento da temperatura, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* mantêm seu pico de atividade na fase noturna (Rivas et al., 2018), seguindo o regime de luz/escuro. Por outro lado, fêmeas submetidas a um regime de luz constante, condição reconhecidamente capaz de perturbar o relógio e levar à arritmia (Saunders, 1997; Glaser e Stanewsky, 2005), não alteram seu perfil de atividade quando estão sob ciclos de temperatura (Figura 4). Isso não ocorre quando a luz e a temperatura são constantes (Rivas et al., 2018).

Esses dados mostraram que, embora luz e temperatura atuem em sinergia para a sincronização do relógio, existe uma diferença na influência dos dois *Zeitgebers* para essas espécies de mosquitos. Enquanto a temperatura é um *Zeitgeber* mais importante para *Ae. aegypti*, a luz é o *Zeitgeber* mais influente para *Cx. quinquefasciatus* (Rivas et al., 2018). Se os mosquitos *Ae. aegypti* forem submetidos a ciclos seminaturais de luz e de temperatura, com variações graduais, sua atividade permanece muito alta no crepúsculo com temperatura mais alta. Porém, quando, experimentalmente, inverte-se os ciclos de luz e temperatura, o pico de atividade no crepúsculo frio não é tão proeminente (Teles-de-Freitas et al., 2020).

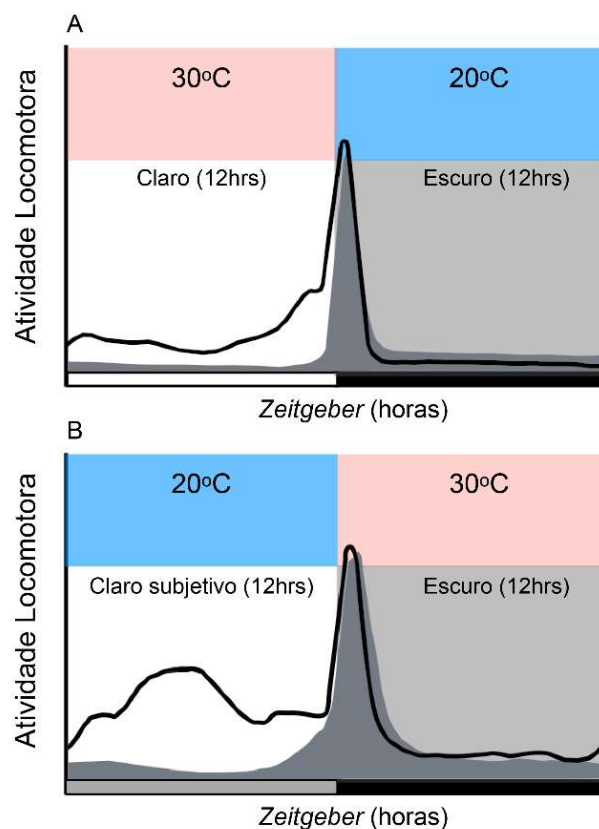


Figura 4: Esquema gráfico mostrando o papel da temperatura como sincronizador do relógio endógeno (Zeitgeber). A) Perfil de atividade locomotora/voo de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* com ciclos de luz e de temperatura em fase; B) Perfil de atividade locomotora/voo de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, com ciclos de luz e de temperatura em antifase. As barras no eixo X indicam o dia (branca), a noite (preta) e a noite subjetiva (cinza).

Fonte: Arquivo pessoal

Além da luz e da temperatura, outros fatores extrínsecos ao organismo também podem configurar pistas importantes para a sincronização dos ritmos comportamentais e fisiológicos, como a disponibilidade de alimento (embora um trabalho recente de Singh e colaboradores (2022) tenha mostrado que o efeito, em *Drosophila*, é de mascaramento e não sincronização), a ocorrência de vibrações regulares no meio (Simoni et al., 2014), e as interações sociais (Clements, 1999; Saunders, 2002; Marques e Menna-Barreto, 2003; Kronfeld-Schor et al., 2017, Beer e Helfrich-Förster, 2020). De maneira geral, exemplos desses casos são escassos ou inexistentes em mosquitos. Além disso, há um desafio em estudar a alimentação sanguínea como um possível sincronizador do relógio circadiano nesses insetos, devido ao fato de que a alimentação sanguínea, *per se*, levar a uma redução da atividade locomotora dos mosquitos, como demonstrado por Lima-Camara e colaboradores, em 2014.

A importância de outros sincronizadores, além de luz e temperatura

Interações intraespecíficas, como os comportamentos reprodutivos, também são potenciais sincronizadores. Em Araripe et al. (2018), os autores estudaram a interação entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, através de experimentos de atividade locomotora, no qual machos foram expostos a fêmeas confinadas. Os resultados mostraram que os machos apresentam dois picos de atividade ao anoitecer (picos E1 e E2), enquanto as fêmeas apresentam um único pico (Figura 5). Além disso, os machos expostos a fêmeas tiveram alteração nas amplitudes dos seus picos de atividade, de modo que o pico de maior amplitude passou a ser o E2 (Figura 5), sobrepondo-se ao pico único de atividade das fêmeas. Esses resultados mostram que os machos foram capazes de perceber a presença de fêmeas e, ainda, de alterar a sua atividade em resposta a elas, embora essas informações não sejam suficientes para confirmar o papel da interação, enquanto fator sincronizador.

A função sensorial está diretamente envolvida com o sucesso reprodutivo dos mosquitos. Alguns sentidos, como a audição, o olfato e a visão, são importantes durante as etapas do comportamento reprodutivo. Porém, os sentidos envolvidos na mediação do reconhecimento entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti* ainda não foram estudados em detalhes. Sabe-se que a audição tem um papel importante: o tipo de som dado pela frequência de batimento das asas pode ser uma característica espécie-específica em muitos grupos de dípteros (em *Lu. longipalpis*: Araki et al., 2013; Vigoder et al., 2010, 2013). Já o papel do olfato

na comunicação entre machos e fêmeas de mosquitos ainda é discutido; apenas em *Ae. aegypti* os feromônios usados para a formação de enxames em machos foram identificados (Vaníčková, 2016). Como feromônios sexuais são conhecidos em dípteros flebotomíneos (*Lu. longipalpis* - Watts et al., 2005; Hamilton et al., 2005; González et al., 2020), é possível que estudos mais detalhados encontrem as moléculas com essa função em mosquitos. Um trabalho recente mostrou que o feromônio heptacosano, quando esfregado no abdômen de machos de *Ae. aegypti*, os torna, significativamente, mais atraentes para as fêmeas, e consequentemente, aumenta sua taxa de inseminação (Wang et al., 2023).

A partir do conhecimento de que os machos de *Ae. aegypti* alteram a sua atividade em resposta à presença de fêmeas da mesma espécie, Araripe e colaboradores (2018) investigaram quais sentidos poderiam estar envolvidos na comunicação entre eles. Como em mosquitos, as antenas são órgãos de olfato e de audição e as asas produzem sons na frequência de seu batimento. Machos com as antenas removidas e fêmeas com as asas removidas foram monitorados, com o objetivo de impactar a comunicação e a percepção olfativa envolvida com o reconhecimento e a reprodução. Os autores encontraram que os machos sem antenas têm uma atividade significativamente menor do que machos com antenas e não alteram o seu padrão de atividade em resposta à presença de fêmeas. Por sua vez, os machos com fêmeas sem asas também apresentaram o pico E2 sobreposto com o pico de fêmeas, mas com a amplitude significativamente menor do que o pico dos machos com fêmeas aladas. Os resultados indicam que, na ausência dos sinais sonoros de batimento das asas, os machos percebem as fêmeas por outros sentidos, como, provavelmente, o olfato e a visão. A capacidade de sincronização do comportamento pela interação social ainda precisa ser confirmada em *Ae. aegypti*, mas já é conhecida em outros organismos, como, por exemplo, em abelhas (Beer et al., 2016).

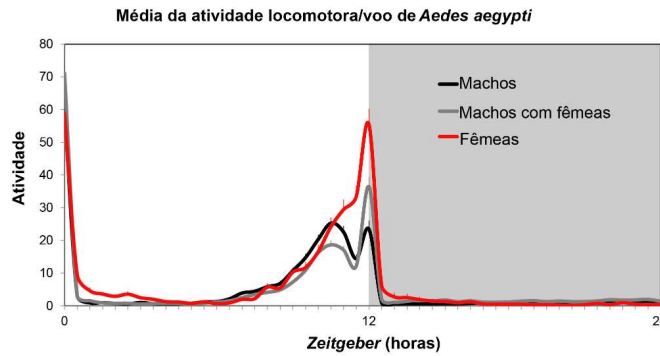


Figura 5: Atividade locomotora/voo de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*. Perfil médio de três dias de experimento de atividade locomotora/voo, ao longo de 24 horas, das condições: machos sozinhos (linha preta), machos com fêmeas (linha cinza) e fêmeas (linha vermelha). A área branca representa a fase clara e a área cinza representa a fase escura.

Fonte: Arquivo pessoal

O sistema sensorial em mosquitos e seus ritmos

Durante o seu ciclo de vida, os mosquitos passam por quatro estágios larvais, quando estão expostos a uma variedade de microrganismos e compostos orgânicos no meio aquoso. O olfato é o principal sentido atuando nesse meio, usado, principalmente, para a detecção de fontes de alimento, mas também para a identificação de indivíduos que sejam potenciais competidores ou predadores. Em mosquitos adultos, o olfato é determinante na busca de fontes de alimento açucaradas, na busca de hospedeiros para as fêmeas realizarem o repasto sanguíneo, bem como de sítios de oviposição (quando fêmeas precisam selecionar sítios com disponibilidade de alimento e ausência de patógenos ou predadores de suas larvas) e, possivelmente, no reconhecimento de parceiros para acasalamento.

Os mosquitos possuem, ainda, um sistema sensorial formado por três apêndices olfativos: as antenas, os palpos maxilares e a probóscide. As moléculas de odor penetram através de poros localizados nas sensilas desses apêndices, iniciando uma cascata de eventos, que será descrita a seguir (Suh et al., 2014). Existem três grupos de receptores sensoriais, chamados de quimiorreceptores, que são responsáveis por detectar moléculas químicas externas e de se ligar a elas: a) receptores de odor (OR); b) receptores gustativos (GR); e c) receptores ionotrópicos (IR), sendo os OR os mais estudados (Bohbot e Pitts, 2015). Os receptores olfativos funcionais são complexos de moléculas formados por uma unidade receptora e um correceptor chamado ORco. São localizados nos dendritos de neurônios receptores olfativos (ORN), que se projetam até as sensilas dos apêndices olfativos (Figura 6 A) (Suh et al., 2014; Bohbot e Pitts,

2015). Em mosquitos, é proposto que, após penetrarem através das sensilas, a maioria das moléculas de odor se ligam a proteínas solúveis chamadas de proteínas ligadoras de odor (*odor binding protein* ou OBP). Essas OBP atuam transportando moléculas de odor, que possuem características hidrofóbicas, ou seja, que não possuem afinidade pelo meio aquoso, até os OR, que, quando ativados, transformam os sinais químicos em sinais elétricos (Figura 6A).

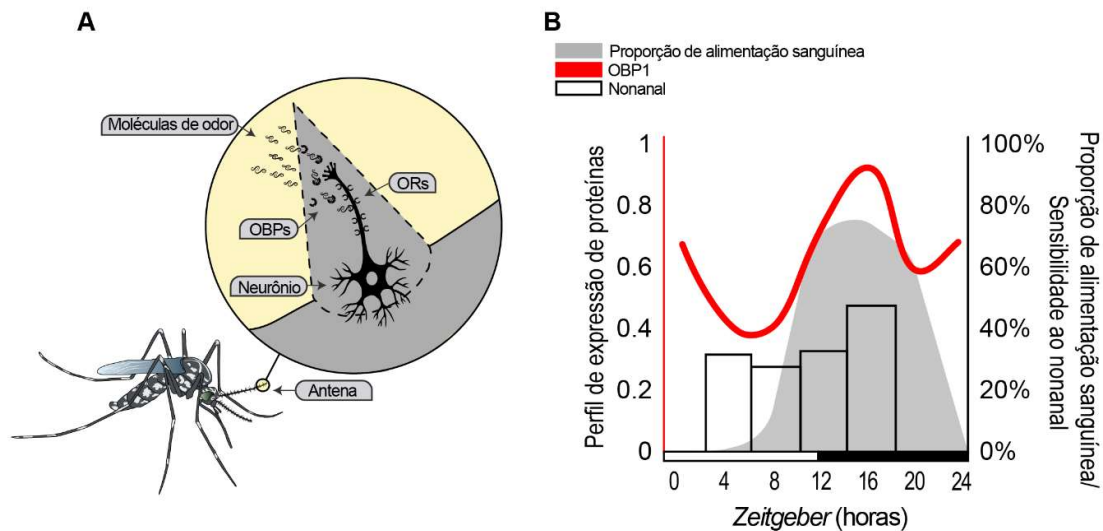


Figura 6: A) Esquema gráfico representando a antena de uma fêmea de mosquito e as proteínas que fazem o transporte das moléculas de odor hidrofóbicas (OBP) até os receptores de odor (OR), localizados nos neurônios receptores de odor. O esquema é o mesmo em machos de mosquitos. B) Perfil de expressão de uma OBP (linha vermelha) em *An. gambiae*, sobreposto ao pico de frequência de alimentação sanguínea (cinza) e ao histograma de frequência de resposta olfativa ao nonanal (odor de hospedeiros)

Fonte: Modificado de Rund et al., 2013

O número de OR varia muito entre espécies de mosquitos, por exemplo: é 89 em *An. gambiae*, 131 em *Ae. aegypti*, 180 em *Cx. quinquefasciatus* e 158 em *Ae. albopictus* (Ni et al., 2021). Como são peças-chave para o sucesso reprodutivo e para a sobrevivência de organismos com comportamentos e hábitos diferentes, suas funções também variam, não só entre espécies, mas também entre machos e fêmeas e entre diferentes estados fisiológicos, como previamente observado em comparações de expressão gênica de 114 genes de OR em *Ae. aegypti* (Ni et al., 2021). O reconhecimento de moléculas de odor é fundamental para o desempenho de funções vitais relacionadas à capacidade vetorial de mosquitos transmissores de arbovírus. Por isso, o estudo de funções das OR e OBP pode levar a estratégias que interfiram na capacidade vetorial dos mosquitos (Rund et al., 2013).

Em um estudo realizado com mosquitos da espécie *An. gambiae*, os autores descreveram padrões rítmicos de expressão de mRNA e proteínas OBP em antenas, e avaliaram a sensibilidade olfativa das antenas em resposta a odores de hospedeiros (Rund et al., 2013). Eles observaram que um aumento na sensibilidade olfativa das antenas coincidia com os picos de expressão de OBP e com a fase de maior atividade de alimentação sanguínea desses mosquitos (Figura 6B). Portanto, nessa espécie e, possivelmente, em outras espécies de mosquitos vetores, os ritmos de expressão de OBP estão associados à sensibilidade das antenas a odores. Da mesma forma, outras interações sociais também são, potencialmente, influenciadas por esses ritmos. Além disso, a percepção de moléculas de odor hidrofílicas, ou seja, que não necessitam de OBP para serem detectadas, não apresentou variação ao longo do dia (Rund et al., 2013).

Em um estudo mais recente, Eilerts e colaboradores (2018) analisaram a sensibilidade olfativa e a resposta comportamental de *Ae. aegypti* a odores provenientes de plantas e de hospedeiros. Os autores observaram que, diferentemente do resultado encontrado em *An. gambiae*, em *Ae. aegypti* parece ocorrer variação da sensibilidade das antenas a moléculas de odores hidrofílicos em diferentes momentos do dia. Contudo, as duas espécies são semelhantes em termos da sobreposição de uma maior sensibilidade das antenas a odores de hospedeiros, com a fase de maior atividade e de busca por fonte de sangue, que em *Ae. aegypti* ocorre no meio e no final da fase clara. Por outro lado, a sensibilidade das antenas a odores provenientes de plantas foi maior em outra fase do dia, sugerindo que, dependendo do horário, os mosquitos estão mais aptos a detectar fontes açucaradas ou fontes de alimentação sanguínea (Eilerts et al., 2018).

A natureza rítmica do ambiente e a coincidência da fisiologia e do comportamento dos mosquitos em desempenhar funções biológicas que contribuem para sua capacidade vetorial, evidenciam a necessidade de estudos integrados de manejo e controle de vetores. Nessas situações, seria importante que a característica circadiana da reprodução e da busca por hospedeiros fosse levada em conta para o aumento da eficácia dos métodos propostos.

Interação patógeno-hospedeiro e a relação com o relógio em mosquitos

Como citado anteriormente, os mosquitos são transmissores de diversos patógenos que causam doenças importantes em humanos. Continuaremos abordando os gêneros e as espécies já citados neste capítulo: Os mosquitos *Ae. aegypti* são vetores de vírus que causam dengue, zika e chikungunya (Valle et al., 2021), enquanto os mosquitos do gênero *Culex* são vetores dos vírus que causam a febre do Nilo ocidental e a febre Oropouche, além do nematoide que causa a filariose linfática (Lara et al., 2021; Peffers e Meuti, 2022). Já os mosquitos do gênero *Anopheles* são vetores de protozoários do gênero *Plasmodium*, que causam a malária (Sangbakembi-Ngounou et al., 2022).

Padrões rítmicos, que compõem as características comportamentais de um inseto vetor, podem estar sob a influência do seu estado fisiológico, como, por exemplo, uma infecção por patógeno. Portanto, neste tópico, iremos abordar o modo como a interação patógeno-hospedeiro se relaciona com o relógio circadiano nestes insetos.

Os mosquitos *Ae. aegypti* possuem um perfil de atividade diurno, com picos de atividade no acender e no apagar das luzes (Gentile et al., 2009). Um estudo realizado em 2011 mostrou que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas por via intratorácica pelo vírus Dengue sorotipo 2 (DENV2), e mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, apresentaram um aumento significativo no padrão da sua atividade locomotora, quando comparadas com mosquitos-controle (não infectados) (Figura 7) (Lima-Camara et al., 2011).

Um trabalho realizado em 2008 pelo grupo de Xi e colaboradores mostrou, através do resultado de transcriptômica, que o gene *Clk* é super expresso em fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas pelo DENV2. Esta variação nos níveis de expressão de *Clk* pode estar relacionada ao aumento da atividade locomotora nas fêmeas infectadas (Xi et al., 2008).

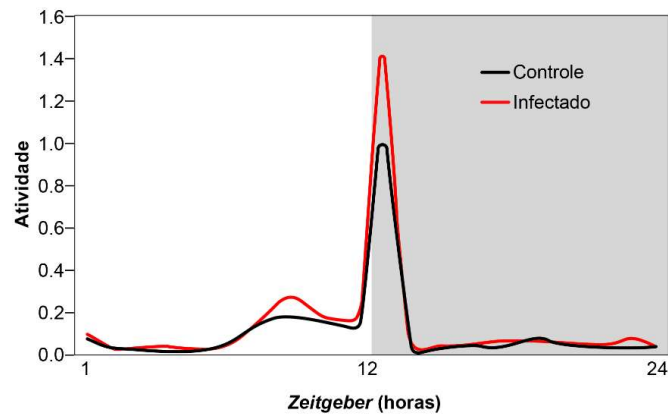


Figura 7: Atividade locomotora de mosquitos *Ae. aegypti* infectados e não infectados pelo vírus Dengue 2, em regime de LD12:12. O eixo y representa a média de atividade locomotora normalizada; as linhas representam a atividade locomotora dos mosquitos-controle (preto) e infectados (vermelho). O eixo x representa o ZT, onde as luzes acendem no ZT1 e apagam no ZT13. O fundo branco representa a fase clara, e o fundo cinza, a fase escura.

Fonte: Arquivo pessoal

Mais recentemente, novos estudos descrevendo os perfis de atividade locomotora e de outros padrões fisiológicos deste inseto, quando infectado por outros arbovírus, foram realizados. Padilha e colaboradores (2018) observaram que os mosquitos infectados pelo vírus Zika (ZIKV) por via oral, apresentaram uma amplitude de atividade locomotora menor em comparação aos mosquitos-controle (não infectados). Esse padrão aconteceu tanto em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, como em escuro constante (Figura 8). Entretanto, a fertilidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos não foram afetadas pela infecção, sugerindo que o vírus não altera a modulação de genes responsáveis pela oviposição das fêmeas (Padilha e Resck et al., 2018).

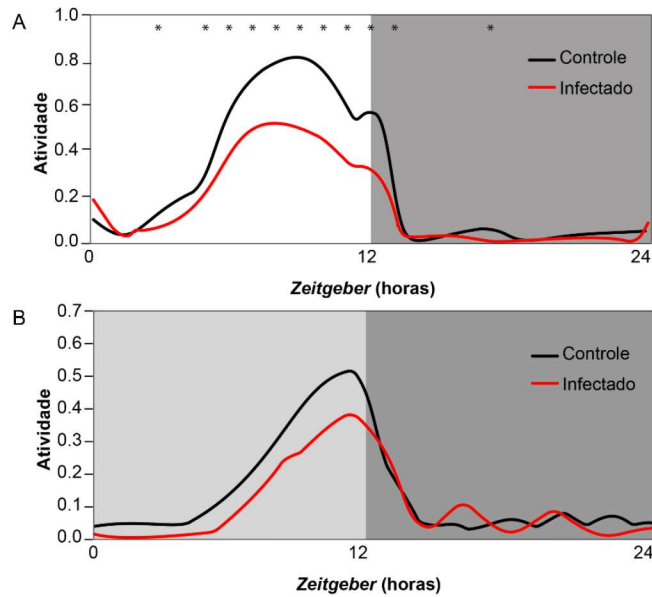


Figura 8: Atividade locomotora de mosquitos *Ae. aegypti* infectados e não infectados pelo vírus ZIKA, em regime de LD12:12 e DD. O eixo y representa a média de atividade locomotora normalizada. As linhas representam a atividade locomotora dos mosquitos-controle (preto) e infectados (vermelho). O eixo x representa o ZT, no qual as luzes acendem no ZT1 e apagam no ZT13 (Figura A) ou CT (Figura B), ou Circadian Time, representação do tempo em condições constantes. A área branca representa a fase clara e a área cinza escura representa a fase escura. Na figura B, a área cinza claro representa o dia subjetivo.

Fonte: Arquivo pessoal

Este grupo também analisou a atividade locomotora em mosquitos oralmente infectados pelo vírus Chikungunya (CHIKV) e mantidos em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Eles observaram que, assim como ocorre quando esses mosquitos estão infectados pelo ZIKV, há uma redução significativa na atividade locomotora, quando comparados a mosquitos-controle (não infectados) (Figura 9) (Padilha et al., 2020). É possível que, ao serem infectados por diferentes arbovírus, os mosquitos *Ae. aegypti* respondam, fisiologicamente, de maneira distinta, o que ocorre mesmo quando os vírus pertencem à mesma família (como é o caso do DENV e ZIKV, que são flavivírus). Isso mostra que os arbovírus são capazes de modular, de modo singular, os genes de relógio, ou até mesmo os genes regulados por eles e que estão envolvidos na infecção por patógenos nesses insetos. Leming e colaboradores (2014) mostraram que aproximadamente 8% dos genes que são expressos na cabeça de *Ae. aegypti* são rítmicos quando esses insetos são mantidos em regime de claro/escuro, e 6,7% desses transcritos podem ser considerados circadianos, uma vez que ciclam mesmo quando esses insetos são mantidos em regime de escuro constante.

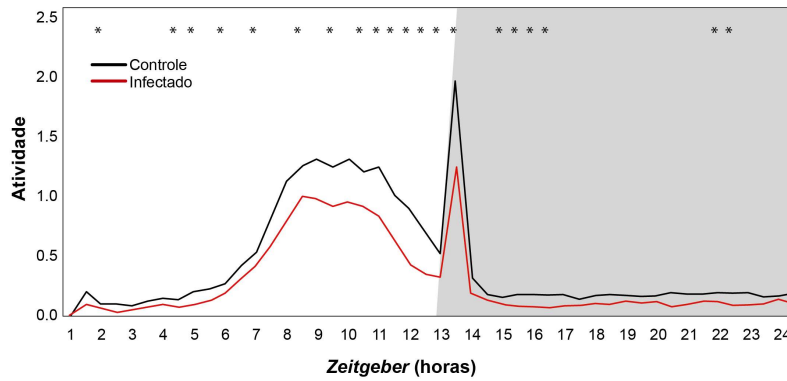


Figura 9: Atividade locomotora de mosquitos *Ae. aegypti* infectados e não infectados pelo vírus Chikungunya em regime de LD12:12. O eixo y representa a média de atividade locomotora normalizada; as linhas representam a atividade locomotora dos mosquitos-controle (preto) e infectados (vermelho). O eixo x representa o ZT, no qual as luzes acendem no ZT1 e apagam no ZT13. O fundo branco representa a fase clara e o fundo cinza, a fase escura.

Fonte: Arquivo pessoal

Como visto anteriormente, os mosquitos do gênero *Culex* são insetos de atividade noturna. Embora esse inseto seja um importante vetor de doenças de interesse médico, há poucos trabalhos que mostram a relação patógeno-hospedeiro, assim como com o relógio circadiano.

A análise da atividade de voo de mosquitos *Culex tarsalis* infectados e não infectados com o vírus da encefalomielite equina ocidental mostrou que os mosquitos infectados apresentaram uma redução significativa na atividade de voo, quando comparados aos mosquitos-controle (Figura 10). Com relação ao perfil diário de atividade de voo, ambos os mosquitos (infectados e controles), não apresentaram diferenças no perfil diário (Lee et al., 2000). Esses dados mostram que, provavelmente, o cerne do relógio molecular não é alterado pela infecção, mas que, como citado anteriormente, genes que são controlados pelo relógio e que atuam durante a infecção de arbovírus, em tais insetos, podem ser modulados de uma forma diferente nos mosquitos infectados, o que poderia explicar essa diferença no perfil de atividade.

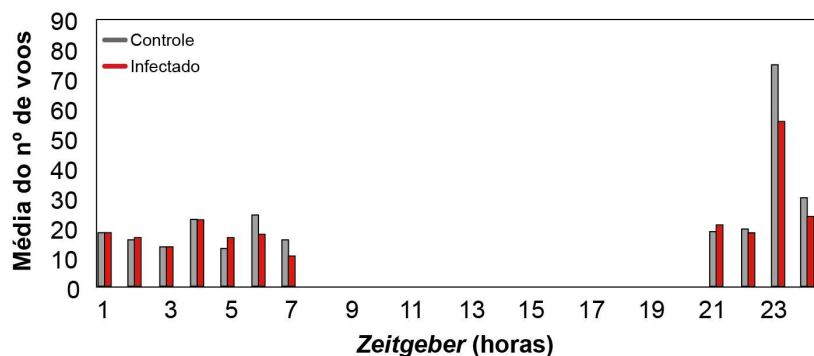


Figura 10: Atividade de voo em mosquitos *Cx. tarsalis* infectados e não infectados pelo vírus da encefalomielite equina ocidental em regime de LD16:8. O eixo y representa a média de atividade de voo/hora. O eixo x representa o tempo em horas. As barras pretas representam os mosquitos-controle e barras vermelhas, mosquitos infectados.

Fonte: Arquivo pessoal

Newman e colaboradores (2016) descreveram o perfil de atividade locomotora da espécie *Culex pipiens*, quando esse inseto estava infectado pelo vírus *Culex Flavivirus* (CxFV), que afeta apenas os mosquitos desse gênero e que não é transmitido para humanos. Os vírus desse tipo são chamados de flavivírus específicos de insetos (Newman et al., 2016). Foram coletados mosquitos que são naturalmente infectados pelo CxFV e mosquitos que não são, mas que foram mantidos em regime de LD16:8. Foi observado que os mosquitos naturalmente infectados pelo CxFV possuíam uma amplitude de atividade locomotora menor do que os mosquitos não infectados (Figura 11). Não se sabe se esse vírus infecta tecidos musculares que auxiliam na atividade de voo, e se isso poderia explicar o fato de os mosquitos infectados voarem menos (Newman et al., 2016). Porém, novamente, os dados mostrados até aqui sugerem, fortemente, que uma regulação gênica diferenciada nos mosquitos infectados por patógenos faz com que eles apresentem comportamentos fisiológicos distintos dos mosquitos-controle, levando direta ou indiretamente a efeitos sobre o seu cerne do relógio circadiano.

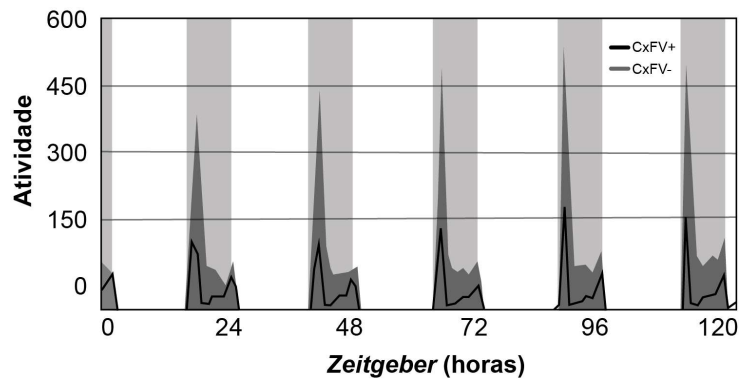


Figura 11: Atividade de voo em mosquitos *Cx. pipiens* infectados e não infectados pelo vírus CxFV em regime de LD16:8, em um período de 120 horas (5 dias). O eixo y representa a média de atividade de voo (segundo/hora). O eixo x representa o tempo em horas ao longo de 5 dias. As linhas representam a atividade locomotora dos mosquitos CxFV negativos (área cinza) e CxFV positivos (linha preta). O fundo branco representa a fase clara e o fundo cinza, a fase escura.

Fonte: Arquivo pessoal

Em um trabalho recente, Adams e colaboradores investigaram se mosquitos *Cx. quinquefasciatus* teriam o seu perfil de atividade locomotora alterado, caso fossem infectados pelo parasita *Plasmodium relictum*, causador da malária aviária. Para o experimento, eles utilizaram mosquitos coletados em campo e mantidos em laboratório em um regime de LD10.5:14.5 a 27°C. Esses insetos foram alimentados sobre canários infectados pelo parasita, colocados em monitores de atividade, onde foram analisados. Os resultados mostraram que os mosquitos-controle apresentaram uma atividade mais dispersa e que os mosquitos infectados por *P. relictum* tiveram um aumento na sua amplitude de atividade de voo em horários de busca pelo hospedeiro (Adams et al., 2022). Embora experimentos moleculares não tenham sido realizados para analisar a expressão de genes de relógio, devemos considerar que a infecção por *P. relictum* é capaz de modificar o comportamento do mosquito, e, portanto, genes envolvidos no mecanismo de controle do relógio circadiano podem ser modulados pelo patógeno.

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são insetos com atividade noturna (revisado em Rund et al., 2013). Trabalhos que estudam o relógio tanto de *Anopheles* spp. como de agentes etiológicos de malária que infectam esses mosquitos (*Plasmodium* spp.), têm aumentado em número nos últimos anos. O'Donnell e colaboradores (2019) realizaram experimentos com o intuito de entender como a alimentação (com sangue em diferentes condições e mosquitos alimentados em diferentes horas do dia) poderia afetar aspectos fisiológicos de mosquitos *Anopheles stephensi*. Os mosquitos foram divididos em 3 grupos experimentais: no primeiro, eles se alimentaram sobre camundongos tornados

anêmicos pelo uso de fenilidrazina; no segundo, os mosquitos foram alimentados sobre camundongos anêmicos devido à infecção por *Plasmodium chabaudi*; e o terceiro grupo se alimentou sobre camundongos infectados por *Plasmodium berghei* e, portanto, não anêmicos. Para cada grupo experimental, esses insetos foram alimentados ou durante o dia (fase de baixa atividade ou de repouso nessa espécie) ou durante a noite.

Os autores observaram que, para as três condições experimentais, a taxa de sobrevivência dos mosquitos não foi alterada, independentemente do horário da alimentação (dia ou noite) ou do tipo de sangue (anêmico ou não, infectado com *P. chabaudi* ou não). Também não foram observadas diferenças significativas na prevalência nem na intensidade da infecção por *P. berghei* nos mosquitos, quando comparadas a alimentação diurna e noturna. Esse resultado foi inesperado, uma vez que processos necessários para neutralizar o ROS produzido pela digestão do sangue são rítmicos. Os dados mostraram, ainda, que a alimentação pela manhã torna os mosquitos mais propensos à oviposição (O'Donnell et al., 2019). No geral, essas informações indicam que esses mosquitos têm flexibilidade suficiente para se adaptar à alimentação em diferentes horários (O'Donnell et al., 2019). Considerando que *P. berghei* tem um relógio intrínseco, assim como é sabido em *P. chabaudi* (Rijo-Ferreira et al., 2020), ele também pode ter essa flexibilidade de adaptação.

Já se sabe que aproximadamente 20% dos genes que compreendem o genoma de *An. gambiae* são expressos ritmicamente, incluindo genes de imunidade, que são essenciais em uma infecção por patógenos (Rund et al., 2011; revisado em Rund et al., 2016). Desse modo, essa interação hospedeiro-patógeno-vetor abrange uma série de genes que estão envolvidos na regulação circadiana e que podem ser afetados pela infecção.

Mais recentemente, estudos começaram a comprovar que patógenos poderiam ter o seu próprio relógio intrínseco, como, por exemplo, o protozoário *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono. Foi provado que, em cultura, esses parasitas apresentaram, aproximadamente, 10% dos genes expressos de modo circadiano (Rijo-Ferreira et al., 2017). Esse mesmo grupo demonstrou que o *P. chabaudi* também possui um relógio intrínseco, ou seja, os ritmos apresentados por esse parasita não são controlados pelo hospedeiro; porém, ele necessita do hospedeiro para sincronizar o seu relógio. Curiosamente, os ritmos do parasita são mantidos mesmo quando o hospedeiro vertebrado é um mutante arritmico para o relógio (Rijo-Ferreira et al., 2020).

Esse achado foi extremamente importante para mostrar a complexidade das interações entre patógenos e seus hospedeiros vertebrados ou invertebrados

e a relação com o relógio circadiano. É necessário entender como os relógios dos diferentes organismos agem para lidar com a infecção (quando olhamos sob o ponto de vista do hospedeiro), ou para manter e fazer com que a infecção seja um sucesso (quando olhamos sob o ponto de vista do patógeno).

Considerações finais

Nesse capítulo, pudemos observar que, apesar da importância epidemiológica dos insetos vetores, pouco ainda se sabe sobre a regulação molecular do relógio circadiano que monitora os diferentes ritmos. No entanto, os ensaios de comportamento, já existentes desde meados do século passado, mostram que os ritmos circadianos são fundamentais para a fisiologia desses animais e, conseqüentemente, para a dinâmica de transmissão de doenças causadas por esses patógenos. Por fim, o avanço das tecnologias moleculares certamente contribuirá para um maior entendimento do relógio circadiano em médio prazo.

Glossário

Amplitude – diferença entre os valores de oscilação máxima e do eixo de repouso de um ritmo biológico.

Circadian time (CT) – período em condições constantes.

Criofase – fase fria de um ciclo de quente/frio.

Escotofase – fase escura (ou da noite) de um ciclo de claro/escuro.

Fase – Janela temporal de um ciclo. Pode se referir à parte de um ciclo que está sob uma determinada condição, como a fase clara e a fase escura em um ciclo de claro/escuro ou a um momento pontual, como por exemplo, a fase do pico de oscilação.

Fotofase – fase clara (ou do dia) de um ciclo de claro/escuro.

LD 12:12 – representação de um ciclo de claro/escuro (do inglês “*light*” e “*dark*”), com 12 horas de cada fase.

Período – tempo de duração de um ciclo

TC 12:12 - representação de um ciclo de quente/frio (do inglês “*thermo*” e “*cold*”), com 12 horas de cada fase.

Termofase – fase quente de um ciclo de quente/frio.

Zeitgeber time (ZT) – tempo transcorrido desde o início da sincronização pelo *Zeitgeber*

Referências

- Adams D.R., Golnar A.J., Meyers J.I., *et al.* 2022 *Plasmodium relictum* infection in *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) decreases diel flight activity but increases peak dusk flight activity. *Malaria Journal*. 21:244
- Araki A.S., Ferreira G.E.M., Mazzoni C.J., *et al.* 2013. Multilocus Analysis of Divergence and Introgression in Sympatric and Allopatric Sibling Species of the *Lutzomyia longipalpis* Complex in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(10): e2495.
- Araripe L.O., Bezerra J.R.A., Rivas G.B.S. *et al.* 2018. Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasites & Vectors*, 11:254.
- Araujo M.d.S., Guo F., Rosbash M. 2020. Video Recording Can Conveniently Assay Mosquito Locomotor Activity. *Sci Rep*, 10, 4994.
- Aschoff J., 1954. Zeitgeber der Tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*, 41: 49-56.
- Aschoff J., 1951. Die 24-Strunden-Periodik der Maus under konstanten Umweltbedingungen. *Naturwissenschaften*, 38: 506-507.
- Beer, K., Steffan-Dewenter, I., Härtel, S. *et al.* 2016. A new device for monitoring individual activity rhythms of honey bees reveals critical effects of the social environment on behavior. *J. Comp. Physiol. A.* 202, 555–565.
- Beer K, Helfrich-Förster C. 2020. Model and Non-model Insects in Chronobiology. *Front. Behav. Neurosci.* Nov 26;14:601676.
- Bohbot J.D., Pitts R.J. 2015. The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Front. Ecol. Evol.* 3:39.
- Boothroyd C.E., Young, M.W., 2008. The in(put)s and out(put)s of the *Drosophila* circadian clock. *Ann N Y Acad Sci.*, 1129:350-7.
- Breda, C.; Rosato, E.; Kyriacou, C.P. 2020. Norp a Signalling and the Seasonal Circadian Locomotor Phenotype in *Drosophila*. *Biology* 9, 130.
- Chen W., Liu Z., Li T., *et al.* 2014. Regulation of *Drosophila* circadian rhythms by miRNA let-7 is mediated by a regulatory cycle. *Nat Commun.* 5:5549.
- Chen X., Rosbash M. 2016. mir-276a strengthens *Drosophila* circadian rhythms by regulating *timeless* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(21):E2965-72.
- Clements A.N. , 1992. *The Biology of Mosquitoes Vol. 1: development, nutrition and reproduction.* CABI Publishing, New York.
- Clements A.N., 1999. *The Biology of Mosquitoes Vol. 2: Sensory Reception and Behaviour.* CABI Publishing, New York.
- Collins B.H., Rosato E., Kyriacou C.P., 2004. Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1945–1950.

Daan S., Pittendrigh, C.S., 1976. A Functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. *J. Comp. Physiol.* 106A: 223-266.

Das S., Dimopoulos G., 2008. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC Physiol* 8:23.

Doherty C.J., Kay S.A., 2010. Circadian control of global gene expression patterns. *Annu Rev Genet.* 44:419-44.

Eilerts D.F., VanderGiessen M., Bose E.A., *et al.* 2018. Odor-Specific Daily Rhythms in the Olfactory Sensitivity and Behavior of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insects.* Oct 23;9(4):147.

Gentile C., Rivas G.B.S., Meireles-Filho A.C.A., *et al.* 2009. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythms.* 24, 444-51.

Glaser F.T., Stanewsky R., 2005. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol.* 15(15):1352-63.

González M.A., Bell M., Souza C.F. *et al.* 2020. Synthetic sex-aggregation pheromone of *Lutzomyia longipalpis*, the South American sand fly vector of *Leishmania infantum*, attracts males and females over long-distance. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(10): e0008798.

Hamilton J.G., Maingon R.D., Alexander B., *et al.* 2005. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol.* 19(4):480-8.

Hardin P.E., 2005. The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Curr Biol.* 15, R714-R722.

Hardin P.E. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv. Genet.* 74, 141-73.

Houl J.H., Yu W., Dudek S.M., Hardin P.E. 2006. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. *J Biol Rhythms.* 21(2):93-103.

Kadener S., Menet J.S., Sugino K. *et al.* 2009. A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 23(18):2179-91.

Keegan K.P., Pradhan S., Wang J.P. *et al.* 2007. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput Biol.* 3, e208.

Kim E.Y., Bae K., Ng F.S. *et al.* 2006. *Drosophila* CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron.* 34, 69-81.

Konopka R.J., Benzer S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68: 2112-2116.

- Kronfeld-Schor N., Visser M.E., Salis L. *et al.* 2017. Chronobiology of interspecific interactions in a changing world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017 Nov 19;372(1734):20160248.
- Labbé F, Abdeladhim M, Abrudan J *et al.* 2023. Genomic analysis of two phlebotomine sand fly vectors of leishmania from the new and old World. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Apr 12;17(4):e0010862. doi: 10.1371/journal.pntd.0010862. Epub ahead of print. PMID: 37043542.
- Lara L.M., Pereira-Filho A.A., Pereira R.H.M., *et al.* 2021 Adaptations to haematophagy: Investigations on how male and female *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) deal with human complement activation after a blood meal. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 139, 103650.
- Lee J.H., Rowley W.A., Platt K.B. 2000. Longevity and Spontaneous Flight Activity of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) Infected with Western Equine Encephalomyelitis Virus. *Journal of Medical Entomology.* 37(1):187–93.
- Leming M.T., Rund S.S.C., Behura S.K. *et al.* 2014. A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 17, 15(1):1128.
- Lima-Camara T.N., Bruno R.V., Luz P.M. *et al.* 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One.* 6(3):e17690.
- Lima-Camara T.N., Lima J.B.P., Bruno R.V., Peixoto A.A. (2014) Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasites & Vectors.* 7:304.
- Majercak J., Sidote D., Hardin P.E. *et al.* 1999. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature features of *Drosophila* day length. *Neuron* 24, 219–230.
- Majercak J., Chen W.F., Edery I., 2004. Splicing of the gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3359– 2116.
- Marques M.D., Golombek D., Moreno C. 2003. Adaptação temporal. In: Marques N, Menna-Barreto L, orgs. *Cronobiologia: princípios e aplicações.* São Paulo: EDUSP-Fiocruz; 2003. p. 45-84.
- Marques N., Menna-Barreto L. 2003. *Cronobiologia: princípios e aplicações.* São Paulo: EDUSP-Fiocruz.
- Mesquita R.D., Vionette-Amaral R.J., Lowenberger C. *et al.* 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(48):14936-41.
- Moore-Ede M.C., Sulzman F.M., Fuller C.A., 1982. *The clocks that time us- Physiology of the circadian timing system.* London: Harvard University Press; 1982.

- Newman C.M., Anderson T.K., Goldberg T.L. 2016 Decreased Flight Activity in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected with *Culex flavivirus*. *Journal of Medical Entomology*. 53(1): 233–36.
- Ni M., Zhao T., Lv Hx. *et al.* 2022. Screening for odorant receptor genes expressed in *Aedes aegypti* involved in host-seeking, blood-feeding and oviposition behaviors. *Parasites Vectors*, 15, 71.
- O'Donnell A.J., Rund S.S.C., Reece S.E. 2019 Time-of-day of blood-feeding: effects on mosquito life history and malaria transmission. *Parasites & Vectors*. 12:301.
- Padilha K.P., Resck M.E.B., Talyuli O.A.C. *et al.* 2018. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 113(10): e180290.
- Padilha K.P., Talyuli O.A.C., Lourenço-de-Oliveira R. *et al.* 2020. Chikungunya infection modulates the locomotor/flight activity of *Aedes aegypti*. *Sleep Science*. 13:74-77.
- Peffer C., Meuti M.E. 2022. Characterizing the relative abundance of circadian transcription factors in diapausing and nondiapausing Northern house mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2022 140:104404.
- Peschel N., Chen K.F., Szabo G., Stanewsky R., 2009. Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Curr Biol*. 2009 19(3):241-7.
- Patke, A., Young, M.W., Axelrod, S. 2020. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 67–84.
- Ptitsyn A.A., Reyes-Solis G., Saavedra-Rodriguez K. *et al.* 2011. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*. 12:153.
- Rijo-Ferreira F., Pinto-Neves D., Barbosa-Morais N.L. *et al.* 2017. *Trypanosoma brucei* metabolism is under circadian control. *Nature Microbiology*. 2, 17032.
- Rijo-Ferreira F., Acosta-Rodriguez V.A., Abel J.H. *et al.* 2020. The malaria parasite has an intrinsic clock. *Science*. 368, 746-753.
- Rivas G.B.S., Teles-de-Freitas R., Pavan M.G. *et al.* 2018. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *J Biol Rhythms*. 33(3):272-288.
- Roessingh, S., Rosing, M., Marunova, M. *et al.* 2019. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock protein PERIOD is controlled by the TRPA channel PYREXIA. *Commun Biol* 2, 246.
- Rund S.S.C., Bonar N.A., Champion M.M. *et al.* 2013. Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports* 3, 2494.

- Rund S.S.C., Hou T.Y., Ward S.M. *et al.* 2011. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. PNAS. 108 (32): E421–E430.
- Rund S.S.C., O'Donnell A.J., Gentile J.E., *et al.* 2016. Daily Rhythms in Mosquitoes and Their Consequences for Malaria Transmission. *Insects*. 7, 14.
- Rutila J.E., Suri V., Le M. *et al.* 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*. 93, 805-814.
- Sangbakembi-Ngounoua C., Costantinib C., Longo-Pendyc N.M. *et al.* 2022. Diurnal biting of malaria mosquitoes in the Central African Republic indicates residual transmission may be “out of control”. PNAS. 119(21): e2104282119.
- Saunders D.S., 2002. *Insect Clocks*. 3rd edition Elsevier Science. Amsterdam.
- Sehadova H., Glaser F.T., Gentile C. *et al.* 2009. Temperature entrainment of *Drosophila's* circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron*. 64(2):251-66.
- Singh V.J., Potdar S., Sheeba V. 2022. Effects of Food Availability Cycles on Phase and Period of Activity-rest Rhythm in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*. 37(5): 528-544.
- Simoni A., Wolfgang W., Topping M.P., Kavlie R.G., Stanewsky R., Albert J.T. 2014. A mechanosensory pathway to the *Drosophila* circadian clock. *Science*. 343:525–8.
- Suh E., Bohbot J., Zwiebel L.J. 2014. Peripheral olfactory signaling in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 1; 6: 86–92.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P. *et al.* 1998. The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*. 95(5):681-92.
- Stanewsky R., 2003. Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J Neurobiol*. 54(1):111-47.
- Teles-de-Freitas R., Rivas G.B.S., Peixoto A.A. *et al.* 2020. The Summer Is Coming: *nocte* and *timeless* Genes Are Influenced by Temperature Cycles and May Affect *Aedes aegypti* Locomotor Activity. *Front Physiol*. 2020 11:614722.
- Tomioka K, Matsumoto A., 2010. A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci*. 67(9):1397-406.
- Valle D., Aguiar R., Pimenta D.N., *et al.* 2021. *Aedes de A a Z*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Vaničková L., Canale A., Benelli G. 2016 Sexual chemoecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae): Current knowledge and implications for vector control programs. *Parasitol. Int.* 66, 190–195.
- Vigoder F.M., Souza N.A., Peixoto A.A. 2010. Copulatory courtship song in *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Dec;105(8):1065-7.

Vigoder F.M., Ritchie M.G., Gibson G *et al.* 2013. Acoustic communication in insect disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 108 Suppl 1(Suppl 1):26-33.

Wang, L.M., Li, N., Zhang, M. *et al.* 2023. The sex pheromone heptacosane enhances the mating competitiveness of sterile *Aedes aegypti* males. *Parasites Vectors* 16, 102. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05711-6>.

Watts P.C., Hamilton J.G., Ward R.D. *et al.* 2005. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 73(4):734-43.

Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.S., Dushay, M.S. *et al.* 1993. Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J.Biol. Rhythms* 8: 67–94.

White G.B., 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1974;68(4):278-301.

Xi Z., Ramirez J.L., Dimopoulos G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogens* 4: e1000098.

Yoshii, T., Sakamoto, M., Tomioka, K., 2002. A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zool. Sci.* 19: 841–850.

Yu W., Zheng H., Houl J.H. *et al.* 2006. PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev.* 20, 723-733.

Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D. *et al.* 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol.* 24 (4), 948-55.

Zhang E.E., Kay S.A. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(11):764-76.

Zhang Y, Markert M.J., Groves S.C. *et al.* 2017. Vertebrate-like CRYPTOCHROME 2 from monarch regulates circadian transcription via independent repression of CLOCK and BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(36):E7516-E7525.

Zhou J., Yu W., Hardin P.E., 2016. CLOCKWORK ORANGE Enhances PERIOD Mediated Rhythms in Transcriptional Repression by Antagonizing E-box Binding by CLOCK-CYCLE. *PLoS Genet* 12 (11): e1006430.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Metabolismo





INCTEM

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

CAPÍTULO 8

Metabolismo de Lipídeos em Insetos

Emerson G. Pontes¹
Katia C. Gondim²
Georgia C. Atella²
David Majerowicz^{2,3}

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

³Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Emerson G. Pontes, Katia C. Gondim, Georgia C. Atella, David Majerowicz].
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Nos insetos, como em outros organismos, os lipídeos desempenham diversas funções. Como exemplos, são constituintes de estruturas celulares, atuam como hormônios e formam importantes reservas energéticas, fundamentais em algumas situações de grande demanda metabólica, tais como o voo e a produção de ovos (Gondim et al., 2018; Heier et al., 2021; Toprak et al., 2020). Na última década, nós assistimos a grandes avanços de técnicas genômicas e de genética funcional, que permitiram o sequenciamento do genoma de vários insetos e a inibição da expressão de genes em organismos não-modelos tradicionais. Isso trouxe novas possibilidades e informações sobre o metabolismo de lipídeos nos insetos, mas, ainda assim, existem diversas lacunas no conhecimento dessa área. Neste capítulo, revisaremos a literatura dos últimos 10 anos, atualizando o capítulo da edição anterior deste livro, assim como apresentaremos nossa perspectiva para a próxima década.

Digestão, absorção e metabolismo intestinal

Durante o processo de digestão no lúmen intestinal, os lipídeos complexos da dieta, como os triacilgliceróis e os fosfolipídeos, são hidrolisados e ácidos graxos livres são liberados, os quais são absorvidos pelo epitélio intestinal (Zhao, Karpac, 2020). Apesar do conhecimento acerca da digestão de lipídeos em insetos ainda ser bastante limitado, especialmente quando se considera a enorme variação nos tipos de alimentação desses organismos (Turunen, Crailsheim, 1996), atividades triacilglicerol-lipásicas digestivas têm sido caracterizadas em diversas espécies (Bonelli et al., 2019; Grillo, Majerowicz; Gondim, 2007; Kodrík, Krištůfek, Svobodová, 2022; Mrdaković et al., 2008; Santana et al., 2017; Sieber, Thummel, 2009; Zhao et al., 2021a, 2021b). Além disso, foram também relatadas outras atividades enzimáticas relacionadas à digestão de lipídeos no lúmen do intestino médio, como fosfolipases (Sajjadian et al., 2019; Spates, Bull, Chen, 1990; Stanley, Sarath, Rana, 1998; Weiher, Komnick, 1997) e colesteril éster hidrolases (Komnick, Giesa, 1994). Uma atividade galactolipásica também já foi descrita em vários insetos fitófagos, já que os galactolipídeos são abundantes nas plantas (Sahaka et al., 2020) (Figura 1).

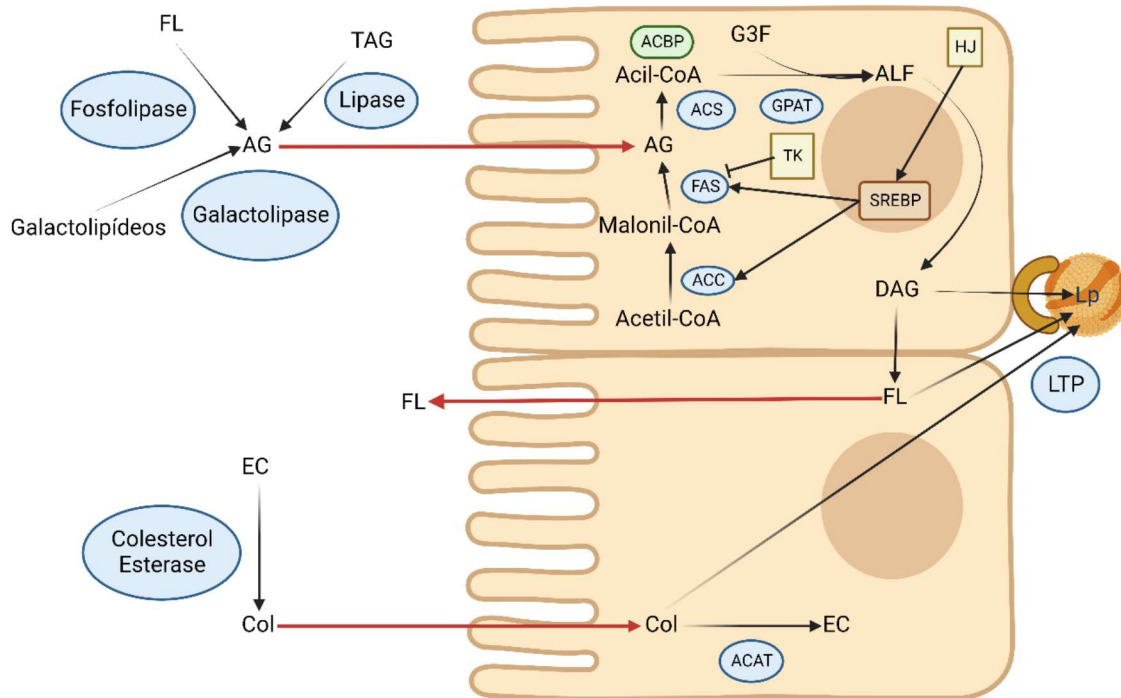


Figura 1: Digestão, absorção e metabolismo intestinal de lipídeos. ACAT: acil-CoA:colesterol aciltransferase; ACBP: proteína ligadora de acil-CoA; ACC: acetil-CoA carboxilase; ACS: acil-CoA sintetase; AG: ácido graxo; ALF: ácido lisofosfatídico; Col: colesterol; DAG: diacilglicerol; EC: éster de colesterol; FAS: ácido graxo sintase; FL: fosfolipídeo; G3F: glicerol-3-fosfato; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferase; HJ: hormônio juvenil; Lp: lipoforina; LTP: partícula transferidora de lipídeos; SREBP: proteína ligadora de elementos responsáveis a esteróis; TAG: triacilglicerol; TK: taquicinina.

Fonte: Arquivo pessoal

A atividade dessas enzimas digestivas pode sofrer modulações em diferentes condições fisiológicas. Em lagartas da mariposa *Hyphantria cunea* destinadas à diapausa (um processo de hibernação voltado para a sobrevivência do inseto em períodos desfavoráveis, como o inverno), a atividade lipásica aumenta e essa maior atividade leva a uma maior eficiência alimentar e quantidade de lipídeos totais nas larvas (Zhao et al., 2021a, 2021b). Na lagarta de outra mariposa, *Spodoptera exigua*, uma fosfolipase A2 secretada é mais expressa no intestino médio durante o estágio 3 das larvas, e a atividade enzimática é mais alta no intestino médio posterior entre os estádios 2 e 4. A inibição da expressão desse gene por RNA de interferência reduz o consumo de comida das lagartas, o seu ganho de peso e a capacidade digestiva.

É importante notar, ainda, que a suplementação da dieta com lisofosfolipídeos reverte esses efeitos. Isso indica que lisofosfolipídeos obtidos da alimentação via a atividade dessa fosfolipase são importantes para o desenvolvimento do inseto. Além disso, a inibição farmacológica da enzima reduz

a quantidade de lipídeos na hemolinfa. Esses resultados corroboram a importância da fosfolipase A₂ na digestão e na absorção de lipídeos (Sajjadian et al., 2019). A microbiota intestinal também parece ter relevante papel na digestão de lipídeos, de acordo com dados genômicos e proteômicos das bactérias presentes no intestino; porém, mais investigações nesse campo são necessárias. Por exemplo, o besouro *Cryptorhynchus lapathi* é capaz de digerir triacilglicerol e fosfolipídeos. Entretanto, o inseto produz apenas triacilglicerol lipases e lipofosfolipases, enquanto as outras enzimas necessárias são fornecidas pela microbiota (Jing, Qi, Wang, 2020).

Os ácidos graxos liberados durante a digestão são absorvidos pelas células do epitélio intestinal, mas são raras as informações sobre o modo como esse processo ocorre nos insetos. Dados obtidos em estudos com a libélula *Aeshna cyanea* mostraram que as células intestinais absorvem, preferencialmente, ácido oleico (18:1), seguido pelo ácido palmítico (16:0) e pelo ácido esteárico (18:0) (Kirkel, Komnick, 1999). No barbeiro *Rhodnius prolixus*, a absorção intestinal de ácidos graxos é maior no primeiro dia após a alimentação com sangue (Bittencourt-Cunha et al., 2013).

Além disso, é interessante observar que os insetos não são capazes de sintetizar esteroides *de novo* (Clark, Block, 1959). Portanto, eles dependem da utilização de esteroides encontrados na dieta para a obtenção dos seus próprios, como colesterol e outros, incluindo os hormônios ecdisteroides. Esses lipídeos devem ser absorvidos pelo intestino e convertidos em outros, de acordo com as necessidades e as dietas de cada espécie. Em larvas da mariposa *Manduca sexta*, náíades de *A. cyanea* e em fêmeas adultas de *R. prolixus* foi acompanhada a incorporação de colesterol da alimentação pelo intestino médio (Entringer, Majerowicz, Gondim, 2021; Jouni, McGill, Wells, 2002; Jouni, Zamora, Wells, 2002; Komnick, Giesa, 1994; Yun, Jouni, Wells, 2002). É importante notar que a estrutura das microvilosidades dos enterócitos é essencial para a absorção dos lipídeos (Dong et al., 2022). Além disso, a microbiota intestinal também é importante. Por exemplo, no mosquito *Aedes aegypti*, a ausência de bactérias causa o acúmulo de gotículas de lipídeos no intestino e uma redução no corpo gorduroso, o que indica um problema do processo de absorção e distribuição dos lipídeos (Valzania et al., 2018).

Após a absorção pelas células do epitélio intestinal, os ácidos graxos são utilizados para a síntese de lipídeos mais complexos. Eles são esterificados e formam, especialmente, fosfolipídeos, diacilgliceróis e triacilgliceróis (Zhao, Karpac, 2020). Esse processo de digestão, absorção, metabolização e transporte de triacilgliceróis da dieta foi estudado em insetos de hábitos alimentares muito

diferentes, como as larvas de *M. sexta* e os hemípteros hematófagos *Panstrongylus megistus* e *R. prolixus* (fêmeas adultas), e resultados muito parecidos foram obtidos (Canavoso, Frede, Rubiolo, 2004; Canavoso, Wells, 2000; Grillo, Majerowicz, Gondim, 2007). Na última década, alguns detalhes adicionais desses processos começaram a ser revelados. Depois de absorvidos, os ácidos graxos devem ser esterificados em acil-CoA para que possam ser usados nos processos metabólicos seguintes. Essa reação é catalisada pelas acil-CoA sintetases (ACS). A expressão dos vários genes que codificam essas enzimas foi descrita no intestino do *R. prolixus* e da mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (Alves-Bezerra et al., 2016b; Reiff et al., 2015). Em *R. prolixus*, a inibição da expressão de um desses genes causa uma redução na taxa de digestão de proteínas; porém, seu efeito sobre o metabolismo de lipídeos no intestino não foi investigado (Alves-Bezerra et al., 2016b). Embora os acil-CoAs tenham um caráter anfipático, eles são pouco solúveis no citoplasma e dependem da proteína ligadora de acil-CoA (ACBP) para se manterem disponíveis às reações metabólicas. Em *R. prolixus*, o gene da RpACBP-1 tem a sua expressão induzida logo após alimentação com sangue (Alves-Bezerra et al., 2010), o que poderia indicar uma função no processo digestivo. De fato, a inibição da expressão desse gene aumenta a quantidade de triacilglicerol no intestino médio posterior, corroborando essa hipótese (Majerowicz et al., 2016).

Ademais, é interessante destacar que um segundo gene para ACBP (*RpACBP-5*), embora seja muito expresso no intestino (Majerowicz et al., 2016), não é induzido. Logo após a alimentação e a inibição da sua expressão, a composição lipídica do intestino não é afetada (Almeida et al., 2020). Os acil-CoA são, então, usados para a síntese de glicerolipídeos. Em *R. prolixus*, essa síntese ocorre, exclusivamente, pela via do glicerol-3-fosfato e a atividade de uma monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) não pode ser detectada. De fato, análises de bioinformática foram capazes de encontrar genes codificantes de todas as enzimas da via do glicerol-3-fosfato, mas não de MGAT (Alves-Bezerra, Gondim, 2012). A primeira etapa limitante da via do glicerol-3-fosfato é a transferência de um acil-CoA para o glicerol-3-fosfato, gerando uma molécula de ácido lisofosfatídico, a qual é catalisada pela glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT). Em *R. prolixus*, duas diferentes GPATs são expressas no intestino médio e a inibição da expressão de *RpGPAT-1* causa uma redução na quantidade de triacilglicerol e de ácido fosfatídico no órgão, corroborando a importância da via do glicerol-3-fosfato na síntese de glicerolipídeos (Alves-Bezerra et al., 2017). Detalhes sobre outras enzimas da via ainda precisam ser investigados. Por fim, é relevante frisar que, dependendo do inseto estudado, os lipídeos produzidos no

intestino podem ter destinos diferentes. Por exemplo, em *R. prolixus*, o diacilglicerol e os fosfolipídeos são exportados para a hemolinfa, como em outros insetos, mas os fosfolipídeos também são usados para a síntese das membranas perimicrovilares no lúmen do intestino (Bittencourt-Cunha et al., 2013) (Figura 1).

O colesterol também é metabolizado nas células intestinais, sendo, em parte, transformado em éster de colesterol em uma reação catalisada pelo colesterol aciltransferase (ACAT). Sua esterificação ocorre no intestino médio de *R. prolixus* (Entringer; Majerowicz; Gondim, 2021); porém, mais detalhes sobre a atividade ou regulação dessa enzima não são conhecidos (Figura 1).

Além de absorver lipídeos provenientes da alimentação, as células intestinais parecem ser capazes de sintetizar ácidos graxos *de novo*. Em *D. melanogaster*, fêmeas acasaladas apresentam um aumento da atividade da proteína ligadora de elementos responsivos a esteróis (SREBP), um fator de transcrição regulador central da lipogênese, e, conseqüentemente, da maior expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, como o ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (ACC). Esses efeitos causam um aumento da quantidade de lipídeos no intestino (Reiff et al., 2015) (Figura 1). A atividade da FAS parece ser importante para esse processo em células intestinais de *Ae. aegypti* em cultura. Isso porque a inibição farmacológica dessa enzima reduz a quantidade de triacilglicerol induzida pela presença de bactérias (Barletta et al., 2016).

A dessaturação dos ácidos graxos também é uma etapa importante na lipogênese, dado que a inibição da expressão de uma estearoil-CoA desaturase (SCD-1) reduz a quantidade de gotículas de lipídeos no intestino do mosquito *Anopheles coluzzii* (Ferdous et al., 2021). Esses resultados mostram que a síntese de ácidos graxos no intestino, e não só no corpo gorduroso, pode ter importância na fisiologia dos insetos.

Depois de absorvidos e metabolizados, os lipídeos precisam ser transferidos para a lipoforina (Lp), a principal lipoproteína presente na hemolinfa dos insetos e responsável pelo transporte hemolinfático de lipídeos (Figura 1), como vamos discutir na próxima sessão. Porém, pouco se sabe sobre esse processo. O caminho dos lipídeos a serem exportados parece seguir pelo Complexo de Golgi: moscas *D. melanogaster* nocautes para uma proteína de remontagem-empilhamento do Golgi (GRASP) acumulam lipídeos no intestino médio posterior, indicando uma falha na sua exportação (Kim et al., 2020).

Recentemente, novas informações têm mostrado que o metabolismo de lipídeos no intestino também é controlado pelo sistema endócrino. Por exemplo, o peptídeo taquicinina é produzido pelas células enteroendócrinas no intestino e

tem efeitos parácrinos sobre os enterócitos, reduzindo a quantidade de lipídeos nessas células (Wang et al., 2021). Esse efeito ocorre por inibição da síntese de ácidos graxos. A redução da expressão de taquicinina aumenta a quantidade de lipídeos no intestino através do aumento da lipogênese, mediada pelo aumento da expressão da FAS (Song, Veenstra, Perrimon, 2014). Além disso, o hormônio juvenil (HJ) também aumenta a quantidade de lipídeos no intestino, ativando a SREBP (Reiff et al., 2015) (Figura 1).

Por último, diferentes vias de sinalização estão envolvidas na regulação do metabolismo de lipídeos no intestino. Em *Ae. aegypti*, a ativação das vias imunes IMD e Toll aumenta a quantidade de gotículas de lipídeos no intestino. Esse resultado explica porque a infecção de mosquitos com bactérias ou vírus induz um acúmulo de lipídeos no órgão, e porque o aumento da quantidade de lipídeos após a alimentação com sangue depende da presença de microbiota (Barletta et al., 2016). Em *D. melanogaster*, moscas mutantes para a MAPK p38c acumulam lipídeos no intestino (Chakrabarti, Poidevin, Lemaitre, 2014). Por outro lado, a ativação da AKT leva à ativação de lipases intestinais, que reduzem a quantidade de lipídeos no órgão (Nirala et al., 2013).

Transporte hemolinfático de lipídeos

Nos insetos, os lipídeos são transportados entre os diferentes órgãos associados à principal lipoproteína hemolinfática, a Lp (Chino et al., 1981). Diferentemente dos mamíferos, em que o transporte de lipídeos é feito por diversas lipoproteínas, nos insetos a Lp desempenha sozinha esse papel, carreando as diversas classes entre os vários órgãos (Chino, Takahashi, 1985; Soulages, Wells, 1994a). Essa lipoproteína atua como uma aceptora de lipídeos, recebendo-os dos tecidos, e também como doadora, isto é, fornecendo lipídeos a eles. Ela é composta por duas apolipoproteínas, denominadas apolipoforinas I e II (ApoLp-I e II), com massas moleculares em torno de 240 e 80 kDa, respectivamente, e que são sempre encontradas na razão molar de 1:1 (Ryan, Van Der Horst, 2000; Soulages, Wells, 1994b). Uma terceira apolipoproteína, ApoLp-III (18 - 20 kDa) pode estar presente ou não, em número variável, de acordo com a espécie e com a situação fisiológica do inseto, como o voo, por exemplo (Gondim et al., 1989; Ryan, Van der Horst, 2000; Soulages, Wells, 1994b). No grilo *Gryllus bimaculatus*, a inibição da expressão da ApoLp-III não altera os níveis de lipídeos da hemolinfa, mas reduz a capacidade de mobilização de lipídeos estimulada pelo hormônio adipocinético (AKH) (Konuma et al., 2016). Além disso, em *Ae. aegypti*, a redução dos níveis de ApoLp-III diminui a quantidade de lipídeos acumulados nos ovários (Telang et al., 2013).

A Lp é produzida pelo corpo gorduroso a partir de um único gene traduzido em uma proteína que é clivada, gerando as ApoLp-I e ApoLp-II (Palm et al., 2012; Van der Horst; Roosendaal; Rodenburg, 2009). A Lp é secretada pelo órgão como uma lipoproteína rica em fosfolipídeos. Entretanto, o processo de sua montagem e secreção depende da ação da proteína transferidora de triglicerídeos microsomal (MTP) (Palm et al., 2012). Detalhes sobre esse processo ainda são pouco conhecidos (Figura 2). Por exemplo, em *D. melanogaster*, a superexpressão de β -espectrina impede a secreção de Lp (Diaconeasa et al., 2013). Em *Ae. aegypti*, o microRNA-8 é importante nesse processo (Lucas et al., 2015). Porém, as funções dessas moléculas não são claras. É interessante notar que, embora expressa no corpo gorduroso, a presença de Lp na saliva de diversos hemípteros já foi observada (Huang et al., 2018; Nicholson, Hartson, Puterka, 2012; Nicholson, Puterka, 2014). Por fim, ainda há pontos a serem estudados sobre estas questões, tais como se a Lp é produzida pela glândula salivar ou transportada da hemolinfa para a saliva, bem como o seu papel na saliva.

A expressão da Lp pode ser regulada de acordo com a situação fisiológica do inseto ou por interferências ambientais. No barbeiro *Dipetalogaster maxima*, tanto a quantidade de RNAm quanto de proteína é aumentada pela alimentação com sangue (Ramos et al., 2021). Por outro lado, a expressão de ApoLp-I e ApoLp-III não é afetada pela dieta na abelha *Apis mellifera* (Lourenço et al., 2012). Em *M. sexta*, a quantidade de Lp aumenta durante o desenvolvimento da larva de 5º estágio, quando a atividade alimentar é alta (Gondim et al., 2013). Na cigarrinha *Nilaparvata lugens*, a inibição da expressão da ácido graxo dessaturase, enzima importante para o processo de lipogênese, reduz a expressão da Lp. Porém, ainda não está claro se esse é um efeito direto ou indireto, causado por uma mudança no perfil de saturação de ácidos graxo ou na quantidade de lipídeos (Ye et al., 2020). A expressão de Lp também é regulada endocrinamente, e o tratamento com HJ aumenta a expressão da proteína em *D. maxima* (Ramos et al., 2021). Além disso, a quantidade de Lp pode ser alterada por agentes externos. Por exemplo, o tratamento com o inseticida buprofezina reduz a expressão de Lp na cigarrinha *Laodelphax striatellus* (Fang et al., 2020). Em *A. mellifera*, a infecção com bactérias reduz levemente a quantidade de ApoLp-I (Lourenço et al., 2012).

A Lp apresenta, em sua composição, diversas classes de lipídeos, tanto fosfolipídeos como lipídeos neutros. Os fosfolipídeos, normalmente, representam algo em torno de 15 a 25 % dos lipídeos totais da partícula, mas exemplos de Lps com percentuais maiores ou menores dessas moléculas também são encontrados. Entre os lipídeos neutros, em grande parte dos casos os diacilgliceróis são os mais abundantes, com proporções que costumam variar

entre 12 e 22 % dos lipídeos totais da lipoproteína. Entretanto, os hidrocarbonetos também podem ser muito abundantes (Atella et al., 2006; De Bianchi, Capurro, 1991; Fan et al., 2004; Majerowicz et al., 2013; Palm et al., 2012; Robbs et al., 1985; Sevala et al., 1999; Ximenes et al., 2015; Ziegler et al., 1999). Em alguns dípteros, como o *Ae. aegypti*, os triacilgliceróis são os principais lipídeos neutros (Ford, Van Heusden, 1994; Pennington, Wells, 2002). O colesterol (livre ou esterificado a ácidos graxos) e os ácidos graxos também são encontrados, geralmente, em menores quantidades (Blacklock, Ryan, 1994; Chino, Takahashi, 1985; Majerowicz et al., 2013; Matsuo et al., 2019; Palm et al., 2012; Soulages, Wells, 1994a; Ximenes et al., 2015).

É interessante observar que as diversas classes de lipídeos não apenas fazem parte da estrutura da Lp, mas são, efetivamente, transportados entre os vários órgãos. Já foi demonstrado o transporte, por essa lipoproteína, de: i) diacilgliceróis (Chino, Murakami, Harashima, 1969; Oliveira et al., 2006; Van Der Horst et al., 1981), que é o sistema melhor conhecido; ii) fosfolipídeos (Atella, Gondim, Masuda, 1992, 1995; Oliveira et al., 2006); iii) hidrocarbonetos (Fan et al., 2004; Schal et al., 2001; Young et al., 1999); iv) colesterol (Chino, Gilbert, 1971; Entringer, Majerowicz, Gondim, 2021; Jouni, Zamora, Wells, 2002) e; v) ácidos graxos (Atella et al., 2000; Soulages, Wells, 1994a). Esse transporte acontece entre a Lp circulante e os sítios de síntese, de utilização e de armazenamento desses lipídeos. Moléculas hidrofóbicas, como precursores de feromônios, também podem ser transportados pela Lp (Matsuoka et al., 2006). Além disso, a Lp pode servir de transporte para outras proteínas. Em *D. máxima*, a Lp interage com a catepsina D, carreando essa proteína para os ovários (Leyria et al., 2018). Em *D. melanogaster*, a Lp funciona como carreadora de Hedgehog (Palm et al., 2013).

De acordo com a quantidade de lipídeos associados à Lp, ela pode apresentar variações na sua densidade. Baseando-se nessas variações, algumas classes foram, então, definidas (Beenackers, Chino, Law, 1988): a) HDLp (lipoforina de alta densidade), de 1,09 a 1,18 g/ml; b) VHDLp (lipoforina de muito alta densidade), de 1,24 a 1,27 g/ml; e c) LDLp (lipoforina de baixa densidade), de 1,02 a 1,07 g/ml. Em um mesmo inseto, a densidade da Lp circulante pode variar, de acordo com a situação metabólica. Por exemplo, uma grande proporção de LDLp é formada na hemolinfa de alguns insetos que fazem voos prolongados (Van der Horst; Rodenburg, 2010a), o que será discutido mais adiante neste capítulo. O momento fisiológico também pode influenciar a densidade da Lp. Em larvas de *M. sexta*, um jejum de 24 horas reduz a densidade e a quantidade de lipídeos na Lp. É interessante notar que essa redução de densidade não depende de um fator

derivado da cabeça da larva no início do 5º estágio, visto que, mesmo lagartas com a cabeça ligada apresentam esse efeito (Gondim et al., 2013).

Uma característica marcante do sistema de transporte de lipídeos nos insetos é o fato de, geralmente, a Lp atuar como uma transportadora reutilizável de lipídeos (Figura 2). Ou seja, a Lp fornece os lipídeos ao órgão receptor, sem que a parte proteica da lipoproteína seja acumulada e degradada, podendo ser reabastecida e reutilizada. A primeira indicação, nesse sentido, foi obtida no gafanhoto *Locusta migratoria*, quando Downer e Chino mostraram que a meia-vida do diacilglicerol da partícula da Lp hemolinfática era bem menor que a das suas apoproteínas (Downer, Chino, 1985). Esses resultados foram, então, confirmados com a demonstração de que, nesse mesmo gafanhoto, a Lp entrega os lipídeos aos músculos de voo, podendo ser reabastecida (Van Heusden et al., 1987), sendo a lipoproteína encontrada apenas associada à superfície da célula muscular (Van Antwerpen et al., 1988). Também em *R. prolixus* foi demonstrado, inicialmente por análise por eletroforese em gel de poliacrilamida do conteúdo dos ovócitos, e depois por imunocitoquímica, que a partícula de Lp é encontrada apenas na superfície dos ovócitos, e não no seu interior (Gondim; Oliveira; Masuda, 1989; Machado et al., 1996).

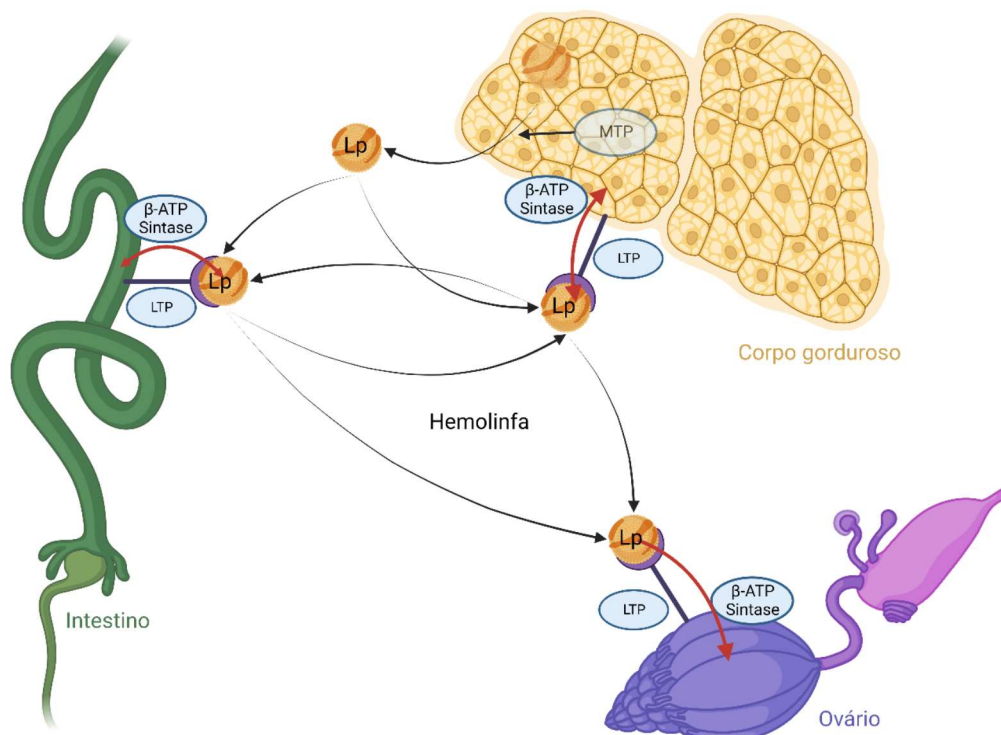


Figura 2: Transporte hemolinfático de lipídeos. As setas pretas indicam as rotas da lipoforina. As setas vermelhas indicam as direções de transferência de lipídeos. Lp: lipoforina; LTP: proteína transferidora de lipídeos; MTP: proteína transferidora de triglicerídeos microssomal.

Fonte: Arquivo pessoal

Para *D. melanogaster*, os resultados também indicaram que a absorção de lipídeos neutros pelos ovócitos ocorre por um mecanismo independente de endocitose (Parra-Peralbo, Culi, 2011). *In vitro*, a Lp de *D. melanogaster* transfere diacilglicerol para membranas bifosfolipídicas artificiais (Matsuo et al., 2019). No entanto, alguns resultados diferentes têm sido também encontrados. Na própria mosca-das-frutas, a Lp sofre endocitose dependente do receptor de lipoforina (LpR), em células em cultura (Matsuo et al., 2019). Em *L. migratoria*, por sua vez, foi observada a incorporação da Lp circulante na hemolinfa pelo corpo gorduroso de adultos jovens, via endocitose mediada por receptor (Dantuma et al., 1997). E, posteriormente, utilizando LpR expresso em células de mamíferos em cultura, pode-se acompanhar a endocitose e reciclagem, tanto da Lp como do seu receptor, de modo semelhante ao que ocorre nessas células com a proteína transferrina (Van Hoof, Rodenburg, Van Der Horst, 2002). Entretanto, ainda não é possível afirmar, com certeza, se, após endocitose, a Lp é também reciclada no corpo gorduroso desses insetos, voltando para a hemolinfa (Van Hoof, Rodenburg, Van der Horst, 2005). Nesse sentido, em células de insetos em cultura expressando o receptor de transferrina de mamífero, nem mesmo essa proteína foi reciclada após sua endocitose, como acontece nos mamíferos (Van Hoof, Rodenburg, Van der Horst, 2005).

Nas mariposas *Hyalophora cecropia* e *M. sexta*, a lipoforina é encontrada em quantidades significativas no interior dos ovócitos. Isso indica que, nos lepidópteros, essa lipoproteína pode ser incorporada pelos ovócitos em crescimento, formando parte do vitelo, e não apenas transferindo lipídeos (Kawooya, Osir, Law, 1988; Telfer, Pan, 1988). No caso de *M. sexta*, demonstrou-se que os dois processos acontecem (Kawooya, Osir, Law, 1988; Kawooya, Law, 1988), o que também ocorre em *P. megistus* (Fruttero et al., 2011). Em *Ae. aegypti*, a Lp também é encontrada no interior dos ovócitos. Entretanto, a quantidade de Lp detectada não é suficiente para explicar todo o lipídeo presente nessas células, o que indica que outro mecanismo deve também estar presente, o qual permite que ela transfira lipídeos sem a incorporação de toda a partícula, como acontece em outras espécies e/ou órgãos (Jouni, Zamora, Wells, 2002; Sun et al., 2000; Ziegler, VanAntwerpen, 2006).

Os processos de transferência de lipídeos da Lp para os órgãos e vice-versa depende da atividade de receptores de membrana específicos, o LpR (Figura 2). O LpR faz parte da família de receptores de lipoproteína de baixa densidade, como o receptor de vitelogenina e o próprio receptor de LDL de mamíferos (Tufail, Takeda, 2009). O LpR estabiliza a partícula de Lp no meio extracelular (Rodríguez-Vázquez et al., 2015) e os diversos resultados obtidos na

última década mostraram que ele é essencial para a fisiologia lipídica dos insetos. No pulgão *Acyrtosiphon pisum*, a inibição da expressão de LpR reduz a quantidade de hidrocarbonetos da cutícula e do corpo, além de reduzir a longevidade e a taxa reprodutiva dos adultos (Qiao et al., 2021). Resultados similares foram obtidos em *N. lugens*: a inibição da expressão de LpR também reduz a fertilidade dos insetos, bloqueando o desenvolvimento dos ovócitos. Parte desse efeito pode ser explicado pela diminuição da expressão da quantidade de vitelogenina. Além disso, a falta de LpR reduz o peso das cigarrinhas e a quantidade de triacilglicerol total no corpo gorduroso e ovários (Lu et al., 2018a). Já em *D. melanogaster*, a deleção de LpR altera a composição de fosfolipídeos no sistema nervoso central e em células em cultura (Matsuo et al., 2019). Assim, a inibição da expressão desse gene no corpo gorduroso aumenta a quantidade de lipídeos na hemolinfa (Huang et al., 2020).

Porém, o LpR não parece ser o único sítio de ligação da Lp na membrana celular (Figura 2). Em *P. megistus*, a subunidade β da ATP sintase é ectopicamente expressa na membrana citoplasmática de células do intestino, do ovário e do corpo gorduroso, e interage com a Lp. O tratamento dos insetos com o anticorpo contra β -ATP sintase reduz a interação da Lp com a membrana das células, assim como a transferência de lipídeos da Lp para os órgãos e do intestino para a Lp (Fruttero et al., 2014, 2017, 2019). É interessante notar que, pelo menos no caso do ovário, a transferência de ácidos graxos, mediada pela β -ATP sintase, independe de endocitose (Fruttero et al., 2017).

Uma segunda lipoproteína, chamada partícula transferidora de lipídeos (LTP), foi descrita em vários insetos e está envolvida no transporte de lipídeos entre Lp de diferentes densidades e entre a Lp e os órgãos (Golodne et al., 2001; Hirayama, Chino, 1990; Ryan, Wells, Law, 1986; Takeuchi, Chino, 1993) (Figura 2). Assim como a Lp, a LTP é composta por três apolipoproteínas (ApoLTP-I, II e III). Em *B. mori*, as ApoLTP-I e II são expressas por um único gene, cujo produto de tradução é clivado para gerar as duas proteínas (Yokoyama et al., 2013). Assim, a expressão da LTP pode ser regulada. Por exemplo, larvas de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta rica em gordura apresentam maior quantidade de LTP na hemolinfa (Huang et al., 2020). Porém, os efeitos fisiológicos desse fenômeno não são claros.

A LTP parece participar da transferência de diacilgliceróis entre o corpo gorduroso e o intestino, e a Lp (Canavoso et al., 2004; Canavoso, Wells, 2001; Van Heusden, Law, 1989), como também do acúmulo de diacilgliceróis nos ovócitos em crescimento (Jouni et al., 2003; Liu, Ryan, 1991). De fato, a inibição da expressão da LTP reduz o acúmulo de lipídeos nos ovários de *D. melanogaster*

(Rodríguez-Vázquez et al., 2015). Porém, os mecanismos desse processo ainda não foram elucidados. Sabe-se que a LTP é necessária para a estabilização da partícula de Lp pelo LpR (Rodríguez-Vázquez et al., 2015), e que a LTP interage com o LpR, sendo transportada para o cérebro (Brankatschk et al., 2014).

Corpo gorduroso: local de armazenamento e mobilização de lipídeos

Formação, armazenagem de triacilglicerol e alvo de ação hormonal

Nos insetos, o corpo gorduroso é um órgão central para o metabolismo. Ele equivale ao fígado e ao tecido adiposo dos mamíferos. Além de sintetizar diversas proteínas, atua também como local de armazenamento de carboidratos, proteínas e lipídeos (Arrese, Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). Essas reservas contribuem para processos importantes, tais como a ovogênese, o voo, a diapausa e a metamorfose ou até mesmo o jejum (Arrese, Soulages, 2010; Fernando-Warnakulasuriya, Tsuchida, Wells, 1988; Van Der Horst, Rodenburg, 2010b, Ziegler, Ibrahim, 2001). Para atender inúmeras demandas metabólicas, ele é um tecido alvo de ação de hormônios, no sentido de promover processos de síntese e de mobilização dessas reservas (Arrese, Soulages, 2010).

Os lipídeos podem ser captados diretamente da dieta ou sintetizados de novo, a partir de outros substratos. O principal lipídeo estocado no corpo gorduroso é o triacilglicerol, podendo ser hidrolisado de forma rápida e eficiente em grandes quantidades, na forma de diacilglicerol, lipídeo neutro transportado na hemolinfa, que será captado e transportado entre os diferentes tecidos através da Lp (Arrese, Soulages, 2010; Gondim et al., 2018). Em diferentes organismos, a síntese de triacilglicerol se dá através de um conjunto de aciltransferases, como descrito anteriormente. A MGAT catalisa a síntese de diacilglicerol a partir de monoacilglicerol. Já a DGAT catalisa a formação de triacilglicerol a partir de diacilglicerol. Além da via do monoacilglicerol, esse processo também pode ocorrer através do glicerol-3-fosfato. A via do glicerol-3-fosfato foi caracterizada no corpo gorduroso de *R. prolixus*. Ela se dá através da acilação do glicerol-3-fosfato, formando ácido lisofosfatídico, em uma reação catalisada pela GPAT que, nesse inseto, se apresenta em duas isoformas, dentre elas uma mitocondrial (Alves-Bezerra et al., 2017). Nesse inseto, a deficiência da RhoprGpat1 resultou em uma diminuição dos estoques de triacilglicerol e em um aumento da oxidação de ácidos graxos no corpo gorduroso, alterando a expressão dos genes da acil-CoA sintetase de cadeia longa 1 (ACSL1), da ACBP e da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1) (Alves-Bezerra et al., 2017).

Os estoques de triacilglicerol contribuem em inúmeros aspectos para a biologia e fisiologia de diferentes espécies de insetos. Nos insetos hematófagos, após a ingestão de uma grande quantidade de sangue, rico em proteína, a digestão e absorção dos aminoácidos irá ocorrer de forma rápida, podendo atender à construção das reservas lipídicas (Gondim et al., 2018). O estabelecimento dessas reservas nos insetos hematófagos em um curto período após a alimentação é importante devido ao período prolongado até o próximo repasto. Em *R. prolixus*, após a alimentação do inseto adulto com sangue, pode-se observar um acúmulo de lipídeos no corpo gorduroso. Vários dias depois, quando o intestino já se encontra quase vazio e a digestão próxima do fim, essas reservas começam a ser utilizadas e a quantidade de lipídeos diminui, gradativamente (Pontes et al., 2008). Parte dos lipídeos armazenados no corpo gorduroso das fêmeas adultas de *R. prolixus* são transferidos à Lp circulante e direcionados aos ovários em crescimento (Atella, Gondim, Masuda, 1992; Coelho et al., 1997).

No inseto *P. megistus*, se observa o mesmo padrão, reforçando essa característica de formação e mobilização de reservas nos triatomíneos hematófagos, a cada alimentação (Canavoso, Frede, Rubiolo, 2004). Em dípteros do gênero *Aedes* e em *Anopheles stephensis*, que são mosquitos anautógenos, a alimentação com carboidratos contribui para a formação das reservas de triacilglicerol no corpo gorduroso de insetos adultos pós-emergidos (Gondim et al., 2018; Renshaw, Silver, Service, 1995; Sawabe, Moribayashi, 2000; Ziegler, Ibrahim, 2001). Em *Ochlerotatus atropalpus*, um mosquito autógeno, a dieta larval também exerce um papel importante para o sucesso reprodutivo, pois pode levar a um estoque de triacilglicerol três vezes maior em adultos originários de uma dieta larval rica em nutrientes, quando comparada à dieta pobre (Telang, Wells, 2004).

Na mariposa *M. sexta*, durante o crescimento da lagarta, o corpo gorduroso estoca enormes quantidades de lipídeos, que serão utilizados, depois, pelo inseto adulto (Fernando-Warnakulasuriya, Tsuchida, Wells, 1988; Ziegler, 1991), como substrato para o voo e durante a ovogênese. Em *G. bimaculatus*, o último estágio de ninfa acumula grande quantidade de lipídeos até o quinto dia após a eclosão, quando as reservas começam a diminuir, progressivamente (Anand, Lorenz, 2008). Já outra espécie da mesma ordem (*Troglophilus neglectus*) acumula lipídeos no corpo gorduroso, como reserva energética para o período de hibernação (Lipovšek et al., 2011).

Os ácidos graxos e esteróis liberados ou utilizados na síntese de triacilglicerol ou de éster de colesterol precisam estar associados a proteínas no

meio intracelular. A proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) liga-se a ácidos graxos, e a ACBP junta ácidos graxos associados à coenzima A (CoA) (Esteves, Ehrlich, 2006; Glatz, 2015; Neess et al., 2015). Os esteroides se ligam às proteínas carreadoras de esteroides (SCP) (Schroeder et al., 2007). No mosquito *Culex pipiens*, a FABP está envolvida com o acúmulo de lipídeos na diapausa (Sim; Denlinger, 2009). No corpo gorduroso de *R. prolixus*, a expressão da RpACBP-1 foi induzida pela injeção do hormônio adipocinético (AKH), hormônio lipolítico que será discutido em mais detalhes a seguir, o que sugere a sua participação na mobilização de triacilglicerol (Alves-Bezerra et al., 2016a). Além disso, a inibição da expressão da RpACBP-1 causou um aumento da incorporação de ácidos graxos em éster de colesterol (Majerowicz et al., 2016). Por outro lado, a inibição da expressão de RpGPAT1 causou a repressão do gene da RpACBP-1 (Alves-Bezerra et al., 2016b).

Em mamíferos, têm sido descritas proteínas associadas às gotículas de lipídeos, envolvidas nos processos de formação e utilização dessas reservas, as perilipinas (Kimmel et al., 2010). Nos insetos, proteínas semelhantes estão envolvidas com o controle do acúmulo e utilização de lipídeos. Em *D. melanogaster*, foram identificadas proteínas relacionadas àquelas dos mamíferos, que foram encontradas associadas às gotículas de lipídeos e, assim, denominadas LSD (*lipid storage droplets*) (Beller et al., 2008; Grönke et al., 2003; Miura et al., 2002). Moscas mutantes para o gene LSD-2 têm dificuldade para estocar lipídeos no corpo gorduroso, mesmo quando alimentadas com dieta rica em gordura, indicando que as LSD têm papel na formação das gotículas de lipídeos (Beller et al., 2006; Fauny, Silber, Zider, 2005; Grönke et al., 2003). Por outro lado, moscas que não expressam o gene PLIN1 (ortólogo à perilipina dos mamíferos) são hiperfágicas e obesas, indicando que essa proteína tem papel na regulação da utilização dos estoques de gordura (Beller et al., 2010). Na mariposa *M. sexta*, a fosforilação da LSD-1, presente nas gotículas, regula a atividade da lipase e a mobilização dos lipídeos estocados (Arrese et al., 2008; Patel et al., 2005).

Como destacado anteriormente, o triacilglicerol é a principal reserva energética do corpo gorduroso e se organiza em gotículas de lipídeos, que aumentam e diminuem em função do estado nutricional do inseto ou da sua fisiologia (Arrese, Soulages, 2010; Fruttero et al., 2019; Grönke et al., 2005). Para que ocorra a mobilização ou a síntese dessas reservas, são necessários sinais hormonais que regulam esses processos. De forma coordenada e integrada, através de múltiplos sinais hormonais e de sinais do estado nutricional do animal, o corpo gorduroso exerce papel central na fisiologia e na homeostase energética.

Os principais hormônios envolvidos na regulação desses eventos são: o AKH, HJ, 20-hidroxiecdisona (20-HE) e peptídeos similares à insulina (ILP) (Gáliková, Klepsatel, 2022).

A 20-HE e o HJ regulam, de maneira coordenada, os eventos de metamorfose e de reprodução nos insetos, através da ligação e da sinalização através dos seus receptores, Receptor de Ecdisona (EcR) ou Metopreno Tolerante (Met), respectivamente (Jindra, Palli, Riddiford, 2013; Schwedes, Carney, 2012). Os ILP são hormônios análogos à insulina, amplamente distribuídos nos insetos, codificados por um ou vários genes. Esse hormônio se mostra sensível ao estado nutricional e controla eventos metabólicos e o crescimento (Marchal et al., 2010, Nagasawa et al., 1984; Nässel, Broeck, Vanden Broeck, 2016). O AKH, sintetizado na corpora cardíaca, tem sido descrito atuando no corpo gorduroso, regulando o metabolismo energético, durante processos de jejum ou na reprodução, mobilizando suas reservas lipídicas (Arrese, Soulages, 2010). Para uma melhor compreensão dos eventos relacionados ao metabolismo de lipídeos no corpo gorduroso, a partir de agora trataremos, separadamente, os eventos de síntese (lipogênese) e mobilização (lipólise) nesse tecido, destacando as enzimas/proteínas chaves e a regulação associada aos sinais hormonais.

Lipólise e oxidação de lipídeos no corpo gorduroso

As primeiras etapas na mobilização de lipídeos ocorrem através das enzimas lipases, processo já bem caracterizado em mamíferos (Zechner et al., 2012). As seguintes lipases vão atuar sequencialmente, liberando um ácido graxo a cada etapa: triacilglicerol lipase do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL) e monoacilglicerol lipase (MGL) (Bolsoni-Lopes, Alonso-Vale, 2015). Os ácidos graxos poderão ser oxidados na mitocôndria para geração de ATP e também usados para a síntese de outros lipídeos, e diacilglicerol poderá ser formado e transferido para a Lp circulante (Chino, Takahashi, 1985; Soulages, Wells, 1994b). Nos insetos, o ortólogo da ATGL foi primeiramente identificado em *D. melanogaster*, e denominado lipase Brummer (Bmm). Nesse inseto, a sua superexpressão é responsável pela depleção das reservas de triacilglicerol, enquanto a sua perda de função leva a um fenótipo obeso (Beller et al., 2008; Grönke et al., 2005).

Outra lipase foi também identificada em *M. sexta*, a triacilglicerol lipase (TGL) (Arrese, Wells, 1994). Essa enzima já foi purificada do corpo gorduroso desse inseto e a sua sequência codificante foi identificada (Arrese, Soulages, 2010; Arrese, Wells, 1994). Além disso, foi demonstrado que pode sofrer

fosforilação por uma proteína quinase A (Arrese, Wells, 1994). No entanto, essa fosforilação não resultou em aumento na atividade enzimática (Patel et al., 2004), o que indicou que os insetos podem ter um mecanismo de regulação da atividade da TGL do corpo gorduroso, semelhante ao da HSL de mamíferos (Brasaemle et al., 2000). Nesse caso, a fosforilação da enzima resulta na sua translocação para as gotículas de lipídeos, o que, junto com alterações em outras proteínas associadas, leva a um aumento da lipólise no tecido (Su et al., 2003). De fato, a mobilização das reservas estocadas no corpo gorduroso de *M. sexta* depende da ativação das gotículas de lipídeos (Patel et al., 2005; Patel, Soulages, Arrese, 2006).

Em modelos vertebrados e em cultura de células tem sido observado que a lipólise é controlada por hormônios, no sentido de garantir o suprimento energético em função das condições nutricionais ou fisiológicas (Cerk, Wechselberger, Oberer, 2017; Lord, Brown, 2012). Os hormônios esteroides, em particular os glicocorticoides (esteroide biológico derivado do colesterol e de caráter apolar), desempenham uma função importante no controle do metabolismo de lipídeos (Peckett, Wright, Riddell, 2011). Nos insetos, a 20-HE, com características químicas similares aos glicocorticoides, é um regulador importante do desenvolvimento e do metabolismo (Tennessee, Thummel, 2011) e exerce um papel central na etapa inicial do processo lipolítico, através da ativação de lipases. O tratamento de *B. mori* com 20-HE reduziu o consumo de alimento e aumentou a atividade lipolítica no corpo gorduroso e a expressão da lipase Bmm, levando a um aumento da concentração de lipídeos na hemolinfa (Wang et al., 2010). Em mosquitos, a etapa de alimentação sanguínea é acompanhada do aumento de 20-HE e, como resultado, ocorre um rápido desenvolvimento dos ovos, e um aumento da expressão de genes relacionados a β -oxidação é observado, em especial da enoil-CoA hidratase e da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (Wang et al., 2017). Em fêmeas adultas de *A. aegypti*, quando a expressão de EcR foi inibida, através da RNAi, foi observada uma diminuição no catabolismo de triacilglicerol e na oxidação de ácidos graxos, com consequente aumento de gotículas de lipídios no corpo gorduroso (Wang et al., 2017). No corpo gorduroso de *Drosophila* foi mostrado que o nocaute do EcR em larvas de terceiro estágio promoveu um acúmulo de lipídeos, confirmando a sua contribuição como um mediador importante na mobilização dessas reservas (Kamoshida et al., 2012).

Outro hormônio muito bem estudado nos insetos, e que se destaca pelos seus efeitos lipolíticos, é o AKH. Ele atua modulando as atividades de lipases sobre os estoques de triacilglicerol, durante situações de alta demanda energética

(Gäde, Auerswald, 2003; Gálíková, Klepsatel, 2022). Esse processo se dá através da ligação do AKH ao seu receptor (AKHR), acoplado à proteína G, e já caracterizado no corpo gorduroso de diferentes espécies (Alves-Bezerra et al., 2016a; Attardo et al., 2012; Hou et al., 2017; Kaufmann et al., 2009; Kaufmann; Brown, 2006). Em função do estágio de desenvolvimento, insetos que receberam injeções de AKH apresentaram um aumento na mobilização de lipídeos (Gäde, Beenackers, 1977; Gołębiowski et al., 2014; Slocinska et al., 2013). Além disso, a superexpressão do AKH promove a depleção do conteúdo de lipídeos em larvas e adultos de *D. melanogaster*, enquanto a inibição da sua expressão produz um fenótipo obeso em adultos (Gálíková et al., 2015, 2017). Em *B. mori*, mutantes com perda de função de BmAKHR1 mostraram uma redução nos níveis de lipídeos na hemolinfa, além de se mostrarem mais sensíveis à condição de jejum (Sehadova et al., 2020). Em *N. lugens*, a inibição da expressão do AKHR diminuiu os níveis de 1,2-diacilglicerol na hemolinfa, e aumentou os níveis de triacilglicerol no corpo gorduroso (Lu et al., 2018b).

Em *R. prolixus*, a alimentação sanguínea controla o padrão de expressão do AKHR. Um pico de expressão do AKRH ocorre no 16º dia após a alimentação, o que coincide com a diminuição dos níveis de triacilglicerol no corpo gorduroso, e a inibição da sua expressão resulta em um aumento de triacilglicerol (Alves-Bezerra et al., 2016a; Pontes et al., 2008). Já as fêmeas da mosca tsé-tsé *Glossina morsitans*, que realizam reprodução do tipo vivípara, quando submetidas ao jejum e à inibição da expressão de Bmm e AKHR, apresentaram um aumento nos níveis de triacilglicerol, resultando na morte dos insetos. A inibição de expressão de ambos os genes também resultou na redução de 80% do número de larvas formadas, o que deve estar diretamente ligado à lipólise e à obtenção dos constituintes dos lipídeos no leite que irá alimentar as larvas durante a reprodução (Attardo et al., 2012).

Uma vez que as reservas de triacilglicerol são mobilizadas, os ácidos graxos podem ser encaminhados à mitocôndria para obtenção de energia pela via de β -oxidação, muito pouco estudada nos insetos. Em *D. melanogaster*, mutantes para as subunidades da proteína trifuncional mitocondrial, componente dessa via, têm menor longevidade, atividade locomotora e reprodução comprometidas, apresentando maior conteúdo de triacilglicerol (Kishita, Tsuda, Aigaki, 2012). Em *R. prolixus*, todos os genes das enzimas da via de β -oxidação foram identificados no genoma do inseto, com a única exceção do gene para a acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD), que também não foi encontrado no genoma de nenhum outro inseto analisado (Majerowicz et al., 2017). No *R. prolixus*, a inibição da expressão do gene para a subunidade alfa da proteína

trifuncional mitocondrial provocou a diminuição da utilização dos estoques de triacilglicerol, da postura e da capacidade de voo (Arêdes et al., 2022).

Uma etapa importante para a oxidação dos ácidos graxos é a sua ativação com uma coenzima A e a formação de acil-CoA, em reação catalisada pelas ACS. A inibição da expressão de uma das isoformas de cadeia longa, a RpACSL2, afetou drasticamente a capacidade de oxidação mitocondrial de ácidos graxos, causando, também, um decréscimo no número de ovos postos e na sua eclosão (Alves-Bezerra et al., 2016b).

Lipogênese no corpo gorduroso

O estabelecimento das reservas de triacilglicerol no corpo gorduroso é de extrema importância para a sobrevivência e para sucesso reprodutivo dos insetos, e o HJ e os ILP exercem um papel importante nos eventos de síntese desses lipídeos. Em *G. morsitans*, foi observado que ambos os hormônios promovem o acúmulo de lipídeos, já que a aplicação de um análogo do HJ (metopreno) e a injeção de insulina promoveram um aumento nos seus estoques, além de reduzir a expressão de Bmm (Baumann et al., 2013).

Além de acumular lipídeos provenientes da dieta, o corpo gorduroso também é capaz de sintetizar ácidos graxos *de novo*. Para que a síntese ocorra, é necessária a participação das enzimas ACC, responsáveis pela síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, e de FAS, que usa o malonil-CoA na formação de ácidos graxos, fornecendo unidades de dois carbonos. No grilo *G. bimaculatus*, a síntese *de novo* de lipídeos varia durante o desenvolvimento do inseto (Anand, Lorenz, 2008; Lorenz, 2001; Lorenz, Anand, 2004), e em larvas de *D. melanogaster*, a participação da FAS na síntese de ácidos graxos no corpo gorduroso está associada a um mecanismo de controle de efeitos nocivo de dietas ricas em carboidratos (Garrido et al., 2015). Nos insetos hematófagos, a dieta é essencialmente proteica, o que significa que os aminoácidos vão ter uma contribuição importante na síntese *de novo* de ácidos graxos (Gondim et al., 2018). Em *Ae. aegypti*, fêmeas alimentadas com açúcar previamente a uma alimentação sanguínea tiveram um acúmulo de lipídeos no corpo gorduroso, o que indica a ocorrência da síntese *de novo* de ácidos graxos (Zhou, Pennington, Wells, 2004; Ziegler, Ibrahim, 2001). Neste inseto, a expressão de ACC e de FAS1 foi inibida e os mosquitos apresentaram uma síntese reduzida de triacilglicerol e de fosfolipídeos a partir de aminoácidos, gerando ovos inviáveis. Isso indica a relevância do corpo gorduroso para a produção dos lipídeos para a ovogênese (Alabaster et al., 2011), dada uma baixa capacidade dos ovócitos realizarem síntese *de novo* (Kawooya, Law, 1988; Ziegler, 1997).

No mosquito *Culex pipens*, por sua vez, a transcrição da FAS é regulada positivamente durante a diapausa, à medida que as fêmeas se alimentam com açúcar, e acumulam lipídeos que serão usados durante o inverno. Quando a expressão dos genes da FAS-1 e FAS-2 é inibida, ocorre uma diminuição dos ácidos graxos sintetizados no início da diapausa (Sim, Denlinger, 2009). Em *R. prolixus*, a expressão da RhoprACC no corpo gorduroso é maior nas fêmeas em jejum quando comparada às alimentadas com sangue, mas a síntese de lipídeos é iniciada após a alimentação (Saraiva et al., 2021). Nesse inseto, o silenciamento dessa enzima promoveu um atraso na digestão e o corpo gorduroso mostrou uma síntese *de novo* reduzida e, conseqüentemente, um menor acúmulo de TAG, comprometendo drasticamente a reprodução (Moraes et al., 2022). A lipogênese *de novo* também foi observada no corpo gorduroso do barbeiro *Triatoma infestans* (Juárez; Brenner, 1989).

Os ILP estão presentes nas diferentes espécies de insetos, sendo importantes reguladores do metabolismo de lipídeos e de carboidratos. Em insetos, os ILP são estrutural e funcionalmente similares à insulina de vertebrados (Brogiolo et al., 2001). Esse hormônio é produzido na cabeça e liberado na hemolinfa (Nässel, Broeck, Vanden Broeck, 2016). A inibição da expressão do receptor de insulina de *R. prolixus* (RhoprIR) aumentou a longevidade e reduziu o conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso, o que deve estar relacionado à diminuição da expressão gênica das RhoprGpat1 e RhoprGpat4, que participam da síntese de triacilglicerol, e do RhoprLpR, além da RhoprCpt1. Como consequência, houve uma redução da oviposição (Silva-Oliveira et al., 2021). Por outro lado, em *D. melanogaster*, larvas superexpressando o receptor de insulina, também apresentaram aumento no conteúdo de lipídeos (Diangelo, Birnbaum, 2009). Em *Ae. aegypti*, no qual oito genes para ILPs foram identificados (Riehle et al., 2006), o tratamento com ILP3 induziu o acúmulo de triacilglicerol em mosquitos decapitados (Brown et al., 2008). Nesse mesmo inseto, foi mostrado que *ilp7* e *ilp8* são alvos do microRNA-277 (miR-277), agindo na sua regulação após a eclosão e a alimentação sanguínea, período em que o metabolismo de lipídeos está direcionado à formação de reservas. A deleção de miR-277 aumentou a expressão de *ilp7* e *ilp8*, resultando na retenção citoplasmática de FOXO e na conseqüente redução das gotículas de lipídeos e do conteúdo de triacilglicerol (Ling et al., 2017).

Metabolismo de lipídeos nos ovários

Os insetos, na maioria dos casos, conseguem produzir um grande número de ovos em cada ciclo de postura. Para o crescimento dos ovócitos, é preciso que

haja o acúmulo de uma grande quantidade de reservas (proteínas, carboidratos e lipídeos), que serão necessárias durante o desenvolvimento do embrião. Alguns dados, obtidos com *M. sexta* e com *Ae. aegypti*, mostraram que os ovários fazem pouca síntese *de novo* de lipídeos (Kawooya, Law, 1988; Lorenz, Anand, 2004; Ziegler, 1997), ou seja, as reservas lipídicas devem ser formadas a partir da incorporação de lipídeos da hemolinfa ou, mais especificamente, da Lp circulante. A vitelogenina, proteína da hemolinfa que é incorporada pelos ovócitos em crescimento, quando passa a ser denominada vitelina, contém lipídeos em sua estrutura. No entanto, eles são em quantidades muito abaixo das encontradas nos ovócitos (Chino, Yamagata, Sato, 1977). Portanto, as reservas lipídicas dos ovos são provenientes, basicamente, da Lp, e constituídas, principalmente, por triacilgliceróis (Santos et al., 2011; Sawabe, Moribayashi, 2000; Ziegler, Van Antwerpen, 2006), como acontece também no corpo gorduroso, conforme descrito anteriormente. Como quase sempre a Lp transporta uma grande proporção de diacilgliceróis, esses são a principal fonte de ácidos graxos para a síntese dos triacilgliceróis acumulados (Atella et al., 2006; Jouni et al., 2003; Santos et al., 2011).

Os diacilgliceróis devem sofrer a ação de uma lipoproteína lipase, cuja presença já foi demonstrada nos ovócitos da mariposa *M. sexta* (Van Antwerpen et al., 1998), e que, provavelmente, localiza-se na membrana celular, liberando ácidos graxos que, após incorporação pela célula, devem ser usados para a síntese de triacilgliceróis. Esse processo de formação de reservas lipídicas nos ovócitos, utilizando diacilglicerol e ácidos graxos livres fornecidos pela Lp hemolinfática, foi mostrado em *R. prolixus* (Santos et al., 2011). Além dos ácidos graxos, os ovários também acumulam colesterol vindo da dieta, através da Lp (Entringer, Majerowicz, Gondim, 2021) (Figura 3).

A transferência de lipídeos da Lp para os ovários tem uma particularidade, que é o fato de algumas espécies de insetos apresentarem mecanismos diferentes para isso (Figura 3). Em algumas espécies, são encontradas quantidades significativas de Lp (parte proteica) no interior dos ovócitos, já que ela

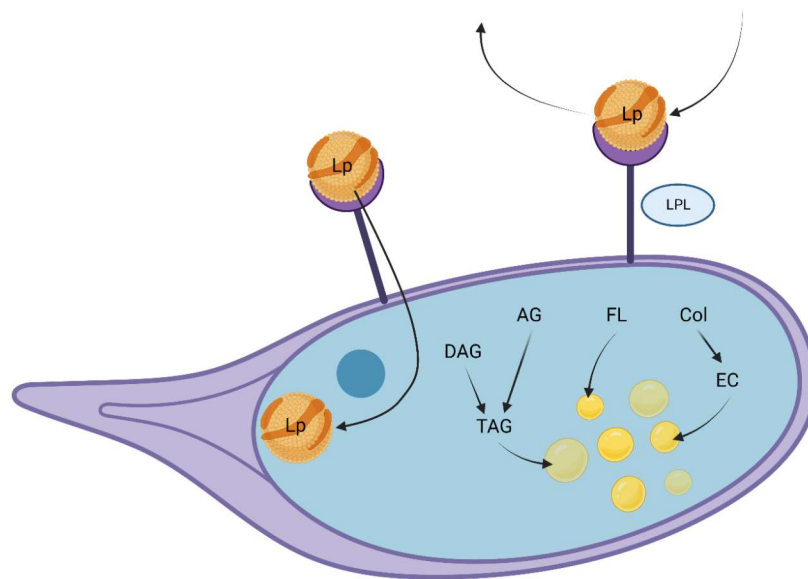


Figura 3: Metabolismo de lipídeos nos ovários. AG: ácidos graxos; Col: colesterol; DAG: diacilglicerol; EC: ésteres de colesterol; FL: fosfolipídeos; Lp: Lipoforina; LPL: lipoproteína lipase; TAG: triacilglicerol.

Fonte: Arquivo pessoal

pode ser endocitada pelos ovócitos em desenvolvimento (Atella et al., 2006; Ciudad, Bellés, Piulachs, 2007; Fruttero et al., 2011; Sun et al., 2000). Tal fenômeno não é observado no barbeiro *R. prolixus* (Gondim, Oliveira, Masuda, 1989; Machado et al., 1996).

A presença das apoproteínas da Lp nos ovócitos não seria esperada, se considerarmos a Lp como uma transportadora reutilizável de lipídeos, e essa questão foi, então, bastante explorada na mariposa *M. sexta*. Nesse inseto, ficou claramente demonstrada a coexistência de dois mecanismos diferenciados para a incorporação de lipídeos pelos ovários. Como o adulto desse inseto pode apresentar lipoforinas de densidades diferentes na hemolinfa (HDLp e LDLp), ambas as populações podem contribuir com lipídeos para os ovócitos. Quando a LDLp transfere os lipídeos, as apoproteínas da partícula não são acumuladas no interior dos ovócitos (Kawooya, Law, 1988). Entretanto, quando a HDLp interage com os ovócitos, a lipoproteína inteira é incorporada, uma vez que a sua parte proteica é encontrada nos ovócitos, porém, com uma densidade maior, na forma de VHDLp, indicando que a partícula teve parte de seus lipídeos removida (Kawooya, Osir, Law, 1988). Desse modo, os autores estimaram, a partir desses dados, que a transferência de lipídeos da LDLp para os ovários é o mecanismo responsável pelo acúmulo de cerca de 90% dos lipídeos dos ovócitos (Kawooya, Law, 1988).

O transporte de outra classe de lipídeos para os ovários, os fosfolipídeos, foi analisado em *R. prolixus*. Durante o processo de ovogênese, a Lp transfere fosfolipídeos para os ovócitos, sem que haja acúmulo da parte proteica (Gondim, Oliveira, Masuda, 1989). A capacidade dos ovócitos de incorporar fosfolipídeos da Lp varia de acordo com o seu desenvolvimento (Gondim, Oliveira, Masuda, 1989), e de forma semelhante à variação observada na endocitose de vitelogenina (Oliveira et al., 1986) (Figura 3).

Na última década, diversos grupos averiguaram o modo como o acúmulo de lipídeos nos ovários é regulado; porém, as informações ainda são dispersas e escassas. O HJ foi um dos sinais endócrinos investigados. Na joaninha *Coccinella septempunctata*, a inibição da expressão da HJ esterase e da HJ epóxido hidrolase, (enzimas envolvidas na degradação do HJ), reduz a quantidade de lipídeos nos ovários. Esses resultados indicam que o HJ inibe o acúmulo de lipídeos. De fato, o tratamento com metopreno, um análogo desse hormônio, tem o mesmo efeito (Li et al., 2022). O metabolismo de cálcio também parece ser importante, e a inibição da expressão do sensor de cálcio neuronal 2 de *N. lugens* causa acúmulo e desarranjo das gotículas de lipídeos nos ovários (Zhang et al., 2022). Em *D. melanogaster*, estudos recentes mostraram os papéis de outras vias no metabolismo de lipídeos nos ovários. Por exemplo, a superexpressão do receptor nuclear HNF4 no corpo gorduroso reduz a quantidade de lipídeos nos ovários, possivelmente devido ao aumento do catabolismo de lipídeos no corpo gorduroso (Almeida-Oliveira et al., 2021). Por outro lado, a inibição da expressão de outro receptor nuclear, o Ftz-F1, reduz a quantidade de lipídeos no epitélio folicular, em um processo com participação de SUMOilação de proteínas e a atividade de receptores do tipo *Scavengers*, envolvidos na captação de lipídeos (Talamillo et al., 2013). Por último, em *A. aegypti*, a deleção do microRNA-277 reduz a quantidade de lipídeos nos ovários, através de alterações no perfil de expressão de alguns ILP (Ling et al., 2017).

Metabolismo de lipídeos no músculo de voo

O voo dos insetos é um dos processos fisiológicos com as taxas metabólicas mais elevadas da natureza. Apesar disso, esse modelo é relativamente simples para o estudo dos processos-chave em bioquímica e fisiologia, que envolvem mobilização e transporte de nutrientes. Insetos que efetuam voo prolongado, como *M. sexta* e *L. migratoria*, têm sido muito utilizados para a compreensão da dramática demanda energética dos músculos de voo (Van der Horst, Rodenburg, 2010b).

Nos músculos de voo, os diacilgliceróis da Lp são hidrolisados por uma lipoproteína lipase presente na membrana celular (Wheeler; Goldsworthy, 1985), sendo que a Lp, aparentemente, não é endocitada no processo (Van Antwerpen et al., 1988). Os ácidos graxos liberados se associam à FABP, que leva esses lipídeos até as fibras musculares, onde serão utilizados via β -oxidação para a produção de ATP, importante para a contração muscular (Van der Horst et al., 1993) (Figura 4). Resultados recentes corroboraram a importância da FABP: a inibição da expressão da proteína em *L. migratoria* reduz a quantidade de lipídeos e metabólitos como acetil-CoA, NADH e citrato no músculo de voo. Como consequência, esses insetos apresentam menor capacidade de voo (Hou et al., 2021). Resultados similares foram obtidos com outro gafanhoto, *Schistocerca gregaria* (Rajapakse et al., 2019). Com a remoção dos diacilgliceróis da LDLp, essa se converte em HDLp, liberando as moléculas de apoLp-III, e a HDLp pode retornar ao corpo gorduroso e ser reabastecida com mais diacilgliceróis (Van der Horst, Rodenburg, 2010b).

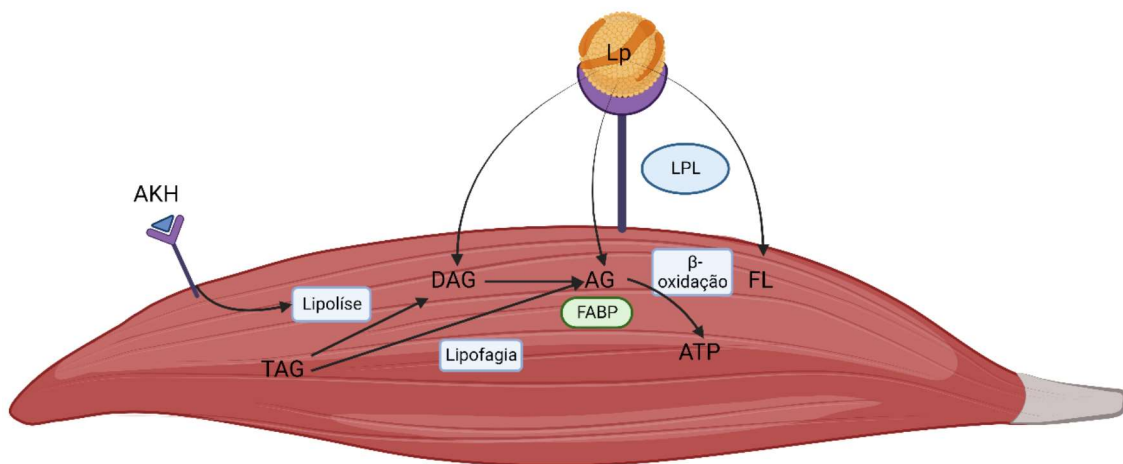


Figura 4: Metabolismo de lipídeos no músculo de voo. AG: ácidos graxos; AKH: hormônio adipocinético; DAG: diacilglicerol; FABP: proteína ligadora de ácidos graxos; FL: fosfolipídeos; Lp: lipoproteína; LPL: lipoproteína lipase; TAG: triacilglicerol.

Fonte: Arquivo pessoal

Outros trabalhos mostraram que, além dos diacilgliceróis, os fosfolipídeos podem ser entregues pela Lp aos músculos de voo (Oliveira et al., 2006; Thomas, Gilbert, 1967) e essa pode ser reabastecida no corpo gorduroso e no intestino médio (Atella, Gondim, Masuda, 1992, 1995). Esses resultados confirmam a hipótese de que a Lp atua como um veículo reutilizável, tanto para diacilgliceróis como para fosfolipídeos (Figura 4).

O voo exaustivo em *R. prolixus* promove um aumento da densidade da Lp em relação ao repouso, com concomitante diminuição da sua massa molecular (Oliveira et al., 2006). De forma diferente, no barbeiro *P. megistus*, o voo promove uma diminuição da densidade da Lp associada a um aumento no conteúdo lipídico da partícula, de modo a prover o exercício prolongado (Canavoso, Stariolo, Rubiolo, 2003). Resultado semelhante foi observado durante o voo de espécies migratórias de longa distância (Surholt et al., 1991, 1992). Nesses insetos, há uma predominância da LDLp, isto é, a Lp encontra-se com o seu conteúdo lipídico aumentado durante a maior parte do exercício, a fim de suprir a intensa demanda energética dos músculos de voo.

Esses experimentos demonstraram que o voo promove uma maior mobilização de lipídeos para os músculos de voo. Por exemplo, na mariposa *Helicoverpa armigera*, a atividade de voo reduz a quantidade corpórea total de triacilglicerol e fosfolipídeos (Wang et al., 2020). Além disso, provoca uma diminuição no transporte de lipídeos pela Lp para os ovários. Como a produção de ovos requer um constante suprimento de lipídeos e proteínas, isso indica que existe uma relação antagônica entre o voo e a ovogênese. De fato, observou-se que o voo prolongado de algumas espécies de insetos pode provocar vários efeitos negativos na reprodução, tais como o retardo no desenvolvimento ou mesmo a atrofia dos ovários, o atraso da primeira oviposição e a diminuição do número de ovos corionados (Johnson, 1963; Lorenz, 2007; Oliveira et al., 2006). Com essas observações, Kennedy cunhou o termo Síndrome voo-ovogênese (Kennedy, 1961).

Embora os lipídeos vindos da hemolinfa sejam importantes para a manutenção do voo, as reservas de lipídeos nas células musculares também podem ser usadas como fontes de energia, especialmente nos hemípteros, que acumulam grandes quantidades de triacilglicerol nos miócitos (Figura 4). Por exemplo, a inibição da expressão do receptor de AKH em *R. prolixus* induz um aumento da quantidade de triacilglicerol no músculo de voo, indicando que a atividade de voo estimula a mobilização também das reservas lipídicas das células musculares (Alves-Bezerra et al., 2016a). O processo de lipofagia também parece ser importante: a inibição da expressão de Atg8, proteína envolvida na autofagia, aumenta a quantidade de triacilglicerol no músculo de voo durante o jejum nesse barbeiro (Santos-Araujo et al., 2020).

O músculo de voo de *R. prolixus* expressa ACC, porém, tem pequena capacidade de síntese *de novo* de ácidos graxos, o que indica que a lipogênese não é relevante para o metabolismo de lipídeos nesse órgão (Saraiva et al., 2021). Entretanto, a inibição da expressão da ACBP-1 reduz a quantidade de

triacilglicerol, indicando que essa proteína é importante para o acúmulo de lipídeos (Majerowicz et al., 2016).

Considerações finais

Em todos os pontos discutidos, seja em relação à digestão, à absorção, à metabolização e à utilização dos lipídeos, percebe-se que muitos aspectos ainda são pouco estudados ou desconhecidos. Na última década, o sequenciamento do genoma de insetos tradicionalmente utilizados como modelos no estudo de diversas situações fisiológicas, como o besouro *Tribolium castaneum*, *A. mellifera* e *R. prolixus*, elevaram a possibilidade de investigações em relação ao metabolismo de lipídeos a um nível acima em complexidade.

Além disso, as ferramentas de RNA de interferência permitiram muito estudos de genética funcional e revelaram funções para diversos genes no metabolismo de lipídeos. Porém, apesar disso, as proteínas responsáveis pela absorção intestinal de ácidos graxos e do colesterol ainda são praticamente desconhecidas, assim como também são escassas as informações sobre o mecanismo de carregamento da Lp no intestino e corpo gorduroso. Do mesmo modo, o envolvimento da endocitose da Lp no abastecimento/entrega de lipídeos permanece pouco compreendido.

Os mecanismos pelos quais o metabolismo de lipídeos é regulado endocrinamente ou por sinais externos apenas começou a ser compreendido. Na próxima década, a popularização de ferramentas de RNA-seq, associadas à proteômica e metabolômica de alta capacidade, permitirá a obtenção de grande quantidade de informações sobre o metabolismo de lipídeos. Além disso, o uso do sistema de edição genética CRISPR-Cas9 já está permitindo a criação simples de mosquitos e gafanhotos mutantes, além de *Drosophila*. Em um futuro próximo, a produção de nocautes gênicos e a adaptação do sistema de expressão GAL4-UAS para outros insetos serão ferramentas essenciais para o estudo do metabolismo de lipídeos.

Referências

- ALABASTER, A. et al. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 12, p. 946–955, 2011.
- ALMEIDA-OLIVEIRA, F. et al. dHNF4 regulates lipid homeostasis and oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, p. 103569, 2021.
- ALMEIDA, M. G. M. D. et al. Expression of acyl-CoA-binding protein 5 from *Rhodnius prolixus* and its inhibition by RNA interference. *PLoS ONE*, v. 15, n. 1, 2020.
- ALVES-BEZERRA, M. et al. Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 2, p. 119–125, 2010.
- ALVES-BEZERRA, M. et al. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 69, p. 51–60, 2016a.
- ALVES-BEZERRA, M. et al. Long-chain acyl-CoA synthetase 2 knockdown leads to decreased fatty acid oxidation in fat body and reduced reproductive capacity in the insect *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1861, n. 7, p. 650–662, 16 abr. 2016b.
- ALVES-BEZERRA, M. et al. Deficiency of glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 decreases triacylglycerol storage and induces fatty acid oxidation in insect fat body. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1862, n. 3, p. 324–336, 2017.
- ALVES-BEZERRA, M.; GONDIM, K. C. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1821, n. 12, p. 1462–1471, 2012.
- ANAND, A. N. N.; LORENZ, M. W. W. Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 10–11, p. 1404–1412, out. 2008.
- ARÊDES, D. S. et al. Silencing of Mitochondrial Trifunctional Protein A Subunit (HADHA) Increases Lipid Stores, and Reduces Oviposition and Flight Capacity in the Vector Insect *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Insect Science*, v. 2, p. 885172, 2022.
- ARRESE, E. L. et al. Function and structure of lipid storage droplet protein 1 studied in lipoprotein complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 473, n. 1, p. 42–47, 2008.

- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.
- ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research*, v. 35, n. 9, p. 1652–1660, 1994.
- ATELLA, G. C. et al. Fatty acid incorporation by *Rhodnius prolixus* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 43, n. 3, p. 99–107, 2000.
- ATELLA, G. C. et al. *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 5, p. 375–386, 2006.
- ATELLA, G. C.; GONDIM, K. C.; MASUDA, H. Transfer of phospholipids from fat body to lipophorin in *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 19, n. 2, p. 133–144, 1992.
- ATELLA, G. C.; GONDIM, K. C.; MASUDA, H. Loading of lipophorin particles with phospholipids at the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 30, n. 4, p. 337–350, 1995.
- ATTARDO, G. M. et al. Analysis of lipolysis underlying lactation in the tsetse fly, *Glossina morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 5, p. 360–370, 2012.
- BARLETTA, A. B. et al. Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. *Scientific Reports*, v. 6, p. 19928, 2016.
- BAUMANN, A. A. A. et al. Juvenile hormone and insulin suppress lipolysis between periods of lactation during tsetse fly pregnancy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 372, n. 1–2, p. 30–41, jun. 2013.
- BEENAKKERS, A. M. T.; CHINO, H.; LAW, J. H. Lipophorin nomenclature. *Insect Biochemistry*, v. 18, n. 1, p. 1–2, 1988.
- BELLER, M. et al. Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 5, n. 6, p. 1082–1094, jun. 2006.
- BELLER, M. et al. COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biology*, v. 6, n. 11, p. 292, 2008.
- BELLER, M. et al. PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, v. 12, n. 5, p. 521–532, nov. 2010.
- BITTENCOURT-CUNHA, P. R. et al. Perimicrovillar membrane assembly: the fate of phospholipids synthesised by the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 4, p. 494–500, 2013.
- BLACKLOCK, B. J.; RYAN, R. O. Hemolymph lipid transport. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, n. 9, p. 855–873, 1994.

BOLSONI-LOPES, A.; ALONSO-VALE, M. I. M. I. C. Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, v. 59, n. 4, p. 335–342, 2015.

BONELLI, M. et al. Characterization of *Hermetia illucens* Larval Midgut. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 204, 2019.

BRANKATSCHK, M. et al. Delivery of circulating lipoproteins to specific neurons in the *Drosophila* brain regulates systemic insulin signaling. *eLife*, v. 3, p. e02862, 2014.

BRASAEMLE, D. L. L. et al. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1438, n. 2, p. 251–262, 2000.

BROGIOLO, W. et al. An evolutionarily conserved function of the drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*, v. 11, n. 4, p. 213–221, fev. 2001.

BROWN, M. R. et al. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 15, p. 5716–5721, abr. 2008.

CANAVOSO, L. E. et al. Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research*, v. 45, n. 3, p. 456–465, 2004.

CANAVOSO, L. E.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 8, p. 845–854, 2004.

CANAVOSO, L. E.; STARIOLO, R.; RUBIOLO, E. R. Flight Metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): The Role of Carbohydrates and Lipids. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 7, p. 909–914, 2003.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, n. 12, p. 1173–1180, 2000.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, n. 8, p. 783–790, 2001.

CERK, I. K.; WECHSELBERGER, L.; OBERER, M. Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Current Protein & Peptide Science*, v. 19, n. 2, dez. 2017.

CHAKRABARTI, S.; POIDEVIN, M.; LEMAITRE, B. The *Drosophila* MAPK p38c regulates oxidative stress and lipid homeostasis in the intestine. *PLoS Genetics*, v. 10, n. 9, p. e1004659, 2014.

CHINO, H. et al. Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. *Insect Biochemistry*, v. 11, n. 4, p. 491, 1981.

CHINO, H.; GILBERT, L. I. Uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. *Insect Biochemistry*, v. 1, n. 3, p. 337–347, 1971.

CHINO, H.; MURAKAMI, S.; HARASHIMA, K. Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph isolation, purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 176, n. 1, p. 1–26, 1969.

CHINO, H.; TAKAHASHI, K. Action of Adipokinetic Hormone on Lipophorin in Locusts. *Zoological Science*, v. 2, n. 6, p. 906, 1985.

CHINO, H.; YAMAGATA, M.; SATO, S. Further Characterization of Lepidopteran Vitellogenin from Hemolymph and Mature Eggs. *Insect Biochemistry*, v. 7, n. 2, p. 125–131, 1977.

CIUDAD, L.; BELLÉS, X.; PIULACHS, M. D. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. *BMC Molecular Biology*, v. 8, p. 53, 2007.

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

COELHO, H. S. L. et al. Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 35, n. 3, p. 301–313, 1997.

DANTUMA, N. P. et al. Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, v. 38, n. 2, p. 254–265, 1997.

DE BIANCHI, A. G.; CAPURRO, M. L. *Musca domestica* larval lipoprotein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 17, n. 1, p. 15–27, 1991.

DIACONEASA, B. et al. Genetic studies of spectrin in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*: evidence for a novel lipid uptake apparatus. *Genetics*, v. 195, n. 3, p. 871–881, 2013.

DIANGELO, J. R.; BIRNBAUM, M. J. Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, n. 24, p. 6341, dez. 2009.

DONG, W. et al. CYP311A1 in the anterior midgut is involved in lipid distribution and microvillus integrity in *Drosophila melanogaster*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 79, n. 5, p. 261, 2022.

DOWNER, R. G. H.; CHINO, H. Turnover of protein and diacylglycerol components of lipophorin in insect haemolymph. *Insect Biochemistry*, v. 15, n. 5, p. 627–630, 1985.

ENTRINGER, P. F.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. The Fate of Dietary Cholesterol in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Physiology*, v. 12, p. 654565, 2021.

ESTEVEES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology*, v. 142, n. 3–4, p. 262–274, mar. 2006.

FAN, Y. et al. Characterization of termite lipophorin and its involvement in hydrocarbon transport. *Journal of Insect Physiology*, v. 50, n. 7, p. 609–620, 2004.

FANG, Y. et al. Insecticidal and synergistic activity of dsRNAs targeting buprofezin-specific genes against the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 105, n. 4, p. e21739, 2020.

FAUNY, J. D. D.; SILBER, J.; ZIDER, A. Drosophila Lipid Storage Droplet 2 gene (Lsd-2) is expressed and controls lipid storage in wing imaginal discs. *Developmental Dynamics*, v. 232, n. 3, p. 725–732, mar. 2005.

FERDOUS, Z. et al. *Anopheles coluzzii* stearyl-CoA desaturase is essential for adult female survival and reproduction upon blood feeding. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 5, p. e1009486, 2021.

FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G. J. P.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. EFFECT OF DIETARY LIPID CONTENT ON LIPID TRANSPORT AND STORAGE DURING LARVAL DEVELOPMENT OF MANDUCA SEXTA. *Insect Biochem*, v. 18, n. 2, p. 211–214, 1988.

FORD, P. S.; VAN HEUSDEN, M. C. Triglyceride-rich lipophorin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, v. 31, n. 3, p. 435–441, 1994.

FRUTTERO, L. L. et al. The storage of nutritional resources during vitellogenesis of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): The pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocytes. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 4, p. 475–486, 2011.

FRUTTERO, L. L. et al. β -chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 52, p. 1–12, 2014.

FRUTTERO, L. L. et al. The process of lipid storage in insect oocytes: The involvement of β -chain of ATP synthase in lipophorin-mediated lipid transfer in the chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 96, p. 82–92, 2017.

FRUTTERO, L. L. et al. The Fat Body of the Hematophagous Insect, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): Histological Features and Participation of the β -Chain of ATP Synthase in the Lipophorin-Mediated Lipid Transfer. *Journal of Insect Science*, v. 19, n. 4, p. 16, 2019.

GÄDE, G.; AUERSWALD, L. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, v. 132, n. 1, p. 10–20, 2003.

GÄDE, G.; BEENAKKERS, A. M. T. Adipokinetic hormone-induced lipid mobilization and cyclic AMP accumulation in the fat body of *Locusta migratoria* during development. *General and Comparative Endocrinology*, v. 32, n. 4, p. 481–487, 1977.

GÁLIKOVÁ, M. et al. Energy homeostasis control in drosophila adipokinetic hormone mutants. *Genetics*, v. 201, n. 2, p. 665–683, out. 2015.

GÁLIKOVÁ, M. et al. The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 119, n. 3, p. 1600138, mar. 2017.

GÁLIKOVÁ, M.; KLEPSATEL, P. Endocrine control of glycogen and triacylglycerol breakdown in the fly model. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, p. S1084- 9521(22)00116–1, abr. 2022.

GARRIDO, D. et al. Fatty Acid Synthase Cooperates with Glyoxalase 1 to Protect against Sugar Toxicity. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 2, p. e1004995, 2015.

GLATZ, J. F. C. J. F. Lipids and lipid binding proteins: a perfect match. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, v. 93, p. 45–49, fev. 2015.

GOŁĘBIEWSKI, M. et al. Adipokinetic hormone induces changes in the fat body lipid composition of the beetle *Zophobas atratus*. *Peptides*, v. 58, p. 65–73, 2014.

GOLODNE, D. M. et al. Purification and characterization of a lipid transfer particle in *Rhodnius prolixus*: Phospholipid transfer. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 31, n. 6–7, p. 563–571, 2001.

GONDIM, K. C. et al. Lipophorin from *Rhodnius prolixus*: purification and partial characterization. *Insect Biochemistry*, v. 19, n. 2, p. 153–161, 1989.

GONDIM, K. C. et al. Effect of starvation on lipophorin density in fifth instar larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 84, n. 3, p. 145–156, 2013.

GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 101, p. 108–123, 2018.

GONDIM, K. C.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: transfer of phospholipids. *Journal of Insect Physiology*, v. 35, n. 1, p. 19–27, 1989.

GRILLO, L. A.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, n. 6, p. 579–588, 2007.

GRÖNKE, S. et al. Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Current Biology*, v. 13, n. 7, p. 603–606, 2003.

GRÖNKE, S. et al. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, v. 1, n. 5, p. 323–330, 2005.

HEIER, C. et al. The *Drosophila* model to interrogate triacylglycerol biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1866, n. 6, p. 158924, 2021.

HIRAYAMA, Y.; CHINO, H. Lipid transfer particle in locust hemolymph: purification and characterization. *Journal of Lipid Research*, v. 31, n. 5, p. 793–799, 1990.

HOU, L. et al. Neuropeptide ACP facilitates lipid oxidation and utilization during long-term flight in locusts. *eLife*, v. 10, p. e65279, 2021.

HOU, Q. L. et al. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol mobilization and sexual behavior in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 90, p. 1–13, nov. 2017.

HUANG, H. J. et al. Combined transcriptomic/proteomic analysis of salivary gland and secreted saliva in three planthopper species. *Journal of Proteomics*, v. 172, p. 25–35, 2018.

HUANG, R. et al. High-fat diet enhances starvation-induced hyperactivity via sensitizing hunger-sensing neurons in *Drosophila*. *eLife*, v. 9, p. e53103, 2020.

JINDRA, M.; PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L. M. The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. *Annual Review of Entomology*, v. 58, n. 1, p. 181–204, 2013.

JING, T. Z.; QI, F. H.; WANG, Z. Y. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 38, 2020.

JOHNSON, C. G. Physiological factors in insect migration by flight. *Nature*, v. 198, n. 4879, p. 423–427, 1963.

JOUNI, Z. E. et al. Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles in vitro: role of the lipid transfer particle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 145–153, 2003.

JOUNI, Z. E.; MCGILL, B.; WELLS, M. A. beta-cyclodextrin facilitates cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body and midgut in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v. 132, n. 4, p. 699–709, 2002.

JOUNI, Z. E.; ZAMORA, J.; WELLS, M. A. Absorption and tissue distribution of cholesterol in *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 49, n. 3, p. 167–175, 2002.

JUÁREZ, P.; BRENNER, R. R. Fatty acid biosynthesis in the integument tissue of *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 93, n. 4, p. 763–772, jan. 1989.

KAMOSHIDA, Y. et al. Ecdysone receptor (EcR) suppresses lipid accumulation in the *Drosophila* fat body via transcription control. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 421, n. 2, p. 203–207, maio 2012.

KAUFMANN, C. et al. The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two putative AKH receptor variants from *A. aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, n. 11, p. 770–781, 2009.

KAUFMANN, C.; BROWN, M. R. Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 6, p. 466–481, 2006.

KAWOOYA, J. K.; OSIR, E. O.; LAW, J. H. Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 8740–8747, 1988.

KAWOOYA, J.; LAW, J. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 18, p. 8748–8753, jun. 1988.

KENNEDY, J. S. A Turning Point in the Study of Insect Migration. *Nature*, v. 189, p. 785–791, 1961.

KIM, J. et al. Grasp55^{-/-} mice display impaired fat absorption and resistance to high-fat diet-induced obesity. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1418, 2020.

KIMMEL, A. R. et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 3, p. 468–471, mar. 2010.

KIRFEL, G.; KOMNICK, H. Differential absorption and esterification of dietary long-chain fatty acids by larvae of the dragonfly, *Aeshna cyanea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 40, n. 4, p. 183–193, 1999.

KISHITA, Y.; TSUDA, M.; AIGAKI, T. Impaired fatty acid oxidation in a *Drosophila* model of mitochondrial trifunctional protein (MTP) deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 419, n. 2, p. 344–349, mar. 2012.

KODRÍK, D.; KRIŠTŮFEK, V.; SVOBODOVÁ, Z. Bee year: Basic physiological strategies to cope with seasonality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, v. 264, p. 111115, 2022.

KOMNICK, H.; GIESA, U. Intestinal absorption of cholesterol, transport in the hemolymph, and incorporation into the fat body and Malpighian tubules of the larval dragonfly *Aeshna cyanea*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, v. 107, n. 3, p. 553–557, 1994.

KONUMA, T. et al. Imbalanced Hemolymph Lipid Levels Affect Feeding Motivation in the Two-Spotted Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, p. e0154841, 2016.

LEYRIA, J. et al. DmCatD, a cathepsin D-like peptidase of the hematophagous insect *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): Purification, bioinformatic analyses and the significance of its interaction with lipophorin in the internalization by developing oocyte. *Journal of Insect Physiology*, v. 105, p. 28–39, 2018.

LI, Y. Y. et al. Enhanced Degradation of Juvenile Hormone Promotes Reproductive Diapause in the Predatory Ladybeetle *Coccinella septempunctata*. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 877153, 2022.

LING, L. et al. MicroRNA-277 targets *insulin-like peptides 7* and *8* to control lipid metabolism and reproduction in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 38, p. E8017–E8024, 2017.

LIPOVŠEK, S. et al. Role of the fat body in the cave crickets *Troglophilus cavicola* and *Troglophilus neglectus* (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Arthropod Structure & Development*, v. 40, n. 1, p. 54–63, jan. 2011.

LIU, H.; RYAN, R. O. Role of lipid transfer particle in transformation of lipophorin in insect oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1085, n. 1, p. 112–118, 1991.

LORD, C. C.; BROWN, J. M. Distinct roles for alpha-beta hydrolase domain 5 (ABHD5/CGI-58) and adipose triglyceride lipase (ATGL/PNPLA2) in lipid metabolism and signaling. *Adipocyte*, v. 1, n. 3, p. 123–131, jan. 2012.

LORENZ, M. W. Synthesis of lipids in the fat body of *Gryllus bimaculatus*: age-dependency and regulation by adipokinetic hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 47, p. 198–214, 2001.

LORENZ, M. W. Oogenesis-flight syndrome in crickets: age-dependent egg production, flight performance, and biochemical composition of the flight muscles in adult female *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology*, v. 53, n. 8, p. 819–832, 2007.

LORENZ, M. W.; ANAND, A. N. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 56, n. 3, p. 110–119, 2004.

LOURENÇO, A. P. et al. Potential costs of bacterial infection on storage protein gene expression and reproduction in queenless *Apis mellifera* worker bees on distinct dietary regimes. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 9, p. 1217–1225, 2012.

- LU, K. et al. Lipophorin receptor regulates *Nilaparvata lugens* fecundity by promoting lipid accumulation and vitellogenin biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 219–220, p. 28–37, 2018a.
- LU, K. et al. Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Lipid Mobilization to Regulate Starvation Resistance in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 1730, nov. 2018b.
- LUCAS, K. J. et al. MicroRNA-8 targets the Wingless signaling pathway in the female mosquito fat body to regulate reproductive processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 5, p. 1440–1445, 2015.
- MACHADO, E. A. et al. Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 31, n. 2, p. 185–196, 1996.
- MAJEROWICZ, D. et al. *Rhodnius prolixus* lipophorin: lipid composition and effect of high temperature on physiological role. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 82, n. 3, p. 129–140, 2013.
- MAJEROWICZ, D. et al. The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression, characterization and function of RpACBP-1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 72, p. 41–52, 2016.
- MAJEROWICZ, D. et al. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: Lessons from the genome. *Gene*, v. 596, p. 27–44, 2017.
- MARCHAL, E. et al. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides*, v. 31, n. 3, p. 506–519, 2010.
- MATSUO, N. et al. Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in *Drosophila*. *Journal of Lipid Research*, v. 60, n. 7, p. 1199–1211, 2019.
- MATSUOKA, K. et al. Transport of a hydrophobic biosynthetic precursor by lipophorin in the hemolymph of a geometrid female moth which secretes an epoxyalkenyl sex pheromone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 7, p. 576–583, 2006.
- MIURA, S. et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 35, p. 32253–32257, ago. 2002.
- MORAES, B. et al. Deficiency of Acetyl-CoA Carboxylase Impairs Digestion, Lipid Synthesis, and Reproduction in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Physiology*, v. 0, p. 1352, jul. 2022.
- MRDAKOVIĆ, M. et al. Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*lymantria dispar* L.) larval midgut. *Folia Biologica*, v. 56, n. 1–2, p. 103–110, 2008.

- NAGASAWA, H. et al. Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 53, n. 1, p. 143–152, 1984.
- NÄSSEL, D. R. D. R.; BROECK, J. VANDEN; VANDEN BROECK, J. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 2, p. 271–290, out. 2016.
- NEESS, D. et al. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins. *Progress in Lipid Research*, v. 59, p. 1–25, 2015.
- NICHOLSON, S. J.; HARTSON, S. D.; PUTERKA, G. J. Proteomic analysis of secreted saliva from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 7, p. 2252–2268, 2012.
- NICHOLSON, S. J.; PUTERKA, G. J. Variation in the salivary proteomes of differentially virulent greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani) biotypes. *Journal of Proteomics*, v. 105, p. 186–203, 2014.
- NIRALA, N. K. et al. Survival response to increased ceramide involves metabolic adaptation through novel regulators of glycolysis and lipolysis. *PLoS Genetics*, v. 9, n. 6, p. e1003556, 2013.
- OLIVEIRA, G. A. et al. Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: Biochemical aspects of lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 62, n. 4, p. 164–175, 2006.
- OLIVEIRA, P. L. et al. Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, v. 32, n. 32, p. 859–866, 1986.
- PALM, W. et al. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*--assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 7, p. e1002828, 2012.
- PALM, W. et al. Secretion and signaling activities of lipoprotein-associated hedgehog and non-sterol-modified hedgehog in flies and mammals. *PLoS Biology*, v. 11, n. 3, p. e1001505, 2013.
- PARRA-PERALBO, E.; CULI, J. *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 2, p. e1001297, 2011.
- PATEL, R. T. et al. cAMP-dependent protein kinase of *Manduca sexta* phosphorylates but does not activate the fat body triglyceride lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 12, p. 1269–1279, dez. 2004.
- PATEL, R. T. et al. Activation of the lipid droplet controls the rate of lipolysis of triglycerides in the insect fat body. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 24, p. 22624–22631, 2005.

PATEL, R. T.; SOULAGES, J. L.; ARRESE, E. L. Adipokinetic hormone-induced mobilization of fat body triglyceride stores in *Manduca sexta*: Role of TG-lipase and lipid droplets. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 63, n. 2, p. 73–81, 2006.

PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, v. 60, n. 11, p. 1500–1510, nov. 2011.

PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Triacylglycerol-rich lipophorins are found in the dipteran infraorder Culicomorpha, not just in mosquitoes. *Journal of Insect Science*, v. 2, p. 15, 2002.

PONTES, E. G. E. G. et al. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: the involvement of lipophorin binding sites. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 5, p. 790–797, 2008.

QIAO, J. W. et al. Lipophorin receptor regulates the cuticular hydrocarbon accumulation and adult fecundity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Science*, v. 28, n. 4, p. 1018–1032, 2021.

RAJAPAKSE, S. et al. Effects of FABP knockdown on flight performance of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, v. 222, n. 21, p. jeb203455, 2019.

RAMOS, F. O. et al. Juvenile hormone mediates lipid storage in the oocytes of *Dipetalogaster maxima*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2021.

REIFF, T. et al. Endocrine remodelling of the adult intestine sustains reproduction in *Drosophila*. *eLife*, v. 28, p. 4, 2015.

RENSHAW, M.; SILVER, J. B.; SERVICE, M. W. Differential lipid reserves influence host-seeking behaviour in the mosquitoes *Aedes cantans* and *Aedes punctator*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 9, n. 4, p. 381–387, out. 1995.

RIEHLE, M. A. M. A. et al. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny. *Peptides*, v. 27, n. 11, p. 2547–2560, nov. 2006.

ROBBS, S. L. et al. Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Lipid Research*, v. 26, n. 2, p. 241–247, 1985.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. et al. *Drosophila* Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 6, p. e1005356, 2015.

RYAN, R. O.; VAN DER HORST, D. J. Lipid Transport Biochemistry and Its Role in Energy Production. *Annual Review of Entomology*, v. 45, n. 1, p. 233–260, 2000.

RYAN, R. O.; WELLS, M. A.; LAW, J. H. Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 136, n. 1, p. 260–265, 1986.

SAHAKA, M. et al. The digestion of galactolipids and its ubiquitous function in Nature for the uptake of the essential α -linolenic acid. *Food & Function*, v. 11, n. 8, p. 6710–6744, 2020.

SAJJADIAN, S. M. et al. Secretion of secretory phospholipase A2 into *Spodoptera exigua* larval midgut lumen and its role in lipid digestion. *Insect Molecular Biology*, v. 28, n. 6, p. 773–784, 2019.

SANTANA, C. C. et al. Lipase Activity in the Larval Midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical Characterization and the Effects of Reducing Agents. *Insects*, v. 8, n. 3, p. 100, 2017.

SANTOS-ARAUJO, S. et al. Silencing of ATG6 and ATG8 promotes increased levels of triacylglycerol (TAG) in the fat body during prolonged starvation periods in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 103484, 2020.

SANTOS, R. et al. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 77, n. 1, p. 1–16, 2011.

SARAIVA, F. B. et al. Blood meal drives de novo lipogenesis in the fat body of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, p. 103511, 2021.

SAWABE, K.; MORIBAYASHI, A. Lipid utilization for ovarian development in an autogenous mosquito, *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, v. 37, n. 5, p. 726–731, 2000.

SCHAL, C. et al. Tissue distribution and lipophorin transport of hydrocarbons and sex pheromones in the house fly, *Musca domestica*. *Journal of Insect Science*, v. 1, p. 12, 2001.

SCHROEDER, F. et al. Sterol carrier protein-2: new roles in regulating lipid rafts and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1771, n. 6, p. 700–718, jun. 2007.

SCHWEDES, C. C.; CARNEY, G. E. Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 3, p. 293–302, mar. 2012.

SEHADOVA, H. et al. Functional Analysis of Adipokinetic Hormone Signaling in *Bombyx mori*. *Cells*, v. 9, n. 12, dez. 2020.

SEVALA, V. et al. Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons. *Journal of Insect Physiology*, v. 45, n. 5, p. 431–441, 1999.

SIEBER, M. H.; THUMMEL, C. S. The DHR96 Nuclear Receptor Controls Triacylglycerol Homeostasis in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, v. 10, n. 6, p. 481–490, 2009.

SILVA-OLIVEIRA, G. et al. Insulin receptor deficiency reduces lipid synthesis and reproductive function in the insect *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1866, n. 2, p. 158851, fev. 2021.

SIM, C.; DENLINGER, D. L. Transcription profiling and regulation of fat metabolism genes in diapausing adults of the mosquito *Culex pipiens*. *Physiological genomics*, v. 39, n. 3, p. 202–209, 2009.

SLOCINSKA, M. et al. UCP4 expression changes in larval and pupal fat bodies of the beetle *Zophobas atratus* under adipokinetic hormone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 166, n. 1, p. 52–59, 2013.

SONG, W.; VEENSTRA, J. A.; PERRIMON, N. Control of lipid metabolism by tachykinin in *Drosophila*. *Cell Reports*, v. 9, n. 1, p. 40–47, 2014.

SOULAGES, J. L.; WELLS, M. A. Metabolic fate and turnover rate of hemolymph free fatty acids in adult *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, n. 1, p. 79–86, 1994a.

SOULAGES, J. L.; WELLS, M. A. Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Advances in Protein Chemistry*, v. 45, p. 371–415, 1994b.

SPATES, G. E.; BULL, D. L.; CHEN, A. C. Hydrolysis of sphingomyelin and phosphatidylcholine by midgut homogenates of the stable fly. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 1990.

STANLEY, D. W.; SARATH, G.; RANA, R. L. A digestive phospholipase A2 in midguts of tobacco hornworms, *Manduca sexta* L. *Journal of Insect Physiology*, v. 44, n. 3–4, p. 297–303, 1998.

SU, C. L. L. et al. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 44, p. 43615–43619, out. 2003.

SUN, J. et al. Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol*, v. 30, n. 12, p. 1161–1171, 2000.

SURHOLT, B. et al. Lipoproteins act as a reusable shuttle for lipid transport in the flying death's-head hawkmoth, *Acherontia atropos*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1086, n. 1, p. 15–21, 1991.

SURHOLT, B. et al. Insect lipophorin conversions. Compositional analysis of high- and low-density lipophorin of *Acherontia atropos* and *Locusta migratoria*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 373, n. 1, p. 10–13, 1992.

TAKEUCHI, N.; CHINO, H. Lipid transfer particle in the hemolymph of the american cockroach: evidence for its capacity to transfer hydrocarbons between lipophorin particles. *Journal of Lipid Research*, v. 34, n. 4, p. 543–551, 1993.

- TALAMILLO, A. et al. Scavenger receptors mediate the role of SUMO and Ftz-f1 in *Drosophila* steroidogenesis. *PLoS Genetics*, v. 9, n. 4, p. e1003473, 2013.
- TELANG, A. et al. Analysis of ovary-specific genes in relation to egg maturation and female nutritional condition in the mosquitoes *Georgacraigius atropalpus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 59, n. 3, p. 283–294, 2013.
- TELANG, A.; WELLS, M. A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. *Journal of Insect Physiology*, v. 50, n. 7, p. 677–685, 2004.
- TELFER, W. H.; PAN, M. L. Adsorptive endocytosis of vitellogenin, lipophorin, and microvitellogenin during yolk formation in *Hyalophora*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 9, n. 4, p. 339–355, 1988.
- TENNESSEN, J. M.; THUMMEL, C. S. Coordinating growth and maturation - Insights from *drosophila*. *Current Biology*, v. 21, n. 18, set. 2011.
- THOMAS, K. K.; GILBERT, L. I. In vitro studies on the release and transport of phospholipids. *Journal of Insect Physiology*, v. 13, n. 6, p. 963–980, 1967.
- TOPRAK, U. et al. A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 104, n. 2, p. e21682, 2020.
- TUFAIL, M.; TAKEDA, M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, n. 2, p. 87–103, 2009.
- TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). *Biology of insect midgut*. London: Chapman and Hall, 1996.
- VALZANIA, L. et al. Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 7, p. e0006638, 2018.
- VAN ANTWERPEN, R. et al. Immunocytochemical localization of lipophorins in the flight muscles of the migratory locust (*Locusta migratoria*) at rest and during flight. *Cell and Tissue Research*, v. 252, n. 3, p. 661–668, 1988.
- VAN ANTWERPEN, R. et al. Uptake of lipids by developing oocytes of the hawkmoth *Manduca sexta*: The possible role of lipoprotein lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, n. 5–6, p. 399–408, 1998.
- VAN DER HORST, D. J. et al. Interconversions of diacylglycerol-transporting lipoproteins in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, v. 11, n. 6, p. 717–723, 1981.
- VAN DER HORST, D. J. et al. Role of fatty acid-binding protein in lipid metabolism of insect flight muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 123, n. 1–2, p. 145–152, 1993.

VAN DER HORST, D. J.; RODENBURG, K. W. Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective. *Biomolecular Concepts*, v. 1, n. 2, p. 165–183, 2010a.

VAN DER HORST, D. J.; RODENBURG, K. W. Locust flight activity as a model for hormonal regulation of lipid mobilization and transport. *Journal of Insect Physiology*, v. 56, n. 8, p. 844–853, 2010b.

VAN DER HORST, D. J.; ROOSENDAAL, S. D.; RODENBURG, K. W. Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 326, n. 1–2, p. 105–119, 2009.

VAN HEUSDEN, M. C. et al. The recycling of protein components of the flight-specific lipophorin in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, v. 17, n. 5, p. 771–776, 1987.

VAN HEUSDEN, M. C.; LAW, J. H. An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 29, p. 17287–17292, 1989.

VAN HOOFF, D.; RODENBURG, K. W.; VAN DER HORST, D. J. Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *Journal of Cell Science*, v. 115, n. 21, p. 4001–4012, 2002.

VAN HOOFF, D.; RODENBURG, K. W.; VAN DER HORST, D. J. Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 2, p. 117–128, 2005.

WANG, S. et al. 20-Hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 3, p. 128–138, 2010.

WANG, S. et al. Odorant binding proteins promote flight activity in the migratory insect, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, v. 29, n. 19, p. 3795–3808, 2020.

WANG, X. et al. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 13, p. E2709–E2718, mar. 2017.

WANG, Y. et al. Symbiotic bracovirus of a parasite manipulates host lipid metabolism via tachykinin signaling. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 3, p. e1009365, 2021.

WEIHER, B.; KOMNICK, H. Digestion of phosphatidylcholines, absorption, and esterification of lipolytic products by *Aeshna cyanea* larvae as studied in vivo and in vitro. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 36, n. 4, p. 273–293, 1997.

- WHEELER, C. H.; GOLDSWORTHY, G. J. Specificity and localization of lipoproteins lipase in the flight muscle of *Locusta migratoria*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 366, p. 1071–1077, 1985.
- XIMENES, A. A. et al. Lipophorin Drives Lipid Incorporation and Metabolism in Insect Trypanosomatids. *Protist*, v. 166, n. 3, p. 297–309, 2015.
- YE, W. et al. The Desaturase Gene *Nilg-desatA2* Regulates the Performance of the Brown Planthopper *Nilaparvata lugens* and Its Relationship with Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, p. 4143, 2020.
- YOKOYAMA, H. et al. Lipid transfer particle from the silkworm, *Bombyx mori*, is a novel member of the apoB/large lipid transfer protein family. *Journal of Lipid Research*, v. 54, n. 9, p. 2379–2390, 2013.
- YOUNG, H. P. et al. Site of synthesis, tissue distribution, and lipophorin transport of hydrocarbons in *Blattella germanica* (L.) nymphs. *Journal of Insect Physiology*, v. 45, n. 4, p. 305–315, 1999.
- YUN, H. K.; JOUNI, Z. E.; WELLS, M. A. Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, n. 9, p. 1151–1158, 2002.
- ZECHNER, R. et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism*, v. 15, n. 3, p. 279–291, mar. 2012.
- ZHANG, L. et al. Neuronal calcium sensor 2 is key to moulting and oocyte development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, p. 10.1111/imb.12799, 2022.
- ZHAO, L. et al. Plasticity of nutrient accumulation patterns in diapausing fall webworm pupae. *Bulletin of Entomological Research*, p. 10.1017/S0007485321000201, 2021a.
- ZHAO, L. et al. Physiological Mechanisms of Variable Nutrient Accumulation Patterns Between Diapausing and Non-Diapausing Fall Webworm (Lepidoptera: Arctiidae) Pupae. *Environmental Entomology*, v. 50, n. 5, p. 1158–1165, 2021b.
- ZHAO, X.; KARPAC, J. The *Drosophila* midgut and the systemic coordination of lipid-dependent energy homeostasis. *Current Opinion in Insect Science*, v. 41, p. 100–105, 2020.
- ZHOU, G. L.; PENNINGTON, J. E. E.; WELLS, M. A. A. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 9, p. 919–925, 2004.
- ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 161, n. 2, p. 125–131, maio 1991.
- ZIEGLER, R. Lipid synthesis by ovaries and fat body of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *European Journal of Entomology*, v. 94, n. 3, p. 385–391, 1997.

ZIEGLER, R. et al. A novel lipoprotein from the hemolymph of the cochineal insect, *Dactylopius confusus*. *European Journal of Biochemistry*, v. 261, n. 1, p. 285–290, 1999.

ZIEGLER, R.; IBRAHIM, M. M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, v. 47, p. 623–627, 2001.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 4, p. 264–272, 2006.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 9

O metabolismo mitocondrial nos insetos voadores

Marcos T. Oliveira¹
Hosana S. Petita¹
Marcus F. Oliveira²

¹Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Considerações iniciais

As mitocôndrias são organelas que desempenham papéis centrais na biologia celular, regulando a homeostase energética e o balanço redox, além de participarem diretamente do controle de vias envolvidas na sobrevivência, diferenciação e morte celular. A gama de funções desempenhadas por essas organelas é expandida ao considerarmos toda a diversidade biológica dos insetos voadores. Neste capítulo, discutiremos os aspectos clássicos e emergentes das mitocôndrias nos insetos voadores e a maneira como elas participam da biologia desses organismos. Um foco especial será dado ao seu envolvimento no metabolismo energético, destacando a utilização das moscas *Drosophila melanogaster* como um excelente modelo de estudo para o entendimento dos processos metabólicos em diversas condições experimentais.

Os insetos voadores como modelos extremos do metabolismo energético

Os artrópodes representam o grupo dominante de animais terrestres na natureza, com estimativas em torno de 7 milhões de espécies. Cerca de 5,5 milhões dessas espécies são insetos (Stork, 2018; Stork et al., 2015). Isso demonstra a enorme diversidade e o sucesso evolutivo dos artrópodes que permitiram que esse grupo dominasse praticamente todos os nichos do nosso planeta. Nesse sentido, a capacidade de dispersão desses organismos cumpre um papel fundamental na biologia dos artrópodes, uma vez que diversos aspectos, incluindo a alimentação, a reprodução, a fuga de predadores e a colonização de novos nichos depende da sua capacidade locomotora.

Até onde se conhece, os insetos foram os primeiros animais alados. Seu registro mais antigo é de, aproximadamente, 324 milhões de anos atrás (Prokop et al., 2005). Embora as origens do voo não sejam claras, o aumento das concentrações atmosféricas de oxigênio (apO_2) parece ter facilitado o desenvolvimento do metabolismo aeróbio, elevando a capacidade oxidativa e a produção de adenosina trifosfato (ATP), de modo a atender a enorme demanda de energia imposta pelo voo (Dudley, 1998). Curiosamente, o surgimento de insetos gigantes, há cerca de 320 milhões de anos, foi paralelo à maior apO_2 já registrada na atmosfera, atingindo níveis próximos a aproximadamente 30% no final do período Paleozoico. Isso sugere uma associação entre a maior disponibilidade de oxigênio e o aumento do tamanho corpóreo (Dudley, 1998). Essa relação se baseia no fato de que o oxigênio é transportado nos insetos através de uma

complexa rede de traqueias, que fornecem oxigênio diretamente aos órgãos internos, sem a necessidade de um sistema circulatório fechado. Portanto, uma pO_2 mais alta evitaria os limites de difusão e favoreceria o desenvolvimento de massas corpóreas maiores (Harrison et al., 2010). No entanto, essa proposta não é consensual na literatura, uma vez que não considera que a oferta de oxigênio é fisiologicamente ajustada à demanda por este gás entre espécies com diferentes tamanhos corpóreos (Hetz and Bradley, 2005).

As enormes forças físicas necessárias para sustentar o voo impuseram diversas limitações biomecânicas, fisiológicas e metabólicas para os insetos voadores (Harrison and Roberts, 2000). Nesse sentido, os músculos de voo são os tecidos responsáveis pelo enorme trabalho mecânico requerido pelo deslocamento aéreo. Esses músculos podem ser anatomicamente divididos em dois grupos: i) os músculos de voo diretos (DFM), que conectam a cutícula torácica às bases das asas e conduzem o movimento descendente dessas estruturas; e ii) os músculos de voo indiretos (IFM), que conduzem o movimento ascendente das asas. Os músculos de voo também podem ser, fisiologicamente, divididos em músculos de voo síncronos (SFM) e assíncronos (AFM), dependendo da relação entre a estimulação elétrica neural e o trabalho mecânico muscular (Roeder, 1951). Enquanto nos SFM um estímulo neural promove uma única contração, os AFM contraem várias vezes após um único estímulo neural, de maneira oscilatória e, geralmente, em altas frequências. Os SFM são considerados mais primitivos e característicos de algumas espécies de insetos, como borboletas, mariposas e gafanhotos (Sacktor, 1955). Aparentemente, os AFM representam o tipo dominante de fibra muscular em insetos voadores, sendo observados na ampla maioria das espécies de insetos voadores (Josephson et al., 2000). A explicação para a ampla prevalência dos AFM na natureza se baseia na maior eficiência na transdução de energia desses músculos, quando comparados aos SFM. Nesse sentido, devemos lembrar que os principais processos que demandam energia na contração das fibras musculares são causados pela ciclagem de íons de cálcio (Ca^{2+}) e pelas actomiosina ATPases. Como a contração dos AFM ocorre em altas frequências e com a menor ciclagem de Ca^{2+} , a demanda energética por ciclo de contração é muito menor do que nos SFM (Lund et al., 1987).

Apesar dos menores custos energéticos para a ciclagem de Ca^{2+} , a demanda total de energia para sustentar as contrações dos AFM é extremamente elevada (Makarieva et al., 2005). Um dos exemplos mais notáveis do potencial energético dos insetos voadores é observado nos gafanhotos migratórios *Schistocerca gregaria* (Mizisin and Josephson, 1987; Schatz, 2003). Durante o

seu voo, a taxa metabólica relativa à massa atinge valores próximos a 70 W/kg, o equivalente à liberação de ~365.000 vezes mais energia por segundo do que o núcleo solar. Essa quantidade colossal de energia só pode ser fornecida através de um sistema de altíssima capacidade e extremamente eficiente, que, no contexto biológico, ocorre nas mitocôndrias desses organismos. Para conseguir isso, as taxas de consumo de oxigênio do AFM aumentam em até 100 vezes durante a transição do repouso para o voo, sendo muito mais elevadas quando comparadas ao aumento de aproximadamente 18 vezes nos músculos de mamíferos (Beenackers et al., 1984; Krogh and Weis-Fogh, 1951).

Independentemente das diversidades anatômicas e estruturais, os músculos de voo dos insetos compartilham uma característica notável: a altíssima velocidade de contração que, em casos extremos, como nos mosquitos, promove o batimento das asas, em frequências acima de 800 Hz (Bomphrey et al., 2017). Assim como os músculos esqueléticos dos vertebrados, o músculo de voo dos insetos é, essencialmente, composto por quatro componentes: (i) as miofibrilas, responsáveis pelo trabalho mecânico gerado durante a contração; (ii) o retículo sarcoplasmático, envolvido diretamente na contração e relaxamento muscular, através da liberação e do sequestro de Ca^{2+} no citosol; (iii) as mitocôndrias, responsáveis pela produção de ATP para atender demandas energéticas celulares (Iwamoto, 2011; Sacktor, 1955; Smith, 1963); e (iv) as traqueias, responsáveis pela entrega de oxigênio atmosférico diretamente às mitocôndrias.

De modo a sustentar as incríveis demandas energéticas, os insetos voadores desenvolveram duas características metabólicas bastante peculiares: (i) a atividade de várias enzimas envolvidas no metabolismo energético muito próximas da V_{max} durante o voo [72]; e (ii) o altíssimo conteúdo destas enzimas $[E]$ [72], que estão em maior excesso, quando comparadas a organismos que possuem taxas metabólicas menores [73]. Esse paradigma se sustenta, quando observamos que reduções de ~ 50% na atividade de várias enzimas do metabolismo energético causaram efeitos mínimos no batimento das asas da mosca *D. melanogaster* [73,74].

As mitocôndrias, esses estranhos invasores que sustentam a vida eucariótica

Os primeiros relatos sobre as mitocôndrias datam do final do século 19, em dos estudos observacionais feitos por Richard Altmann, na Alemanha, com inúmeros organismos, incluindo algumas espécies de insetos, como o besouro da água *Dysticus marginalis*. O registro visual do músculo torácico desse inseto,

publicado em 1894, identifica a presença de estruturas esféricas que intercalam as fibras musculares, que Altmann chamou de “bioblastos” ou “germes vivos”. Esse nome se refere ao fato de que essas estruturas se mexem como se fossem bactérias. O termo “mitocôndria” só surgiu na virada do século 19 para o 20, em 1899, quando o pesquisador alemão Carl Benda observou que os bioblastos se assemelhavam mais a um colar de contas ou, como ele chamou, a grânulos finos, derivado dos termos gregos *mitos* e *chondron*. Curiosamente, a associação histórica no estudo das mitocôndrias e dos artrópodes se confunde e permeia o conhecimento ao longo das décadas. Posteriormente, o pesquisador britânico Charles Mac Munn desenvolveu um micro-espectrofotômetro acoplado a uma luneta, que permitia a observação de amostras biológicas na natureza e a avaliação de suas propriedades espectroscópicas. Mac Munn observou a existência de pigmentos teciduais de coloração vermelha, que ele chamou de “histohematinas” e que, de alguma forma, participariam do processo respiratório (Munn and Foster, 1886). No entanto, Mac Munn foi duramente criticado por não considerar a possibilidade desses pigmentos serem meros contaminantes derivados de hemoglobina, que também tinha coloração vermelha e, portanto, suas ideias não foram aceitas pela comunidade.

Posteriormente, David Keilin aprimorou o micro-espectrofotômetro, acoplado-o a um microscópio e observou a existência dos mesmos pigmentos em tecidos de vários organismos, incluindo leveduras, insetos e plantas (Keilin and Hardy, 1925). A inclusão de organismos que não possuíam hemoglobina levou Keilin a derrubar a principal crítica feita a Mac Munn. Uma vez que esses compostos se encontram amplamente distribuídos na natureza, Keilin decide chamá-los de “citocromos”. Além dessas observações, Keilin descobre que os citocromos participam de reações redox da respiração celular, utilizando, particularmente, a mariposa *Galleria mellonella* como modelo de estudo. Os trabalhos iniciais de Mac Munn e Keilin revelam apenas uma pequena parcela da contribuição dos insetos como modelo de estudo sobre as mitocôndrias, que foram estendidos nos anos seguintes. Posteriormente, Watanabe e Williams demonstraram que as estruturas conhecidas como sarcossomos em músculos de voo de insetos eram, na verdade, mitocôndrias, por possuírem as mesmas propriedades bioquímicas das mitocôndrias de fígado (Watanabe and Williams, 1951).

Embora os insetos sejam o grupo taxonômico mais diverso e com o maior número de espécies, o conhecimento sobre a participação das mitocôndrias no seu metabolismo energético é escasso e, em grande, parte inexplorado. A Figura 1, que segue, mostra a evolução do conhecimento sobre o papel das mitocôndrias

no metabolismo de diversos organismos, nos insetos e na mosca *Drosophila*. Observamos, na Figura 1A, a evolução do conhecimento sobre as mitocôndrias na natureza, representada pela linha vermelha (Kowaltowski and Oliveira, 2020). Vemos, ainda, que entre os anos de 1950 e 1960 há um grande impulso na produção de conhecimento sobre esta organela, fruto dos trabalhos pioneiros de George Palade, Albert Lehninger e Britton Chance. Esses pesquisadores desenvolveram as técnicas necessárias para o estudo dessas organelas isoladas do ambiente intracelular e estabeleceram os fundamentos conceituais sobre o metabolismo mitocondrial (Chance and Williams, 1955a; Hogeboom et al., 1948; Kennedy and Lehninger, 1949). No entanto, muitas questões permaneceram sem solução, na época, como o mecanismo responsável pelo acoplamento da energia oriunda da oxidação de nutrientes na produção de ATP, bem como o efeito dos desacopladores na conservação de energia.

Uma segunda mudança abalou o campo, em 1961, quando Peter Mitchell propôs uma explicação para o mecanismo de produção de ATP nas mitocôndrias, a chamada hipótese quimiosmótica. Mitchell propôs que a energia dos elétrons era utilizada para conduzir o transporte vetorial de prótons através da membrana interna mitocondrial, criando uma força próton-motriz que, por sua vez, era usada por uma ATPase na síntese de ATP (Mitchell, 1961).

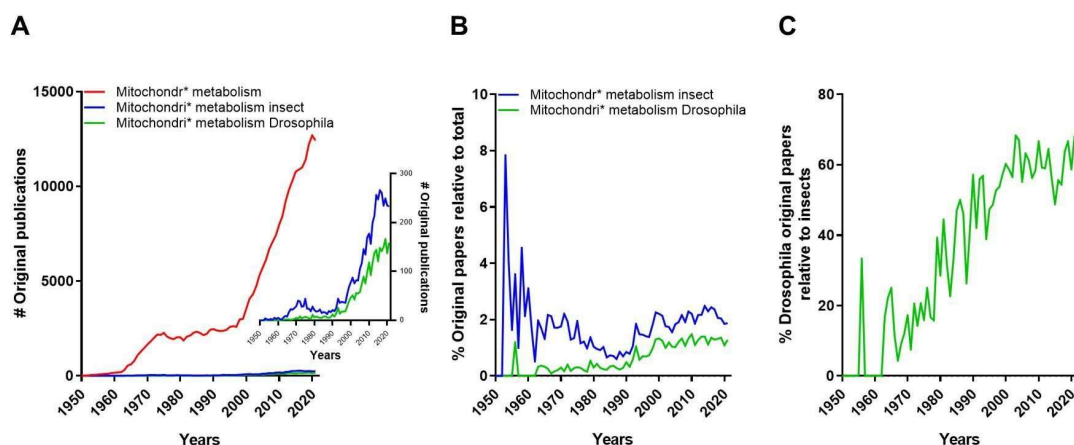


Figura 1: Evolução do conhecimento sobre a participação das mitocôndrias no metabolismo. A) Número de publicações originais, entre 1950 e 2021 em todos os organismos (linha vermelha), nos insetos (linha azul) e nas moscas *Drosophila* (linha verde). O *inset*, na figura A, destaca apenas as publicações em insetos e em *Drosophila*. B) Evolução percentual das publicações originais em insetos (linha azul) e em *Drosophila* (linha verde), em relação ao total de artigos originais publicados em todos os organismos. C) Evolução percentual das publicações originais em *Drosophila* (linha verde) em relação ao total de artigos originais publicados em insetos.

Fonte: Arquivo pessoal

A definição desse mecanismo, e a posterior comprovação experimental, levou à segunda mudança de paradigma, entre 1962 e 1975, quando temos um segundo aumento na quantidade de artigos publicados. Finalmente, consolidou-se a teoria quimiosmótica como o mecanismo responsável por acoplar a energia fornecida pela respiração à produção de ATP.

Seguiu-se, então, um período de crescimento quase estagnado nas publicações de metabolismo mitocondrial de, praticamente, 20 anos, refletindo a constante geração de conhecimento sobre o papel das mitocôndrias na homeostase energética. No entanto, o estabelecimento da quimiosmose manteve o volume de publicações ainda em um patamar elevado.

Embora o entendimento sobre a origem das mitocôndrias seja um assunto amplamente debatido, a primeira proposta, neste sentido, foi feita em 1967 pela pesquisadora Lynn Margulis, através da chamada “hipótese endossimbionte” da origem das organelas (Sagan, 1967). Ela propôs que as mitocôndrias surgiram por meio de interações simbióticas entre bactérias que respiravam e células eucarióticas primitivas. Essa hipótese é baseada em diversas evidências bioquímicas, celulares e evolutivas, tais como: i) a presença de um genoma próprio, com toda a maquinaria de transcrição e tradução independente do genoma nuclear; ii) a utilização de um código genético próprio e distinto do genoma nuclear; iii) a presença de duas membranas, o que sugere que a internalização das bactérias que respiravam pelas células eucarióticas primitivas tenha ocorrido através de um processo de fagocitose incompleta (pois não houve a destruição do invasor); iv) a composição muito parecida da membrana interna mitocondrial com as membranas de bactérias; e v) a semelhança, em termos estruturais do DNA mitocondrial, com o genoma de bactérias como, por exemplo, a forma circular e a organização mais compacta do conteúdo gênico. Embora a hipótese endossimbionte da origem mitocondrial seja a mais aceita pela comunidade, algumas propostas alternativas foram publicadas, como a “hipótese do hidrogênio da origem dos eucariotos”, de forma que esta não é a única proposta sobre a origem destas organelas (Martin and Müller, 1998).

As mitocôndrias são organelas que possuem uma estrutura muito peculiar que, em linhas gerais, pode ser representada pelo esquema apresentado na Figura 2. Observamos que as mitocôndrias possuem duas membranas, uma externa e outra interna, em que a última possui uma área bem maior. Por essa razão, a membrana interna mitocondrial se compacta na forma de cristas, invaginações que se projetam para a parte mais interna da organela, onde se localizam os componentes responsáveis pela respiração celular e pela produção de ATP (Wolf et al., 2019). O espaço delimitado entre essas duas membranas é

conhecido como espaço intermembranas e a região mais interna da organela é conhecida como matriz mitocondrial. Nesse local ocorrem inúmeras reações, incluindo aquelas do ciclo do ácido cítrico, replicação do genoma mitocondrial, dentre outras. É importante salientar que as duas membranas mitocondriais são bastante distintas do ponto de vista estrutural e funcional. Uma diferença marcante é a maior permeabilidade da membrana externa, que contrasta com a altíssima seletividade da membrana interna, onde o transporte de solutos somente ocorre através da atividade de carreadores mitocondriais específicos (Cunningham and Rutter, 2020; Mráček et al., 2013).

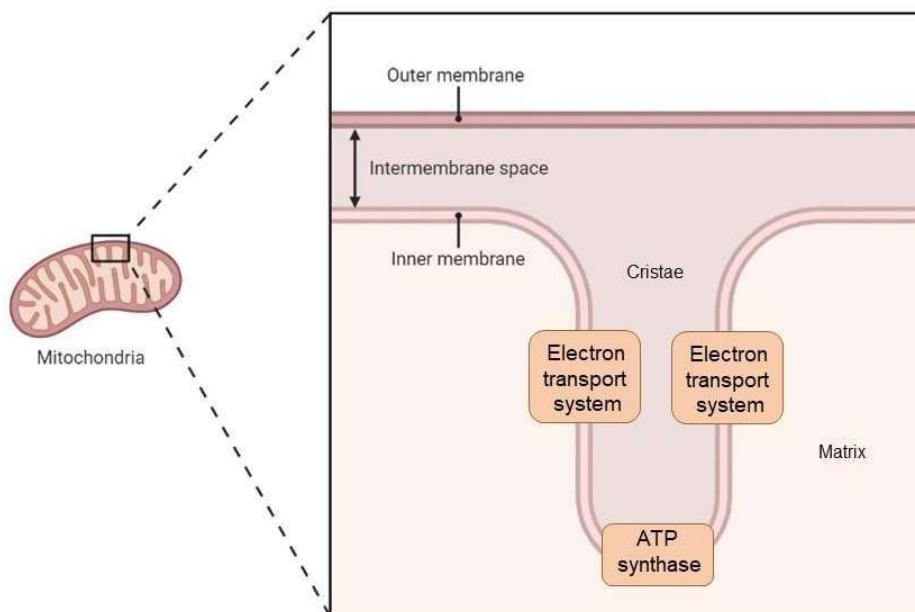


Figura 2: Organização estrutural das mitocôndrias. As mitocôndrias possuem duas membranas bastante distintas estrutural e funcionalmente: a membrana externa e a membrana interna mitocondrial. O espaço delimitado entre essas duas membranas é definido como espaço intermembranas. Como a área da membrana interna é maior do que a externa, ela se compacta em forma de cristas, que se projetam para o interior da organela. Os componentes-chave do processo de fosforilação oxidativa, os complexos do sistema de transporte de elétrons e da síntese de ATP se localizam exatamente nas cristas mitocondriais. A parte mais interna da organela é chamada de matriz mitocondrial.

Fonte: Arquivo pessoal. Figura gerada pelo *software* Biorender

As mitocôndrias apresentam uma heterogeneidade morfológica bastante ampla, adotando formas que vão desde organelas cilíndricas alongadas (ou fusionadas) até estruturas esféricas (ou fragmentadas). Essa diversidade morfológica é resultado de um complexo mecanismo que controla os processos de fragmentação e fusão das mitocôndrias, dependendo dos estímulos que ela recebe (Liesa and Shirihai, 2013). A quantidade de mitocôndrias que uma célula possui também é bastante variável, sendo ausente nas hemácias de mamíferos,

por exemplo, enquanto a ampla maioria das células eucarióticas possui inúmeras mitocôndrias. Um caso muito peculiar é dos tripanossomatídeos, parasitas unicelulares causadores de doenças tropicais, como a leishmaniose e a doença de Chagas, nos quais uma única e longa mitocôndria está presente em todas as fases do seu ciclo de vida (Alencar, 2022). Ainda do ponto de vista estrutural, sabemos que o genoma mitocondrial codifica uma quantidade bastante limitada de proteínas, quando comparado ao genoma nuclear. O tamanho do genoma mitocondrial dos metazoários é bastante próximo, em torno de 16.000 nucleotídeos. De fato, o tamanho do genoma da mosca-das-frutas *D. melanogaster* é de 19.517 pares de bases (pb), um pouco maior do que o humano de 16.559 pb (Chen et al., 2019). A Figura 3 mostra uma representação esquemática do genoma mitocondrial de *D. melanogaster* e humano, onde podemos observar o pequeno número de genes codificantes. Na vasta maioria dos animais, o DNA mitocondrial codifica apenas 13 proteínas, que participam da fosforilação oxidativa (OXPHOS), além de 24 componentes de RNA necessários à síntese proteica intramitocondrial.

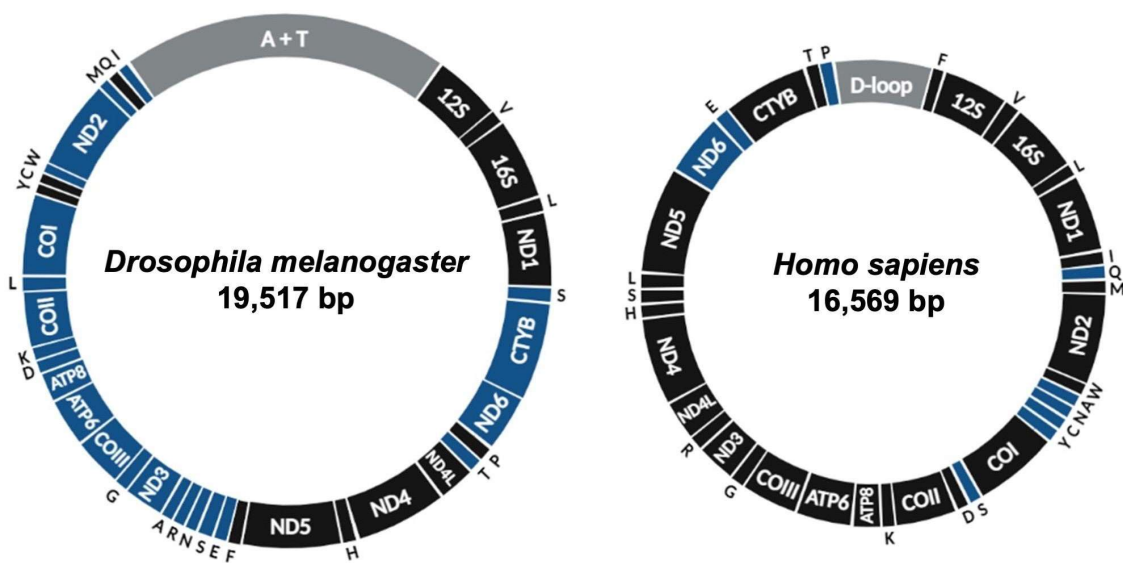


Figura 3: Organização estrutural do genoma mitocondrial de *D. melanogaster* e humano. As cores preta e azul identificam os genes codificados em fitas opostas do DNA. Genes codificadores de RNA de transferência estão representados por símbolos de uma única letra, e os genes dos RNA ribossômicos pequeno e grande aparecem como 12S e 16S, respectivamente. As regiões A+T e D-loop (em cinza) representam regiões não codificadoras.

Fonte: Modificado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36254835/>

A composição proteica das mitocôndrias humanas é numerosa e bastante diversa, composta por 1.136 proteínas diferentes (Rath et al., 2021). A maior parte das proteínas mitocondriais humanas se localizam na matriz e na membrana interna mitocondrial (46 e 32%, respectivamente). Já a membrana externa mitocondrial contém apenas 10% do proteoma mitocondrial, sublinhando a maior importância da membrana interna mitocondrial para a biologia desta organela (Rath et al., 2021). Considerando que a maior parte do proteoma mitocondrial (>99.9%) é codificada pelo genoma nuclear, entendemos que as mitocôndrias são organelas bastante integradas e dependentes de outras organelas celulares. De fato, as mitocôndrias interagem ativamente com o retículo endoplasmático, gotas lipídicas e lisossomos, com impactos diretos em inúmeros processos celulares como no metabolismo de cálcio, lipogênese dentre outros.

Mas as mitocôndrias foram, historicamente, associadas ao metabolismo energético e há uma razão clara para isto. Sabemos, hoje, que a maior parte da energia biologicamente disponível é transformada nas mitocôndrias dos eucariotos, através da oxidação completa dos nutrientes em dióxido de carbono (CO₂) e água (Kennedy and Lehninger, 1949). Nesse sentido, os macronutrientes são metabolizados em vias catabólicas, produzindo moléculas mais simples, que são transportadas por meio da membrana interna mitocondrial. Na matriz mitocondrial, possam ser totalmente oxidados pelas atividades das inúmeras desidrogenases mitocondriais, notadamente envolvidas nas reações do ciclo do ácido cítrico. Todo o potencial redutor dos substratos oriundos do metabolismo dos macronutrientes é convertido na redução de moléculas de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) ou Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) na matriz mitocondrial. Essas moléculas reduzidas são reoxidadas por complexos proteicos localizados na membrana interna mitocondrial e os elétrons são transportados por uma sequência de reações redox até o oxigênio molecular, gerando, ao final, água. Durante este transporte, a energia presente nos elétrons é utilizada pelos complexos proteicos para realizar o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (Mitchell, 1961; Mitchell and Moyle, 1965; Reid et al., 1966). Assim, um dos produtos da respiração celular é a formação de um gradiente eletroquímico de prótons, também chamado de força próton-motriz (Δp). Esse gradiente possui dois componentes: um elétrico ($\Delta \Psi_m$), considerando que os prótons possuem carga positiva, e o outro químico (ΔpH), resultado do acúmulo deste íon no espaço intermembranas. A energia da Δp é utilizada na produção de ATP, nas mitocôndrias, através do transporte de prótons do espaço intermembranas de volta para a matriz mitocondrial, mediado pelo complexo da F₁F_o-ATP sintase, localizado nas pontas das cristas mitocondriais (Blum et al., 2019; Mitchell and Moyle, 1965; Reid et al., 1966; Strauss et al., 2008).

Durante a passagem dos prótons pela F_1F_0 -ATP sintase, esse complexo sofre mudanças conformacionais que favorecem a ligação de fosfato inorgânico à adenosina difosfato (ADP), produzindo ATP (Boyer et al., 1973). A Figura 4 resume, de forma geral, os processos metabólicos que compõem a OXPHOS. Nesse sentido, é importante considerar que o metabolismo energético é regulado por fatores distintos e, geralmente, em várias etapas (Bioenergetics - 4th Edition). Portanto, as taxas respiratórias e a síntese de ATP mitocondrial são, basicamente, regulados por três fatores: (i) o fornecimento de substrato; (ii) o “vazamento” de energia realizado pelo transporte inespecífico de prótons; e (iii) a demanda de energia. Um modelo clássico de regulação metabólica estabelece que, com o aumento da demanda energética, os produtos de hidrólise de ATP (ADP e Pi) se ligam a sítios alostéricos de enzimas-chave reguladoras do metabolismo energético e, com isso, ativam as vias catabólicas. Esse modelo, conhecido como “modelo de regulação metabólica por adenilatos” prevê também que a redução da demanda energética resulta no acúmulo de ATP, que, por sua vez, reduz o fluxo de vias anabólicas. O resultado prático disso seria uma notável estabilidade dos níveis de ATP celular, mantendo a homeostase energética, mesmo durante grandes demandas de energia, como, por exemplo, durante o voo dos insetos (Sacktor and Hurlbut, 1966; Wegener et al., 1991).

Mecanicamente, duas possibilidades explicariam como a demanda energética regula as taxas respiratórias e o OXPHOS. A primeira delas postula que, sob alta demanda energética, o acúmulo de ADP ativa o complexo F_1F_0 -ATP sintase, para produzir ATP, usando a energia da Δp , mediante um mecanismo quimiosmótico (Mitchell, 1961). Nesse sentido, devemos considerar que a magnitude da Δp afeta, de maneira inversa, a frequência respiratória, de forma que, quanto maior a Δp , menor o transporte de elétrons e a respiração (Chance and Williams, 1955b; Lardy and Wellman, 1952; Mitchell, 1961). A explicação para esse fenômeno se baseia no fato de que alguns dos complexos proteicos envolvidos no transporte de elétrons são também responsáveis pelo transporte de prótons através da membrana interna. Considerando que o transporte de prótons é termodinamicamente desfavorável, ele só ocorre quando há o fornecimento de energia oriundo da passagem dos elétrons pelos complexos proteicos. Assim, quando a energia acumulada sob a forma de Δp é alta, significa que maior será a quantidade de energia a ser requerida pelos complexos proteicos para que o transporte de prótons possa ser feito. Uma vez que a quantidade de energia fornecida pelos elétrons é finita e quando ela se aproxima da energia acumulada pela Δp , o transporte de elétrons passa a ser reduzido (Bioenergetics - 4th Edition). A segunda possibilidade envolve a regulação alostérica de várias

enzimas mitocondriais pelo balanço da concentração de ATP/ADP (Arnold and Kadenbach, 1999, 1997; Gaviraghi et al., 2019; Hansford, 1972; Hansford and Chappell, 1968; Hansford and Sacktor, 1970). Ambas as possibilidades foram demonstradas, experimentalmente, em insetos voadores, fornecendo evidências que apoiam a existência de mecanismos de regulação da OXPHOS nesse grupo de organismos (Gaviraghi et al., 2019; Hansford, 1972; Hansford and Sacktor, 1970; Mesquita et al., 2021).

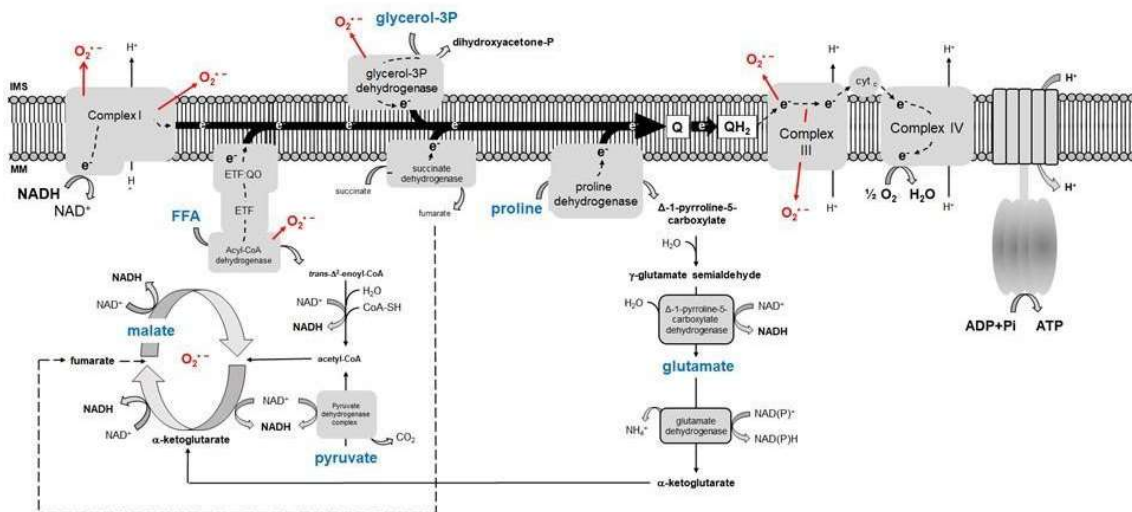


Figura 4: Representação esquemática da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e da produção de superóxido nas mitocôndrias de insetos voadores. Os principais substratos utilizados pela OXPHOS (piruvato, prolina, glicerol-3-fosfato, malato, e ácidos graxos livres, FFA) estão identificados em azul. Os principais sítios conhecidos de produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) estão identificados em vermelho. IMS, espaço intermembranas. MM, Matriz mitocondrial.

Fonte: Modificado de (Soares et al., 2015)

A terceira e última mudança de paradigma no conhecimento acerca das mitocôndrias ocorreu em 1996, quando se descobriu que componentes mitocondriais (citocromo c e o fator indutor de apoptose, AIF) eram capazes de desencadear a apoptose (Liu et al., 1996; Susin et al., 1996). O resultado dessas descobertas foi um aumento notável nas publicações sobre o metabolismo mitocondrial de ~2.500 artigos, em 1997, para ~ 12000, em 2021. Com isso, os papéis clássicos dessa organela foram expandidos para muito além do metabolismo energético, colocando a mitocôndria como uma das organelas mais importantes no contexto celular (Kowaltowski and Oliveira, 2020).

Uma outra característica importante das mitocôndrias é a sua enorme capacidade de utilização de oxigênio, que regula a homeostase desse gás no ambiente intracelular. Em geral, a maior parte do oxigênio consumido pelas células ocorre pela atividade do citocromo c oxidase, o complexo proteico

responsável pela respiração celular nas mitocôndrias (Mesquita et al., 2021). A redução completa do oxigênio se dá através da transferência de quatro elétrons, oriundos do citocromo c, gerado como produto a água. No entanto, uma parte do oxigênio utilizado pelas mitocôndrias é parcialmente reduzida a espécies intermediárias altamente reativas, dentre as quais a mais importante é o radical superóxido (Boveris et al., 1972; Boveris and Chance, 1973). Essa espécie química é, na realidade, um radical livre derivado do oxigênio que possui alta reatividade e, quando gerado no ambiente celular, provoca inúmeros danos (Kirby et al., 2002; Phillips et al., 1989). Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie química que possui, pelo menos, um orbital incompleto, que confere, intrinsecamente, uma alta reatividade. Por essa razão, os radicais livres são potencialmente danosos no ambiente celular, visto que podem modificar quimicamente diversas biomoléculas celulares, culminando com dano celular permanente. Além dos radicais livres derivados de oxigênio, as células também produzem outras espécies químicas coletivamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS englobam não somente os radicais livres derivados de oxigênio, mas também compostos dele derivados que não possuem elétrons desemparelhados, mas que podem gerar radicais livres centrados em oxigênio. Nesse sentido, as mitocôndrias representam os principais sítios de produção de ROS celulares. Além do seu potencial tóxico, elas desempenham inúmeros papéis fisiológicos e sinalizadores (Boveris et al., 1972; Boveris and Chance, 1973).

A produção de ROS mitocondrial ocorre, em grande parte, pelo “vazamento” de elétrons, durante as reações redox do sistema de transporte de elétrons (notadamente nos complexos I e III). Entretanto, condições patofisiológicas podem aumentar a produção de ROS mitocondrial, como resultado da redução do fluxo de elétrons na membrana interna mitocondrial ou, ainda, pelo aumento do Δp (Korshunov et al., 1997).

Características estruturais e funcionais das mitocôndrias nos insetos voadores

A evolução do conhecimento acerca do metabolismo mitocondrial em insetos difere, de certa maneira, do padrão observado nos outros organismos. Observamos, no *inset* da Figura 1A (linha azul), um aumento considerável nas publicações após a década de 1960, resultantes da descoberta do mecanismo quimiosmótico de Mitchell, mas que foi seguido de uma estabilidade entre as décadas de 1970 e 1990. Interpretamos esta estabilidade como uma certa perda

de interesse da comunidade da área de metabolismo como uma tentativa de consolidação do conhecimento bioenergético em outros modelos que não insetos. Verificamos, ainda, que a fração majoritária desse conhecimento em insetos foi gerada utilizando como modelo a mosca *Drosophila* (linha verde). A contribuição relativa dos insetos e de *Drosophila* na produção de conhecimento sobre o metabolismo mitocondrial é mostrado na Figura 1B.

Foi possível perceber, também, que os insetos foram mais utilizados como modelos para o estudo do metabolismo mitocondrial entre 1950 e 1960, sendo que, após esse período, a contribuição deste grupo praticamente não ultrapassou 2% da produção total de conhecimento. No caso de *Drosophila*, esse percentual praticamente chega a 1% de todo o conhecimento produzido sobre o metabolismo mitocondrial. Isso nos mostra que há um enorme campo a ser explorado sobre o metabolismo mitocondrial nos insetos. A Figura 1C destaca a contribuição relativa dos trabalhos publicados utilizando *Drosophila* como modelo de estudo para o entendimento do metabolismo mitocondrial em insetos. Houve, ainda, uma evolução distinta da contribuição relativa da *Drosophila*, que aumenta de forma consistente entre a década de 1960 e 2000, quando atinge cerca de 60%. Isso sublinha o enorme poder e a utilidade das ferramentas genéticas e de biologia celular existentes neste modelo, que a comunidade científica vem utilizando para entender os processos metabólicos nas mitocôndrias de insetos.

Os insetos possuem várias características metabólicas únicas, que vão além do seu mero uso como modelo para o estudo de doenças humanas. Na Tabela 1, vê-se algumas características funcionais das mitocôndrias de insetos voadores. Por exemplo, o transporte e a oxidação de dicarboxilatos, como o succinato, são bastante limitados nas mitocôndrias de músculos de voo (Ferguson et al., 2005; Tulp et al., 1971; Van den Bergh and Slater, 1962). Além disso, a oxidação do succinato em insetos adultos não parece estar acoplada à geração de $\Delta\Psi_m$, resultando em baixa eficiência da síntese de ATP mitocondrial (Hansford and Johnson, 1975; Kashi and Bond, 1979; Syromyatnikov et al., 2019). Por outro lado, a oxidação de succinato é alta no intestino médio das larvas da mariposa *Manduca sexta*, sendo drasticamente reduzida durante a metamorfose em pupas (Chamberlin, 2007). Além disso, o metabolismo mitocondrial de Ca^{2+} em insetos é bastante distinto dos mamíferos, uma vez que o transporte desse íon através da membrana interna mitocondrial e da posterior estimulação da respiração são muito baixos (Carafoli et al., 1971; Carafoli and Lehninger, 1971; Syromyatnikov et al., 2019).

Processos metabólicos	Referências
Limitado transporte e oxidação de succinato	(Tulp et al., 1971; van den BERGH and Slater, 1962)
Baixa eficiência da fosforilação oxidativa sustentada pela oxidação de succinato	(Hansford and Johnson, 1975; Kashi and Bond, 1979; Syromyatnikov et al., 2019)
Limitado transporte de Ca ²⁺ e de estimulação da respiração em algumas espécies de insetos	(Carafoli et al., 1971; Carafoli and Lehninger, 1971) (Syromyatnikov et al., 2019)
Alta capacidade de oxidação de glicerol fosfato para sustentar a respiração	(Masson et al., 2017; Soares et al., 2015)
Lançadeira glicerol fosfato como principal mecanismo de reciclagem de NAD ⁺ citosólico e respiração	(Kubista, 1957; Zebe and Mcshan, 1957)

Tabela 1: Algumas características funcionais das mitocôndrias de insetos.

Fonte: Arquivo pessoal

O estudo sobre o metabolismo mitocondrial, em insetos, foi absolutamente fundamental para identificar e definir o significado biológico do metabolismo de glicerol fosfato, principalmente nos músculos de voo (Estabrook and Sacktor, 1958, 1958; Kubista, 1957; Masson et al., 2017; Mráček et al., 2013; Zebe and Mcshan, 1957). Nesse sentido, as mitocôndrias de insetos têm uma capacidade notavelmente alta de oxidar glicerol-3-fosfato (G3P), que só é comparável ao tecido adiposo marrom de mamíferos (Mráček et al., 2013; Ohkawa et al., 1969). Análises comparativas entre adultos de diversas espécies de insetos voadores mostraram que a atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) e a produção de G3P são muito maiores do que a atividade da lactato desidrogenase (LDH) e os níveis de lactato (Kubista, 1957; Zebe and Mcshan, 1957).

É importante apontar que as atividades de G3PDH e LDH desempenham um papel central no balanço redox de NAD citossólico, favorecendo a manutenção do potencial redox de NAD mais oxidado, o que, por sua vez, permite a manutenção de vias metabólicas-chave, como a glicólise. Aparentemente, o uso preferencial do G3P como mecanismo de reciclagem de NAD⁺ citossólico confere uma vantagem adaptativa importante nos insetos voadores, uma vez que o alto fluxo glicolítico pode ser mantido, sem que haja a acidificação gerada pelo acúmulo de lactato, como ocorre em vertebrados.

Apesar das elevadíssimas taxas respiratórias observadas nos insetos voadores, a potência gerada pela contração mecânica, dividida pelo requerimento

energético oriundo do metabolismo energético (também chamado de “eficiência muscular”), é muito menor nos insetos do que nas aves (Harrison and Roberts, 2000; Sohal et al., 1972; Taylor et al., 1982). Estudos alométricos indicam que a eficiência muscular aumenta com o tamanho do corpo. Por exemplo, em humanos, a eficiência muscular é de ~70%, enquanto que, na ampla maioria dos insetos, a eficiência muscular é de ~10% (Ellington, 1985). Curiosamente, a capacidade termogênica parece seguir uma tendência oposta, uma vez que esta diminui com o aumento do tamanho corporal. Neste sentido, sabemos que diversas espécies de insetos voadores são homeotérmicas endotérmicas, ou seja, mantêm a temperatura corpórea através da ativação de mecanismos internos. No caso dos insetos voadores, esses contrastam com os insetos terrestres não alados, que são essencialmente peilotérmicos ectotérmicos (Harrison and Roberts, 2000). Esses padrões fisiológicos nos levam a concluir que parte da energia disponibilizada pelas elevadas taxas respiratórias se dissipa como calor. Portanto, para compensar essa eficiência muscular reduzida, os insetos voadores aumentam sua capacidade de extrair energia da oxidação de nutrientes nas mitocôndrias. Uma observação interessante do papel termogênico da respiração em um inseto voador é exemplificada nas mamangavas *Bombus terrestris*. Em vez de conservar a energia da oxidação de nutrientes como ATP, as mamangavas, quando são expostas ao frio, respiram G3P para produzirem calor (Masson et al., 2017). Uma vez que a oxidação mitocondrial de G3P é intrinsecamente menos acoplada à produção de ATP do que outros substratos, a termogênese pré-voo é facilitada, permitindo que os músculos de voo se aqueçam em climas frios (Gaviraghi et al., 2019; Gaviraghi and Oliveira, 2019; Masson et al., 2017; Miwa et al., 2003; Soares et al., 2015).

Embora o “modelo de regulação metabólica por adenilatos” seja observado em diversos organismos, ele não parece ser o mecanismo principal de manutenção da homeostase energética nos insetos voadores (Eanes et al., 2006; Gaviraghi et al., 2019; Hochachka, 2019; Hochachka et al., 1993; Mesquita et al., 2021). Por exemplo, sabe-se que, durante o voo, as taxas respiratórias dos insetos aumentam centenas de vezes, o que contrasta com a aparente manutenção dos níveis de adenilato (Sacktor and Hurlbut, 1966; Wegener et al., 1991). Além disso, no caso dos gafanhotos *Schistocerca gregaria* mantidos sob anóxia, os níveis de AMP, ADP e Pi aumentam e os de ATP diminuem. Essas observações colocam em xeque o “modelo de regulação metabólica por adenilatos”, uma vez que os mecanismos envolvidos na reciclagem de ATP não foram ativados como previsto (Hochachka et al., 1993). Mas, se o controle do fluxo respiratório não parece depender das variações dos níveis de adenilato, como

explicar o estupendo aumento do consumo de oxigênio durante o voo dos insetos? Uma explicação plausível é a enorme quantidade de enzimas do metabolismo energético, particularmente no músculo de voo. Experimentos utilizando linhagens de *Drosophila* mutantes para diversas enzimas do metabolismo energético demonstraram que a frequência de batimento das asas, praticamente, não se altera quando a expressão dessas enzimas é reduzida em ~90%. Isso nos leva a concluir que o músculo de voo dos insetos possui um excesso de enzimas metabólicas para sustentar o voo (Eanes et al., 2006). Essas observações estão de acordo com as propostas anteriores, que sugerem que a concentração de enzimas do metabolismo energético $[E]$ seria o principal regulador das taxas de reciclagem de ATP nos insetos voadores (Crabtree and Newsholme, 1972; Hochachka, 2019; Suarez et al., 1996). Assim, os fluxos metabólicos extremamente elevados dos insetos, durante o voo, podem ser alcançados com $[E]$ muito maiores e com atividades muito mais próximas das suas respectivas V_{\max} do que as mesmas enzimas nos mamíferos.

***Drosophila melanogaster*: um maravilhoso modelo para estudos de metabolismo em insetos, mamíferos e além**

Dentre os insetos utilizados nas mais diversas áreas das ciências biológicas e biomédicas, nenhum tem sido tão bem estudado ao longo dos anos quanto a *Drosophila*. Muitas vezes, referida como mosca-das-frutas ou drosófila no Brasil, é a espécie *D. melanogaster* (Acalyptratae: Drosophilidae) que encabeça pesquisas científicas em todo o mundo. Esse organismo foi, inicialmente, usado como modelo para a confirmação dos princípios da hereditariedade e para o estabelecimento dos conceitos básicos da genética de populações e da teoria sintética da evolução. Atualmente, oferece a cientistas a possibilidade de compreensão dos mais variados mecanismos celulares, do desenvolvimento e funcionamento do sistema imune inato à neurogênese e tumorigênese em animais. Isso se deve a vários fatores, mas, principalmente, ao fato da drosófila ter um genoma e vários transcriptomas tecido-específicos sequenciados de alta qualidade, à facilidade de edição genômica (amplamente expandida pela tecnologia CRISPR¹, e da manipulação da expressão gênica, através do sistema *UAS/GAL4* e de outros sistemas de expressão transgênica² para estudos funcionais. Além disso, é importante destacar a existência do

¹<https://wiki.flybase.org/wiki/FlyBase:CRISPR>

²<https://bdsc.indiana.edu/stocks/uas/index.html> e <https://bdsc.indiana.edu/stocks/gal4/index.html>

FlyBase³ (Gramates et al., 2022), um banco de dados curado e aberto, que integra informações morfológicas, moleculares e tecnológicas relacionadas à grande maioria dos quase 14.000 genes codificadores de proteínas dessa espécie. Desses, mais de 70% são também encontrados em genomas de outros dípteros, tais como *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, e de outros insetos, como *Tribolium castaneum* e *Apis mellifera* (Tribolium Genome Sequencing Consortium et al., 2008). Ademais, quase 60% dos genes codificadores de proteínas de *D. melanogaster* são ortólogos de genes humanos e de camundongos, e ~75% de genes humanos associados à doenças possuem, pelo menos, um ortólogo em drosófila, fato que tem proporcionado a modelagem de doenças humanas com certo sucesso nessa espécie (Ugur et al., 2016).

Esse conjunto de genes conservados ajuda no desenvolvimento e funcionamento de sistemas e de órgãos em drosófilas. Esses sistemas são homólogos ou análogos em outros insetos e, até mesmo, em seres humanos e outros mamíferos. Por exemplo, o sistema nervoso central é o grande responsável pelo controle de diversos processos fisiológicos e metabólicos desse e de outros animais, produzindo moléculas sinalizadoras, hormônios e diversas macromoléculas importantes para a locomoção, memória de curto e longo prazo, os sentidos, entre outros (Gillette et al., 2021; Gutierrez et al., 2007). O coração, assim como em humanos e em outros vertebrados, funciona tal qual uma bomba (embora mecanisticamente bem mais simples em *Drosophila*), que impulsiona nutrientes e hormônios por meio da circulação (hemolinfa) para todo o corpo. Por fim, os oenócitos são células bem parecidas com os hepatócitos de mamíferos, atuando, principalmente, no metabolismo de carboidratos e lipídeos (Gutierrez et al., 2007).

Mas, além dessa conservação genética, as drosófilas possuem um ciclo de vida relativamente rápido (9-10 dias a 25°C), que permite a análise de diferentes gerações em poucas semanas, e um cultivo em laboratório fácil e barato (Drummond-Barbosa and Tennessen, 2020; Gálíková and Klepsatel, 2018), sem a necessidade de aprovação dos trabalhos por comitês de ética. No Brasil, o uso de linhagens transgênicas de drosófila em pesquisa requer uma área com nível 1 de biossegurança e a aprovação pelo comitê interno de biossegurança da instituição⁴. No entanto, mesmo com esse nível de burocracia que é inerente a todo trabalho com organismos geneticamente modificados no país, o apelo para o uso desse organismo para o estudo de fenômenos importantes em biologia animal e biomedicina ainda é grande.

³<http://flybase.org>

⁴https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/decreto/d5591.htm

Em termos metabólicos, por alternar as fases do ciclo de vida entre sistemas nutricionais abertos e fechados, *D. melanogaster* oferece uma ampla oportunidade para análise de fatores externos e internos, ao desenvolvimento e funcionamento de tecidos e órgãos diversos (Gillette et al., 2021). De forma breve, como todo inseto holometábolo, seu ciclo de vida é grosseiramente dividido em 4 fases: embrião, larva, pupa e adulto. A fase de embrião, que dura ~24 horas, é pautada pela rápida divisão celular e reorganização destas células para a formação das estruturas iniciais, que darão origem aos tecidos larvais maduros. Será, então, só na fase de larva que esse organismo conseguirá (e precisará), pela primeira vez, buscar fontes de alimento do ambiente para a sustentação de um crescimento exorbitante, com um acúmulo massivo de biomassa, que ocorre em três ínstaes e se finaliza em torno de 3 a 4 dias. A larva ainda precisa comer o suficiente para garantir a nutrição do organismo na próxima fase do ciclo, a pupa, que também representa um sistema metabólico fechado. No período pupal, a degradação inicial dos tecidos larvais e a biossíntese dos tecidos do adulto são processos energeticamente custosos, que duram cerca de 5 dias. O adulto, que emerge da pupa, necessita novamente obter nutrientes do ambiente para sobrevivência e, principalmente, para a reprodução e a locomoção (Gillette et al., 2021).

A transição entre as fases do ciclo de vida e o desenvolvimento de tecidos e órgãos são controlados por diversos hormônios. Talvez os mais interessantes sejam os homólogos da insulina, os *Drosophila insulin-like peptides* (DILP), que são codificados por oito genes distintos e que possuem os mais variados papéis na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos (Garofalo, 2002; Texada et al., 2020). Os mecanismos de ação dos DILP parecem ser semelhantes, uma vez que sete deles se ligam e ativam o homólogo do receptor de insulina (InR) nos mais diversos tecidos de drosófila (Nässel et al., 2013; Rehman and Varghese, 2021). As principais fontes de produção desses hormônios são um conjunto de sete células do sistema nervoso central denominadas de células produtoras de insulina (IPC) (Nässel et al., 2013; Nässel and Vanden Broeck, 2016; Rehman and Varghese, 2021). Além das IPC, o corpo gorduroso e os discos imaginais também são capazes de produzir algumas isoformas de DILP, como a DILP6 e DILP8, respectivamente (Colombani et al., 2012; Slaidina et al., 2009). Neurônios secretores também irrigam componentes da glândula anelar que atuam no metabolismo, produzindo o hormônio adipocinético, um hormônio com atividade semelhante ao glucagon de mamíferos (Gáliková et al., 2015; Lee and Park, 2004). Esse hormônio tem papel regulador da saciedade do inseto, além de modular o comportamento de busca por alimentos.

Um dos componentes da glândula anelar, a glândula protorácica, produz a ecdisona, que tem ação ampla em diversos tecidos, principalmente durante o desenvolvimento. A ecdisona é liberada em picos e convertida na sua forma ativa, a 20-hidroxiecdisona, que inicia as cascatas metabólicas necessárias para a passagem de uma fase do ciclo de vida para a próxima (King-Jones and Thummel, 2005).

Nesse sentido, a análise da mudança de fases, ao longo do ciclo de vida da drosófila, viabiliza o entendimento da ação dos pulsos hormonais. O sistema nutricional e metabólico fechado representado pelo embrião funciona com base nas reservas nutritivas oriundas da mãe no ovo. Assim, mesmo que haja alguma escassez de nutrientes no local onde a oviposição ocorreu, o embrião continuará se desenvolvendo de maneira adequada, desde que a mãe tenha produzido ovos com reservas ideais, principalmente na forma de glicogênio e triglicerídeos (Drummond-Barbosa, 2019; Gillette et al., 2021; Sieber and Spradling, 2017). Vias metabólicas ligadas à quebra dessas macromoléculas são bem importantes para o embrião, para a obtenção de ATP e das demais biomoléculas necessárias ao desenvolvimento embrionário (An et al., 2014; Tennessen et al., 2014). Em termos bioenergéticos, a β -oxidação de ácidos graxos mitocondrial possui um grande destaque, gerando metabólitos reduzidos, que podem alimentar a OXPHOS diretamente, e acetil-CoA, que, por sua vez, pode ser oxidada no ciclo do ácido cítrico, alimentando ainda mais a produção de ATP via OXPHOS. A quebra do glicogênio disponibiliza glicose-6-fosfato, que pode ser convertida, via glicólise, em piruvato e, também, alimentar o ciclo do ácido cítrico nas mitocôndrias, seja via formação de mais acetil-CoA, através da piruvato desidrogenase, de oxaloacetato, por meio da piruvato carboxilase, ou de malato, através da enzima málica mitocondrial (Gillette et al., 2021; Tennessen et al., 2014). Dessa forma, o embrião passa a dispor de uma grande quantidade de energia capaz de sustentar os processos necessários para as divisões celulares, como, por exemplo, a movimentação do citoesqueleto, que orienta as fases da mitose, e a síntese de ácidos nucleicos e de novas proteínas.

Com o fim da fase embrionária, o pulso de ecdisona, em conjunto com a ação de outros hormônios, levam à diminuição da expressão de enzimas da β -oxidação e um aumento marcante da expressão de genes ligados ao metabolismo de carboidratos (Tennessen et al., 2014; Tennessen and Thummel, 2011). O indivíduo, na fase inicial de larva, passa, então, a obter alimento ativamente do ambiente, principalmente na forma de açúcares e de outros carboidratos presentes em frutas para sustentar os processos de biossíntese, que levam a um ganho exponencial de peso, podendo chegar a 200 vezes o tamanho corporal,

quando se compara indivíduos no início do primeiro ínstar larval a indivíduos em fase de pré-pupa (Chakraborty et al., 2021). Assim como a maioria das células tumorais humanas, o crescimento rápido das larvas de drosófila é sustentado por um forte metabolismo glicolítico, com papel importante para a conversão de piruvato a lactato, através da enzima LDH (Tennessee and Thummel, 2011). Através das reações de fosforilação a nível do substrato, a produção contínua e suficiente de ATP garante o rápido crescimento corpóreo da larva. Essa oxidação parcial de monossacarídeos também permite suas conversões em outras biomoléculas, tais como ácidos graxos usados na síntese de triglicerídeos, que serão estocados no corpo gorduroso. Além disso, esses açúcares provindos da alimentação larval podem ser oxidados parcialmente, por meio da via das pentoses-fosfato, contribuindo para a síntese de nucleotídeos, ou usados na síntese de glicogênio (Yamada et al., 2019). A enzima glicogênio sintase, por exemplo, merece especial atenção por utilizar as moléculas de glicose excedentes para formar o estoque de glicogênio larval. Esse acúmulo de biomassa e armazenamento de glicogênio e lipídios é crucial para a próxima fase do ciclo de vida, a pupa, já que, assim como o embrião, nessa fase o indivíduo também não se alimenta, dependendo, portanto, da metabolização das reservas geradas pela larva para toda energia necessária para a realização da metamorfose (Heier and Kühnlein, 2018; Mattila and Hietakangas, 2017).

Como a atividade da LDH desempenha um importante papel no crescimento larval, é possível especular que pelo menos algumas vias metabólicas mitocondriais não sejam determinantes para o metabolismo das larvas. Alterações genéticas que propiciam um declínio na expressão de enzimas do ciclo do ácido cítrico não causam alterações importantes no desenvolvimento larval (Duncan et al., 2017; Wang et al., 2010). Entretanto, é notável a importância de vias catapleróticas e de um certo nível de OXPHOS funcional para o completo desenvolvimento larval. O citrato, formado na primeira reação do ciclo do ácido cítrico, é usado no citoplasma como substrato da enzima citrato liase ATPCL para síntese de acetil-CoA, que por sua vez serve de material para a síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, triglicerídeos. Depleção dos níveis normais de ATPCL é letal para as larvas (Saari et al., 2019). Apesar do *knockdown* de subunidades periféricas do citocromo c oxidase, como Cox7a, não parecer interferir com o desenvolvimento larval, as larvas não conseguem passar do primeiro ínstar na ausência de subunidades centrais deste complexo, como Cox4 (Kemppainen et al., 2014). Assim como para tumores, a reoxidação de NADH mitocondrial e coenzima Q pelo sistema de transporte de elétrons da mitocôndria parece ser essencial também para a continuação do ciclo do ácido cítrico e da cataplerose larval.

Larvas de drosófilas também possuem uma grande plasticidade metabólica, tanto no nível celular quanto fisiológico (Tennessee and Thummel, 2011; Texada et al., 2020). Nesse sentido, observamos que a deleção do gene codificador da LDH promove um remodelamento metabólico das células larvais, de forma a regenerar NAD⁺ citossólico através da lançadeira glicerol fosfato (GPSH) (Li et al., 2019). Curiosamente, respostas metabólicas semelhantes são observadas em células tumorais, após a inibição farmacológica da LDH (Billiard et al., 2013; Boudreau et al., 2016). No nível fisiológico, a ausência de ganho de peso ideal pode levar ao uso das reservas de glicogênio geradas até então, para que ATP seja produzido e as funções metabólicas basais continuem garantindo a sobrevivência do indivíduo (Matsuda et al., 2015). A utilização dessas reservas gera um atraso no desenvolvimento e um prolongamento da fase de pupa, com formação de indivíduos adultos de menor tamanho corpóreo (Gillette et al., 2021; Matsuda et al., 2015). Diante de tais restrições nutricionais, o desenvolvimento de órgãos internos das larvas, principalmente do sistema nervoso, são priorizados, de modo que, por mais que o indivíduo venha a apresentar um tamanho reduzido, quando comparado a indivíduos com nutrição repleta, ele ainda será capaz de completar o ciclo de vida, sem grandes limitações (Cheng et al., 2011; Lanet and Maurange, 2014). Nessas condições, o corpo gorduroso produz uma série de citocinas, que caem na hemolinfa e são captadas pelas IPC no sistema nervoso central, induzindo a produção de DILP. Isso estimula o animal a procurar novas fontes de alimentação e a continuar se alimentando, até que o peso crítico seja alcançado para o término adequado do desenvolvimento larval e a passagem para a fase de pupa (Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002).

Quando a larva atinge ou ultrapassa o peso crítico, atingindo condições, portanto, de sustentar a metamorfose, os níveis de DILPs caem drasticamente, assim como os níveis de um outro hormônio que também influencia o comportamento larval, o hormônio juvenil (Nijhout and Williams, 1974; Riddiford et al., 2003). Essa queda é um sinal para que a larva pare de se alimentar e encontre um local apropriado para a fase de pupa. Interessantemente, a produção do hormônio juvenil, nas células neurosecretoras da corpora allata, parte da glândula protorácica, é regulada por DILP, já que, quando os níveis destes últimos caem na hemolinfa, a sinalização via InR, na corpora allata, não mais ocorre, levando à queda na produção de hormônio juvenil (Tu et al., 2005). Em suma, com o peso ideal e a sinalização precisa de hormônios, a fase de larva chega ao fim, permitindo que a fase de pupa se instale.

Por definição, a metamorfose envolve mudanças drásticas na morfologia do organismo, quando estruturas imaturas são alteradas e dão origem às

estruturas dos indivíduos adultos. Mas, no caso de drosófila e de outros insetos holometábolos, ela também representa o ápice das mudanças metabólicas pelas quais o organismo passa (Chamberlin, 2007). Mais uma vez, um pulso do hormônio ecdisona parece ser um dos mecanismos principais por trás dessas mudanças: as enzimas glicolíticas e outras associadas ao catabolismo de glicose, incluindo a LDH, são drasticamente diminuídas no início da fase de pupa, e isso pode estar intimamente ligado ao controle da degradação dos tecidos larvais (Gillette et al., 2021; Li et al., 2017). Concomitantemente, os níveis de trealose na hemolinfa também caem. Apesar de ser esperado que isso ocorra passivamente com a cessação da ingestão de nutrientes, é possível que também haja um mecanismo ativo envolvido nessa queda, já que indivíduos com algum tipo de mutação no sistema de transporte da trealose apresentam defeitos na formação da pupa (Nishimura, 2020).

Tendo em vista a complexidade dos processos de degradação tecidual e o surgimento de novas estruturas durante a metamorfose, nota-se, novamente, a importância de vias centrais do metabolismo. A histólise das glândulas salivares larvais no início da fase de pupa, por exemplo, parece estar intimamente relacionada ao declínio dos níveis das enzimas do ciclo do ácido cítrico nesse tecido, como se o último gerasse uma espécie de sinalização para a ocorrência do primeiro. Moscas que apresentam algum tipo de problema ou mutação que altere a expressão das enzimas do ciclo do ácido cítrico encontram uma grande dificuldade para a degradação das glândulas salivares larvais e, com isso, o processo de metamorfose não ocorre de maneira correta (Duncan et al., 2017; Wang et al., 2010). Por outro lado, a degradação de glicogênio parece não representar um fator primordial para o controle da degeneração dos tecidos larvais e posterior formação dos tecidos adultos. Por isso mesmo, eventualmente, a metamorfose de drosófilas com alguma deficiência no metabolismo do glicogênio ocorre sem maiores problemas (Storelli et al., 2019).

A biossíntese dos tecidos adultos, na segunda parte da metamorfose, principalmente a musculatura torácica e o sistema nervoso, envolve a biogênese de uma quantidade expressiva de mitocôndrias. O adulto de drosófila e de outros insetos, em geral, são animais extremamente atléticos, que demandam uma quantidade relativamente alta de alimento para o fornecimento da energia necessária ao voo, via OXPHOS. Nos músculos diretos e indiretos do voo, por exemplo, um terço da massa do tecido pode ser atribuído a essas organelas (Levenbook and Williams, 1956). É nesta fase final do desenvolvimento pupal ou no início da fase adulta que, geralmente, problemas genéticos relacionados ao funcionamento da OXPHOS são expressos, comumente levando a letalidade dos

indivíduos (Kemppainen et al., 2014). De dentro da pupa, o indivíduo adulto imaturo precisa ter força muscular suficiente e coordenação neurolocomotora para sua emergência. As falhas nesse processo são um dos motivos mais comuns da letalidade nos estágios tardios da pupa, exemplificando, mais uma vez, a importância do indivíduo gerar um estoque de biomassa adequado durante o estágio larval. Interessantemente, a maioria dos triglicerídeos que são estocados na larva acabam não sendo usados como combustível para geração de ATP via OXPHOS (Carvalho et al., 2012), como postulado anteriormente. Eles parecem ser convertidos em ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia muito longa, que ajudam na proteção do adulto contra ressecamento e desidratação, um processo aparentemente homólogo àquele que contribui com a impermeabilização da epiderme em mamíferos, regulado pelo mesmo receptor nuclear HNF4 (Storelli et al., 2019).

Com a metamorfose devidamente concluída e a emergência do adulto, o indivíduo passa, novamente, a ter a necessidade de se alimentar, mantendo um sistema metabólico e nutricional aberto, assim como na fase de larva. Entretanto, para um indivíduo recém-emergido, encontrar novas fontes de alimento, de imediato, pode ser retardado pelo fato de suas asas não se distenderem por completo por até oito horas após a emergência da pupa. O animal, então, precisa permanecer parado ou se movimentar apenas com as pernas, sem definir pela possível escassez de nutrientes durante um tempo significativo, até que consiga alçar voo e encontrar novas fontes de alimentação (Aguila et al., 2007; Oliveira et al., 2021). Nessa configuração, os estoques de biomassa larval são, mais uma vez, de suma importância. Em indivíduos bem alimentados na fase de larva, mesmo que todas as estruturas larvais tenham definido por conta da metamorfose, as células do corpo gorduroso larval permanecem ativas quando adulto jovem por um período após a emergência (Aguila et al., 2007; Oliveira et al., 2021). As reservas dessas células servem, nesse caso, como a fonte primordial de energia do organismo, através da disponibilização de ácidos graxos para a circulação (Storelli et al., 2019).

Com a expansão das asas e uma nutrição apropriada, os indivíduos adultos concomitantemente atingem a maturidade sexual e saem em busca de possíveis parceiros para reprodução, fechando o ciclo de vida. Do ponto de vista metabólico, a gametogênese e a reprodução apresentam suas próprias complexidades metabólicas, principalmente no que se refere ao papel das mitocôndrias. Por exemplo, apesar da ovogênese envolver uma biogênese mitocondrial muito intensa, as células germinativas femininas mantêm um metabolismo glicolítico bem basal. Isso porque, as mitocôndrias recém formadas só entram em

funcionamento, mesmo depois da fecundação e oviposição, quando o embrião iniciar seu desenvolvimento. As fêmeas, portanto, assim como em outras espécies animais, acabam investindo grandes quantidades de recursos para a produção de ovos e para a busca por um local seguro para a oviposição (Rehman and Varghese, 2021). No caso dos espermatozoides, suas duas únicas mitocôndrias representam muito mais do que um *hub* metabólico. Cada uma pode atingir até 2 milímetros de comprimento e servir de estrutura de ancoramento para a rede de microtúbulos que sustenta o desenvolvimento e o funcionamento da cauda deste gameta (Noguchi et al., 2011). E, para que a fecundação ocorra, os machos precisam cortejar as potenciais parceiras por meio do bater de asas e de danças realizadas em voos coordenados. Mutações que afetam o funcionamento da mitocôndria, como as descritas para o gene *tko*, codificador da proteína ribossomal mitocondrial S12, são exemplos bem interessantes de como disfunções dessa organela podem impedir que machos consigam realizar esse tipo de cortejo, mesmo tendo espermatozoides aparentemente saudáveis (Toivonen et al., 2001).

Em suma, *D. melanogaster* possui uma complexidade metabólica que viabiliza a passagem das diferentes fases do desenvolvimento, típica de insetos holometábolos, mas construída a partir de enzimas, na grande maioria, codificadas por genes órtologos de mamíferos e, possivelmente, encontrados em todos os animais.

Considerações finais

As mitocôndrias desempenham papéis centrais no controle da homeostase energética e de redox celular. Nos insetos voadores, estas organelas possuem características únicas, tais como: i) a menor dependência do metabolismo de Ca^{2+} ; ii) a elevada capacidade de oxidação de G3P como principal mecanismo de reciclagem de NAD^+ citossólico; iii) a capacidade termogênica dependente da utilização de G3P; e iv) a alta concentração de enzimas do metabolismo energético como o principal controlador das elevadas taxas de reciclagem de ATP. Muitas dessas características puderam ter sido descritas em mais detalhes genético-bioquímicos por causa da versatilidade oferecida por *Drosophila*, um organismo que está entre os modelos animais mais bem estudados. Acreditamos, ainda, que muitas outras características comuns entre mitocôndrias de insetos e únicas dessa organela em algumas espécies virão a ser descritas no futuro, nos ajudando a compreender sua fascinante diversidade estrutural e funcional.

Referências

- Aguila, J.R., Suszko, J., Gibbs, A.G., Hoshizaki, D.K., 2007. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 210, 956–963. <https://doi.org/10.1242/jeb.001586>.
- Alencar 2022 MitoFit - Bioblast [WWW Document], n.d. URL https://www.bioblast.at/index.php/Alencar_2022_MitoFit (accessed 9.20.22).
- An, P.N.T., Yamaguchi, M., Bamba, T., Fukusaki, E., 2014. Metabolome analysis of *Drosophila melanogaster* during embryogenesis. *PLoS One* 9, e99519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099519>.
- Arnold, S., Kadenbach, B., 1999. The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically¹This paper is dedicated to Professor Britton Chance, the pioneer in the research on mitochondrial respiration.1. *FEBS Lett.* 443, 105–108. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01694-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01694-9).
- Arnold, S., Kadenbach, B., 1997. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 249, 350–354. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x>.
- Beenackers, A.M.Th., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J.A., 1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 14, 243–260. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90057-X).
- Billiard, J., Dennison, J.B., Briand, J., Annan, R.S., Chai, D., Colón, M., Dodson, C.S., Gilbert, S.A., Greshock, J., Jing, J., Lu, H., McSurdy-Freed, J.E., Orband-Miller, L.A., Mills, G.B., Quinn, C.J., Schneck, J.L., Scott, G.F., Shaw, A.N., Waitt, G.M., Wooster, R.F., Duffy, K.J., 2013. Quinoline 3-sulfonamides inhibit lactate dehydrogenase A and reverse aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Metab.* 1, 19. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-19>.
- Bioenergetics - 4th Edition [WWW Document], n.d. URL <https://www.elsevier.com/books/bioenergetics/nicholls/978-0-12-388425-1> (accessed 9.20.22).
- Blum, T.B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K.M., Kühlbrandt, W., 2019. Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 4250–4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>.
- Bomphrey, R.J., Nakata, T., Phillips, N., Walker, S.M., 2017. Smart wing rotation and trailing-edge vortices enable high frequency mosquito flight. *Nature* 544, 92–95. <https://doi.org/10.1038/nature21727>.
- Boudreau, A., Purkey, H.E., Hitz, A., Robarge, K., Peterson, D., Labadie, S., Kwong, M., Hong, R., Gao, M., Del Nagro, C., Pusapati, R., Ma, S., Salphati, L., Pang, J., Zhou, A., Lai, T., Li, Y., Chen, Z., Wei, B., Yen, I., Sideris, S., McClelland, M., Firestein, R., Corson, L., Vanderbilt, A., Williams, S., Daemen, A., Belvin, M., Eigenbrot, C., Jackson, P.K., Malek, S., Hatzivassiliou, G., Sampath, D., Evangelista, M., O'Brien, T., 2016. Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 12, 779–786. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2143>.

Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716. <https://doi.org/10.1042/bj1340707>.

Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617–630. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>.

Boyer, P.D., Cross, R.L., Momsen, W., 1973. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 2837–2839. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.10.2837>.

Carafoli, E., Hansford, R.G., Sackton, B., Lehninger, A.L., 1971. Interaction of Ca²⁺ with blowfly flight muscle mitochondria. *J. Biol. Chem.* 246, 964–972.

Carafoli, E., Lehninger, A.L., 1971. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem. J.* 122, 681–690. <https://doi.org/10.1042/bj1220681>.

Carvalho, M., Sampaio, J.L., Palm, W., Brankatschk, M., Eaton, S., Shevchenko, A., 2012. Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. *Mol. Syst. Biol.* 8, 600. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.29>.

Chakraborty, A., Sgrò, C.M., Mirth, C.K., 2021. The proximate sources of genetic variation in body size plasticity: The relative contributions of feeding behaviour and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 135, 104321. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104321>.

Chamberlin, M.E., 2007. Changes in mitochondrial electron transport chain activity during insect metamorphosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1016-1022. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00553.2006>.

Chance, B., Williams, G.R., 1955a. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217, 383–393.

Chance, B., Williams, G.R., 1955b. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J. Biol. Chem.* 217, 409–427.

Chen, Z., Zhang, F., Xu, H., 2019. Human mitochondrial DNA diseases and *Drosophila* models. *J. Genet. Genomics, Drosophila and Human Diseases* 46, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.03.009>.

Cheng, L.Y., Bailey, A.P., Leever, S.J., Ragan, T.J., Driscoll, P.C., Gould, A.P., 2011. Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell* 146, 435–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.040>.

Colombani, J., Andersen, D.S., Léopold, P., 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336, 582–585. <https://doi.org/10.1126/science.1216689>.

- Crabtree, B., Newsholme, E.A., 1972. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 126, 49–58. <https://doi.org/10.1042/bj1260049>.
- Cunningham, C.N., Rutter, J., 2020. 20,000 picometers under the OMM: diving into the vastness of mitochondrial metabolite transport. *EMBO Rep.* 21, e50071. <https://doi.org/10.15252/embr.202050071>.
- Drummond-Barbosa, D., 2019. Local and Physiological Control of Germline Stem Cell Lineages in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 213, 9–26. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300234>.
- Drummond-Barbosa, D., Tennessen, J.M., 2020. Reclaiming Warburg: using developmental biology to gain insight into human metabolic diseases. *Dev. Camb. Engl.* 147, dev189340. <https://doi.org/10.1242/dev.189340>.
- Dudley, R., 1998. Atmospheric oxygen, giant Paleozoic insects and the evolution of aerial locomotor performance. *J. Exp. Biol.* 201, 1043–1050. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1043>.
- Duncan, D.M., Kiefel, P., Duncan, I., 2017. Mutants for *Drosophila* Isocitrate Dehydrogenase 3b Are Defective in Mitochondrial Function and Larval Cell Death. *G3 Bethesda Md* 7, 789–799. <https://doi.org/10.1534/g3.116.037366>.
- Eanes, W.F., Merritt, T.J.S., Flowers, J.M., Kumagai, S., Sezgin, E., Zhu, C.-T., 2006. Flux control and excess capacity in the enzymes of glycolysis and their relationship to flight metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19413–19418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607095104>.
- Ellington, C.P., 1985. Power and efficiency of insect flight muscle. *J. Exp. Biol.* 115, 293–304. <https://doi.org/10.1242/jeb.115.1.293>.
- Estabrook, R.W., Sacktor, B., 1958. α -Glycerophosphate Oxidase of Flight Muscle Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 233, 1014–1019. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64696-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64696-4).
- Ferguson, M., Mockett, R.J., Shen, Y., Orr, W.C., Sohal, R.S., 2005. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 390, 501–511. <https://doi.org/10.1042/BJ20042130>.
- Gáliková, M., Diesner, M., Klepsatel, P., Hehlert, P., Xu, Y., Bickmeyer, I., Predel, R., Kühnlein, R.P., 2015. Energy Homeostasis Control in *Drosophila* Adipokinetic Hormone Mutants. *Genetics* 201, 665–683. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.178897>.
- Gáliková, M., Klepsatel, P., 2018. Obesity and Aging in the *Drosophila* Model. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E1896. <https://doi.org/10.3390/ijms19071896>.
- Garofalo, R.S., 2002. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 13, 156–162. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00548-3](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00548-3).

Gaviraghi, A., Correa Soares, J.B.R., Mignaco, J.A., Fontes, C.F.L., Oliveira, M.F., 2019. Mitochondrial glycerol phosphate oxidation is modulated by adenylates through allosteric regulation of cytochrome c oxidase activity in mosquito flight muscle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 114, 103226. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103226>.

Gaviraghi, A., Oliveira, M.F., 2019. A method for assessing mitochondrial physiology using mechanically permeabilized flight muscle of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Anal. Biochem.* 576, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.005>

Gillette, C.M., Tennessen, J.M., Reis, T., 2021. Balancing energy expenditure and storage with growth and biosynthesis during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 475, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.01.019>.

Gramates, L.S., Agapite, J., Attrill, H., Calvi, B.R., Crosby, M.A., Dos Santos, G., Goodman, J.L., Goutte-Gattat, D., Jenkins, V.K., Kaufman, T., Larkin, A., Matthews, B.B., Millburn, G., Strelets, V.B., 2022. FlyBase: a guided tour of highlighted features. *Genetics* 220, iyac035. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>.

Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., Gould, A.P., 2007. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nature05382>.

Hansford, R.G., 1972. Some properties of pyruvate and 2-oxoglutarate oxidation by blowfly flight-muscle mitochondria. *Biochem. J.* 127, 271–283. <https://doi.org/10.1042/bj1270271>.

Hansford, R.G., Chappell, J.B., 1968. The energy-dependent accumulation of phosphate by blowfly mitochondria and its effect on the rate of pyruvate oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 643–648. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90561-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90561-5).

Hansford, R.G., Johnson, R.N., 1975. The nature and control of the tricarboxylate cycle in beetle flight muscle. *Biochem. J.* 148, 389–401. <https://doi.org/10.1042/bj1480389>.

Hansford, R.G., Sacktor, B., 1970. The Control of the Oxidation of Proline by Isolated Flight Muscle Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 991–994. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63280-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63280-6).

Harrison, J.F., Kaiser, A., VandenBrooks, J.M., 2010. Atmospheric oxygen level and the evolution of insect body size. *Proc. Biol. Sci.* 277, 1937–1946. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0001>.

Harrison, J.F., Roberts, S.P., 2000. Flight Respiration and Energetics. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 179–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.179>.

Heier, C., Kühnlein, R.P., 2018. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 210, 1163–1184. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301583>.

Hetz, S.K., Bradley, T.J., 2005. Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433, 516–519. <https://doi.org/10.1038/nature03106>.

Hochachka, P.W., 2019. *Muscles as Molecular and Metabolic Machines*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780429276804>.

Hochachka, P.W., Nener, J.C., Hoar, J., Saurez, R.K., Hand, S.C., 1993. Disconnecting metabolism from adenylate control during extreme oxygen limitation. *Can. J. Zool.* 71, 1267–1270. <https://doi.org/10.1139/z93-173>.

Hogeboom, G.H., Schneider, W.C., Pallade, G.E., 1948. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* 172, 619–635.

Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., Hafen, E., 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* CB 12, 1293–1300. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01043-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01043-6).

Iwamoto, H., 2011. Structure, function and evolution of insect flight muscle. *Biophys. Nagoya-Shi Jpn.* 7, 21–28. <https://doi.org/10.2142/biophysics.7.21>.

Josephson, R.K., Malamud, J.G., Stokes, D.R., 2000. Asynchronous muscle: a primer. *J. Exp. Biol.* 203, 2713–2722. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.18.2713>.

Kashi, K.P., Bond, E.J., 1979. Studies on isolation and respiratory activity of the mitochondria of *Sitophilus granarius* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 15, 17–24. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(79\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0022-474X(79)90020-1).

Keilin, D., Hardy, W.B., 1925. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* 98, 312–339. <https://doi.org/10.1098/rspb.1925.0039>.

Kemppainen, K.K., Rinne, J., Sriram, A., Lakanmaa, M., Zeb, A., Tuomela, T., Popplestone, A., Singh, S., Sanz, A., Rustin, P., Jacobs, H.T., 2014. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2078–2093. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt601>.

Kennedy, E.P., Lehninger, A.L., 1949. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 179, 957–972.

King-Jones, K., Thummel, C.S., 2005. Nuclear receptors--a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* 6, 311–323. <https://doi.org/10.1038/nrg1581>.

Kirby, K., Hu, J., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., 2002. RNA interference-mediated silencing of *Sod2* in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16162–16167. <https://doi.org/10.1073/pnas.252342899>.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).

Kowaltowski, A.J., Oliveira, M.F., 2020. Mitochondria: New developments in pathophysiology. *Mol. Aspects Med., Mitochondria: New developments in pathophysiology* 71, 100841. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100841>.

KROGH, A., WEIS-FOGH, T., 1951. The Respiratory Exchange of the Desert Locust (*Schistocerca Gregaria*) before, During and After Flight. *J. Exp. Biol.* 28, 344–357. <https://doi.org/10.1242/jeb.28.3.344>.

Kubista, V., 1957. Accumulation of a stable phosphorus compound in glycolysing insect muscle. *Nature* 180, 549. <https://doi.org/10.1038/180549a0>.

Lanet, E., Maurange, C., 2014. Building a brain under nutritional restriction: insights on sparing and plasticity from *Drosophila* studies. *Front. Physiol.* 5, 117. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00117>.

Lardy, H.A., Wellman, H., 1952. Oxidative phosphorylations; rôle of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem.* 195, 215–224.

Lee, G., Park, J.H., 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311–323. <https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.311>.

Levenbook, L., Williams, C.M., 1956. Mitochondria in the flight muscles of insects. III. Mitochondrial cytochrome c in relation to the aging and wing beat frequency of flies. *J. Gen. Physiol.* 39, 497–512. <https://doi.org/10.1085/jgp.39.4.497>.

Li, H., Chawla, G., Hurlburt, A.J., Sterrett, M.C., Zaslaver, O., Cox, J., Karty, J.A., Rosebrock, A.P., Caudy, A.A., Tennessen, J.M., 2017. *Drosophila* larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 1353–1358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614102114>.

Li, H., Rai, M., Buddika, K., Sterrett, M.C., Luhur, A., Mahmoudzadeh, N.H., Julick, C.R., Pletcher, R.C., Chawla, G., Gosney, C.J., Burton, A.K., Karty, J.A., Montooth, K.L., Sokol, N.S., Tennessen, J.M., 2019. Lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase cooperatively regulate growth and carbohydrate metabolism during *Drosophila melanogaster* larval development. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev175315. <https://doi.org/10.1242/dev.175315>.

Liesa, M., Shirihai, O.S., 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 17, 491–506. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9).

- Lund, J., Webb, M.R., White, D.C., 1987. Changes in the ATPase activity of insect fibrillar flight muscle during calcium and strain activation probed by phosphate-water oxygen exchange. *J. Biol. Chem.* 262, 8584–8590. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47453-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47453-4).
- Makarieva, A.M., Gorshkov, V.G., Li, B.-L., 2005. Energetics of the smallest: do bacteria breathe at the same rate as whales? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272, 2219–2224. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3225>.
- Martin, W., Müller, M., 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37–41. <https://doi.org/10.1038/32096>.
- Masson, S.W.C., Hedges, C.P., Devaux, J.B.L., James, C.S., Hickey, A.J.R., 2017. Mitochondrial glycerol 3-phosphate facilitates bumblebee pre-flight thermogenesis. *Sci. Rep.* 7, 13107. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13454-5>.
- Matsuda, H., Yamada, T., Yoshida, M., Nishimura, T., 2015. Flies without trehalose. *J. Biol. Chem.* 290, 1244–1255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619411>.
- Mattila, J., Hietakangas, V., 2017. Regulation of Carbohydrate Energy Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 207, 1231–1253. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.199885>.
- Mesquita, R.D., Gaviraghi, A., Gonçalves, R.L.S., Vannier-Santos, M.A., Mignaco, J.A., Fontes, C.F.L., Machado, L.E.S.F., Oliveira, M.F., 2021. Cytochrome c Oxidase at Full Thrust: Regulation and Biological Consequences to Flying Insects. *Cells* 10, 470. <https://doi.org/10.3390/cells10020470>.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>.
- Mitchell, P., Moyle, J., 1965. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature* 208, 147–151. <https://doi.org/10.1038/208147a0>.
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., Brand, M.D., 2003. Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 938–948. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00464-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00464-7).
- Mizisin, A.P., Josephson, R.K., 1987. Mechanical power output of locust flight muscle. *J. Comp. Physiol. A* 160, 413–419. <https://doi.org/10.1007/BF00613030>.
- Mráček, T., Drahotá, Z., Houšťek, J., 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>.
- Munn, C.A.M., Foster, M., 1886. VI. Researches on myohamatin and the histohæmatins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 177, 267–298. <https://doi.org/10.1098/rstl.1886.0007>.

Nässel, D.R., Kubrak, O.I., Liu, Y., Luo, J., Lushchak, O.V., 2013. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Front. Physiol.* 4, 252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00252>.

Nässel, D.R., Vanden Broeck, J., 2016. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 271–290. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2063-3>.

Nijhout, H.F., Williams, C.M., 1974. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *J. Exp. Biol.* 61, 493–501. <https://doi.org/10.1242/jeb.61.2.493>.

Nishimura, T., 2020. Feedforward Regulation of Glucose Metabolism by Steroid Hormones Drives a Developmental Transition in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 30, 3624–3632.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.043>.

Noguchi, T., Koizumi, M., Hayashi, S., 2011. Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 21, 805–814. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.016>.

Ohkawa, K.-I., Vogt, M.T., Farber, E., 1969. UNUSUALLY HIGH MITOCHONDRIAL ALPHA GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT BROWN ADIPOSE TISSUE. *J. Cell Biol.* 41, 441–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.2.441>.

Oliveira, A.C., Rebelo, A.R., Homem, C.C.F., 2021. Integrating animal development: How hormones and metabolism regulate developmental transitions and brain formation. *Dev. Biol.* 475, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.01.016>.

Phillips, J.P., Campbell, S.D., Michaud, D., Charbonneau, M., Hilliker, A.J., 1989. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2761–2765. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2761>

Prokop, J., Nel, A., Hoch, I., 2005. Discovery of the oldest known Pterygota in the Lower Carboniferous of the Upper Silesian Basin in the Czech Republic (Insecta: Archaeorthoptera). *Geobios* 38, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.geobios.2003.11.006>.

Rath, S., Sharma, R., Gupta, R., Ast, T., Chan, C., Durham, T.J., Goodman, R.P., Grabarek, Z., Haas, M.E., Hung, W.H.W., Joshi, P.R., Jourdain, A.A., Kim, S.H., Kotrys, A.V., Lam, S.S., McCoy, J.G., Meisel, J.D., Miranda, M., Panda, A., Patgiri, A., Rogers, R., Sadre, S., Shah, H., Skinner, O.S., To, T.-L., Walker, M.A., Wang, H., Ward, P.S., Wengrod, J., Yuan, C.-C., Calvo, S.E., Mootha, V.K., 2021. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res.* 49, D1541–D1547. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>.

- Rehman, N., Varghese, J., 2021. Larval nutrition influences adult fat stores and starvation resistance in *Drosophila*. *PloS One* 16, e0247175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247175>.
- Reid, R.A., Moyle, J., Mitchell, P., 1966. Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature* 212, 257–258. <https://doi.org/10.1038/212257a0>.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X., Nelson, C.A., 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.001>.
- Roeder, K.D., 1951. Movements of the thorax and potential changes in the thoracic muscles of insects during flight. *Biol. Bull.* 100, 95–106. <https://doi.org/10.2307/1538681>.
- Rulifson, E.J., Kim, S.K., Nusse, R., 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296, 1118–1120. <https://doi.org/10.1126/science.1070058>.
- Saari, S., Kemppainen, E., Tuomela, T., Oliveira, M.T., Dufour, E., Jacobs, H.T., 2019. Alternative oxidase confers nutritional limitation on *Drosophila* development. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* 331, 341–356. <https://doi.org/10.1002/jez.2274>.
- Sacktor, B., 1955. CELL STRUCTURE AND THE METABOLISM OF INSECT FLIGHT MUSCLE. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 29–46.
- Sacktor, B., Hurlbut, E.C., 1966. Regulation of Metabolism in Working Muscle in Vivo: II. CONCENTRATIONS OF ADENINE NUCLEOTIDES, ARGININE PHOSPHATE, AND INORGANIC PHOSPHATE IN INSECT FLIGHT MUSCLE DURING FLIGHT. *J. Biol. Chem.* 241, 632–634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96884-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96884-5).
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 255–274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3).
- Schatz, G., 2003. The tragic matter. *FEBS Lett.* 536, 1–2. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00046-2).
- Sieber, M.H., Spradling, A.C., 2017. The role of metabolic states in development and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 45, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.002>.
- Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., Léopold, P., 2009. A *Drosophila* insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. *Dev. Cell* 17, 874–884. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.009>.
- Smith, D.S., 1963. THE STRUCTURE OF FLIGHT MUSCLE SARCOSESOMES IN THE BLOWFLY CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA (DIPTERA). *J. Cell Biol.* 19, 115–138. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.1.115>.

Soares, J.B.R.C., Gaviraghi, A., Oliveira, M.F., 2015. Mitochondrial Physiology in the Major Arbovirus Vector *Aedes aegypti*: Substrate Preferences and Sexual Differences Define Respiratory Capacity and Superoxide Production. *PLoS ONE* 10, e0120600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120600>.

Sohal, R.S., McCarthy, J.L., Allison, V.F., 1972. The formation of 'giant' mitochondria in the fibrillar flight muscles of the house fly, *Musca domestica* L. *J. Ultrastruct. Res.* 39, 484–495. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(72\)90115-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(72)90115-3).

Storelli, G., Nam, H.-J., Simcox, J., Villanueva, C.J., Thummel, C.S., 2019. *Drosophila* HNF4 Directs a Switch in Lipid Metabolism that Supports the Transition to Adulthood. *Dev. Cell* 48, 200–214.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.030>.

Stork, N.E., 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annu. Rev. Entomol.* 63, 31–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>.

Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., Hamilton, A.J., 2015. New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7519–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502408112>.

Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Kühlbrandt, W., 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>.

Suarez, R.K., Lighton, J.R., Joos, B., Roberts, S.P., Harrison, J.F., 1996. Energy metabolism, enzymatic flux capacities, and metabolic flux rates in flying honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12616–12620. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12616>.

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G., 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184, 1331–1341. <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1331>.

Syromyatnikov, M.Y., Gureev, A.P., Vitkalova, I.Y., Starkov, A.A., Popov, V.N., 2019. Unique features of flight muscles mitochondria of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 102, e21595. <https://doi.org/10.1002/arch.21595>.

Taylor, C.R., Heglund, N.C., Maloiy, G.M., 1982. Energetics and mechanics of terrestrial locomotion. I. Metabolic energy consumption as a function of speed and body size in birds and mammals. *J. Exp. Biol.* 97, 1–21. <https://doi.org/10.1242/jeb.97.1.1>.

Tennessen, J.M., Bertagnolli, N.M., Evans, J., Sieber, M.H., Cox, J., Thummel, C.S., 2014. Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. *G3 Bethesda Md* 4, 839–850. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010652>.

Tennessen, J.M., Thummel, C.S., 2011. Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Curr. Biol.* CB 21, R750-757. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.033>.

Texada, M.J., Koyama, T., Rewitz, K., 2020. Regulation of Body Size and Growth Control. *Genetics* 216, 269–313. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303095>.

Toivonen, J.M., O'Dell, K.M., Petit, N., Irvine, S.C., Knight, G.K., Lehtonen, M., Longmuir, M., Luoto, K., Touraille, S., Wang, Z., Alziari, S., Shah, Z.H., Jacobs, H.T., 2001. Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness. *Genetics* 159, 241–254. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.1.241>.

Tribolium Genome Sequencing Consortium, Richards, S., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Brown, S.J., Denell, R., Beeman, R.W., Gibbs, R., Beeman, R.W., Brown, S.J., Bucher, G., Friedrich, M., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Klingler, M., Lorenzen, M., Richards, S., Roth, S., Schröder, R., Tautz, D., Zdobnov, E.M., Muzny, D., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Attaway, T., Bell, S., Buhay, C.J., Chandrabose, M.N., Chavez, D., Clerk-Blankenburg, K.P., Cree, A., Dao, M., Davis, C., Chacko, J., Dinh, H., Dugan-Rocha, S., Fowler, G., Garner, T.T., Ganes, J., Gnirke, A., Hawes, A., Hernandez, J., Hines, S., Holder, M., Hume, J., Jhangiani, S.N., Joshi, V., Khan, Z.M., Jackson, L., Kovar, C., Kowis, A., Lee, S., Lewis, L.R., Margolis, J., Morgan, M., Nazareth, L.V., Nguyen, N., Okwuonu, G., Parker, D., Richards, S., Ruiz, S.-J., Santibanez, J., Savard, J., Scherer, S.E., Schneider, B., Sodergren, E., Tautz, D., Vattahil, S., Villasana, D., White, C.S., Wright, R., Park, Y., Beeman, R.W., Lord, J., Oppert, B., Lorenzen, M., Brown, S., Wang, L., Savard, J., Tautz, D., Richards, S., Weinstock, G., Gibbs, R.A., Liu, Y., Worley, K., Weinstock, G., Elsik, C.G., Reese, J.T., Elhaik, E., Landan, G., Graur, D., Arensburger, P., Atkinson, P., Beeman, R.W., Beidler, J., Brown, S.J., Demuth, J.P., Drury, D.W., Du, Y.-Z., Fujiwara, H., Lorenzen, M., Maselli, V., Osanai, M., Park, Y., Robertson, H.M., Tu, Z., Wang, J., Wang, S., Richards, S., Song, H., Zhang, L., Sodergren, E., Werner, D., Stanke, M., Morgenstern, B., Solovyev, V., Kosarev, P., Brown, G., Chen, H.-C., Ermolaeva, O., Hlavina, W., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Kitts, P., Maglott, D., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Souvorov, A., Mackey, A.J., Waterhouse, R.M., Wyder, S., Zdobnov, E.M., Zdobnov, E.M., Wyder, S., Kriventseva, E.V., Kadowaki, T., Bork, P., Aranda, M., Bao, R., Beermann, A., Berns, N., Bolognesi, R., Bonneton, F., Bopp, D., Brown, S.J., Bucher, G., Butts, T., Chaumot, A., Denell, R.E., Ferrier, D.E.K., Friedrich, M., Gordon, C.M., Jindra, M., Klingler, M., Lan, Q., Lattorff, H.M.G., Laudet, V., von Levetzow, C., Liu, Z., Lutz, R., Lynch, J.A., da Fonseca, R.N., Posnien, N., Reuter, R., Roth, S., Savard, J., Schinko, J.B., Schmitt, C., Schoppmeier, M., Schröder, R., Shippy, T.D., Simonnet, F., Marques-Souza, H., Tautz, D., Tomoyasu, Y., Trauner, J., Van der Zee, M., Vervoort, M., Wittkopp, N., Wimmer, E.A., Yang, X., Jones, A.K., Sattelle, D.B., Ebert, P.R., Nelson, D., Scott, J.G., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Arakane, Y., Beeman, R.W., Zhu, Q., Hogenkamp, D., Dixit, R., Oppert, B., Jiang, H., Zou, Z., Marshall, J., Elpidina, E., Vinokurov, K., Oppert, C., Zou, Z., Evans, J., Lu, Z., Zhao, P., Sumathipala, N., Altincicek, B., Vilcinskis, A., Williams, M., Hultmark, D., Hetru, C., Jiang, H., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Y., Li, B., Tanaka, Y., Predel, R., Neupert, S., Schachtner, J., Verleyen, P., Raible, F., Bork, P., Friedrich, M., Walden, K.K.O., Robertson, H.M., Angeli, S., Forêt, S., Bucher, G., Schuetz, S., Maleszka, R., Wimmer, E.A., Beeman, R.W., Lorenzen, M., Tomoyasu, Y.,

Miller, S.C., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949–955. <https://doi.org/10.1038/nature06784>.

Tu, M.-P., Yin, C.-M., Tatar, M., 2005. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.009>.

Tulp, A., Stam, H., Van Dam, K., 1971. Permeability of housefly mitochondria towards dicarboxylate ions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 234, 301–305. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(71\)90194-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(71)90194-0).

Ugur, B., Chen, K., Bellen, H.J., 2016. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis. Model. Mech.* 9, 235–244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>.

van den BERGH, S., Slater, E.C., 1962. The respiratory activity and permeability of housefly sarcosomes. *Biochem. J.* 82, 362–371. <https://doi.org/10.1042/bj0820362>.

Wang, L., Lam, G., Thummel, C.S., 2010. Med24 and Mdh2 are required for *Drosophila* larval salivary gland cell death. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 954–964. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22213>.

Watanabe, M.I., Williams, C.M., 1951. Mitochondria in the flight muscles of insects. I. Chemical composition and enzymatic content. *J. Gen. Physiol.* 34, 675–689. <https://doi.org/10.1085/jgp.34.5.675>.

Wegener, G., Bolas, N.M., Thomas, A.A.G., 1991. Locust flight metabolism studied in vivo by ³¹P NMR spectroscopy. *J. Comp. Physiol. B* 161, 247–256. <https://doi.org/10.1007/BF00262305>.

Wolf, D.M., Segawa, M., Kondadi, A.K., Anand, R., Bailey, S.T., Reichert, A.S., van der Blik, A.M., Shackelford, D.B., Liesa, M., Shirihai, O.S., 2019. Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J.* 38, e101056. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101056>.

Yamada, T., Habara, O., Yoshii, Y., Matsushita, R., Kubo, H., Nojima, Y., Nishimura, T., 2019. The role of glycogen in development and adult fitness in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev176149. <https://doi.org/10.1242/dev.176149>.

Zebe, E.C., Mcshan, W.H., 1957. Lactic and alpha-glycerophosphate dehydrogenases in insects. *J. Gen. Physiol.* 40, 779–790. <https://doi.org/10.1085/jgp.40.5.779>



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 10

Genômica de Vetores

Leonardo Barbosa Koerich¹
Rafael Dias Mesquita²

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Considerações iniciais

No início do século XX, W. E. Castle, em Harvard, e T. H. Morgan, na Universidade de Columbia, foram os primeiros geneticistas a utilizarem a mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster*, em experimentos de genética (Castle, 1906; Morgan, 1910). O uso de *D. melanogaster*, como um modelo nos estudos de genética, se provou acertado em 1910, quando Morgan publicou seu famoso artigo, no qual escreveu:

Em uma linhagem de *Drosophila* que estava sendo acompanhada por aproximadamente um ano, após um considerável número de gerações apareceu um macho de olhos brancos. As moscas selvagens têm olhos vermelho-brilhantes. (Morgan, 1910, tradução nossa).

Morgan chegou à conclusão de que isso era uma mutação genética, chamando, então, esse gene de *white*, descrevendo um sistema de herança para o *white* em *D. melanogaster*, que era ligado aos cromossomos sexuais. A partir deste trabalho, Morgan e seus estudantes, Alfred H. Sturtevant e Calvin B. Bridges, junto com o professor Herman J. Muller, criaram a disciplina de genética, culminando no livro *Os Mecanismos da Hereditariedade Mendeliana* (Morgan, 1915), no qual se estabelece que os genes estão ligados aos cromossomos.

Enquanto a genética de drosófila avançava a passos largos, com identificação de vários genes e seu mapeamento nos cromossomos, a genética de vetores se limitava à descrição de cariótipos. Foi somente na década de 1940 que estudos citológicos, em mosquitos, ganharam mais evidência, a partir dos trabalhos de mapeamento de cromossomos politênicos (Painter, 1939; Suzuki, 1939). Nas décadas seguintes, surgiram diversos estudos genéticos, similares aos já realizados em drosófila, com os primeiros trabalhos de genética de populações em mosquitos (William Hovanitz, 1944). As décadas de 1950 a 1970 foram o período dourado da genética clássica de vetores, culminando no livro *Genética de Insetos Vetores de Doenças* (J. W. Wright; R. Pal, 1967), que resumia os estudos de genética e citogenética em mosquitos, flebotomíneos, simulídeos, moscas, pulgas, piolhos, triatomíneos e carrapatos. No Brasil, Schreiber e Pellegrino foram pioneiros no estudo de genética de vetores, usando triatomíneos como modelo em seus laboratórios, na Universidade Federal de Minas Gerais (Schreiber; Pellegrino, 1950, 1951). Nos anos 1950, eles identificaram algumas mutações na cor de olho e no formato de asas em *Triatoma infestans* e, por experimentos de cruzamentos, ainda conseguiram identificar se os genes responsáveis pelas características eram ligados a cromossomos autossômicos ou sexuais (Schreiber, 1974). No entanto, as dificuldades em se trabalhar com

organismos não modelos (principalmente as dificuldades de criação em laboratório e o longo tempo de geração para alguns modelos) cobriam seu preço, e os estudos em genética de vetores praticamente desapareceram, sendo significativos apenas em anofelinos.

Foi com o avanço da biologia molecular que passamos a ver um novo interesse em genética de vetores, para além dos anofelinos. Além do uso de marcadores genéticos para estudos de genética de populações, observamos, também, um crescimento expressivo de proteínas caracterizadas funcionalmente e geneticamente (com sequência de nucleotídeos identificada), como as nitroforinas de *Rhodnius prolixus* (Ribeiro; Schneider; Guimaraes, 1995; Ribeiro et al., 2004b). Mas, foi na virada do milênio que observamos uma verdadeira revolução na genética de vetores.

Em 2000 foi publicado um artigo descrevendo o genoma de *D. melanogaster* (Myers et al., 2000). Além do marco científico, o genoma de *D. melanogaster* deixava claro que entrávamos em uma nova era tecnológica, e apenas dois anos depois foi publicado o primeiro genoma de um vetor, o mosquito *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002). Junto com os genomas, vieram também os transcriptomas (sequenciamento de RNA mensageiros) de vetores, em especial, os sialomas (transcriptomas de glândula salivar artrópodes hematófagos) que revelam o arsenal farmacológico envolvido no processo de hematofagia.

Mas, a inovação tecnológica traria uma nova revolução, em 2007. Novas metodologias de sequenciamento foram criadas e uma acirrada disputa de mercado fez com que o preço dos sequenciamentos de genoma caísse vertiginosamente. Enquanto o genoma de *An. gambiae* custou alguns milhões de dólares para ser sequenciado em 2002, em 2010 já era possível fazer genomas de vetores por menos de 10 mil dólares. A redução de custos não só aumentou significativamente o número de vetores com genomas e transcriptoma disponíveis, mas permitiu o início de uma nova disciplina de estudo, a genômica de populações (em que são sequenciados os genomas de milhares de indivíduos de uma mesma espécie para estudar mutações relacionadas a fenótipos, como a resistência a inseticidas). As primeiras iniciativas em genômica de populações de vetores iniciaram em 2010, com o projeto Genoma de 1000 Anopheles.

Hoje, temos, à disposição, sequenciadores portáteis que custam menos de mil dólares. Isso tornou o sequenciamento de genomas e transcriptomas de vetores tão rotineiro que, antes que se faça um novo genoma, é necessário pesquisar se um genoma ou transcriptoma já não está disponível em uma base de dados. A seguir, faremos uma revisão dos principais genomas e de alguns transcriptomas disponíveis.

Revolução da genômica de vetores

Como dito anteriormente, o mosquito *An. gambiae* foi o primeiro vetor a ter um genoma sequenciado, em 2002. Com o barateamento do processo de sequenciamento de genoma, não vimos apenas uma explosão de espécies vetoras de doenças sequenciadas (Figura 1), mas, também, em especial nos últimos cinco anos, vimos o ressequenciamento dos genomas (com o objetivo de melhorar a montagem) e o sequenciamento de diferentes linhagens e populações¹. Até 2010, tínhamos um total de 5 espécies sequenciadas e, em 2022, já são mais de 44 espécies com genomas disponíveis (Tabela 1). A disponibilidade de genomas de vetores acaba refletindo no número de artigos publicados em genética de vetores, que, desde 2014, representa mais de 50% de todos os artigos publicados com vetores (dados obtidos na PUBMED, *National Center for Biotechnology Information of the National Library of Medicine*, EUA).

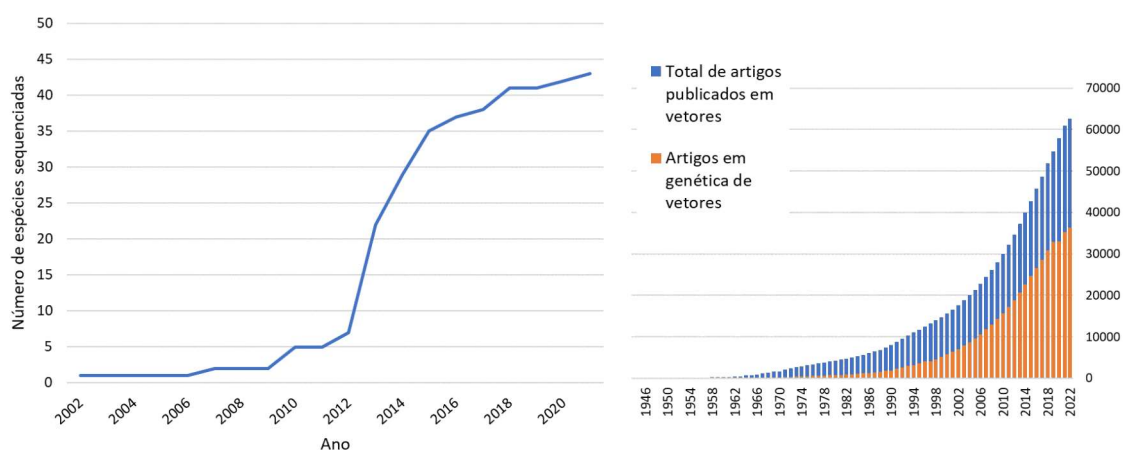


Figura 1: Número de espécies vetoras com o genoma sequenciado. Desde 2002, quando o genoma de *An. gambiae* foi sequenciado, até 2021, tivemos um aumento significativo no número de espécies sequenciadas, a partir de 2010, reflexo do barateamento dos custos de sequenciamentos. O gráfico à direita mostra o número total de artigos científicos publicados com vetores (barras azuis) e o crescimento dos artigos na área de genética de vetores (barras laranjas).

Fonte: Arquivo pessoal

¹ No caso de insetos, toda linhagem é uma população, mas nem toda população é uma linhagem. Linhagens são populações artificiais (no caso, estabelecidas em laboratório) que se iniciam, normalmente, da prole de um único indivíduo, garantindo, assim, maior homogeneidade genotípica. Por outro lado, quando nos referimos ao genoma de uma “população”, em geral nos referimos a indivíduos de populações naturais, podendo ser genotipicamente mais homogêneas ou mais heterogêneas.

A escolha das primeiras espécies (*An. gambiae*, *Aedes aegypti* e *Culex pipens*) se deu não só pela importância médica destes insetos, mas também por serem dípteros, como *Drosophila melanogaster*. Ou seja, além de possuírem genomas pequenos (os genomas da maioria dos mosquitos possuem entre 240 milhões de bases e 450Mb), o que acarreta custos menores (o custo do sequenciamento é calculado por nucleotídeo sequenciado), também seria possível usar *D. melanogaster* como parâmetro, tanto para montagem e estrutura do genoma, quanto para avaliação da qualidade dos genomas montados. No entanto, os primeiros genomas de vetores sofreram com o fato de que não possuímos linhagens isogênicas (como ocorre em drosófila), o que acarretou genomas bastante fragmentados, quando comparados à drosófila. Quando, em 2007, surgiram novos métodos de sequenciamento, os novos genomas passaram a ser sequenciados e montados com múltiplas abordagens, buscando um barateamento do processo. Embora o sequenciamento fosse mais barato, alguns desses métodos de sequenciamento (como o pirosequenciamento) se mostraram problemáticos, introduzindo erros em genomas já bastante heterogêneos². Em 2014 a Illumina anunciou que suas máquinas poderiam sequenciar genomas humanos por 1.000 dólares (The \$1,000 Genome Arrives -- For Real, This Time), prenunciando o fim da competição dos sequenciadores de nova geração (NGS), hoje conhecidos como sequenciadores de 2ª geração. Com os novos sequenciadores Illumina, genomas de artrópodes poderiam agora ser sequenciados com alta qualidade por, aproximadamente, 10 mil dólares e, foi nesse período, que vimos uma explosão de genomas de vetores sequenciados (quase todos de mosquitos anofelinos sequenciados pelo Projeto de 16 genomas de *Anopheles* sp.). No entanto, os genomas sequenciados por Illumina ainda apresentavam um problema presente em todos os genomas publicados até então: cromossomos incompletos e a não montagem das sequências heterocromáticas. Para entender o problema, e como ele foi solucionado, precisamos explicar a constituição de um genoma e como um genoma é sequenciado.

O DNA dos organismos eucariotos (os cromossomos), normalmente, estão organizados em duas estruturas distintas. A primeira estrutura é composta por um

² O problema dos genomas heterogêneos, ou heterozigotos, é que a existência de dois alelos diferentes para um mesmo *locus* gênico cria uma ambiguidade que os computadores, montadores de genomas, não conseguem lidar. Entre ter que escolher um alelo ou outro, o montador se vê com três possibilidades: *i*) não montar a região heterozigota, criando uma deleção artificial; *ii*) colapsar os dois alelos em um só, correndo o risco de erros na sequência devido a falsos alelos (erros de sequenciamento); e *iii*) montar os dois alelos em cromossomos pequenos, separados, aumentando a fragmentação do genoma.

DNA acessível a proteínas nucleares (como as DNA e RNA polimerases e os fatores de transcrição que ativam os genes). Essa estrutura do DNA acessível é chamada de eucromatina (esse nome advém de que estas regiões cromossômicas apresentam uma cor verdadeira, quando corados em preparações para microscopia). É na região eucromática dos cromossomos que fica localizada a maior parte dos genes, pois, ali, as proteínas podem “ler” esses genes e ativá-los, para que produzam proteínas importantes para o funcionamento da célula. O segundo tipo de estrutura cromossômica é a heterocromatina (hetero: diferente; cromos: cor). Nessas regiões heterocromáticas, o DNA está compactado, enovelado em proteínas chamadas histonas que, por sua vez, ligam-se umas às outras (na eucromatina o DNA também está enovelado nas histonas, mas, diferentemente da heterocromatina, as histonas não se ligam umas às outras). A Figura 2 detalha as estruturas de eucromatina e heterocromatina que se pode encontrar em diferentes partes do cromossomo.

Grupo	Organismo	Linhagem	REF	Mbp	Cromossomos	Supercontigs	Mitocondria	Proteínas	ncRNA	Ano	Referência
Diptera	<i>Anopheles albimanus</i>	STELCA	Sim	173,34	4+XY	196	Não	12.294	322	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles arabiensis</i>	Dongola	Sim	246,57	4+XY	1.214	Não	13.271	378	2021	(ZAMYATIN et al., 2021)
	<i>Anopheles atroparvus</i>	EBRO	Sim	225,30	4+XY	1.315	Não	13.718	323	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles christyi</i>	ACHKN1017	Sim	172,66	4+XY	30.369	Não	10.872	337	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles coluzzii</i>	Ngouso	Sim	251,41	4+XY	205	Não	12.766	469	2021	(ZAMYATIN et al., 2021)
	<i>Anopheles culicifacies</i>	A-37	Sim	203,00	4+XY	16.162	Não	14.358	371	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles darlingi</i>	Coari	Sim	136,95	4+XY	2.220	Sim	10.556	449	2013	(MARINOTTI et al., 2013)
	<i>Anopheles dirus</i>	WRAIR2	Sim	216,31	4+XY	1.266	Não	12.925	325	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles epiroticus</i>	Epiroticus2	Sim	223,49	4+XY	2.673	Não	11.956	366	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles farauti</i>	FAR1	Sim	183,10	4+XY	310	Não	12.932	361	2015	(LOGUE et al., 2015)
	<i>Anopheles funestus</i>	FUM0Z	Sim	210,99	4+XY	1.053	Não	13.094	1.082	2019	(GHURYE et al., 2019)
	<i>Anopheles gambiae</i>	PEST	Sim	281,38	4+XY	145	Sim	13.107	738	2002	(HOLT et al., 2002)
	<i>Anopheles maculatus</i>	maculatus3	Sim	141,89	4+XY	47.797	Não	14.858	177	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles melas</i>	CM1001059_A	Sim	224,16	4+XY	20.229	Não	15.367	410	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles merus</i>	MAF	Sim	288,05	4+XY	2.027	Não	13.150	428	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles minimus</i>	MINIMUS1	Sim	201,79	4+XY	678	Não	12.820	328	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles quadriannulatus</i>	SANGWE	Sim	283,83	4+XY	2.823	Não	13.414	404	2013	(NEAFSEY et al., 2013)
	<i>Anopheles sinensis</i>	SINENSIS	Sim	375,76	4+XY	10.448	Não	12.905	301	2013	(ZHOU et al., 2014)
	<i>Anopheles stephensi</i>	SDA-500	Sim	225,37	4+XY	1.110	Não	13.336	275	2014	(JIANG et al., 2014)
	<i>Aedes aegypti</i>	LVP_AGWG	Sim	1278,73	6	2.306	Sim	14.718	5.086	2007	(NENE et al., 2007)
	<i>Aedes albopictus</i>	Foshan	Sim	1923,48	6	154.782	Não	17.535	759	2015	(CHEN et al., 2015)
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Johannesburg	Sim	579,06	6	3.171	Sim	18.965	828	2010	(ARENSBURGER et al., 2010)
	<i>Culicoides sonorensis</i>	PIR-s-3	Sim	194,18	Desconhecido	7.974	Não	15.612	0	2018	Não Publicado
	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Jacobina	Sim	154,23	8	11.532	Não	10.427	338	2023	(LABBÉ et al., 2023)
	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Israel	Sim	363,77	8	106.826	Não	11.391	444	2023	(LABBÉ et al., 2023)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	iso-1	Sim	143,73	6+XY	1.862	Sim	13.968	4.386	2000	(ADAMS et al., 2000)
	<i>Musca domestica</i>	Aabys	Sim	750,40	10+XY	20.487	Não	14.402	1.733	2014	(SCOTT et al., 2014)
	<i>Stomoxys calcitrans</i>	USDA	Sim	971,19	Desconhecido	12.042	Não	14.078	2.892	2021	(OLAFSON et al., 2021)
	<i>Glossina austeni</i>	TTRI	Sim	370,26	4+XY	2.205	Não	19.720	378	2019	(ATTARDO et al., 2019)
	<i>Glossina brevipalpis</i>	IAEA	Sim	315,36	4+XY	1.651	Não	14.656	335	2019	(ATTARDO et al., 2019)
<i>Glossina fuscipes</i>	IAEA	Sim	374,77	4+XY	2.395	Não	20.117	385	2019	(ATTARDO et al., 2019)	
<i>Glossina fuscipes</i>	IAEA 2018	Não	390,09	4+XY	7.986	Não	12.387	1.762	2019	(ATTARDO et al., 2019)	
<i>Glossina morsitans</i>	Yale	Sim	366,20	4+XY	13.807	Não	12.773	376	2014	(ATTARDO et al., 2014)	
<i>Glossina pallidipes</i>	IAEA	Sim	357,33	4+XY	1.726	Não	19.278	360	2019	(ATTARDO et al., 2019)	
<i>Glossina palpalis</i>	IAEA	Sim	380,10	4+XY	3.926	Não	20.162	373	2019	(ATTARDO et al., 2019)	
Anoplura	<i>Pediculus humanus</i>	USDA	Sim	110,80	Desconhecido	1.882	Sim	10.785	927	2010	(KIRKNESS et al., 2010)
Hemiptera	<i>Cimex lectularius</i>	Harlan	Sim	650,48	Desconhecido	1.402	Não	14.083	1.209	2016	(ROSENFELD et al., 2016)
	<i>Rhodnius prolixus</i>	CDC	Sim	706,82	20+XY	16.537	Não	15.068	670	2015	(MESQUITA et al., 2015)

	<i>Dermacentor silvarum</i>	Dsil-2018	Sim	2474,31	22	1.664	Sim	21.428	14.382	2021	Não Publicado
	<i>Ixodes scapularis</i>	Wikel	Sim	1765,38	30	369.492	Não	20.488	2.854	2016	(GULIA-NUSS, 2016)
Carrapatos	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Rmic-2018	Sim	2529,93	22	7.047	Sim	18.598	10.399	2017	(BARRERO et al., 2017)
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Rsan-2018	Sim	2365,54	22	2.328	Sim	23.522	12.229	2020	(JIA et al., 2020)
	<i>Leptotrombidium deliense</i>	UoL-UT	Sim	117,32	Desconhecido	66.710	Não	14.667	348	2018	(DEAN RIDER; MORGAN; ARLIAN, 2015)
Sarcoptidae	<i>Sarcoptes scabiei</i>	Arlian	Sim	56,26	18	18.859	Não	10.471	326	2015	(DEAN RIDER; MORGAN; ARLIAN, 2015)

Tabela 1: Genomas de artrópodos disponíveis no VectorBase.

Fonte: Arquivo pessoal

Na heterocromatina, o DNA está menos acessível a outras proteínas e, por isso, dizemos que esses genes heterocromáticos estão silenciados, pois raramente são traduzidos em proteínas. Essa capacidade de silenciamento da heterocromatina é essencial para o correto funcionamento e sobrevivência dos organismos eucariotos, pois ela pode nos proteger de elementos de DNA autorreplicantes, chamados elementos de transposição (TE; do inglês, *transposable elements*). Especula-se que os TE têm origem nos vírus, como um elemento que permite que o genoma viral seja inserido no genoma do hospedeiro. Ao longo de milhões de anos de evolução, os TE passaram a fazer parte do genoma de eucariotos e sua capacidade de replicar um pedaço de DNA os torna os principais responsáveis pela origem de novos genes³. No entanto, se mantidos sem controle, os TE podem fazer uma “bagunça no DNA” e acabar ocasionando a morte celular. Por isso, as regiões ricas em cópias de TE são identificadas pela célula e silenciadas, formando a heterocromatina. Com o tempo, as regiões heterocromáticas acumulam mais cópias de DNA, criando o que chamamos de cópias repetidas de DNA. Essas cópias repetidas são um problema para a genômica.

³Quando um TE faz uma cópia de DNA, é possível que um gene seja copiado junto. Agora, o genoma terá duas cópias do mesmo gene. Para o organismo, ter duas cópias de um gene é uma redundância e, por isso, um dos genes pode sofrer mutações sem risco ao organismo. Essas mutações geralmente fazem o gene deixar de funcionar (torna-se um pseudogene), mas podem fazer o gene funcionar um pouco diferente (uma variante) e, dado o tempo e a seleção natural, essa nova variante pode adquirir funções completamente distintas da função original.

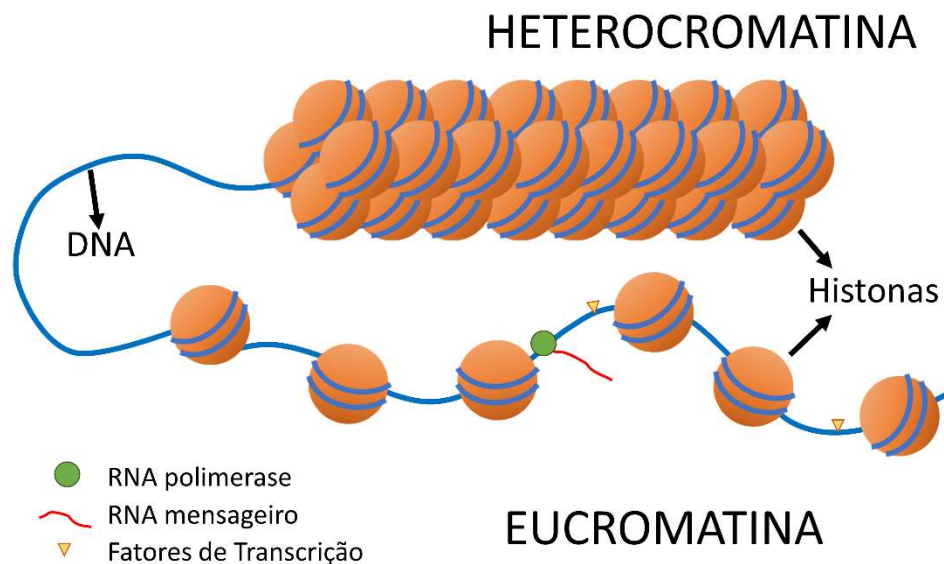


Figura 2: As estruturas dos cromossomos. A figura representa duas estruturas básicas dos cromossomos: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é considerada a parte ativa dos cromossomos. O complexo de histonas e DNA está mais frouxo, permitindo que o DNA interaja com outras proteínas, como fatores de transcrição e RNA polimerases. A heterocromatina é a região do cromossomo que está inativada por uma compactação do DNA pela interação das histonas.

Fonte: Arquivo pessoal

Quando sequenciamos um genoma, não conseguimos (ainda) ler o DNA de uma ponta de um cromossomo até a outra ponta. Os sequenciadores de primeira e segunda geração (como o Illumina) conseguem ler algumas centenas de nucleotídeos por vez (o Illumina lê normalmente 150 nucleotídeos). Se um genoma, como o humano, possui 3 bilhões de nucleotídeos, então, precisaríamos de, no mínimo, 20 milhões de leituras (6.667 leituras para cada milhão de nucleotídeos), ou 20 milhões de peças desse enorme quebra-cabeça. Porém, como as leituras são feitas de partes aleatórias do DNA (poderíamos fazer leituras de partes que escolhermos, mas é tão mais caro e tão mais demorado, que é melhor fazer de partes aleatórias e, depois, deixar que um computador lide com o problema), é comum produzirmos várias vezes o tamanho do genoma em leituras, e a isso chamamos de profundidade de sequenciamento. Então, um genoma de 100 milhões de nucleotídeos pode ser sequenciado a uma profundidade de 50 vezes, o que significa que produzimos leituras suficientes que, somadas, equivalem a 50 vezes o tamanho do genoma ou, nesse caso, 5 bilhões de nucleotídeos. Essa estratégia é usada assim, pois, como sequenciamos pedaços aleatórios do genoma, precisamos aumentar as chances de sequenciar todas as regiões do genoma. Vejam, então, que o sequenciamento de DNA é complexo. Em uma analogia, seria como se você comprasse 50 caixas do mesmo quebra-

cabeça (com milhões de peças) e misturasse todas as peças, ou seja, um caos. Porém, os computadores conseguem lidar com esse problema com certa “facilidade” (computadores utilizados para montar um genoma possuem, normalmente, dezenas de processadores e alguns terabites de memória RAM).

E como a heterocromatina, o DNA repetitivo, entra nessa conta? No nosso super quebra-cabeça hipotético, o DNA repetitivo seria aquela região branca, de neve, com o agravante de que as peças seriam todas iguais, com laterais perfeitamente retas. Quando um supercomputador precisa montar uma região de DNA repetitivo, em que existem milhares de peças iguais, nós damos a instrução para que ele pare a montagem e recomece de outro ponto, pois preferimos não montar essas regiões problemáticas a correr o risco de cometer um erro que pode nos induzir a conclusões precipitadas. Por isso, nos genomas montados com sequenciadores do tipo Illumina (que sequenciam peças pequenas), os cromossomos não são completos, pois toda parte de DNA repetitivo não é montada. E o fato é que, na maioria dos insetos, 20% a 50% do genoma é composto de DNA repetitivo (isso inclui os centrômeros, os telômeros, quase metade do cromossomo X e o cromossomo Y inteiro).

Assim, qual seria a solução para obtermos genomas completos? Ainda no início dos anos 2000, logo após o genoma de *D. melanogaster* ser publicado, iniciou-se um esforço coletivo para a montagem das regiões heterocromáticas usando-se um complexo sistema de mapeamento genético (Hoskins et al., 2002). Apesar do projeto ter conseguido obter um sucesso considerável em sua empreitada, ficou claro que o esforço era grande demais (e o custo também) para ser aplicado em todos os organismos que estavam sendo sequenciados. A solução só seria possível se conseguíssemos ler pedaços de DNA grandes o suficiente para termos as regiões repetitivas em uma única leitura. Com base nessa necessidade, duas empresas buscaram criar sequenciadores capazes de ler milhares de nucleotídeos em cada leitura, e ambas as empresas lançaram suas tecnologias quase que concomitantemente.

Em 2012, a Pacific Biosciences anunciou seu sequenciador PacBio, que seria capaz de ler até 10 mil nucleotídeos por vez. Seu grande avanço é que, diferentemente dos sequenciadores anteriores, ele consegue ver, em tempo real, o DNA sendo lido pela DNA-polimerase⁴. Esse processo é muito mais eficiente do

⁴As tecnologias de 1ª, 2ª e 3ª geração usam a DNA polimerase para polimerizar uma cópia do DNA. Os sequenciadores então “lêem” qual nucleotídeo foi inserido pela DNA-polimerase. Na 1ª e 2ª geração era preciso parar a DNA-polimerase para ver qual nucleotídeo foi incorporado (isso é custoso e trabalhoso e, por isso, as leituras são curtas). O PacBio usa uma DNA-polimerase que fica presa em um sensor de fluorescência e esse sensor consegue detectar, em tempo real, os nucleotídeos sendo incorporados pela proteína, pois cada nucleotídeo é marcado com um fluoróforo de cor diferente.

que as gerações anteriores e, em uma década, a tecnologia foi melhorada, conseguindo ler até 400.000 nucleotídeos em cada leitura (com média de 25.000 nucleotídeos por leitura) (Hon et al., 2020).

Em 2014, a Oxford Nanopore anunciou seu sequenciador MinION, prometendo uma nova revolução genômica. Além de uma nova tecnologia de sequenciamento (4ª geração), os aparelhos MinION são portáteis (possuindo um tamanho de, aproximadamente, 10cm x 3cm x 2cm) e custam, apenas, 1.000 dólares, permitindo que, mesmo laboratórios pequenos, tenham seu próprio sequenciador. O Nanopore é a primeira tecnologia de sequenciamento que não usa a DNA-polimerase. No seu caso, o DNA passa por um poro de proteínas colocado em uma membrana e uma corrente elétrica detecta os nucleotídeos que estão passando pelo poro. Essa tecnologia permite, em teoria, que se possa sequenciar os nucleotídeos de um cromossomo inteiro (telômero a telômero) numa única leitura. As leituras, então, estão limitadas ao tamanho do DNA que conseguimos isolar (e, infelizmente, no momento é impossível isolar cromossomos eucariotos intactos). Atualmente, as leituras produzidas pelo MinION possuem uma média de tamanho de 100 mil nucleotídeos, e alguns grupos de pesquisa já conseguiram produzir leituras de até 4 milhões de nucleotídeos (Xu et al., 2022). A vantagem do PacBio em relação ao MinION está, principalmente, na qualidade da sequência produzida, pois o sequenciador erra menos de 1 nucleotídeo a cada 10 mil nucleotídeos sequenciados. As vantagens do MinION estão na portabilidade, no preço e na possibilidade de conseguir leituras com mais de 1 milhão de nucleotídeos.

O fato é que, com o MinION e o PacBio, agora podemos obter genomas completos, incluindo as regiões repetitivas (heterocromáticas). Por isso, podemos ver um esforço da comunidade científica em produzir novos genomas para os organismos já sequenciados. Em 2022, foi anunciado o genoma humano completo, telômero a telômero (Nurk et al., 2022), e vemos a mesma iniciativa na comunidade científica que estuda vetores tendo, hoje, vários genomas completos de anofelinos e carrapatos. No VectorBase, é possível encontrar genomas “duplicados” de alguns vetores em que o nome da linhagem muda apenas para um ano recente (como por exemplo, *Anopheles albimanus* Stelca 2020), indicando que essas linhagens foram sequenciadas já com tecnologia PacBio, MinION, ou as duas.

Mais recentemente, um genoma de artrópode de alta qualidade (com possibilidade de genomas inteiros) tem custo aproximado de 5.000 dólares (menos de R\$ 30.000,00). Dessa forma, o sequenciamento de genomas de novos vetores é uma realidade até mesmo para laboratórios de menor porte. Os maiores

entraves atuais (após o entrave financeiro) são a inexperiência na área de genômica e bioinformática, que acaba afastando pesquisadores da área, mostrando a necessidade de formação de biólogos e bioinformatas especialistas em genômica para ocuparem espaço neste crescente campo da biologia de vetores.

Transcriptômica de vetores

A transcriptômica consiste na análise do conteúdo de RNAs, usualmente o mensageiro (mRNA), em uma dada amostra. Inicialmente, esta técnica identificava a sequência dos mRNAs, sem quantificá-los, e após evoluções nas tecnologias de sequenciamento, se tornou possível obter ambas as informações. Os primeiros transcriptomas, na área de insetos vetores, foram feitos para tecidos específicos, usando a tecnologia de sequenciamento de Sanger, como os sialomas do grupo do Professor José Ribeiro (NIH, EUA). Eles focaram na identificação de transcritos codificando proteínas secretadas pela glândula salivar de diversos insetos vetores, como os mosquitos *Ae. aegypti* (Valenzuela et al., 2002), *An. gambiae* (Francischetti et al., 2002), *Anopheles stephensi* (Valenzuela et al., 2003) e os barbeiros *R. prolixus* (Ribeiro et al., 2004a) e *T. infestans* (Assumpção et al., 2008). Apesar da tecnologia envolvida com a preparação do material, chamado de preparação de biblioteca de sequenciamento, e do sequenciamento propriamente dito gerar um número de sequências pequeno, de algumas dezenas até poucos milhares, esses trabalhos representaram uma inovação. Isso porque significaram a entrada em um universo desconhecido, já que o sequenciamento da amostra era feito de forma aleatória, permitindo identificar qualquer mRNA abundante. Diversas famílias de proteínas relacionadas com capacidade hematofágica foram expandidas ou mesmo identificadas, como galectinas, anofelinas, nitroforinas, triabinas e palidipinas. Simultaneamente, um estudo em piolhos (*Pediculus humanus*) levou à identificação da primeira defensina nesse inseto, além de cerca de outras 500 sequências das quase 1200 obtidas (Pedra et al., 2003).

Os estágios de desenvolvimento do vetor da malária (*An. gambiae*) também foram estudados por transcriptômica, comparando diversos estádios de larva, a pupa e tecidos de insetos adultos, identificando transcritos diferencialmente expressos, e os agrupando por perfil de expressão. Os perfis de expressão foram chamados de programas de expressão gênica e correlacionados com processos biológicos do desenvolvimento de *An. gambiae*, além de serem comparados a dados da mosca-das-frutas (*D. melanogaster*)

(Koutsos et al., 2007). Os resultados mostraram, por exemplo, que quatro grupos de genes expressos estavam correlacionados à embriogênese, sendo mais expressos no estágio larval, incluindo transcritos com funções na replicação, transcrição, processamento e regulação de mRNA, ciclo celular, transdução de sinal, crescimento celular e metabolismo. Nesse trabalho, é importante destacar que o transcriptoma ainda utilizou a tecnologia de Sanger, mas produziu mais dados pelo uso de amostras de oito períodos de desenvolvimento, e, no caso de insetos adultos, quatro partes do corpo para machos e fêmeas, somando 15 amostras biológicas preparadas em triplicata, que totalizaram 45 amostras sequenciadas em réplica técnica (90 sequenciamentos). Esse desenho experimental se valeu do uso de um sequenciador de 96 capilares, permitindo a geração de mais dados em menor tempo.

Essa técnica continuou sendo utilizada, em sua maturidade, por muitos anos, permitindo a análise de diversos tecidos, como os folículos ovarianos de *R. prolixus* (Medeiros et al., 2011), os órgãos reprodutivos masculinos (Azevedo et al., 2012), a glândula produtora de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (González-Caballero et al., 2013) e de fêmeas adultas de *Anopheles albimanus* (Martínez-Barnette et al., 2012). Esses artigos têm uma linha condutora comum, que é explorar os transcritos identificados nas amostras, correlacionando fortemente os achados com dados e experimentos, além do transcriptoma, criando uma história para que o foco do trabalho não seja a técnica usada no seu sequenciamento.

A técnica de pirosequenciamento já aumentou a geração de dados para o nível de milhões de sequências, que, montadas, produziam dezenas de milhares de transcritos. O transcriptoma *de-novo*⁵ de *Aedes albopictus* produziu mais de 1.1 milhão de sequências, que foram montadas em quase 70 mil transcritos. Esses dados foram produzidos para ovócitos do mosquito destinados ou não à diapausa⁶ e identificou transcritos relacionados a este processo (Poelchau et al., 2011). Apesar dos achados biológicos, o artigo também mostra enfoque na parte técnica do sequenciamento, das análises computacionais e da validação das variações de expressão encontrada, mostrando claramente a preocupação de mostrar a validade do novo método de sequenciamento.

Em 2014, o artigo “An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug *Rhodnius prolixus*” (Ribeiro et al., 2014), sequenciou quase

⁵Um transcriptoma *de-novo* significa que, apesar de já existirem dados transcriptômicos do organismo em questão, um novo sequenciamento abrangente foi feito, provavelmente com uma tecnologia mais avançada que a usada nos transcriptomas anteriores.

⁶Diapausa é uma retenção temporária do desenvolvimento e está presente em quase todos os filões animais. É controlada por fatores fisiológicos endógenos e pode ou não envolver uma diminuição do metabolismo.

2 milhões de sequências montadas em mais de 300 mil transcritos. Nesse artigo foram identificados transcritos mais expressos no trato digestivo em relação ao corpo, que mostraram diversos grupos de função relacionados à alimentação, tais como: as enzimas digestivas, o transporte/estoque, a matriz extracelular/adesão, as mucinas, a imunidade, as lipocalinas e outras. Além disso, esse trabalho identificou que diferentes regiões do trato digestivo produziam grupos de peritrofinas particulares para compor a membrana peritrófica, dentre o universo de 24 peritrofinas identificadas com sequência completa e mais 14 incompletas. Também foram identificadas as enzimas digestivas para carboidratos, que podem ter papel na digestão da parede celular de endossimbiontes e na interação parasito-hospedeiro, já que muitas proteínas de superfície de parasitos são glicosiladas. Quatro das mais de 10 glicosidases são mais de dez vezes expressas nos tecidos digestivos quando comparadas aos valores de outros tecidos.

Uma espécie de mosquito relevante para a Ásia, por ser o maior vetor de malária na região, o *Anopheles sinensis*, também teve seu transcriptoma sequenciado (Zhu et al., 2014). Uma colônia desta espécie, susceptível a inseticidas, foi usada na preparação de duas bibliotecas, uma agrupando os estágios imaturos (ovos, larvas de primeiro à quarto estádios e pupa) e outra com as fêmeas adultas. Também foram usadas amostras de campo de mosquitos resistentes e susceptíveis a deltametrina. O total de cerca de 625 mil sequências permitiu a montagem de mais de 33 mil transcritos, no qual o foco foi dado aos diferencialmente expressos entre os mosquitos resistentes e susceptíveis (cerca de 2 mil). Dentre os transcritos com maior aumento, estavam as enzimas glutationa-S-transferases, as citocromo-c-oxidases, as P450-mono-oxigenases e os codificantes para proteínas de cutícula, justificando a alta resistência encontrada. Além disso, este estudo também identificou polimorfismos de nucleotídeo único⁷ e microsatélites⁸, com o objetivo de permitir futuras pesquisas de genética evolutiva para esta espécie.

O pirosequenciamento também foi utilizado no estudo de insetos vetores sob uma abordagem indireta, neste caso avaliando sua microbiota, uma vez que ela influencia na capacidade vetorial, por ser relevante no resultado das infecções do mosquito pelos parasitos *Plasmodium*. O artigo “Genetic Dissection of *Anopheles gambiae* gut epithelial responses to *Serratia marcescens*”

⁷Polimorfismos de nucleotídeo único, conhecidos como SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), são diferenças em um único nucleotídeo entre sequências de DNA comparadas.

⁸Microsatélites são sequências repetitivas de DNA. Podem ser formados por homopolímeros (um único nucleotídeo que se repete “n” vezes) ou por combinações de repetições (ex.: ATATATATAT).

(Stathopoulos et al., 2014) sequenciou a microbiota dos mosquitos sob várias condições. Ele mostrou que, quando os genes codificantes das proteínas contendo o domínio fibronectina tipo III (FN3D) são silenciados, os insetos ficam mais susceptíveis a uma infecção artificial com *S. marcescens*, assim como a microbiota de mosquitos sem infecção muda, favorecendo uma população de *Enterobacteriaceae*. Esses dados sugerem que as variações naturais genéticas em genes relacionados à imunidade podem modular a população bacteriana no intestino do mosquito e sugerem, conseqüentemente, uma modulação da capacidade vetorial.

O inseto *T. infestans* teve como um dos primeiros dados de sequenciamento o transcriptoma de seu tegumento, que inclui a cutícula e a epiderme adjacente (Calderón-Fernández et al., 2017). Esse estudo, com quase 150 mil sequências, produziu cerca de 15 mil transcritos, anotando funcionalmente mais que a metade. Pode-se dizer que mais de 10% do total de transcritos codificantes para proteínas estavam relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e correlatos (como ácido graxo sintases, elongases, desaturases e ácido graxo álcool redutases), proteínas estruturais do tegumento e ao sistema de detoxificação de inseticida (incluindo citocromos P450, esterases e glutathione S-transferases).

O desenvolvimento da técnica de RNA-seq foi baseado nas novas tecnologias de sequenciamento, que aumentaram muito a profundidade de sequenciamento, permitindo que os transcriptomas definitivamente pudessem ser ferramentas muito mais precisas para quantificar os transcritos (Wang; Gerstein; Snyder, 2009). Esse tipo de sequenciamento, por volta do ano 2009, produzia milhões de sequências, apesar de serem mais curtas. Alguns transcriptomas foram sequenciados *de-novo* com esta tecnologia, como o de *Anopheles funestus* (Crawford et al., 2010), *An. sinensis* (Chen et al., 2014) e *Triatoma brasiliensis* (Marchant et al., 2015)

A capacidade quimio-sensora dos insetos foi um dos temas abordados desde o início do RNA-seq, identificando assinaturas de expressão gênica relacionadas ao tecido e ao sexo para *An. gambiae* (Pitts et al., 2011), à influência da alimentação sanguínea (Rinker et al., 2013a) e à especialização para odores humanos (Rinker et al., 2013b). Outros mosquitos também foram estudados: em *An. sinensis*, o efeito da alimentação sanguínea na expressão de genes relacionados à quimiorrecepção na antena foi abordado, identificando os genes influenciados (Chen et al., 2017) e em *Ae. albopictus*, os genes relacionados à sensoriedade foram identificados em populações naturais (Gomulski et al., 2020). Além disso, mostrou-se, pela primeira vez, uma função para os receptores

olfativos em outros tecidos não-olfativos, como os testículos em *An. gambiae*. Neles, há a expressão de receptores olfativos, incluindo o correceptor AgOrco, que está presente no flagelo do espermatozoide e cuja ligação de moléculas a esse correceptor ativa o batimento do flagelo (Pitts et al., 2014). Quanto aos triatomíneos, estudos em *T. brasiliensis* sugerem que aqueles domiciliados mostraram menor expressão da maquinaria quimio-sensora que espécimes coletados de outros ambientes (Marchant et al., 2016), além da comparação desta maquinaria em dois triatomíneos próximos, *Rhodnius robustus* e *R. prolixus* (Marchant et al., 2021).

O desenvolvimento dos insetos também traz questões biológicas diversas, que foram abordados por RNA-seq, incluindo diapausa, quiescência, embriogênese e genes maternais. Foi mostrado que existe um conjunto de genes controlados pela diapausa em *Ae. albopictus* e em diversos outros taxa, incluindo os genes *Pepck* e *PCNA* (Poelchau et al., 2013b). Além disso, observou-se que os genes com expressão alterada durante a diapausa tendem, conforme o avanço da diapausa, a ter expressão semelhante aos regulados pela quiescência, com exceção do metabolismo de lipídios (Poelchau et al., 2013a). Estudos de RNA-seq sobre o ovário (Coelho et al., 2021) e a dinâmica de expressão de genes maternais na embriogênese de *R. prolixus* levaram a proposta de três grupos de genes com expressões que diminuem, transientes e invariáveis ao longo da ovogênese e embriogênese (Pascual; Rivera-Pomar, 2022). Além disso, a identificação da via de piRNA, nesse mesmo inseto, permitirá outros estudos em ovogênese e fertilidade masculina (Brito et al., 2018).

A alimentação sanguínea, suas consequências fisiológicas em diversos tecidos e a infecção por parasitos também formam um grupo de desafios fisiológicos dos insetos hematófagos, que não poderia ser deixado de fora da abordagem por RNA-seq. A filtração nos túbulos de Malpighi sofrem mudanças drásticas com a alimentação sanguínea, devido à necessidade de aumento de atividade, eliminando muito líquido em pouco tempo, como exemplificado em *Ae. albopictus* (Esquivel; Cassone; Piermarini, 2014, 2016). Certos transcriptomas abordando as glândulas salivares, corpo gorduroso e intestino de barbeiros, alguns deles incluindo insetos alimentados com sangue e parasitos, apontaram os genes relevantes para a função desses tecidos (Nevoa et al., 2018) e as mudanças de expressão gênica relacionadas à alimentação e à infecção (Carvalho-Costa et al., 2021). A tolerância de moscas tsé-tsé à infecção por *Trypanosoma brucei* foi estudada por RNA-seq das glândulas salivares, mostrando uma intensa resposta local para controlar os danos ao epitélio dessas glândulas, a produção de espécies reativas de oxigênio e a infecção parasitária, o que explica a tolerância (Matetovici; Caljon; Van Den Abbeele, 2016).

Apesar de menos exploradas, outras abordagens também são possíveis com RNA-seq, como o sequenciamento de RNAs não codificantes (Brito et al., 2018) e a montagem e análise de genomas mitocondriais (Ding et al., 2020), que, no caso do mosquito *An. sinensis*, mostrou os genes relacionados à resistência à piretróides.

Genoma de barbeiros

A genômica de barbeiros foi iniciada com os trabalhos que identificaram o conteúdo cromossômico de diversas espécies de barbeiro. Alguns deles datam de 1950, como o que identificou 22 cromossomos (20 autossomos como $2n$ mais XY) na espécie *R. prolixus* (Schreiber; Pellegrino, 1950). O grupo do Professor Panzera revisou a literatura diversas vezes e determinou o conteúdo cromossômico de várias espécies de barbeiros, de diferentes origens. Dentre as dezenas de triatomíneos analisados, podemos citar as espécies: a) *R. prolixus* e *Dipetalogaster maximus*, com 20 cromossomos autossômicos ($2n$) mais dois cromossomos sexuais (XY), sem heterocromatina constitutiva (C-heterocromatina) nos autossomos; e b) *T. brasiliensis* e *T. infestans*, com o mesmo número de cromossomos, mas com presença de C-heterocromatina. É importante destacar que, de maneira geral, quase todas as espécies tiveram 20 autossomos ($2n$), mas os cromossomos sexuais também foram encontrados em maior número (XXY ou XXXY). Além disso, o conteúdo de C-heterocromatina nos autossomos se mostrou bastante frequente no gênero *Triatoma* (Panzera et al., 2007, 2010).

Apesar da conservação do número de cromossomos, existe grande variabilidade genética entre os triatomíneos, mostrada não só pela presença da heterocromatina já citada, como também pela localização do conjunto gênico do DNA ribossomal 45S. Esse grupo gênico não se localiza em um só lugar em todas as espécies, como mostrado por uma sonda específica para o DNA ribossomal de triatomíneos. Ela sempre localizou o conjunto no cromossomo X, mas, dependendo da espécie, também foi encontrado em mais de um X, no Y, e em autossomos (Panzera et al., 2012).

Os genomas de triatomíneos variam, em termos de tamanho, em até quatro vezes quando comparamos os menores e maiores genomas. O gênero *Rhodnius* tem espécies que estão entre os de menor genoma, além de terem menor variação de tamanho entre elas. A Por exemplo, a espécie *R. prolixus* tem 0,75pg de DNA, o que equivale a cerca de 733 megabases (Mb). O gênero *Triatoma* tem tamanhos variados entre as espécies e, mesmo dentro de uma espécie, por

exemplo, o *T. infestans*, existem variedades com enorme diferença no tamanho do genoma. A variante “Não-Andino” tem 1,52pg (1.486Mb), o “Dark-Morph” 1.44pg (1.408Mb) e o “Andino” 1,98pg (1.936Mb) (F. Panzera et al., 2007; Pérez et al., 2010).

O primeiro genoma de um triatomíneo sequenciado foi de *R. prolixus*, que alcançou 95% do tamanho esperado, com 702,6Mb montados em 27.872 segmentos (*scaffolds*) em sua versão v3.0.1, designada RproC1 (Mesquita et al., 2015). Esse genoma passa por outras montagens detalhadas, no tópico seguinte, mas somente, em 2019, uma mudança significativa ocorreu. Dudchenko e colaboradores utilizaram a versão RproC3 para realizar uma montagem baseada na técnica de Hi-C⁹, em que realizaram o mapeamento cromossômico, aumentando a contiguidade, organizando e ordenando os segmentos de DNA em sequências, ao nível cromossômico, disponível no site DNAZoo (https://www.dnazoo.org/assemblies/Rhodnius_prolixus). Essa montagem, aqui nomeada “RproHiC1”, contém 17.755 segmentos, apesar de somente 12 deles equivalerem aos cromossomos de *R. prolixus* (10 autossomos + XY), contendo a grande parte do volume de informação, enquanto os outros são pequenos fragmentos de sequências que não foram mapeados. A Figura 3, a seguir, apresenta os dados de tamanho e métricas de montagem e mostra a diferença de contiguidade entre as montagens.

⁹A técnica Hi-C cria ligações covalentes cruzadas entre as proteínas ligadas ao DNA. Em seguida, o DNA é fragmentado, biotilado e os fragmentos de DNA são ligados, favorecendo a ligação daqueles presos a uma mesma proteína. O produto da ligação é fragmentado novamente e os pequenos fragmentos biotilados são purificados e sequenciados. Os fragmentos biotilados contêm um trecho de cada pedaço de DNA original e vão identificar duas regiões espacialmente próximas, provavelmente de um mesmo cromossomo (Dudchenko e cols <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aal3327>).

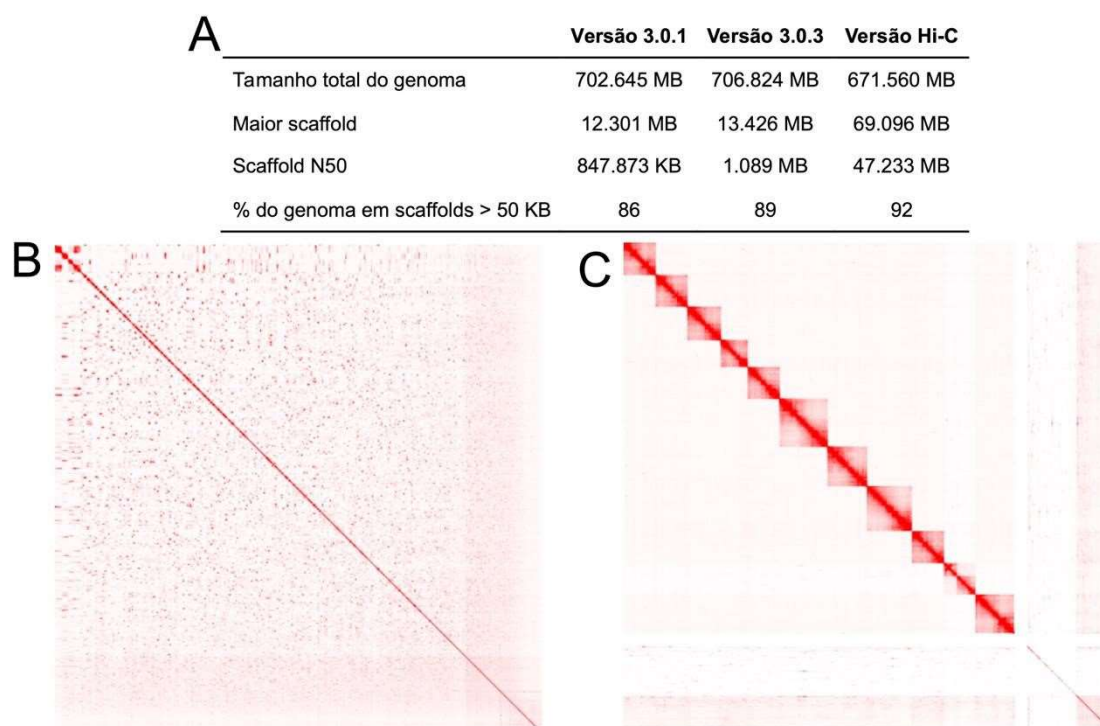


Figura 3: Dados de diferentes versões de montagem do genoma de *R. prolixus*. **(A)** dados numéricos das montagens RproC1 (v3.0.1), RproC3 (v3.0.3) e versão Hi-C. **(B)** Mapeamento da RproC3: repare que pequenos quadrados podem ser vistos no canto superior esquerdo da imagem, ilustrando que poucas sequências foram mapeadas. **(C)** Mapeamento da versão RproHiC1: repare nos 12 quadrados representando a organização das sequências mapeadas nos 12 cromossomos (10 autossomos como 1n mais XY). A imagem A foi obtida de (NICOLAS ARAUJO, 2022). As imagens B e C foram reproduzidas do site https://www.dnazoo.org/assemblies/Rhodnius_prolixus.

Fonte: Arquivo pessoal

A segunda espécie de triatomíneo a ser sequenciada foi o *Triatoma rubrofasciata* (Liu et al., 2019). Essa espécie tem 25 cromossomos, dos quais 22 são autossomos (2n) e 3 são cromossomos sexuais XXY (Pérez; Ferrandis; Calleros, 2010), sendo a espécie com maior conteúdo cromossômico. Os trabalhos anteriores não tinham uma estimativa do tamanho deste genoma, que foi estimado usando os próprios dados de sequenciamento, pela técnica chamada de contagem de k-mer (Liu et al., 2013) em 757 Mb. O sequenciamento foi feito apenas com uma fêmea, então, não há dados do cromossomo Y, e foram utilizadas as tecnologias Illumina (sequências curtas) e PacBio (longas). Na montagem também foi usada a técnica de Hi-C, totalizando 680 Mb montados nos 11 autossomos e dos dois cromossomos X.

Após as montagens do genoma, é importante identificar regiões funcionais, como genes codificadores de proteínas, elementos de repetição, região promotora, regiões regulatórias e genes de RNAs não-codificadores. Esse

processo é conhecido como anotação genômica. Os genes codificadores de proteínas são os responsáveis por dar origem às principais moléculas responsáveis pelo metabolismo da célula. Os elementos de repetição compõem grande parte do genoma de eucariotos e, apesar de não terem suas funções bem definidas, é evidente a sua importância para a diversidade genética, devido à capacidade em gerar modificações no genoma. Os RNAs não-codificadores também têm papel importante na regulação da expressão gênica, seja promovendo (tRNA e rRNA) ou inibindo essa expressão (miRNA e siRNA).

Em *R. prolixus*, a versão “oficial” da predição gênica, em 2022, é a RproC3.5, baseada no genoma RproC3 e disponível no site do VEuPathDB, possuindo 15.114 transcritos preditos. Uma versão ainda não publicada de predição gênica foi feita pelo grupo do Professor Mesquita, na montagem RproHiC1, com o software Augustus e está disponível (<http://bioinfo.iq.ufrj.br/genomes> ou <http://www.triatominebase.org>). Essa predição não publicada não será descrita nesse livro, mas está disponível para utilização. Maiores detalhes de todas as versões de predição serão apresentados no tópico seguinte.

O genoma de *T. rubrofasciata* foi predito, inicialmente, com uma metodologia *de novo* (Augustus), assim como uma baseada em similaridade (usando tblastn, Iso-seq and Gmap) para identificar 12.691 genes codificantes de proteínas, mostrando o número de genes um pouco menor que de *R. prolixus*. Apesar disso, os autores comentam que estimam uma completude de 95,1%, baseado em análise com o programa BUSCO, o que é muito bom, já que a predição RproC3.4 tem 91,7% de completude (dados não publicados). É importante destacar que a versão mais nova RproC3.5 não tem avaliação com o BUSCO publicada, nem feita pelo nosso grupo.

Bancos de dados para triatomíneos

Tradicionalmente, o banco de dados com as informações de triatomíneos tem sido o VectoBase. A montagem genômica disponível para a navegação é a RproC3 (v3.0.3), que foi liberada no mesmo ano da publicação do artigo do genoma (descrito no tópico anterior), sendo uma montagem mais contígua em relação à anterior, com 16.537 segmentos, somando 706,8 Mb. Apesar de ter quase o mesmo tamanho, essa montagem incluía 142 Mb (20%) de caracteres “N”, utilizados na ligação de segmentos sabidamente adjacentes para a criação de *scaffolds*. Essa versão ainda não tem mapeamento cromossômico e seus detalhes podem ser obtidos em https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMPTX_rproCDCC. É importante destacar, ainda, que, no final de 2019, o

site Vectorbase foi fundido com o EuPathDB, formando o VEuPathDB (The Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Bioinformatics Resource Center), o que mudou a maneira de numerar suas versões de bancos de dados.

O site do VectorBase e o portal VEuPathDB têm como pontos fortes diversas funções que permitem a busca por nome, id, por similaridade (Blast) no genoma ou predição gênica corrente, por número de regiões transmembrana ou presença de peptídeo sinal nas proteínas preditas. Para as entradas gênicas, seus transcritos e proteínas também existem análises pré-computadas de sintenia, ortologia, transcriptômica (expressão) e características das proteínas, como domínios conservados, peptídeo sinal e hélices transmembrana, disponíveis em um navegador de proteínas. Todos os genes, transcritos e proteínas podem ser analisados por Blast contra outros organismos presentes no banco de dados. Apesar disso, podemos apontar como ponto negativo a indisponibilidade de versões anteriores de montagem de genoma (RproC1) e suas respectivas predições gênicas, assim como as versões anteriores de predição gênica para o genoma RproC3, que não estão mais disponíveis para navegação no site VectorBase, apenas para download.

O banco de dados GenomeRio foi criado para hospedar a versão RproC3 do genoma de *R. prolixus*, com dados de novos genes identificados pela comparação a partir dos dados de transcriptomas (vide artigo “Analysis of ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*!”). O trabalho identificou 2.126 genes que estavam ausentes na versão publicada anteriormente (genoma RproC1, predição RproC1.3). Esse banco de dados foi criado como um espelho do UCSC Genome Browser, porém com os dados de *R. prolixus* incluídos. Apesar das inúmeras funcionalidades descritas no artigo, ele não esteve disponível durante a escrita deste capítulo.

O banco genômico DNA Zoo (<https://www.dnazoo.org/>) foi criado em 2018, e contém montagem de diversos genomas, utilizando a tecnologia de Hi-C, que permite a montagem a nível cromossômico. Atualmente, conta com mais de 300 genomas de espécies de diversos grupos, incluindo fungos, plantas e animais. O único triatomíneo presente no banco é o *R. prolixus*, e os dados dessa montagem já foram discutidos no tópico anterior. Esse banco de dados não objetiva interação com o público em geral, não possuindo um navegador de genomas com dados processados, mas almeja ser um repositório genômico, como um banco de dados de genomas, oferecendo montagens melhoradas, em relação aos genomas na sua versão rascunho, ou seja, montados antes da tecnologia Hi-C.

Durante toda a trajetória do genoma de *R. prolixus*, as diferentes predições fizeram o número de genes preditos mudar (Tabela 2), especialmente devido à

metodologia utilizada, que já inclui o *pipeline* do Ensembl (versões RproC1.0 à 1.2 e RproC3.1 à 3.2; VectorBase), o Geneld (RproC1.3) e o *pipeline* do VEuPathDB (RproC3.3 à 3.5). Além disso, algumas “predições” parecem ter sido uma simples tentativa de reposicionamento de genes já preditos, levando a um menor número de genes, em relação à versão anterior, como a RproC3.1 em relação a RproC1.3. No entanto, a predição RproC3.4, feita através da anotação da comunidade, conseguiu melhorar, minimamente, esses problemas, uma vez que alguns genes ressurgiram. As predições RproHiC1.1 e RproACR1.1 não foram descritas neste livro para não inviabilizar sua publicação como artigo, apesar de estarem disponíveis nos links descritos a seguir.

Versão da Predição	Número de transcritos	Número de peptídeos
RproC1.0	16.184	16.134
RproC1.1	17.155	15.441
RproC1.2	17.256	15.441
RproC1.3 *	17.262	15.456
RproC3.1	16.857	15.078
RproC3.2	15.755	15.078
RproC3.3 ou VEuPathDB 47 a 48	15.752	15.075
RproC3.4 ou VEuPathDB 49 a 54 [#]	15.783	15.106
RproC3.5 ou VEuPathDB 55 ^{&}	15.114	15.114
RproHiC1.1	Em andamento	Em andamento
RproACR1.1	Em andamento	Em andamento

Tabela 2: Versões do genoma e predição gênica com acesso público. As contagens de transcritos e proteínas foram feitas nos arquivos fasta disponíveis no repositório do VectorBase. *versão utilizada para o artigo do genoma (Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection). [#]Em 2022 a versão disponível para navegação no site do VectorBase era o genoma RproC3 com a predição VEuPathDB 54 que pode ser acessada em <https://vectorbase.org/vectorbase/app/jbrowse?data=/a/service/jbrowse/tracks/default> (é preciso selecionar o organismo para acessar o genoma e depois escolher a predição gênica nos tracks). &Em 2022 a versão disponível no site do VEuPathDB era o genoma RproC3 com a predição VEuPathDB 55 que pode ser acessada em <https://veupathdb.org/veupathdb/app/search?q=rhodnius%20prolixus&documentType=gene>. As predições RproHiC1.1 e RproACR1.1 não tiveram seus dados incluídos neste livro para não inviabilizar sua publicação como artigo, mas estão disponíveis no link que segue no texto.

Fonte: Arquivo pessoal

Nosso grupo está construindo o banco de dados **TriatomineBase** (<http://www.triatominebase.org>) para poder contribuir com um repositório tipo BETA, ou seja, um banco de dados que poderá ser editado pela interação com a comunidade bem como ser atualizado a qualquer momento. Planejamos que versões estáveis sejam geradas de tempos em tempos, para serem enviadas ao VEuPathDB e ter uma hospedagem definitiva. O TriatomineBase contornou o problema da indisponibilidade das versões antigas das montagens do genoma, assim como das predições gênicas, já que todas as versões genômicas e de predição gênica estão disponíveis em um navegador de genomas tipo Jbrowse, o mesmo usado no VectorBase. Além disso, ele também possui a predição gênica da montagem RproHiC1 com o software Augustus e criou uma versão “across” do genoma chamada RproACR1, contendo o genoma RproHiC1, suplementado com trechos de DNA de montagens anteriores, contendo genes já preditos, que não foram encontrados na predição RproHiC1.1. As novas predições (RproHiC1.1 e RproACR1.1) e seus dados associados ainda estão em fase de escrita para publicação, mas já estão disponíveis no endereço mencionado.

O portal TriatomineBase tem todos os seus dados de *R. prolixus* mapeados contra diversos dados de RNAseq, disponíveis na literatura. É possível visualizar a intensidade de expressão dos transcritos, intuitivamente, em um navegador (Figura 4), além da possibilidade da verificação pelo código ou pela anotação do gene. É importante citar que a montagem e predição gênica de *T. rubrofasciata* ainda não estão disponíveis no TriatomineBase, nem em nenhum outro banco de dados, apenas como parte dos dados suplementares da publicação.

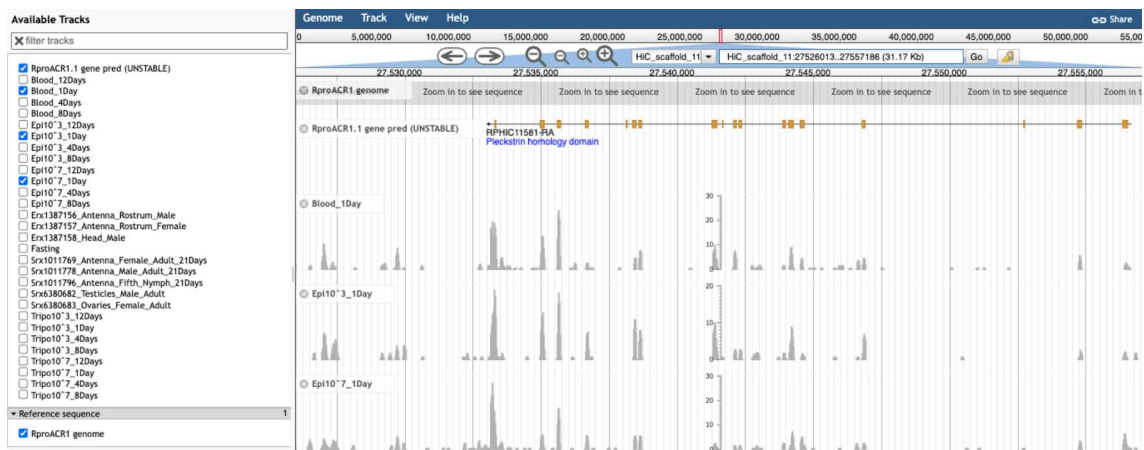


Figura 4: Tela do navegador de genomas disponível no site TriatomineBase. Montagem de genoma RproACR1, predição RproACR1.1, mostrando o gene RPHIC11581-RA, anotado automaticamente como “Pleckstrin homology domain”.

Fonte: Arquivo Pessoal

Perspectivas na genômica de vetores

É certo que os custos de sequenciamento de DNA, RNA e proteínas devem continuar a cair. Da mesma forma, a acessibilidade a equipamentos deve avançar muito nos próximos anos. A Illumina já fala em genomas humanos completos por até 100 dólares. E a Oxford Nanopore já revelou estar trabalhando em um sequenciador chamado SmidgelON, que seria acoplado a celulares. Não estamos distantes, então, de ter, em nossas mãos, aparelhos semelhantes aos “tricorders” mostrados na série Star Trek desde a década de 1960. Em algumas décadas, o sequenciamento de genomas será tão trivial e barato, que será realizado diretamente no trabalho de campo, com dados disponíveis em questão de horas (ou minutos).

Mas o que fazer com tal possibilidade? Primeiramente, ainda existem centenas de espécies de vetores sem o genoma sequenciado, e o primeiro passo será ter esses genomas disponíveis, de preferência com qualidade de sequenciamento de telômero a telômero. Depois disso, a imaginação é o limite. Porém, existem vários pontos que ainda necessitam de um grande melhoramento. O sequenciamento do DNA e de outras moléculas é apenas um passo numa era verdadeiramente genômica. O problema é que, hoje, conseguimos gerar mais dados do que conseguimos analisar. Isso porque, mais da metade das sequências depositadas no NCBI não possuem nenhuma função atribuída. Estima-se que o estudo da função de um único gene pode levar de 1 a 3 anos, dependendo da “sorte” do pesquisador (existem genes que ainda não conseguimos estudar pelos métodos atuais – *knockout*, *knockdown*, clonagem, etc). Então, enquanto não existirem métodos de alto desempenho para o estudo da função de genes, ainda viveremos um grande gargalo de informação científica. Uma das grandes perspectivas no melhoramento de métodos de identificação de genes está no desenvolvimento de *softwares* de rede neural, as Inteligências Artificiais, que poderiam analisar milhares de sequências, prevendo conformação tridimensional de proteínas, sítios de ligação e interações para predição de função de genes.

O segundo gargalo está na disponibilização e análise dos dados. Apesar das bases de dados terem evoluído bastante, desde que o NCBI foi criado, em 1990, elas ainda estão longe de serem simples de usar. Alguns dos problemas dessas bases são: i) muito variadas e muito específicas; ii) sem homogeneidade e de difícil usabilidade; e iii) com falta de comunicação. Isso porque, atualmente, temos bases de dados de genomas para tudo, como o GenBank, e muito específicas, como, por exemplo, para genoma de *Arabidopsis* sp., *Drosophila*,

humano, de helmintos, de protozoários, de vetores, etc. As diferentes bases de dados possuem diferentes interfaces, diferentes ferramentas, e diferentes conjuntos de dados. Além disso, é quase impossível usar quaisquer das bases de dados, sem treinamento.

Infelizmente, as bases de dados não se comunicam entre si. Para piorar, algumas delas usam identificadores das sequências específicas para as bases de dados, tornando mais difícil de procurar pelos mesmos dados em outras bases. Então, precisamos evoluir para uma base de dados de genômica única (ou poucas, com usabilidade padronizada) e de usabilidade mais familiar para novos usuários.

O terceiro passo é o avanço dos processos de bioinformática. Infelizmente, a bioinformática ainda não é uma disciplina obrigatória nas universidades federais do Brasil. Além de termos alunos iletrados na bioinformática, é comum que diferentes grupos de pesquisadores criem uma infinidade de programas para solução de problemas semelhantes, causando confusão e temor em cientistas que gostariam de entrar na área da genômica. Também é frequente pesquisadores novatos em genômica se perderem na decisão de qual montador usar, qual anotador, como atribuir função aos genes e que análises, a posteriori, são relevantes. Isso sem falar na barreira de ter que aprender linguagens, como Python, Perl e saber usar linhas de comando em Linux. Atualmente, o que temos de melhor usabilidade é o Galaxy.org, um ambiente de programas de bioinformática, que fica disponível para acesso pelo navegador de web. No Galaxy, é possível, de forma intuitiva, desenhar pipelines que vão da análise das sequências brutas à montagem, análise de qualidade e anotação de genomas, tudo com poucos cliques. Além disso, a ferramenta Galaxy é gratuita. Ela é um grande avanço na usabilidade dos processos de bioinformática, mas ainda não chegou ao ponto ideal. Uma ferramenta ideal seria aquela que perguntaria ao usuário o que ele deseja fazer (ou qual pergunta deseja responder), e, com um clique, a ferramenta montaria o pipeline e faria todos os processos. Mais uma vez, com o desenvolvimento de *softwares* de Inteligência Artificial voltados para bioinformática, estamos cada vez mais perto de sistemas intuitivos, que nos ajudem em escolhas complexas.

Considerações finais

Apesar dos avanços e da disponibilidade de sequenciamento de genomas, ainda temos um longo caminho a percorrer para que a genômica se torne um processo tão simples quanto ler um livro. Independentemente disso, os impactos

da genômica nos estudos de vetores são cada vez maiores. Os estudos já evoluíram de uma simples descrição do genoma para estudos de populações inteiras (genomas de milhares de indivíduos), que são capazes de correlacionar mutações de nucleotídeo único com fenótipos complexos (como resistência a inseticidas). Além disso, os transcriptomas têm sido uma ferramenta crucial na identificação de genes-chave em processos fisiológicos e de interação parasita-vetor. Atualmente, devido à genômica e aos avanços indiretos correlacionados a ela (CRISPR-cas9 e sistemas de *gene drive*) estamos mais perto do que nunca de bloquear a transmissão de patógenos por vetores (Hammond et al., 2016; Carballar-Lejarazú et al., 2020; Simoni et al., 2020). Por fim, como ressaltado anteriormente, o impacto que a genômica terá, no campo da medicina tropical e da saúde global, além da ciência básica, estará limitada apenas pela nossa “imaginação”.

Referências

- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, v. 287, n. 5461, p. 2185–95, 24 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007978>>.
- ARENSBURGER, P. et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* Establishes a Platform for Mosquito Comparative Genomics. *Science*, v. 330, n. 6000, p. 86–88, out. 2010.
- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 2, p. 213–232, fev. 2008.
- ATTARDO, G. M. et al. Genome Sequence of the Tsetse Fly (*Glossina morsitans*): Vector of African Trypanosomiasis. *Science*, v. 344, n. 6182, p. 380–386, 25 abr. 2014.
- ATTARDO, G. M. et al. Comparative genomic analysis of six *Glossina* genomes, vectors of African trypanosomes. *Genome Biology*, v. 20, n. 1, p. 187, 2 dez. 2019.
- AZEVEDO, R. V. D. M. et al. The Transcriptome of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Male Reproductive Organs. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e34495, 5 abr. 2012.
- BARRERO, R. A. et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *International Journal for Parasitology*, v. 47, n. 9, p. 569–583, ago. 2017.
- BRITO, T. et al. Transcriptomic and functional analyses of the piRNA pathway in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 10, p. e0006760, 10 out. 2018.
- CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. M. et al. Transcriptome Analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Integument. *Journal of Medical Entomology*, v. 54, n. 6, p. 1531–1542, 7 nov. 2017.
- CARBALLAR-LEJARAZÚ, R. et al. Next-generation gene drive for population modification of the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 37, p. 22805–22814, 15 set. 2020. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2010214117>>. Acesso em: 12 out. 2022.
- CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Salivary and Intestinal Transcriptomes Reveal Differential Gene Expression in Starving, Fed and *Trypanosoma cruzi*-Infected *Rhodnius neglectus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 17 dez. 2021.

CASTLE, W. E. INBREEDING, CROSS-BREEDING AND STERILITY IN DROSOPHILA. *Science (New York, N.Y.)*, v. 23, n. 578, p. 153, 1906. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17778994/>>. Acesso em: 12 out. 2022.

CHEN, B. et al. De novo transcriptome sequencing and sequence analysis of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 314, 2014.

CHEN, Q. et al. The antenna transcriptome changes in mosquito *Anopheles sinensis*, pre- and post- blood meal. *PLOS ONE*, v. 12, n. 7, p. e0181399, 17 jul. 2017.

CHEN, X.-G. et al. Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 44, 3 nov. 2015.

COELHO, V. L. et al. Analysis of ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1918, 21 dez. 2021.

CRAWFORD, J. E. et al. De Novo Transcriptome Sequencing in *Anopheles funestus* Using Illumina RNA-Seq Technology. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. e14202, 2 dez. 2010.

DEAN RIDER, S.; MORGAN, M. S.; ARLIAN, L. G. Draft genome of the scabies mite. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–14, 10 nov. 2015. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-1198-2>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

DING, Y. et al. Mitochondrial genes associated with pyrethroid resistance revealed by mitochondrial genome and transcriptome analyses in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, v. 76, n. 2, p. 769–778, 5 fev. 2020.

ESQUIVEL, C. J.; CASSONE, B. J.; PIERMARINI, P. M. Transcriptomic Evidence for a Dramatic Functional Transition of the Malpighian Tubules after a Blood Meal in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, p. e2929, 5 jun. 2014.

ESQUIVEL, C. J.; CASSONE, B. J.; PIERMARINI, P. M. A *de novo* transcriptome of the Malpighian tubules in non-blood-fed and blood-fed Asian tiger mosquitoes *Aedes albopictus*: insights into diuresis, detoxification, and blood meal processing. *PeerJ*, v. 4, p. e1784, 10 mar. 2016.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*, v. 205, n. 16, p. 2429–2451, 15 ago. 2002.

GHURYE, J. et al. A chromosome-scale assembly of the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *GigaScience*, v. 8, n. 6, 1 jun. 2019.

GOMULSKI, L. M. et al. Transcriptional variation of sensory-related genes in natural populations of *Aedes albopictus*. *BMC Genomics*, v. 21, n. 1, p. 547, 7 dez. 2020.

GONZÁLEZ-CABALLERO, N. et al. Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 56, 7 dez. 2013.

GULIA-NUSS, M. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. 2016. Disponível em: <www.nature.com/naturecommunications>. Acesso em: 23 abr. 2023.

HAMMOND, A. et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology* 2015 34:1, v. 34, n. 1, p. 78–83, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.3439>>. Acesso em: 12 out. 2022.

HOLT, R. A. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, v. 298, n. 5591, p. 129–149, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1076181>>.

HON, T. et al. Highly accurate long-read HiFi sequencing data for five complex genomes. *Scientific Data* 2020 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–11, 17 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41597-020-00743-4>>. Acesso em: 12 out. 2022.

HOSKINS, R. A. et al. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome biology*, v. 3, n. 12, p. 1–16, 31 dez. 2002. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-12-research0085>>. Acesso em: 12 out. 2022.

J. W. WRIGHT; R. PAL. *Genetics of Insect Vectors of Disease*. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 1967.

JIA, N. et al. Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities. *Cell*, v. 182, p. 1328- 1340.e13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

JIANG, X. et al. Genome analysis of a major urban malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Genome Biology*, v. 15, n. 9, p. 459, 23 set. 2014.

KIRKNESS, E. F. et al. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 27, p. 12168–12173, 6 jul. 2010.

KOUTSOS, A. C. et al. Life cycle transcriptome of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* and comparison with the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 27, p. 11304–11309, 3 jul. 2007.

LABBÉ, F. et al. Genomic analysis of two phlebotomine sand fly vectors of leishmania from the new and old World. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 4, p. e0010862, 12 abr. 2023.

LIU, B. et al. Estimation of genomic characteristics by analyzing k-mer frequency in de novo genome projects. 8 ago. 2013.

LIU, Q. et al. A chromosomal-level genome assembly for the insect vector for Chagas disease, *Triatoma rubrofasciata*. *GigaScience*, v. 8, n. 8, 1 ago. 2019.

LOGUE, K. et al. Whole-genome sequencing reveals absence of recent gene flow and separate demographic histories for *Anopheles punctulatus* mosquitoes in Papua New Guinea. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 6, p. 1263–1274, mar. 2015.

MARCHANT, A. et al. De novo transcriptome assembly for a non-model species, the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis*, a vector of Chagas disease. *Genetica*, v. 143, n. 2, p. 225–239, 19 abr. 2015.

MARCHANT, A. et al. Under-Expression of Chemosensory Genes in Domiciliary Bugs of the Chagas Disease Vector *Triatoma brasiliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, p. e0005067, 28 out. 2016.

MARCHANT, A. et al. Chemosensory Gene Expression for Two Closely Relative Species *Rhodnius robustus* and *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) Vectors of Chagas Disease. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 9, 6 out. 2021.

MARINOTTI, O. et al. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Research*, p. 1–14, 12 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkt484>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

MARTÍNEZ-BARNETCHE, J. et al. Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 207, 30 dez. 2012.

MATETOVICI, I.; CALJON, G.; VAN DEN ABEELE, J. Tsetse fly tolerance to *T. brucei* infection: transcriptome analysis of trypanosome-associated changes in the tsetse fly salivary gland. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 971, 25 dez. 2016.

MEDEIROS, M. N. et al. Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 10, p. 823–831, out. 2011.

MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 1 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1506226112>>.

MORGAN, T. H. SEX LIMITED INHERITANCE IN *DROSOPHILA*. *Science (New York, N.Y.)*, v. 32, n. 812, p. 120–122, 1910. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17759620/>>. Acesso em: 12 out. 2022.

- MORGAN, T. H. *The mechanism of Mendelian heredity*. New York: Holt, 1915.
- MYERS, E. W. et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science (New York, N. Y.)*, v. 287, n. March, p. 2196–2204, 2000.
- NEAFSEY, D. E. et al. The evolution of the Anopheles 16 genomes project. *G3 (Bethesda, Md.)*, v. 3, n. 7, p. 1191–4, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3704246&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 set. 2013.
- NENE, V. et al. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, 22 jun. 2007.
- NEVOA, J. C. et al. An insight into the salivary gland and fat body transcriptome of *Panstrongylus lignarius* (Hemiptera: Heteroptera), the main vector of Chagas disease in Peru. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 2, p. e0006243, 20 fev. 2018.
- NICOLAS ARAUJO. *Genoma de Rhodnius prolixus: Predição gênica, conciliação com versões anteriores e disponibilização em navegador WEB*. 2022. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.
- NURK, S. et al. The complete sequence of a human genome. *Science*, v. 376, n. 6588, p. 44–53, 1 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj6987>>. Acesso em: 12 out. 2022.
- OLAFSON, P. U. et al. The genome of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals potential mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. *BMC Biology*, v. 19, n. 1, p. 41, 10 mar. 2021.
- PAINTER, T. S. The Structure of Salivary Gland Chromosomes. <https://doi.org/10.1086/280842>, v. 73, n. 747, p. 315–330, jul. 1939. Disponível em: <<https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/280842>>. Acesso em: 12 out. 2022.
- PANZERA, F. et al. Genome size determination in chagas disease transmitting bugs (hemiptera-triatominae) by flow cytometry. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 76, n. 3, p. 516–21, mar. 2007.
- PANZERA, F. et al. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 128, n. 1–3, p. 77–87, 2010.
- PANZERA, Y. et al. High Dynamics of rDNA Cluster Location in Kissing Bug Holocentric Chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 138, n. 1, p. 56–67, 2012.
- PASCUAL, A.; RIVERA-POMAR, R. Dynamics of maternal gene expression in *Rhodnius prolixus*. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 6538, 20 dez. 2022.

- PEDRA, J. H. F. et al. Transcriptome identification of putative genes involved in protein catabolism and innate immune response in human body louse (Pediculidae: *Pediculus humanus*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 11, p. 1135–1143, nov. 2003.
- PÉREZ, F. P. R.; FERRANDIS, Y. P. I.; CALLEROS, M. J. F. L. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera , Reduviidae). p. 77–87, 2010.
- PITTS, R. J. et al. Transcriptome profiling of chemosensory appendages in the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals tissue- and sex-specific signatures of odor coding. *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, p. 271, 27 dez. 2011.
- PITTS, R. J. et al. Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 7, p. 2566–2571, 18 fev. 2014.
- POELCHAU, M. F. et al. A de novo transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, p. 619, 20 dez. 2011.
- POELCHAU, M. F. et al. RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of Experimental Biology*, 1 jan. 2013a.
- POELCHAU, M. F. et al. Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 280, n. 1759, p. 20130143, 22 maio 2013b.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 1, p. 61–79, jan. 2004a.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 1, p. 61–79, 1 jan. 2004b. . Acesso em: 12 out. 2022.
- RIBEIRO, J. M. C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *The Biochemical journal*, v. 308 (Pt 1), n. Pt 1, p. 243–249, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7755571/>>. Acesso em: 12 out. 2022.
- RIBEIRO, M. C. et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius Prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 1, p. 27, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416461>>.
- RINKER, D. C. et al. Blood meal-induced changes to antennal transcriptome profiles reveal shifts in odor sensitivities in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 20, p. 8260–8265, 14 maio 2013a.

RINKER, D. C. et al. Antennal transcriptome profiles of anopheline mosquitoes reveal human host olfactory specialization in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, v. 14, n. 1, p. 749, 1 dez. 2013b.

ROSENFELD, J. A. et al. Genome assembly and geospatial phylogenomics of the bed bug *Cimex lectularius*. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 10164, 2 fev. 2016.

SCHREIBER, G. Vinte e cinco anos de citogenética de Triatominae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 8, n. 2, p. 123–127, 1974. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/8FLCjrpVHgd8ywX8CCSpNS/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 12 out. 2022.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Heteropycnosis of the autosomes as possible mechanism of speciation; cytological research in some neotropical Hemiptera. *Scientia genetica; periodico di genetica per i paesi latini*, v. 3, n. 3–4, p. 215–26, maio 1950.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 49, p. 513–542, 1 mar. 1951. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/mioc/a/wGvv7Lg676r4hCr9kRx7VCB/?lang=pt>>. Acesso em: 12 out. 2022.

SCOTT, J. G. et al. Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment. *Genome Biology*, v. 15, n. 10, p. 466, 14 out. 2014.

SIMONI, A. et al. A male-biased sex-distorter gene drive for the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology* 2020 38:9, v. 38, n. 9, p. 1054–1060, 11 maio 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41587-020-0508-1>>. Acesso em: 12 out. 2022.

STATHOPOULOS, S. et al. Genetic Dissection of *Anopheles gambiae* Gut Epithelial Responses to *Serratia marcescens*. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 3, p. e1003897, 6 mar. 2014.

SUZUKI, K. Chromosomes of Mosquitoes (Prel. Note). *The Japanese Journal of Genetics*, v. 15, n. 5, p. 296–298, 1939. . Acesso em: 12 out. 2022.

The \$1,000 Genome Arrives -- For Real, This Time. Disponível em: <<https://www.forbes.com/sites/matthewherper/2014/01/14/the-1000-genome-arrives-for-real-this-time/?sh=2025f4845796>>. Acesso em: 12 out. 2022.

VALENZUELA, J. G. et al. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, n. 9, p. 1101–1122, set. 2002.

VALENZUELA, J. G. et al. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 7, p. 717–732, jul. 2003.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WILLIAM HOVANITZ. A GENETIC STUDY OF WILD POPULATIONS AND EVOLUTION. *Caldasia*, v. 2, n. 10, p. 459–464, 1944.

XU, Y. et al. Oxford Nanopore Technology: revolutionizing genomics research in plants. *Trends in Plant Science*, v. 27, n. 5, p. 510–511, 1 maio 2022. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1360138521003101/fulltext>>. Acesso em: 12 out. 2022.

ZAMYATIN, A. et al. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis*. *GigaScience*, v. 10, n. 3, 15 mar. 2021.

ZHOU, D. et al. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, 18 jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24438588/>>. Acesso em: 20 out. 2022.

ZHU, G. et al. Transcriptome profiling of pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes in the malaria vector, *Anopheles sinensis*. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 448, 9 dez. 2014.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Interação patógeno-vetor





Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 11

Interações entre triatomíneos e tripanosomas

Alessandra A. Guarneri

Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Minas Gerais, Belo Horizonte.

Considerações iniciais

A partir do momento em que um parasito é ingerido por um inseto vetor, juntamente com o repasto sanguíneo, uma série de interações são iniciadas. Algumas delas ocorrem na interface entre células ou tecidos, outras ocorrerão em decorrência de produtos secretados ou excretados pelo parasito, e outras, ainda, se darão por respostas do vetor geradas pela chegada do parasito. Muitas dessas interações não apresentam efeitos a longo prazo na fisiologia do vetor ou na sua história de vida, mas algumas podem causar profundas mudanças, que irão afetar, inclusive, a sua sobrevivência.

Triatomíneos são insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, cuja principal característica é a hematofagia, hábito alimentar comum a todas as espécies a todas as cinco fases ninfais e a fase adulta, uma vez que o sangue é necessário para completar o seu desenvolvimento. Os triatomíneos podem subsistir com alimentações sanguíneas abundantes e ocasionais, uma vez que, entre os repastos, podem permanecer por longos períodos sem se desidratar (Friend, Smith, 1985). Isso é possível graças a sua capacidade de buscar, ativamente, por condições microclimáticas que levam a uma maior ou menor perda de água, dependendo do seu estado fisiológico (Guarneri et al., 2002, 2003; Roca, Lazzari, 1994; Schilman, Lazzari, 2004; Xavier et al., 2005). Os triatomíneos são primitivamente insetos silvestres, característica mantida, ainda hoje, pela maioria das espécies encontradas nos focos naturais, onde vivem associados a animais silvestres (Abad-Franch, Gurgel-Gonçalves, 2021). Algumas espécies também invadem e colonizam ambientes peridomésticos, como galinheiros currais e domicílios humanos, onde o sangue humano passa a ser uma de suas fontes de alimentação (Schofield, 1994).

Além da espoliação sanguínea que causam, os triatomíneos são hospedeiros de algumas espécies de protozoários, entre elas o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli*. O *T. cruzi* é um parasito heteroxênico, que infecta triatomíneos e mamíferos nas Américas, sendo o agente etiológico da doença de Chagas, uma antroponose que afeta entre 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo (World Health Organization, 2023). Assim como o *T. cruzi*, o *T. rangeli* também tem triatomíneos e mamíferos como hospedeiros e, embora esse protozoário não seja considerado patogênico para o ser humano, ele pode apresentar diferentes graus de patogenicidade para o inseto vetor (revisado por Guarneri, Schaub, 2021).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. No

intestino médio posterior, essas formas se diferenciam em epimastigotas, que são as formas multiplicativas do parasito no inseto. Na ampola retal, as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, que poderão ser transmitidas a outros mamíferos no próximo repasto. A transmissão do parasito, nesse contexto, pode acontecer através da deposição de fezes e urina infectadas nas mucosas ou áreas de descontinuidade da pele, ou quando o inseto ou suas fezes e urina contaminadas são ingeridos por um hospedeiro susceptível. No ambiente silvestre, a transmissão oral é a forma mais provável de dispersão do parasito entre hospedeiros, a qual se dá pela predação de insetos ou de mamíferos infectados (Jansen, Xavier, Roque, 2018). O aparecimento de surtos de transmissão oral do *T. cruzi* em humanos, pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados, demonstra a importância dessa rota de transmissão também nos ambientes domiciliares (Santana et al., 2019; Steindel et al., 2008). Uma vez no hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas são capazes de invadir diferentes tipos celulares, onde se diferenciam em formas amastigotas, que se dividem e vão gerar novos tripomastigotas, que entram na circulação sanguínea e são as formas infectantes para o triatomíneo (Brener, 1973; Zeledón, 1987).

O ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado é pouco conhecido, com algumas evidências de estudos *in vitro* que sua proliferação possa ocorrer no interior de monócitos (Eger-Mangrich et al., 2001; Osorio et al., 1995). Um estudo recente mostrou a presença do parasito no baço e em linfonodos de camundongos infectados e sugeriu que órgãos linfoides secundários podem funcionar como sítios de multiplicação (Ferreira et al., 2020). No hospedeiro invertebrado, o ciclo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas, juntamente com o repasto sanguíneo. Dentro do intestino, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas longas e curtas, que se dividem e atravessam o epitélio intestinal, alcançando a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos se multiplicam e, então, migram para as glândulas salivares, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são transmitidos ao hospedeiro vertebrado no momento da picada (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo, Saraiva, 1992).

Interações entre o inseto vetor e o *T. cruzi*: o parasito

Trypanosoma cruzi é um parasito flagelado pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, que se caracteriza pela presença de um flagelo e de uma única mitocôndria, denominada de cinetoplasto. Uma característica importante da espécie é a alta diversidade genética e fenotípica proveniente de diferenças no conteúdo do seu DNA nuclear e mitocondrial, que podem chegar a 48% entre as diferentes cepas (Lewis et al., 2009). O parasito se multiplica por uma divisão binária. Além disso, diferentes estudos têm indicado a ocorrência de hibridização, envolvendo troca de cinetoplasto e de material genético nuclear (Messenger, Miles, 2015). Atualmente, são reconhecidas sete linhagens genéticas ou DTUs (*discrete typing units*), denominadas de TcI-TcVI e Tcbat, que se diferem quanto à sua distribuição nas Américas, bem como na circulação entre os ciclos silvestres e domésticos (Brenière, Waleckx, Barnabé, 2016; Zingales, 2018).

Desenvolvimento do *T. cruzi* no trato intestinal do inseto: o estabelecimento da infecção

O trato intestinal dos triatomíneos pode ser dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio (dividido em médio anterior, IMA, e médio posterior, IMP) e intestino posterior. As regiões do trato intestinal diferem-se na sua morfologia e nas suas funções e, portanto, nas condições microambientais a que os parasitos estarão expostos. Os triatomíneos concentram e estocam o sangue ingerido no intestino médio anterior, onde ocorre a absorção de água e a secreção de moléculas com atividades anticoagulantes, imunológicas e digestivas (Oliveira, Genta, 2021). A digestão do sangue ocorre, majoritariamente, no intestino médio posterior, a região mais estreita do intestino médio (Billingsley, 1990; Schaub, Meiser, 1990). As duas porções do intestino médio são recobertas por membranas perimicrovilares, formadas por bicamadas lipídicas não quitinosas, e com baixo conteúdo proteico, que separam o epitélio intestinal dos conteúdos presentes no lúmen (Billingsley, Downe, 1986, 1983; Terra, Ferreira, 2005). Os remanescentes da digestão e/ou excreção são estocados, até a defecação, no intestino posterior, também denominado de reto, que possui uma cutícula estratificada recoberta por cera (Schmidt, Kleffmann, Schaub, 1998).

Uma vez que o *T. cruzi* entra no intestino do triatomíneo juntamente com o repasto sanguíneo, os parasitos são confrontados com um novo microambiente. No intestino, o parasito é exposto a uma série de enzimas digestivas e a

mudanças na temperatura, na osmolaridade, nos fatores nutricionais e no pH, além dos microrganismos que fazem parte da microbiota do inseto. O IMA é um ambiente inóspito para o *T. cruzi* e, em infecções crônicas, raramente são encontrados parasitos nessa porção intestinal. Uma redução de mais de 80% no número de parasitos foi observada em infecções de *Rhodnius prolixus* com as cepas CL, CL Brener e Dm28c nas primeiras 24 horas após os insetos terem ingerido sangue infectado (Dias et al., 2015; Ferreira et al., 2016; Kessler et al., 2017). Poucas horas após a ingestão, os tripomastigotas mudam sua forma, que pode se tornar arredondada, e em infecções crônicas não é mais possível visualizar o parasito no exame a fresco (Ferreira et al., 2016; Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021).

Mais recentemente, o RNA do parasito foi identificado no IMA em infecções de 29 dias, sugerindo que alguns parasitos consigam se manter nessa porção, sem, contudo, se multiplicarem, mesmo depois de uma nova alimentação (Dias et al., 2015; Finamore-Araujo et al., 2022). No caso da associação entre *R. prolixus* e a cepa CL, há indicativos de que alguma substância presente no IMA de ninfas recém alimentadas promova a lise dos parasitos (Ferreira et al., 2016). Em infecções de *Triatoma infestans* com a cepa Dm28c, também foi observada uma significativa redução do número de parasitos nas primeiras horas da infecção, mas, nesse caso, os parasitos não estavam sendo eliminados, mas cruzando o IMA rapidamente e iniciando o processo de colonização no IMP (Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021). Já foi mostrado que fatores líticos (Azambuja, Guimarães, Garcia, 1983) e aglutininas (Mello et al., 1996) produzidos pelo inseto podem interagir com o parasito e interferir na sua capacidade de colonização, embora essas substâncias não tenham sido completamente caracterizadas. Também já foi mostrado um aumento na expressão de inibidores de proteases no IMA de insetos recém infectados com *T. cruzi* (Buarque et al., 2011; Soares et al., 2015). Além disso, a saliva de *T. infestans* contém trisialina, uma proteína que tem a capacidade de permeabilizar e lisar formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e que poderia estar envolvida na eliminação de algumas cepas do parasito. Isso pode ocorrer já no início da infecção do triatomíneo (Amino et al., 2002), uma vez que parte da saliva do triatomíneo, que é injetada no hospedeiro vertebrado, chega ao IMA durante o processo de ingestão sanguínea (Soares et al., 2006).

Desenvolvimento no intestino médio posterior e reto

O processo de diferenciação das formas tripomastigotas sanguíneas para epimastigotas, denominado de epimastigogênese, ocorre no IMP e, em 24 horas

após a infecção, as primeiras formas multiplicativas já podem ser encontradas (Ferreira et al., 2016; Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021). Nos casos em que ocorre a lise de tripanosomas, a colonização é iniciada por aqueles poucos parasitos que conseguem atravessar o IMA, ocorrendo de forma mais lenta, o que influenciará no tempo em que as formas infectivas serão produzidas (Ferreira et al., 2016). Já naqueles casos em que os parasitos permanecem vivos, a colonização inicia-se com um número maior de células viáveis e a presença de formas metacíclicas pode ocorrer em poucos dias após o início da infecção (Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021). Essas diferenças são importantes, porque determinam a velocidade que uma determinada espécie de triatomíneo pode se transformar em vetor, dependendo da cepa de *T. cruzi* que alberga.

No IMP, a adesão dos epimastigotas às membranas perimicrovillares parece ser importante para a divisão dos parasitos. Isso porque, o tratamento do tecido intestinal de *R. prolixus* com antissoro produzido contra as membranas perimicrovillares, ou, ainda, procedimentos que interferem na formação dessas estruturas reduzem o desenvolvimento do parasito (Gonzalez et al., 1999; 2006). Os epimastigotas permanecem aderidos às membranas perimicrovillares dessa porção intestinal, através da ancoragem dos seus flagelos (Nogueira et al., 2007). Várias moléculas produzidas pelo IMP do inseto têm sido implicadas na interação entre *T. cruzi* e as membranas perimicrovillares, entre elas glicosaminoglicanas (Costa-Filho et al., 2004; Oliveira et al., 2012; Souza et al., 2004), glicosaminoglicanas sulfatadas (Gonzalez et al., 2011) e resíduos de carboidratos de glicoproteínas, principalmente o ácido siálico e a D-manose (Alves et al., 2007). Outras moléculas de superfície do parasito que também parecem mediar a adesão dos epimastigotas ao IMP são a cisteína-protease cruzipaina (Uehara et al., 2012), as cisteína-peptidases da família das calpains (Ennes-Vidal et al., 2011), os glicoinositolfosfolípidos (Nogueira et al., 2007) e as mucinas (Gonzalez et al., 2013), além das proteínas que se ligam aos glicopolipeptídeos (Alves et al., 2007), à heparina (Oliveira et al., 2012) e aos carboidratos (Bonay, Fresno, 1995; Bonay, Molina, Fresno, 2001).

Embora seja frequente encontrar populações de *T. cruzi* no IMP, a região preferencial para o desenvolvimento do parasito é o reto (Kollien, Schmidt, Schaub, 1998; Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021; Schaub, 1989a;). Várias formas de desenvolvimento, que incluem epimastigotas, formas intermediárias (arredondadas ou alongadas) e tripomastigotas metacíclicos, podem ser encontradas nessa porção intestinal (Sanabria, 1966). A maior parte dos parasitos se mantém aderida à cutícula retal, preferencialmente na região das papilas retais, uma área com cutícula mais fina e maior superfície de absorção (Böker,

Schaub, 1984; Lopes et al., 2022; Schmidt, Kleffmann, Schaub, 1998). As formas epimastigotas possuem uma pequena porção hidrofóbica no flagelo, que é capaz de se ligar à camada de cera que recobre a cutícula retal (Kleffmann, Schmidt, Schaub, 1998; Schmidt, Kleffmann, Schaub, 1998). Mais recentemente, foi demonstrado que a mucina Gp35/50kDa, que recobre todo o corpo celular das formas epimastigotas, também participa no processo de adesão do parasito à cutícula retal (Cámara et al., 2019). A aderência é reforçada por alargamentos do flagelo e por estruturas similares a hemidesmossomos, localizadas abaixo da membrana plasmática do parasito (Böker, Schaub, 1984). Em áreas com altas densidades de flagelados, as superfícies dos seus corpos celulares podem estar corrugadas e interdigitadas (Kollien, Schmidt, Schaub, 1998).

Os triatomíneos ingerem grandes quantidades de sangue, que é continuamente digerido pela ação de proteases, liberando aminoácidos, peptídeos e heme. No intestino do inseto, o *T. cruzi* utiliza diversos aminoácidos, como a prolina, a histidina, o aspartato, o glutamato, a asparagina, a glutamina, a leucina e a isoleucina para o seu metabolismo energético (Barisón et al., 2016; Mancilla, Naquira, Lanas, 1967; Mantilla et al., 2015; Sylvester, Krassner, 1976). Os epimastigotas também incorporam o grupo heme, que é utilizado pelo *T. cruzi* como cofator nutricional, e em várias hemeoproteínas essenciais para o seu metabolismo, já que o parasito não possui uma via de biossíntese completa da molécula (Lara et al., 2007; Lombardo, Araujo, Batlle, 2003; Salzman et al., 1982). Entretanto, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), propagadas por hemes “livres”, afetam a diferenciação do parasito para formas tripomastigotas. Assim, a cristalização de parte dessas moléculas na forma de hemozoína, que acontece no intestino do inseto, acaba funcionando como um mecanismo protetor que permite o desenvolvimento do parasito (Ferreira et al., 2018a). Além disso, os epimastigotas também utilizam ácidos graxos livres, que são gerados após a degradação dos lipídeos do sangue (Florin-Christensen et al., 1997; Wainszelbaum et al., 2003). Já foi demonstrado que uma lipoproteína de alta densidade (HDL) presente no plasma de vertebrados é capaz de se ligar à superfície de epimastigotas, promovendo aglutinação de parasitos, o que, possivelmente, os protege da lise que ocorre nos primeiros dias de infecção. Por esse motivo, a molécula, que é posteriormente incorporada pelo parasito, parece ser importante para o seu desenvolvimento, uma vez que insetos alimentados com dietas contendo HDL produzem quantidades maiores de parasitos (Moreira et al., 2018). Assim, a utilização de lipídeos e ácidos graxos provenientes de lipídeos ocorre graças à capacidade do parasito de alterar seu metabolismo de consumo, de glicose para lipídeos (Souza et al., 2021).

O reto é a porção intestinal onde a metacicloênese, isto é, a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, preferencialmente ocorre (Böker, Schaub, 1984; Brener, 1973; Kollien, Schaub, 2000; Schaub, 1989a; Zeledón, 1987). A adesão dos parasitos à cutícula retal parece ter um papel importante na diferenciação dos parasitos (Bonaldo et al., 1988; Figueiredo, Rosa, Soares, 2000; Kleffmann, Schmidt, Schaub, 1998). Além disso, vários outros fatores têm sido associados ao processo de metacicloênese em *T. cruzi*, entre eles o estresse nutricional (Camargo, 1964; Castellani, Ribeiro, Fernandes, 1967; Figueiredo, Rosa, Soares, 2000; Hamedi et al., 2015) e as moléculas presentes no intestino do inseto (Fraidenaich et al., 1993; Garcia et al., 1995; Isola et al., 1981; Isola; Lammel, Cappa, 1986). A formação da urina também parece influenciar no processo de metacicloênese, uma vez que, durante o período de produção de urina, tripomastigotas e seus estágios intermediários apresentam uma taxa mais alta de desprendimento da cutícula do que epimastigotas (Kollien, Schaub, 1997; Schaub, Lösck, 1988). De fato, mais de 99% dos parasitos encontrados na urina de insetos infectados são tripomastigotas (Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021; Schaub, Lösck, 1988). Um dos mecanismos sugeridos para o desprendimento das formas tripomastigotas da cutícula retal seria uma diminuição da expressão de glicoinositolfosfolipídeos de superfície, uma vez que os tripomastigotas apresentam uma redução da quantidade dessas moléculas em comparação às formas epimastigotas (Golgher et al., 1993; Pereira-Chioccola et al., 2000; Zingales et al., 1982). Um aumento da expressão da cruzipaina também tem sido associado à metacicloênese de *T. cruzi* (Tomas, Miles, Kelly, 1997).

O desenvolvimento do *T. cruzi* é profundamente afetado pelas condições do intestino do inseto, que mudam drasticamente durante os períodos de jejum e após a alimentação (Schaub, Lösck, 1988, 1989). Uma vez que os triatomíneos são capazes de resistir ao jejum durante longos períodos, a redução de nutrientes no trato intestinal reduz o crescimento dos parasitos, que acabam ficando sem aporte nutricional. A infecção pode, inclusive, ser perdida após longos períodos sem alimentação, e isso vai depender da espécie e do estágio de desenvolvimento do triatomíneo, bem como da cepa do parasito (Schaub, Böker, 1986). Os efeitos do jejum são evidentes sobre suas densidades populacionais, promovendo uma redução das formas epimastigotas e tripomastigotas e um aumento de formas arredondadas e intermediárias, que já foram sugeridas como as formas de resistência ao estresse nutricional (Kollien, Schaub, 1998, 2000; Vargas, Zeledón, 1985). Por outro lado, a diurese promovida pela ingestão de sangue também promove uma redução temporária no número de tripanosomas

do reto, já que uma alta proporção dos parasitos é liberada junto às fezes e à urina (Schaub, Böker, 1987; Schaub, Lösch, 1988; Zeledón et al., 1988). Nas primeiras gotas de urina, que pode conter fezes remanescentes da alimentação anterior, a maior parte dos parasitos encontrados são epimastigotas, que, provavelmente, estavam livres no lúmen do reto. Conforme a diurese continua, um gradual aumento na proporção de tripomastigotas metacíclicos é observado (Schaub, Lösch, 1988). Com o passar dos dias, a alimentação restabelece o número de parasitos, que passa a ser formado, majoritariamente, por epimastigotas (Kollien, Schaub, 1998). Repastos sanguíneos maiores produzem um número maior de epimastigotas, que vão aumentar a produção de formas metacíclicas (Asin, Catalá, 1995). A temperatura ambiental é outro fator que modula o desenvolvimento do *T. cruzi* no inseto vetor, uma vez que temperaturas mais elevadas podem promover uma maior densidade de epimastigotas e acelerar a produção de metacíclicos, sempre que não sejam combinadas com estresse nutricional (Asin, Catalá, 1995; Phillips, 1960).

Um fator importante que também afeta o desenvolvimento do parasito são as associações entre diferentes cepas do parasito e espécies de triatomíneos (revisado por Jansen, Xavier, Roque, 2015). A cepa Y, por exemplo, pode produzir diferentes quantidades de formas metacíclicas, dependendo da espécie de triatomíneo que infecta (Perlowagora-Szumlewicz; Moreira, 1994). Essa mesma cepa também pode ser eliminada do intestino de *R. prolixus* quando os insetos albergam a bactéria *Serratia marcescens* (Azambuja, Feder, Garcia, 2004; Castro et al., 2007). Da mesma forma, diferentes cepas de *T. cruzi* exibem perfis distintos de desenvolvimento no trato intestinal da mesma espécie de triatomíneo, como mostrado para *R. prolixus* (Mello et al., 1996), *Rhodnius neglectus* (Carvalho-Moreira et al., 2003), *T. infestans* (De Lana et al., 1998; Paranaíba, Soares, Guarneri, 2021), *Rhodnius robustus* e *Triatoma sordida* (Dworak et al., 2017). A presença de infecções mistas com diferentes DTUs de *T. cruzi* podem, inclusive, aumentar o crescimento do parasito, conforme observado em infecções experimentais de *R. prolixus* (Araújo, Waniek, Jansen, 2014).

Apesar de jamais deixar o tubo digestivo, a presença do *T. cruzi* parece modificar o metabolismo de seu hospedeiro invertebrado. A infecção recente (três dias) de adultos de *R. prolixus* com a cepa Y de *T. cruzi* promoveu uma alteração na expressão de genes que participam da ativação de diversas vias de síntese e de degradação de lipídeos, em diferentes órgãos do inseto (Sousa, De Carvalho, Atella, 2021). Com dez dias de infecção, utilizando-se o mesmo modelo, foi observada uma diminuição na quantidade de lipídeos presentes no corpo gorduroso e um aumento de síntese dessas moléculas no intestino dos insetos (Atella et al., 2022).

Efeitos do *T. cruzi* no desenvolvimento do inseto

Os efeitos patogênicos do *T. cruzi* para os seus vetores são o resultado de interações multifatoriais entre a cepa do parasito, a espécie de triatomíneo, as condições nutricionais do inseto, além das condições ambientais às quais o inseto está exposto. Uma comparação de *R. prolixus* infectados com diferentes cepas do parasito mostrou que fatores como o tempo de infecção e a quantidade de parasitos/sangue ingeridos, associados às características de cada cepa, podem afetar o desenvolvimento dos insetos, diminuindo sua sobrevivência em alguns casos (Peterson et al., 2015). Geralmente, quando triatomíneos infectados por *T. cruzi* são criados com alimentações frequentes, não são encontrados efeitos patogênicos promovidos pelo parasito (Brenner, 1973; Juarez, 1970; Marinkelle, 1968; Schaub, 1988a, 1988b). Entretanto, mesmo nessas condições, algumas alterações têm sido relatadas em diferentes espécies (Botto-Mahan, 2009; Botto-Mahan, Ossa, Medel, 2008; Lima et al., 1992; Peterson et al., 2015). *Mepraia spinolai* alimentados repetidamente em camundongos infectados por *T. cruzi* tiveram um prolongamento do seu tempo de desenvolvimento e uma redução na sua sobrevivência (Botto-Mahan, 2009). Além disso, os insetos se desenvolveram em adultos com menor tamanho corporal, o que impactou o fitness reprodutivo de machos e de fêmeas (Botto-Mahan, Campos, Medel, 2017; Botto-Mahan, Ossa, Medel, 2008). *Panstrongylus megistus* infectados com a cepa VLE-95 de *T. cruzi* e mantidos em temperatura de 30°C, apresentaram um desenvolvimento de ninfa a adulto semelhante ao do grupo controle, incluindo taxas de mortalidade e período intermudas. Entretanto, as fêmeas provenientes do grupo infectado colocaram uma menor quantidade de ovos, que, por sua vez, tiveram menores taxas de eclosão (Lima et al., 1992). *Rhodnius prolixus* infectados com a cepa Gal61 apresentaram uma redução significativa das estimativas de reprodução e fitness (Peterson et al., 2016). Infecções sucessivas de *R. prolixus* após uma primeira infecção com parasitos mortos, mostraram que os insetos com infecções homólogas com a cepa Y sobreviveram por mais tempo e aqueles com infecções homólogas com a cepa Dm28c apresentaram períodos intermuda mais curtos (Carmona-Peña et al., 2022). Aparentemente, *T. cruzi* parece competir com seu vetor por nutrientes, já que a resistência dos insetos é reduzida em condições de jejum (Schaub, 1989b). Além disso, já foi demonstrado que a temperatura ambiental também pode influenciar os efeitos promovidos pelo parasito. *Rhodnius prolixus* infectados tiveram seu fitness reprodutivo diminuído quando criados em temperaturas de 30°C (Fellet et al., 2014). Nessa mesma espécie, a associação entre temperatura ambiental e jejum diminuiu as taxas de sobrevivência de ninfas de terceiro estágio (Elliot et al., 2015).

Efeitos do *T. cruzi* na microbiota do inseto

Como se alimentam de sangue em todas as suas fases de vida, o desenvolvimento dos triatomíneos depende fortemente da presença de bactérias simbiotes, que são transmitidas dentro de uma população por via oral. Os simbiotes desenvolvem-se, principalmente, no esôfago e no IMA, aumentando cerca de 1000 vezes o tamanho de suas populações após a ingestão sanguínea pelo triatomíneo (Eichler, Schaub, 2002). A ausência de simbiotes leva a vários efeitos deletérios no inseto, que incluem atraso no desenvolvimento e aumento nas taxas de mortalidade ninfal, assim como problemas durante a digestão sanguínea e excreção, além de reduções do sistema traqueal (Brecher, Wigglesworth, 1944; Eichler, Schaub, 1998; Lake, Friend, 1967). As interações entre a microbiota de triatomíneos e o *T. cruzi* são bastante variadas e estão associadas à indução da resposta imune. Na associação entre *T. infestans* e a cepa CL, o silenciamento da proteína antimicrobiana TiAP reduziu o número de parasitos e aumentou a quantidade de bactérias presentes no intestino do inseto (Buarque et al., 2016). O mesmo efeito de redução da quantidade de parasitos, observou-se no aumento de bactérias, quando o inibidor de proteases rRpTI de *R. prolixus* foi silenciado (Soares et al., 2015). Na associação entre *R. prolixus* e a cepa Dm28c, um aumento na expressão dos mRNA da defensina C, da prolixicina, da atividade antibacteriana e da fenoloxidase foram acompanhados de uma redução na quantidade total de bactérias após uma semana de infecção (Castro et al., 2012; Vieira et al., 2016). Os tripomastigotas sanguíneos parecem induzir uma regulação positiva de moléculas antibacterianas, que reduzem as populações de microrganismos, no trato intestinal dos triatomíneos. De fato, um estudo mais recente mostrou uma redução significativa na diversidade de bactérias, fungos e vírus, uma semana após ninfas de *R. prolixus* terem se alimentado em camundongos infectados com a cepa Dm28c (Eberhard et al., 2022). A análise do desenvolvimento dos simbiotes *Nocardia sp.* e *Rhodococcus rhodnii* no intestino de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente, na presença de *T. cruzi*, mostrou que o parasito não afetou as taxas de crescimento dessas bactérias (Eichler, Schaub, 2002). Já em insetos coletados no campo, a presença do parasito foi associada a alterações na diversidade microbiana de *T. infestans* (Waltmann et al., 2019) e a um aumento da diversidade microbiana em *Triatoma dimidiata* e em *Triatoma protracta* (Orantes et al., 2018; Rodríguez-Ruano et al., 2018).

Efeitos do *T. cruzi* na resposta imune do inseto

A presença do *T. cruzi* no trato intestinal dos triatomíneos dispara uma série de respostas imunológicas, que já acontecem nas primeiras horas da sua entrada. Um aumento na expressão dos genes que codificam um inibidor de lisozima e de cisteína-proteases, inclusive as do parasito, foi observado no IMA de *T. infestans* 24 horas após os insetos terem ingerido tripomastigotas sanguíneos (Buarque et al., 2011, 2013). Em *R. prolixus*, um aumento significativo da expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase (NOS) também foi observado no IMA de insetos, depois de dois dias da alimentação com tripanosomas sanguíneos. Nas duas semanas seguintes, a expressão da enzima foi aumentada no IMP e no reto. Já com relação às concentrações de nitrito, o metabólito do antimicrobiano óxido nítrico, foram significativamente aumentadas nos dois períodos avaliados em todas as porções intestinais (Whitten et al., 2007). O tratamento de *R. prolixus* com L-arginina, um precursor do óxido nítrico, diminuiu tanto as taxas de infecção, quanto a carga parasitária de insetos infectados pela cepa Dm28c. Por outro lado, o tratamento dos insetos com o inibidor da NOS, L-NAME, aumentou as populações do parasito no trato intestinal (Batista et al., 2020). Infecções de *R. prolixus* com tripanosomas sanguíneos também promoveram um aumento da expressão da lisozima intestinal mais ativa, a RpLysA, entre 7 e 14 dias pós-infecção (Ursic-Bedoya et al., 2008). Foi observado um aumento significativo da expressão da defensina Def1 no intestino médio posterior de *T. brasiliensis*, 20 dias depois do início da infecção (Waniek, Jansen, Araújo, 2011). Além disso, a atividade da fenoloxidase foi aumentada no IMA de *R. prolixus*, nove dias depois da infecção (Castro et al., 2012) e no IMA de *Triatoma pallidipennis* 28 dias após a infecção com tripomastigotas sanguíneos (Favila-Ruiz et al., 2018). Um estudo recente, que avaliou o perfil proteômico da hemolinfa de *R. prolixus* infectados com uma alta concentração de formas epimastigotas (1×10^7 parasitos/mL), mostrou que a presença do parasito no trato intestinal promoveu alterações no padrão de expressão de várias proteínas em seis e 12 horas após a infecção. Esses dados indicaram a ativação de uma resposta imune sistêmica na hemolinfa do inseto (Ouali et al., 2022).

Efeitos do *T. cruzi* no comportamento do inseto

O comportamento dos triatomíneos tem sido extensivamente estudado e vários processos moduladores de características comportamentais já foram descritos (revisado por Lazzari, 2021; Lazzari, Pereira, Lorenzo, 2013). Entretanto, os efeitos produzidos pela infecção por tripanosomatídeos somente têm sido avaliados mais recentemente. A infecção por *T. cruzi* pode afetar o padrão de defecação dos triatomíneos, como mostrado em *T. infestans*, no qual mais indivíduos infectados defecaram e o fizeram mais rapidamente, após finalizada a alimentação (Pereyra, Lobbia, Mougabure-Cueto, 2020). Também já foi observado que *M. spinolai* infectados com *T. cruzi* e com jejuns superiores a 30 dias, aumentaram sua capacidade de detecção e orientação ao hospedeiro vertebrado em relação a coespecíficos não infectados (Botto-Mahan, Cattán, Medel, 2006). Utilizando humanos como isca, foi possível capturar um número maior de *M. spinolai* infectados em ensaio de campo, mostrando um comportamento de aproximação diferente dos não infectados. No entanto, ninfas de primeiro estágio apresentaram piores estados nutricionais do que os coespecíficos não infectados (Estay-Olea et al., 2020).

Um outro estudo de campo, que avaliou a capacidade de invasão de áreas domiciliares por adultos de *T. dimidiata* no México, mostrou uma maior captura de fêmeas infectadas, que apresentaram menores pesos corporais, sugerindo que a presença do parasito possa aumentar a capacidade de dispersão desses insetos (Ramirez-Sierra et al., 2010). Nessa mesma espécie, adultos infectados apresentaram asas maiores do que coespecíficos não infectados, o que também pode impactar na sua capacidade de dispersão (Nouvellet et al., 2011). Na ausência de pistas do hospedeiro, a infecção pelo *T. cruzi* diminuiu significativamente os níveis de atividade locomotora de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* em jejum, durante as primeiras horas da escotofase, período que tem sido associado à saída do abrigo para a busca do hospedeiro (Marlière et al., 2015). Nesse mesmo modelo, a presença de um hospedeiro promoveu um comportamento de saída do abrigo similar ao de coespecíficos não infectados. Entretanto, os insetos infectados foram significativamente mais predados, em decorrência de uma maior insistência em tentar se alimentar (Marlière, Lorenzo, Guarneri, 2021). Uma mudança na atividade locomotora também foi observada em ninfas de terceiro estágio de *M. spinolai* infectadas por *T. cruzi*, com uma diminuição significativa durante a fotofase (Pérez et al., 2021). A infecção por *T. cruzi* também aumentou a geotaxia negativa e o comportamento de agregação de machos e de fêmeas de *T. infestans* (Depickère, Ramírez-Ávila, Deneubourg,

2019). A maior parte das alterações comportamentais observadas em triatomíneos infectados com *T. cruzi* parece estar relacionada à diminuição das reservas nutricionais do inseto, que também são utilizadas pelo parasito para o seu desenvolvimento (Asin, Catalá, 1995).

Interações entre o inseto vetor e o *T. rangeli*: o parasito

Trypanosoma rangeli é um parasito hemoflagelado que apresenta um alto grau de variabilidade genética (Maia Da Silva et al., 2007; Steindel et al., 1994). Dois genótipos do parasito, KP1(+) e KP1(-), foram descritos através da caracterização molecular do DNA do cinetoplasto (kDNA) (Vallejo et al., 2002, 2003). Além disso, também foram descritas linhagens denominadas de A, B, C, D e E, por meio da caracterização das subunidades menores de rDNA, ITS-1 e de sequências de regiões intergênicas do *spliced-leader* (Maia Da Silva et al., 2004, 2009). Estudos posteriores, utilizando análises de polimorfismo de nucleotídeo único e de microssatélites, sugeriram a existência de três grupos de *T. rangeli*: Amazônico, KP1(-) e KP1(+) (Sincero et al., 2015).

Trypanosoma rangeli pode infectar diferentes gêneros de triatomíneos, com relatos de infecções naturais e experimentais em espécies dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* (revisado por Guarneri, Lorenzo, 2017). Entretanto, a infecção da hemolinfa em *Triatoma* e *Panstrongylus* é bastante incomum e a invasão das glândulas salivares é ainda mais rara (D'Alessandro, 1976; Tovar; Urdaneta-Morales, Tejero, 1989). O intestino de *T. infestans*, em comparação ao de *R. prolixus*, possui níveis mais altos de aglutininas contra *T. rangeli*. Embora não tenham sido encontradas evidências de atividade lítica das aglutininas contra o parasito, elas poderiam, juntamente com outras moléculas, conferir uma maior resistência ao desenvolvimento de *T. rangeli* no intestino de *T. infestans* (Gregório, Ratcliffe, 1991). Além disso, a saliva de *T. infestans* apresenta atividade lítica contra *T. rangeli* e, uma vez que parte da saliva é ingerida pelo inseto durante o repasto sanguíneo, essa atividade poderia também estar relacionada ao baixo grau de desenvolvimento do parasito no intestino de *T. infestans* (Gregório, Ratcliffe, 1991).

O gênero *Rhodnius* é, normalmente, suscetível à infecção por *T. rangeli*, e a transmissão pela via salivar já foi demonstrada em 13 espécies: *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. montenegrensis*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. prolixus* e *R. robustus* (Vallejo et al., 2015). Estudos anteriores à caracterização genética tinham identificado diferenças no desenvolvimento de *T. rangeli* entre

espécies de *Rhodnius* (D'Alessandro, 1976; Machado et al., 2001; Tobie, 1961; Zeledón, Blanco, 1965). Posteriormente, foi demonstrado que cepas de *T. rangeli* KP1(-) isoladas de diferentes espécies do complexo *R. pictipes* (contendo espécies Andinas e Amazônicas, como *R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*) são, geneticamente, divergentes das cepas de *T. rangeli* KP1(+) isoladas do complexo *R. robustus* (composto pela espécie amazônica *R. robustus* e *R. prolixus*, além de espécies que ocorrem em outras regiões, como *R. nasutus*, *R. neglectus* e *R. domesticus*) (Urrea et al., 2005; Vallejo et al., 2007). Essas diferenças indicam possíveis alterações na suscetibilidade de vetores a diferentes genótipos de *T. rangeli*.

Adicionalmente, a invasão das glândulas salivares e a transmissão de cepas específicas de *T. rangeli* pela picada é, normalmente, limitada a espécies locais, sugerindo uma forte associação coevolutiva, entre isolados de *T. rangeli* e seus vetores simpátricos (Guhl, Vallejo, 2003; Maia Da Silva et al., 2007; Urrea et al., 2005, 2011; Vallejo et al., 2003). A resistência de triatomíneos a cepas alopátricas de *T. rangeli* pode ainda ser decorrente da presença de fatores tripanolíticos, uma vez que uma proteína de aproximadamente 79 e kDa, que lisa seletivamente cepas KP1(-), foi isolada da hemolinfa de *R. prolixus* (Pulido, Pérez, Vallejo, 2008; Sánchez et al., 2005).

Desenvolvimento de *T. rangeli* no trato intestinal do inseto

Trypanosoma rangeli é ingerido quando um triatomíneo se alimenta em um mamífero infectado e pode persistir no inseto vetor pela vida toda, sendo que parasitos podem ser encontrados nas fezes de 31 a 70% dos insetos infectados (Cuba, 1975; D'alessandro, 1976; Hecker, Schwarzenbach, Rudin, 1990; Pifano et al., 1948). Entretanto, esses parasitos não parecem ser infectivos, fazendo com que a transmissão contaminativa, característica no caso de infecções por *T. cruzi*, não ocorra (D'Alessandro, 1976; Hecker, Schwarzenbach, Rudin, 1990; Salcedo, Groot, Piedrahita, 1997; Tobie, 1964). O número de parasitos inicialmente ingerido é provavelmente pequeno, uma vez que as parasitemias são normalmente baixas ou negativas, pelo menos em mamíferos experimentalmente infectados (Molyneux, 1973; Urdaneta-Morales, Tejero, 1985). Apesar das baixas parasitemias, as taxas de transmissão de *T. rangeli* de mamíferos para os triatomíneos são bastante elevadas, chegando a mais de 80% em *R. prolixus*, por exemplo, mesmo utilizando-se camundongos na fase crônica da infecção (Ferreira, Pereira, Guarneri, 2015). O parasito também pode ser transmitido de inseto para inseto através de hemolinfagia (quando triatomíneos ingerem

hemolinfa de coespecíficos), ou quando indivíduos não infectados compartilham simultaneamente um mesmo hospedeiro com indivíduos infectados, mesmo quando o hospedeiro não é suscetível ao parasito (Cuba Cuba, 1972; Ferreira, Pereira, Guarneri, 2015).

Poucas horas depois que o triatomíneo ingere sangue de um mamífero infectado, as formas tripomastigotas começam a ser substituídas por formas arredondadas e intermediárias no IMA, sendo que um dia após a infecção já é possível encontrar formas epimastigotas (Añez, 1983a; Ferreira et al., 2018b). *Trypanosoma rangeli* coloniza e se multiplica em todo o trato intestinal, mas as maiores quantidades de parasitos são observadas no intestino médio (Ferreira et al., 2018b). A temperatura ambiental modula o desenvolvimento do parasito no início da infecção e depois o crescimento das populações é regulado pelas reservas nutricionais do inseto, sendo que a infecção intestinal pode ser eliminada em jejuns muito prolongados (Ferreira et al., 2018b). No trato intestinal, os parasitos se dividem livres no lúmen, nunca aderidos ao epitélio (Hecker, Schwarzenbach, Rudin, 1990).

Desenvolvimento de *T. rangeli* na hemolinfa do inseto

A infecção na hemolinfa ocorre quando os parasitos presentes no intestino penetram a parede do intestino e alcançam a cavidade corporal dos triatomíneos. Mesmo com um eficiente desenvolvimento no trato intestinal, atravessar o epitélio intestinal não é algo trivial para *T. rangeli*, uma vez que a porcentagem de insetos com infecções sistêmicas normalmente fica abaixo de 50% (Añez, Nieves, Cazorla, 1987; Ferreira et al., 2010; Groot, 1954; Hecker, Schwarzenbach, Rudin, 1990; Marinkelle, 1968; Tobie, 1965, 1970). Ainda não são conhecidos os fatores que levam ao desenvolvimento de infecções sistêmicas e a penetração do epitélio do intestino médio por *T. rangeli* aparentemente não está relacionada com a duração da infecção, nem com combinações entre cepas de parasitos e vetores. Normalmente, a invasão da hemolinfa acontece semanas após a colonização do intestino, quando os parasitos já estão estabelecidos e com populações numerosas (D'Alessandro, 1976; Grewal, 1957; Groot, 1954). Entretanto, a presença do parasito na hemolinfa já foi registrada em 24 horas após a alimentação infectiva (Añez, 1980).

Hecker, Schwarzenbach, Rudin (1990) registraram a passagem do parasito pelo epitélio intestinal, através de uma rota intracelular. Nesse caso, os parasitos sempre foram vistos contidos dentro de vacúolos, que podiam ser individuais ou conter vários tripanosomas. As células infectadas não

apresentaram mudanças estruturais, mesmo com vários parasitos presentes no seu interior. Após passarem pela lâmina basal e alcançarem a hemolinfa, eles deixaram os vacúolos celulares. De Oliveira e De Souza (2001) mostraram alterações morfológicas e citoplasma menos denso nas células invadidas pelos parasitos durante a passagem pelo epitélio intestinal. Nesse estudo, não foi observada a presença de vacúolos envolvendo os parasitos durante a passagem pelas células intestinais. Apesar de estarem normalmente livres no lúmen do intestino, para alcançarem a hemocele do inseto, os epimastigotas de *T. rangeli* realizam uma série de interações com o epitélio intestinal mediadas, provavelmente, por lectinas/ligantes presentes na superfície do parasito e nas células epiteliais do inseto. A aderência de *T. rangeli* às células epiteliais se dá, aparentemente, pelo seu flagelo ou região posterior (De Oliveira, De Souza, 2001). Resíduos de açúcar e de proteínas expostos em superfícies de interação parecem ser importantes para a habilidade dos parasitos em atravessar o epitélio intestinal. Rudin, Schwarzenbach, Hecker (1989) demonstraram que as formas epimastigotas encontradas na hemolinfa adquirem reatividade para a lectina Concanavalina A durante a passagem pelo epitélio intestinal. Isso indica a existência de modificações na superfície dos parasitos, como a expressão de novas moléculas de superfície, o que pode ser importante em relação aos mecanismos de reconhecimento entre o parasito e as células do sistema imunológico. As membranas perimicrovilares que revestem o intestino, provavelmente, funcionam como uma primeira barreira de defesa do inseto contra a invasão da hemocele por *T. rangeli*. Já foi mostrado, em *R. prolixus*, que a desorganização dessas membranas, através de irradiação, acelerou a invasão da hemolinfa pelo parasito (Gomes et al., 2002).

Uma vez que *T. rangeli* consegue alcançar a hemolinfa, inicia-se um período de intensa multiplicação. Em infecções iniciadas através do inóculo de epimastigotas da cepa CHOACHI diretamente na hemocele do inseto, se observa que as formas epimastigotas iniciais são, predominantemente, curtas, apresentando alto grau de multiplicação (Fig. 1A). Essas formas vão dando lugar a epimastigotas longas, que também se multiplicam intensamente e logo passam a predominar na hemolinfa (Fig. 1B). Parasitos são encontrados dentro de hemócitos e a interiorização de *T. rangeli* está, normalmente, associada ao predomínio de formas epimastigotas curtas na hemolinfa (Fig. 1C, D). Vários estudos reportaram a multiplicação de parasitos dentro dessas células, que seriam, então, rompidas com a liberação de formas arredondadas (Añez, 1983b; Takle, 1988; Tobie, 1968, 1970; Watkins, 1971a). Entretanto, De Oliveira e De Souza (2003) não encontraram multiplicação intracelular em plasmatócitos, mas

parasitos arredondados mostrando diferentes graus de degeneração, indicando lise celular. É possível que essas diferenças estejam relacionadas a características específicas das cepas de parasito utilizadas nos estudos.

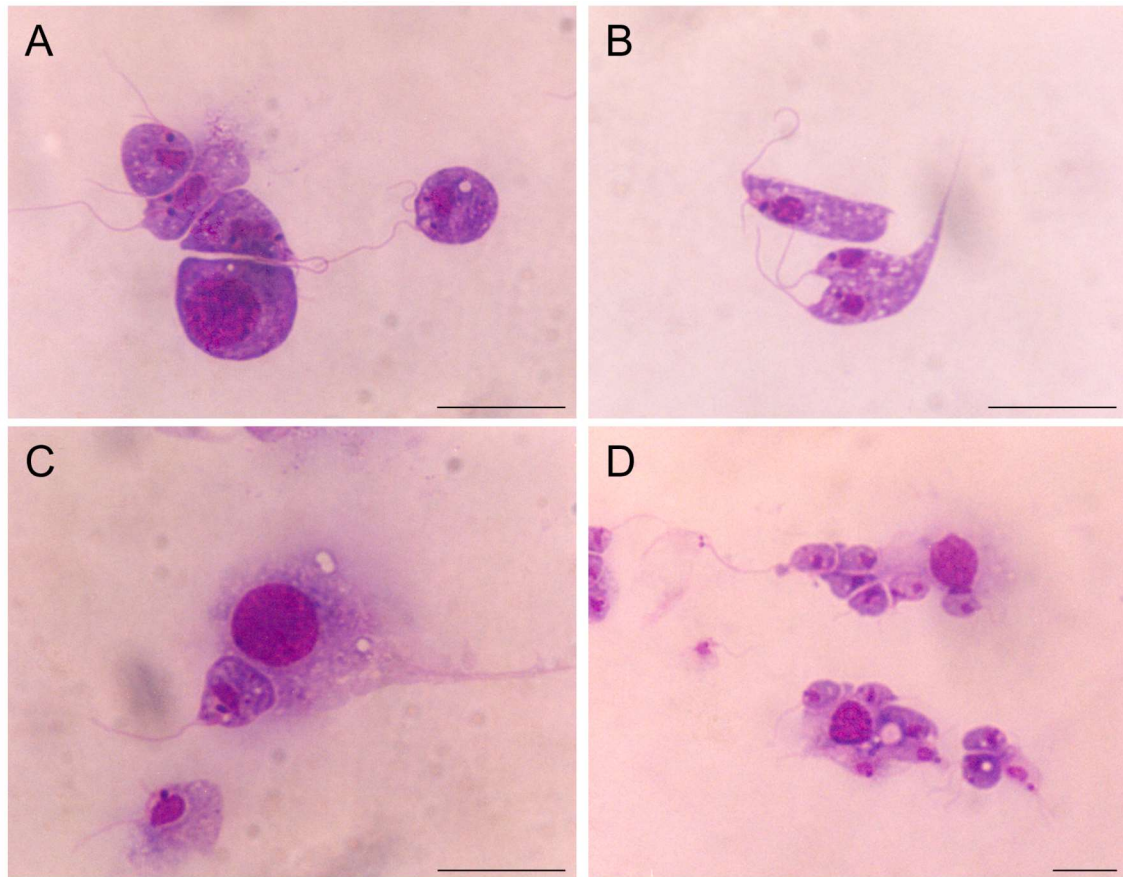


Figura 1: Diferentes formas de *T. rangeli* encontradas na hemolinfa de *R. prolixus* no início da infecção. Lâminas coradas por Giemsa mostrando (A) formas epimastigotas curtas em divisão, 72 h pós-infecção (p.i.), (B) formas epimastigotas longas em divisão, 96 h p.i. (C e D) e interiorização de formas epimastigotas curtas por hemócitos, 120 h p.i. Barras = 20 μ .

Fonte: Arquivo pessoal

Um aumento no volume de hemolinfa de triatomíneos infectados pelo *T. rangeli* tem sido registrado por diferentes autores (Grewal, 1957; Tobie, 1965; Watkins, 1971b). Watkins (1971b) relacionou esse aumento a uma redução nas taxas de excreção nas três primeiras horas após a alimentação. Ferreira et al. (2010) mediram as taxas de excreção e de perda de água em ninfas de *R. prolixus* infectadas que apresentaram aumento de volume de hemolinfa e não observaram alterações em relação a insetos controle. Entretanto, os insetos infectados apresentaram um aumento na quantidade de lipídeos e de corpos gordurosos. Como citado anteriormente, o sangue ingerido pelos triatomíneos é estocado no IMA e digerido no IMP (Billingsley, 1990). Após um repasto sanguíneo, moléculas de diacilglicerol

e fosfolídeos são transferidas do intestino para o corpo gorduroso e para os sítios de utilização por uma proteína carreadora, denominada de lipoforina (Atella, Gondim, Masuda, 1995; Coelho et al., 1997). Interessantemente, o *T. rangeli* é capaz de endocitar moléculas de lipoforina, através de receptores específicos presentes na superfície do parasito, e de metabolizar os lipídeos presentes na lipoproteína (Folly et al., 2003). Assim, o aumento na quantidade de lipídeos poderia ser resultado de uma redução nas quantidades de lipoforina circulantes ou de alterações das vias de metabolismo de lipídeos promovidas pela infecção.

Desenvolvimento nas glândulas salivares

A transmissão de *T. rangeli* é feita via saliva, durante a picada do triatomíneo, e, para isso, o tripanosoma precisa penetrar nas glândulas salivares do inseto. Sete dias após a infecção intracelomática de *R. prolixus* com *T. rangeli*, formas epimastigotas longas já podem ser encontradas aderidas pelos flagelos à superfície externa das glândulas salivares (Ellis, Evans, Stamford, 1980; Kitajima, Cuba Cuba, Brener, 1998; Paim et al., 2013). Em aproximadamente 25 dias após a invasão da hemolinfa, as taxas de infecção das glândulas salivares chegam a quase 100% (Paim et al., 2013). Entretanto, a temperatura ambiental parece modular o desenvolvimento do parasito nas glândulas salivares, uma vez que, tanto as taxas de infecção quanto o número de parasitos são reduzidos em temperaturas baixas (21°C) ou acima de 28°C (Hinestroza, Ortiz, Molina, 2016; Rodrigues et al., 2016).

Rhodnius prolixus possui um par de glândulas salivares. Cada glândula consiste em um lobo principal de cor vermelha e em uma glândula acessória transparente (Meirelles et al., 2003). O lobo principal é composto por uma única camada epitelial de células glandulares binucleadas, que formam uma câmara central, onde o material secretado é estocado. A camada celular epitelial é envolvida por uma dupla camada de células musculares lisas, que são, por sua vez, envolvidas por uma lâmina basal (Baptist, 1941; Meirelles et al., 2005; Nussenzweig, Bentley, Ribeiro, 1995). A invasão das glândulas salivares é iniciada por epimastigotas longos, que podem ser encontrados isolados ou agrupados, em aparente contato com a lâmina basal. O mecanismo pelo qual os epimastigotas invadem as células das glândulas salivares ainda não está completamente esclarecido, embora tenha sido encontrada em *T. rangeli* uma proteína formadora de poros que poderia estar envolvida na sua penetração (Meirelles et al., 2005). As glândulas salivares de *R. prolixus* são altamente glicosiladas, com diversos tipos de resíduos de carboidratos presentes na lâmina basal, músculos e células

epiteliais. A entrada do parasito parece ser mediada pela interação inicial de lectinas/carboidratos presentes na superfície do parasito e na parede da glândula salivar (Basseri, Tew, Ratcliffe, 2002). A superfície das glândulas salivares de *R. prolixus* contém grandes quantidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), que parece ser importante para a adesão de formas epimastigotas longas de *T. rangeli*, uma vez que a incubação prévia dessas formas com GlcNAc impede a sua adesão (Basseri, Tew, Ratcliffe, 2002). Estes penetram a glândula, através da inserção inicial de seus flagelos e, então, adentram os corpos celulares, passando entre as células musculares com diferentes graus de distorção. A penetração da membrana basal também é iniciada pelos flagelos, que se invaginam pela membrana celular das células da glândula salivar até que o parasito inteiro esteja envelopado. Os tripanosomas cruzam as células das glândulas salivares dentro desses vacúolos, mas sua maioria os perde antes de alcançar o lúmen da glândula (Ellis, Evans, Stamford, 1980; Hecker, Schwarzenbach, Rudin, 1990).

Uma vez dentro da glândula salivar, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que nadam livremente na saliva. As formas epimastigotas iniciam a diferenciação enquanto ainda aderidas aos microvilos das células glandulares pelos flagelos (Meirelles et al., 2005). Cerca de 20 dias após o início da colonização das glândulas, as formas metacíclicas do *T. rangeli* representam 95% dos parasitos. Nesse período, uma média de 100 mil parasitos está presente em cada glândula (Paim et al., 2013). Os tripanosomas, aparentemente, usam as proteínas estocadas no lúmen das glândulas salivares como fonte de energia, até que sejam transmitidos para o hospedeiro vertebrado (Paim et al., 2013).

Efeitos do *T. rangeli* no inseto

Como já mencionado, *T. rangeli* é um parasito que produz infecções sistêmicas em espécies do gênero *Rhodnius*. Esse tripanosoma se multiplica em todas as regiões do trato intestinal, bem como na hemolinfa, além de manter grandes populações de formas metacíclicas nas glândulas salivares. Em infecções experimentais usando a combinação *R. prolixus*/cepa Choachi, iniciadas tanto oralmente quanto através de inóculo, é frequente o encontro de massivas populações de parasitos (Guarneri, Schaub, 2021). Assim, não é surpreendente que a infecção produza efeitos patogênicos no inseto.

Em insetos experimentalmente infectados, as taxas de mortalidade são bastante elevadas, especialmente durante a ecdise, quando os insetos morrem ao não conseguirem sair da antiga cutícula (Añez, 1984; Cuba Cuba, 1998;

Grewal, 1957; Tobie, 1965). Além disso, é bastante frequente, também, ocorrer um prolongamento do período intermudas, e a presença de diferentes alterações morfológicas em decorrência de mudas mal sucedidas (Añez, 1984; Grewal, 1957; Rodrigues et al., 2016; Tobie, 1961). É possível que essas alterações sejam promovidas por danos causados por *T. rangeli* a tecidos e órgãos dos insetos, como já tem sido observado em túbulos de Malpighi, no corpo gorduroso, em músculos, em nervos e em células da traqueia (Watkins, 1971b, 1971a). A performance reprodutiva de *R. prolixus* também é reduzida durante a infecção por *T. rangeli*. Fêmeas jovens infectadas apresentaram atraso para o início da primeira postura, redução da quantidade ingerida de sangue que é transformada em ovos, e diminuição nas taxas de eclosão dos ovos postos (Fellet et al., 2014). Mais recentemente, um estudo que acompanhou casais infectados e não infectados ao longo de toda a vida adulta. Os resultados mostraram que a infecção afetou, de maneira drástica, o sucesso reprodutivo de *R. prolixus*, diminuindo o número de ovos postos e as taxas de eclosão, e aumentando a proporção de ovos inférteis, além de diminuir a longevidade das fêmeas (da Silva, Guarneri, 2023)

Efeitos da infecção por *T. rangeli* na microbiota do inseto

Como já mencionado, *T. rangeli* se desenvolve em todas as porções do trato intestinal dos triatomíneos, dependendo da quantidade de reservas nutricionais. Conseqüentemente, o parasito apresenta uma associação próxima com a microbiota do inseto, especialmente no IMA, onde os microrganismos são muito abundantes (Wigglesworth, 1936). Vários estudos têm mostrado que a presença de *T. rangeli* modifica as populações de simbiossitos no trato intestinal dos seus hospedeiros invertebrados. A infecção de *R. prolixus* por *T. rangeli* retardou o desenvolvimento de *R. rhodnii* presentes nos conteúdos intestinais do inseto (Eichler, Schaub, 2002). Além disso, foi também demonstrado que formas de cultura de *T. rangeli* são capazes de inibir o crescimento de simbiossitos em placas de ágar (Watkins, 1971b). O número de bactérias cultiváveis foi também reduzido, significativamente, em *R. prolixus* infectados pela cepa Macias (Vieira et al., 2015). O sequenciamento do gene rRNA 16S mostrou que o tripanosoma altera as comunidades bacterianas presentes no intestino médio anterior, que incluiu uma diminuição na quantidade de Enterococcaceae e Mycobacteriaceae e um aumento em Burkholderiaceae (Vieira et al., 2015). Recentemente, um sequenciamento do tipo *shotgun* do intestino de *R. prolixus*, infectados através da alimentação em camundongos infectados, mostrou que a presença do parasito diminuiu a diversidade de espécies de bactérias, de fungos e de vírus no IMA do

inseto no início da infecção (Eberhard et al., 2022). Provavelmente, a redução da quantidade e da diversidade de microrganismos no IMA esteja relacionada à competição por nutrientes, uma vez que o parasito desenvolve massivas populações nessa porção intestinal (Ferreira et al., 2018b).

Efeitos da infecção por *T. rangeli* na resposta imune do inseto

Trypanosoma rangeli dispara uma série de respostas imunológicas no trato intestinal do triatomíneo durante seu desenvolvimento. Além de causar alterações na composição da microbiota, a presença do parasito modifica o estado redox do microambiente intestinal. Como consequência, há um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase e uma diminuição da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido, o que, aparentemente, afeta o desenvolvimento de *T. rangeli* (Cosentino-Gomes, Rocco-Machado, Meyer-Fernandes, 2014). Vários mecanismos humorais e celulares atuam como fatores limitantes para o desenvolvimento do parasito, incluindo as lisozimas e a atividade tripanolítica (Gomes et al., 1999; Mello et al., 1995), a ativação do sistema pró-fenoxidase (Gomes et al., 1999, 2003; Mello et al., 1995), a fagocitose e a microagregação de hemócitos (Mello et al., 1995; Takle, 1988), a aglutinação (Mello et al., 1995; Pereira, Andrade, Ribeiro, 1981; Ratcliffe et al., 1996) e a produção de ânions superóxido (Whitten et al., 2001). Além disso, o perfil celular da hemolinfa de *R. prolixus* se modifica na presença do *T. rangeli* após o primeiro dia de infecção (De Oliveira, De Souza, 2003). Estudos utilizando microscopia eletrônica mostraram um aumento no número de plasmatócitos e oenócitos, e um decréscimo de pró-hemócitos, células granulares e adipócitos. Os nódulos foram compostos, predominantemente, por plasmatócitos e células granulares, cujo número decresceu ao longo da infecção.

Uma grande quantidade de flagelados foi encontrada dentro de plasmatócitos, em vacúolos citoplasmáticos que continham atividade de fosfatase ácida, e não foram observados parasitos em divisão. Aparentemente, os plasmatócitos são capazes de interiorizar e destruir formas epimastigotas de *T. rangeli* dentro de vacúolos (De Oliveira, De Souza, 2003). Na hemolinfa de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli*, ocorre uma diminuição da atividade tanto de mecanismos humorais quanto celulares, que coincide com o desaparecimento das formas curtas do parasito (Feder et al., 1999; Garcia, Machado, Azambuja, 2004; Gomes et al., 2003). Vários trabalhos têm demonstrado que a resposta imune do inseto é voltada, preferencialmente, às formas curtas, enquanto as formas longas teriam a capacidade de evadir e seriam responsáveis pela

manutenção da infecção, bem como pela invasão das glândulas salivares (Gomes et al., 1999, 2003; Mello et al., 1995, 1999). Aparentemente, as formas epimastigotas longas do *T. rangeli* estariam funcionando como um mecanismo de escape do parasito às respostas imunológicas do inseto.

A presença do parasito no trato intestinal promove uma redução da resposta imune sistêmica, sugerindo que a infecção favoreça um estado de imunossupressão generalizada no inseto. *Trypanosoma rangeli* afeta a expressão da enzima NOS, variando de maneira tecido específica e com variação temporal diminuindo a sua expressão e a produção de nitrito nos locais onde está presente (Whitten et al., 2007). Além disso, a produção de peptídeos antimicrobianos, como as lisozimas A e B, e a prolixicina, são, também, reduzidas durante a infecção intestinal (Vieira et al., 2015). Também já foi mostrado que a infecção oral diminuiu a ativação do sistema pró-fenoloxidase e reduziu a fagocitose de hemócitos (Garcia, Machado, Azambuja, 2004; Gomes et al., 2003). Esses efeitos podem ser o resultado da diminuição da ativação das vias de sinalização Toll, IMD e Jak/Stat, que também ocorre durante a infecção pelo parasito (Rolandelli et al., 2021).

Efeitos da infecção por *T. rangeli* no comportamento do inseto

Alterações no comportamento alimentar são as mudanças comportamentais mais comuns observadas em artrópodes hematófagos que transmitem parasitos através da saliva (Murdock, Luckhart, Cator, 2017). Esses efeitos são, também, observados nas espécies de *Rhodnius* infectadas por *T. rangeli*, nas quais a infecção promove um aumento significativo no número de picadas e na duração do repasto sanguíneo. Como consequência, tem-se a redução da habilidade do inseto em ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado, com um consequente aumento das chances de transmissão do parasito (Añez, East, 1984; Cuba Cuba, 1998; Garcia et al., 1994). A saliva dos triatomíneos contém uma série de moléculas com propriedades anti-hemostáticas, que permitem a dilatação dos vasos sanguíneos do hospedeiro e o fluxo contínuo de sangue durante a ingestão (Ribeiro et al., 2004). Já foi mostrado que infecções com *T. rangeli* reduzem as atividades anti-hemostáticas da saliva (Garcia et al., 1994). Além disso, promovem a inibição da atividade de uma tirosina fosfatase que, por sua vez, leva a uma redução da atividade da enzima NOS responsável pela produção do vasodilatador óxido nítrico (Gazos-Lopes et al., 2012). Essas alterações são, provavelmente, o resultado de uma redução de aproximadamente 60% da quantidade total das proteínas estocadas nas glândulas salivares, que são utilizadas como fonte de energia pelo para-

sito (Paim et al., 2013). A redução das hemeproteínas, que são responsáveis pela cor avermelhada das glândulas, leva a uma mudança na sua coloração (Paim et al., 2013).

A infecção por *T. rangeli* também promove alterações no comportamento de *R. prolixus*. Ninfas infectadas pelo parasito exibiram um aumento nos níveis de atividade locomotora espontânea quando estão em jejum e uma redução da fototaxia negativa, o que faz com que, na presença de um hospedeiro, um número maior de insetos deixe o abrigo e inicie o forrageamento (Marlière et al., 2015). Esse comportamento aumenta as taxas de predação sofridas por insetos infectados (Marlière, Lorenzo, Guarneri, 2022), provavelmente pelo aumento na percepção das picadas pelo hospedeiro (Schofield, Williams, Marshall, 1986). Uma vez que o parasito é transmitido pela saliva do inseto, se um maior número de indivíduos picar o hospedeiro, isso acaba levando a um aumento nas suas taxas de transmissão.

Considerações finais

Os insetos vetores são um fator determinante na transmissão e na disseminação de diversas doenças que afetam o homem e animais domésticos. O estudo de sua interação com seus parasitos naturais não só contribui para ampliar o conhecimento sobre a importância das associações parasito-hospedeiro no desenvolvimento de vetores, como também proporciona informações relevantes para o melhoramento de ferramentas de controle da infecção e da transmissão dos parasitos e, conseqüentemente, das doenças por eles causadas.

Referências

- ABAD-FRANCH, F.; GURGEL-GONÇALVES, R. The ecology and natural history of wild triatominae in the Americas. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. Entomology in Focus. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 387–445.
- ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.
- AMINO, R. et al. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 8, p. 6207–6213, 22 fev. 2002.
- AÑEZ, N. Early invasion of *Trypanosoma rangeli* into the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, n. 3, p. 422–423, 1980.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: V-Developmental pattern in the alimentary canal of *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 78, p. 183–191, 1983a.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920: VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 78, p. 413–419, 1983b.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. VII-Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 249–255, 1984.
- AÑEZ, N.; NIEVES, E.; CAZORLA, D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, p. 1–6, 1987.
- ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 94, 2014.
- ASIN, S.; CATALÁ, S. Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: Influence of temperature and blood consumption. *The Journal of Parasitology*, v. 81, n. 1, p. 1, fev. 1995.
- ATELLA, G. C.; GONDIM, K. C.; MASUDA, H. Loading of lipophorin particles with phospholipids at the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 30, n. 4, p. 337–350, 1995.
- ATELLA, T. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates lipid metabolism and highjacks phospholipids from the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica*, v. 233, p. 106552, 1 set. 2022.

AZAMBUJA, P. DE; GUIMARÃES, J. A.; GARCIA, E. S. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*, v. 29, n. 11, p. 833–837, 1 jan. 1983.

AZAMBUJA, P.; FEDER, D.; GARCIA, E. S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, v. 107, n. 1, p. 89–96, 1 maio 2004.

BAPTIST, B. A. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Journal of Cell Science*, v. 2, n. 329, p. 91–139, 1941.

BARISÓN, M. J. et al. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 48, n. 4, p. 437–449, 1 ago. 2016.

BASSERI, H. R.; TEW, I. F.; RATCLIFFE, N. A. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology*, v. 100, n. 4, p. 226–234, 2002.

BATISTA, K. K. D. S. Nitric oxide effects on *Rhodnius prolixus*'s immune responses, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* development. *Journal of Insect Physiology*, v. 126, p. 104100, out. 2020.

BILLINGSLEY, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219–248, 1990.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Acta Tropica*, v. 43, n. 4, p. 355–366, 1 dez. 1986.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E. R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*, v. 61, n. 11, p. 2574–2586, nov. 1983.

BÖKER, C. A.; SCHAUB, G. A. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 70, n. 4, p. 459–469, 1984.

BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, v. 106, n. 4, p. 1349–1358, 1 abr. 1988.

BONAY, P.; FRESNO, M. Characterization of carbohydrate binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 19, p. 11062–11070, 1995.

BONAY, P.; MOLINA, R.; FRESNO, M. Binding specificity of mannose-specific carbohydrate-binding protein from the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology*, v. 11, n. 9, p. 719–729, 1 set. 2001.

BOTTO-MAHAN, C. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: Implications for parasite transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, n. 5, p. 505–510, out. 2009.

BOTTO-MAHAN, C.; CAMPOS, V.; MEDEL, R. Sex-dependent infection causes nonadditive effects on kissing bug fecundity. *Ecology and Evolution*, v. 7, n. 10, p. 3552–3557, 2017.

BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; MEDEL, R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica*, v. 98, n. 3, p. 219–223, 1 jul. 2006.

BOTTO-MAHAN, C.; OSSA, C. G.; MEDEL, R. Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. *Physiological Entomology*, v. 33, n. 1, p. 25–30, 2008.

BRECHER, G.; WIGGLESWORTH, V. B. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology*, v. 35, n. 4, p. 220–224, 1944.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1973.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an inventory. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. e0004792, 29 ago. 2016.

BUARQUE, D. S. et al. Tigutcystatin, a cysteine protease inhibitor from *Triatoma infestans* midgut expressed in response to *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 413, n. 2, p. 241–247, 23 set. 2011.

BUARQUE, D. S. et al. Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLOS ONE*, v. 8, n. 5, p. e61203, 2 maio 2013.

BUARQUE, D. S. et al. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. *Biochimie*, v. 123, p. 138–143, 1 abr. 2016.

CÁMARA, M. DE LOS M. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, p. e0007418, 2019.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*-I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 6, n. 3, p. 93–100, 1964.

CARMONA-PEÑA, S. P. et al. Benefits and costs of immune memory in *Rhodnius prolixus* against *Trypanosoma cruzi*. *Microbial Pathogenesis*, v. 165, p. 105505, abr. 2022.

CARVALHO-MOREIRA, C. J. et al. *In vivo* and *in vitro* metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Experimental Parasitology*, v. 103, n. 3, p. 102–111, 1 mar. 2003.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V.; FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *The Journal of Protozoology*, v. 14, n. 3, p. 447–451, 1967.

CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental Parasitology*, v. 117, n. 2, p. 201–207, 1 out. 2007.

CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLOS ONE*, v. 7, n. 5, p. e36591, 4 maio 2012.

COELHO, H. S. L. et al. Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 35, n. 3, p. 301–313, 1997.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Rhodnius prolixus*: Modulation of antioxidant defenses by *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology*, v. 145, p. 118–124, 1 out. 2014.

COSTA-FILHO, A. et al. Identification and tissue-specific distribution of sulfated glycosaminoglycans in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Linnaeus). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 3, p. 251–260, 1 mar. 2004.

CUBA, C. A. C. Studies on a Peruvian strain of *Trypanosoma rangeli*. IV- Observations on its development and morphogenesis in the haemocoel and salivary glands of *Rhodnius ecuadoriensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 17, n. 5, p. 283–297, 1975.

CUBA CUBA, C. A. Development of *T. rangeli* metacyclic forms from triatomid bugs' salivary glands ingested by *Rhodnius ecuadoriensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 6, p. 944–945, 1972.

CUBA CUBA, C. A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 207–220, 1998.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Em: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (Eds.). *Biology of Kinetoplastida*. London: Academic Press, 1976. v. 1p. 328–403.

D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAIVA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. Em: KREIR, J.P; BAKER, J. (Eds.). *Parasitic Protozoa*. London: Academic Press, 1992. v. 2p. 1–54.

da SILVA, B. D.; GUARNERI, A. A. *Trypanosoma rangeli* infection impairs reproductive success of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*, v. 150, n. 1, p. 42–48, jan. 2023.

DE LANA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, v. 90, n. 1, p. 20–25, 1 set. 1998.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 77, n. 1, p. 22–26, 1 jan. 2001.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology International*, v. 52, n. 4, p. 299–307, 1 dez. 2003.

DEPICKÈRE, S.; RAMÍREZ-ÁVILA, G. M.; DENEUBOURG, J.-L. Alteration of the aggregation and spatial organization of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 17432, 22 nov. 2019.

DIAS, F. DE A. et al. Monitoring of the parasite load in the digestive tract of *Rhodnius prolixus* by combined qPCR analysis and imaging techniques provides new insights into the trypanosome life cycle. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. e0004186, 23 out. 2015.

DWORAK, E. S. et al. Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 5, p. 629–637, set-out. 2017.

EBERHARD, F. E. et al. Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Microbiome*, v. 10, n. 1, p. 45, 10 mar. 2022.

EGER-MANGRICH, I. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines *in vitro*. *Parasitology research*, v. 87, n. 6, p. 505–509, 2001.

EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, v. 44, n. 2, p. 131–140, 1 fev. 1998.

EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, v. 100, n. 1, p. 17–27, 1 jan. 2002.

ELLIOT, S. L. et al. *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 3, p. e0003646, 20 mar. 2015.

ELLIS, D. S.; EVANS, D. A.; STAMFORD, S. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 62, n. 1, p. 63–74, 1 fev. 1980.

ENNES-VIDAL, V. et al. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. PLOS ONE, v. 6, n. 4, p. e18371, 4 abr. 2011.

ESTAY-OLEA, D. et al. *Trypanosoma cruzi* could affect wild triatomine approaching behaviour to humans by altering vector nutritional status: A field test. Acta Tropica, v. 210, p. 105574, 1 out. 2020.

FAVILA-RUIZ, G. et al. Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). Parasites & Vectors, v. 11, n. 1, p. 434, 27 jul. 2018.

FEDER, D. et al. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, p. 771–777, nov. 1999.

FELLET, M. R. et al. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. PLOS ONE, v. 9, n. 8, p. e105255, 19 ago. 2014.

FERREIRA, C. M. et al. Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow insect reproduction and parasite infection. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 7, p. e0006661, 23 jul. 2018a.

FERREIRA, L. DE L. et al. New features on the survival of human-infective *Trypanosoma rangeli* in a murine model: Parasite accumulation is observed in lymphoid organs. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n. 12, p. e0009015, 28 dez. 2020.

FERREIRA, L. DE L.; PEREIRA, M. H.; GUARNERI, A. A. Revisiting *Trypanosoma rangeli* Transmission Involving Susceptible and Non-Susceptible Hosts. PLOS ONE, v. 10, n. 10, p. e0140575, 15 out. 2015.

FERREIRA, L. L. et al. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. Journal of Invertebrate Pathology, v. 105, n. 1, p. 91–97, 1 set. 2010.

FERREIRA, R. C. et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. Parasitology, v. 143, n. 4, p. 434–443, abr. 2016.

FERREIRA, R. C. et al. Effect of temperature and vector nutrition on the development and multiplication of *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*. Parasitology Research, v. 117, n. 6, p. 1737–1744, 1 jun. 2018b.

FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. Journal of Parasitology, v. 86, n. 6, p. 1213–1218, 1 dez. 2000.

FINAMORE-ARAUJO, P. et al. RNA as a feasible marker of *Trypanosoma cruzi* viability during the parasite interaction with the triatomine vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae). PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7;16(7):e0010535 7 Jul. 2022.

FLORIN-CHRISTENSEN, M. et al. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 88, n. 1, p. 25–33, 1 set. 1997.

FOLLY, E. et al. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 310, n. 2, p. 555–561, 17 out. 2003.

FRAIDENRAICH, D. et al. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 90, n. 21, p. 10140–10144, 1993.

FRIEND, W.G.; SMITH, J.J.B. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Em: CARCAVALLO, R.U.; RABINOVICH, J.E.; TONN, R.J. (Eds.). Epidemiología. Vectores. Argentina: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS, OMS, 1985. p. 55–72.

GARCIA, E. S. et al. *Rhodnius prolixus*: Salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Experimental Parasitology, v. 78, n. 3, p. 287–293, 1 maio 1994.

GARCIA, E. S. et al. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying α D-globin sequences. Experimental Parasitology, v. 81, n. 3, p. 255–261, 1 nov. 1995.

GARCIA, E. S.; MACHADO, E. M. M.; AZAMBUJA, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. Experimental Parasitology, v. 107, n. 1, p. 31–38, 1 maio 2004.

GAZOS-LOPES, F. et al. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in *Rhodnius prolixus* salivary glands. PLOS ONE, v. 7, n. 10, p. e47285, 15 out. 2012.

GOLGHER, D. B. et al. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 60, n. 2, p. 249–264, 1 ago. 1993.

GOMES, S. A. O. et al. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *In vivo* and *in vitro* experiments. Journal of Invertebrate Pathology, v. 73, n. 3, p. 289–293, 1 maio 1999.

GOMES, S. A. O. et al. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 79, n. 2, p. 86–92, 1 fev. 2002.

- GOMES, S. A. O. et al. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology*, v. 49, n. 9, p. 829–837, 1 set. 2003.
- GONZALEZ, M. S. et al. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 92, n. 2, p. 100–108, 1 jun. 1999.
- GONZALEZ, M. S. et al. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 114, n. 4, p. 297–304, 1 dez. 2006.
- GONZALEZ, M. S. et al. Involvement of sulfated glycosaminoglycans on the development and attachment of *Trypanosoma cruzi* to the luminal midgut surface in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*, v. 138, n. 14, p. 1870–1877, dez. 2011.
- GONZALEZ, M. S. et al. *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 11, p. e2552, 14 nov. 2013.
- GREGÓRIO, E. A.; RATCLIFFE, N. A. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 181–186, jun. 1991.
- GREWAL, M. S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Experimental Parasitology*, v. 6, n. 2, p. 123–130, 1957.
- GROOT, H. Estudios sobre los tripanosomas humanos clasificados como *T. rangeli* con especial referencia a su evolución en *Rhodnius prolixus* ya su comparación con *T. ariarii*. *Anales de la Sociedad de Biología de Bogotá*, v. 6, n. 3, p. 109–126, 1954.
- GUARNERI, A. A. et al. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*, v. 27, n. 2, p. 142–147, 2002.
- GUARNERI, A. A. et al. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*, v. 28, n. 3, p. 185–191, 2003.
- GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *Journal of Insect Physiology*, v. 97, p. 66–76, 1 fev. 2017.
- GUARNERI, A. A.; SCHAUB, G. A. Interaction of triatomines with their bacterial microbiota and trypanosomes. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. *Entomology in Focus*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 345–386.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 435–442, jun. 2003.

HAMEDI, A. et al. *In vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 200, n. 1, p. 9–18, 1 mar. 2015.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitology Research*, v. 76, n. 4, p. 311–318, 1 abr. 1990.

HINESTROZA, G.; ORTIZ, M. I.; MOLINA, J. Behavioral fever response in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) to intracoelomic inoculation of *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, p. 425–432, ago. 2016.

ISOLA, E. L. et al. Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Parasitology*, p. 53–58, 1981.

ISOLA, E. L. D.; LAMMEL, E. M.; CAPPA, S. G. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Experimental parasitology*, v. 62, n. 3, p. 329–335, 1986.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica, Ecology and diversity of Trypanosoma cruzi*. v. 151, p. 1–15, 1 nov. 2015.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2018.

JUAREZ, E. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Triatoma arthurneivai*, em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, v. 4, p. 13–18, 1970.

KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Molecular Microbiology*, v. 104, n. 5, p. 712–736, 2017.

KITAJIMA, E. W.; CUBA CUBA, C. A.; BRENER, Z. Ultrastructural observations on *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* in the salivary glands of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera, Reduviidae). *Parasitología al Día*, v. 22, n. 3–4, p. 65–71, jul. 1998.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 45, n. 5, p. 548–555, 1998.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. *Parasitology Research*, v. 83, n. 8, p. 781–788, 1 set. 1997.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of starvation. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 59–63, 1998.

KOLLIEN, A. H.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, v. 70, n. 2, p. 127–141, 30 jun. 1998.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*, v. 16, n. 9, p. 381–387, 1 set. 2000.

LAKE, P.; FRIEND, W. G. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*, v. 98, p. 53–57, 1967.

LARA, F. A. et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 355, n. 1, p. 16–22, 30 mar. 2007.

LAZZARI, C. R. The behaviour of kissing Bugs. *Triatominae-The Biology of Chagas Disease Vectors*, p. 215–238, 2021.

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

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 12, p. 1305–1317, 1 out. 2009.

LIMA, M. M. et al. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 85, n. 4, p. 458–461, 1992.

LOMBARDO, M. E.; ARAUJO, L. S.; BATLLE, A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, n. 8, p. 1263–1271, 1 ago. 2003.

LOPES, D. D. M. et al. Ecdysone modulates both ultrastructural arrangement of hindgut and attachment of *Trypanosoma cruzi* DM 28c to the rectum cuticle of *Rhodnius prolixus* fifth-instar nymph. *Experimental Parasitology*, v. 236-237, p. 108247 May-Jun 2022.

MACHADO, P. E. et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 5, p. 632–634, 1 maio 2001.

MAIA DA SILVA, F. et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, v. 129, n. 5, p. 549–561, nov. 2004.

MAIA DA SILVA, F. et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 16, p. 3361–3373, 2007.

MAIA DA SILVA, F. et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica*, v. 109, n. 3, p. 199–207, 1 mar. 2009.

MANCILLA, R.; NAQUIRA, C.; LANAS, C. Protein biosynthesis in trypanosomidae: II. The metabolic fate of dl-leucine-1-C¹⁴ in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 21, n. 2, p. 154–159, 1967.

MANTILLA, B. S. et al. Role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 12, p. 7767–7790, 2015.

MARINKELLE, C. J. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stål in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 5, n. 4, p. 497–499, 1968.

MARLIÉRE, N. P. et al. Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: Effects on locomotion and on the expression of a related gene. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 8, p. e0003973, 20 ago. 2015.

MARLIÉRE, N. P.; LORENZO, M. G.; GUARNERI, A. A. *Trypanosoma cruzi*-infected *Rhodnius prolixus* endure increased predation facilitating parasite transmission to mammal hosts. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 7, p. e0009570, 1 jul. 2021.

MARLIÉRE, N. P.; LORENZO, M. G.; GUARNERI, A. A. *Trypanosoma rangeli* infection increases the exposure and predation endured by *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*, v. 149, n. 2, p. 155–160, 2022.

MEIRELLES, R. M. et al. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 35, n. 2, p. 199–207, 1 abr. 2003.

MEIRELLES, R. M. S. et al. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology Research*, v. 97, n. 4, p. 259–269, 1 out. 2005.

MELLO, C. B. et al. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 65, n. 3, p. 261–268, 1 maio 1995.

- MELLO, C. B. et al. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 82, n. 2, p. 112–121, 1 mar. 1996.
- MELLO, C. B. et al. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology*, v. 91, n. 4, p. 289–296, 1 abr. 1999.
- MESSENGER, L. A.; MILES, M. A. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica, Ecology and diversity of Trypanosoma cruzi*. v. 151, p. 150–155, 1 nov. 2015.
- MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Annals of tropical Medicine and Parasitology*, v. 67, n. 3, p. 371–2, 1973.
- MOREIRA, C. J. D. C. et al. Lipoproteins from vertebrate host blood plasma are involved in *Trypanosoma cruzi* epimastigote agglutination and participate in interaction with the vector insect, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 195, p. 24–33, 1 dez. 2018.
- MURDOCK, C. C.; LUCKHART, S.; CATOR, L. J. Immunity, host physiology, and behaviour in infected vectors. *Current Opinion in Insect Science*, v. 20, p. 28–33, 1 abr. 2017.
- NOGUEIRA, N. F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 2, p. 120–128, 1 jun. 2007.
- NOUVELLET, P. et al. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, n. 6, p. 1243–1249, 1 ago. 2011.
- NUSSENZVEIG, R. H.; BENTLEY, D. L.; RIBEIRO, J. M. Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Experimental Biology*, v. 198, n. 5, p. 1093–1098, 1995.
- OLIVEIRA, F. O. R. et al. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*, v. 139, n. 6, p. 735–743, maio 2012.
- OLIVEIRA, P. L.; GENTA, F. A. Blood digestion in triatomine insects. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. *Entomology in Focus*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 265–284.
- ORANTES, L. C. et al. Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 10, p. e0006730, 18 out. 2018.

- OSORIO, Y. et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *The Journal of Parasitology*, p. 687–693, 1995.
- OUALI, R. et al. *Rhodnius prolixus* hemolymph immuno-physiology: deciphering the systemic immune response triggered by *Trypanosoma cruzi* establishment in the vector using quantitative proteomics. *Cells*, v. 11, n. 9, p. 1449, jan. 2022.
- PAIM, R. M. M. et al. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43, n. 3, p. 229–236, 1 mar. 2013.
- PARANAIBA, L. F.; SOARES, R. P.; GUARNERI, A. A. *Triatoma infestans* susceptibility to different *Trypanosoma cruzi* strains: parasite development and early escape from anterior midgut. *Parasitology*, v. 148, n. 3, p. 295–301, 2021.
- PEREIRA, M. E.; ANDRADE, A. F.; RIBEIRO, J. M. C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, v. 211, n. 4482, p. 597–600, 1981.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *Journal of Cell Science*, v. 113, n. 7, p. 1299–1307, 1 abr. 2000.
- PEREYRA, N.; LOBBIA, P. A.; MOUGABURE-CUETO, G. Effects of the infection with *Trypanosoma cruzi* on the feeding and excretion/defecation patterns of *Triatoma infestans*. *Bulletin of Entomological Research*, v. 110, n. 1, p. 169–176, fev. 2020.
- PÉREZ, G. et al. Modification of the daily activity pattern of the diurnal triatomine *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae) induced by *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) infection. *Journal of Medical Entomology*, v. 58, n. 6, p. 2474–2478, 1 nov. 2021.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MOREIRA, C. J. DE C. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi* - 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 603–618, dez. 1994.
- PETERSON, J. K. et al. *Rhodnius prolixus* life history outcomes differ when infected with different *Trypanosoma cruzi* strains. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 3, p. 564–572, 2 set. 2015.
- PETERSON, J. K. et al. *Trypanosoma cruzi*–*Trypanosoma rangeli* co-infection ameliorates negative effects of single trypanosome infections in experimentally infected *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*, v. 143, n. 9, p. 1157–1167, ago. 2016.
- PHILLIPS, N. R. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: considerations regarding the standardization of materials. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 54, n. 1, p. 60–70, 1960.

- PIFANO, C. F. et al. Primera comprobacion de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periferica. Archivos Venezolanos de Patologia Tropical y Parasitologia Medica, v. 1, p. 1–31, 1948.
- PULIDO, X. C.; PÉREZ, G.; VALLEJO, G. A. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 172–179, mar. 2008.
- RAMIREZ-SIERRA, M. J. et al. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. Tropical Medicine & International Health, v. 15, n. 1, p. 77–86, 2010.
- RATCLIFFE, N. A. et al. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: A comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. Experimental Parasitology, v. 83, n. 1, p. 83–93, 1 jun. 1996.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 34, n. 1, p. 61–79, 1 jan. 2004.
- ROCA, M. J.; LAZZARI, C. R. Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygropreference and eclosion success. Journal of Insect Physiology, v. 40, n. 10, p. 901–907, 1 out. 1994.
- RODRIGUES, J. DE O. et al. Temperature and parasite life-history are important modulators of the outcome of *Trypanosoma rangeli*–*Rhodnius prolixus* interactions. Parasitology, v. 143, n. 11, p. 1459–1468, 2016.
- RODRÍGUEZ-RUANO, S. M. et al. Microbiomes of North American triatominae: The grounds for Chagas disease epidemiology. Frontiers in Microbiology, v. 9, 2018.
- ROLANDELLI, A. et al. Modulation of IMD, Toll, and Jak/STAT immune pathways genes in the fat body of *Rhodnius prolixus* during *Trypanosoma rangeli* infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, 2021.
- RUDIN, W.; SCHWARZENBACH, M.; HECKER, H. Binding of lectins to culture and vector forms of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa, Kinetoplastida) and to structures of the vector gut. The Journal of Protozoology, v. 36, n. 6, p. 532–538, 1989.
- SALCEDO, S. R.; GROOT, H.; PIEDRAHITA, C. U. Contribución al estudio de Trypanosomas humanos y de animales en Colombia. Biomédica, v. 17, n. 3, p. 152–204, 1997.
- SALZMAN, T. A. et al. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: Functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 72, n. 4, p. 663–667, 1 jan. 1982.

- SANABRIA, A. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, v. 19, n. 3, p. 276–299, 1966.
- SÁNCHEZ, I. P. et al. Inmunidad natural de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) frente a la infección con *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* KP1 (-) aislados de *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, v. 17, p. 108–118, 2005.
- SANTANA, R. A. G. et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 1, p. 132–135, jan. 2019.
- SCHAUB, G. A. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Tropica*, v. 45, n. 1, p. 11–19, 1988a.
- SCHAUB, G. A. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 74, n. 6, p. 593–594, 1988b.
- SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, v. 68, n. 3, p. 260–273, 1989a.
- SCHAUB, G. A. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitology Today*, v. 5, n. 6, p. 185–188, 1989b.
- SCHAUB, G. A.; BÖKER, C. A. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta tropica*, v. 43, n. 4, p. 349–354, 1986.
- SCHAUB, G. A.; BÖKER, C. A. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. *Parasitology Research*, v. 73, n. 5, p. 417–420, 1987.
- SCHAUB, G. A.; LÖSCH, P. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, v. 65, n. 2, p. 174–186, 1988.
- SCHAUB, G. A.; LÖSCH, P. Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 83, n. 3, p. 215–223, 1989.
- SCHAUB, G. A.; MEISER, A. Presence of undigested haemoglobin in the small intestine and haemolymph of *Triatoma infestans* (Reduviidae) infected with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *Parasitology Research*, v. 76, n. 8, p. 724–725, 1990.
- SCHILMAN, P. E.; LAZZARI, C. R. Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. *Acta tropica*, v. 90, n. 1, p. 115–122, 2004.

SCHMIDT, J.; KLEFFMANN, T.; SCHAUB, G. A. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. *Parasitology Research*, v. 84, n. 7, p. 527–536, 1998.

SCHOFIELD, C. J. *Triatominae: biology & control*. Eurocommunica Publications, 1994.

SCHOFIELD, C. J.; WILLIAMS, N. G.; MARSHALL, T. DE C. Density-dependent perception of triatomine bug bites. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 80, n. 3, p. 351–358, 1986.

SINCERO, T. C. M. et al. *Trypanosoma rangeli* displays a clonal population structure, revealing a subdivision of KP1 (-) strains and the ancestry of the Amazonian group. *International Journal for Parasitology*, v. 45, n. 4, p. 225–235, 2015.

SOARES, A. C. et al. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *Journal of Insect Physiology*, v. 52, n. 5, p. 468–472, 1 maio 2006.

SOARES, T. S. et al. A Kazal-type inhibitor is modulated by *Trypanosoma cruzi* to control microbiota inside the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. *Biochimie*, v. 112, p. 41–48, 2015.

SOUSA, G.; DE CARVALHO, S. S.; ATELLA, G. C. *Trypanosoma cruzi* affects *Rhodnius prolixus* lipid metabolism during acute infection. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 2, p. 737909, 2021.

SOUZA, M. L. S. et al. Sulfated glycosaminoglycans in two hematophagous arthropod vectors of Chagas disease, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 139, n. 4, p. 631–635, 1 dez. 2004.

SOUZA, R. O. O. et al. Fatty acid oxidation participates in resistance to nutrient-depleted environments in the insect stages of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathogens*, v. 17, n. 4, p. e1009495, 5 abr. 2021.

STEINDEL, M. et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 261–267, 1994.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2008.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 55, n. 3, p. 443–447, 1976.

TAKLE, G. B. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 51, n. 1, p. 64–72, 1988.

- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. *Comprehensive Molecular Insect Science*, v. 4, p. 171–224, 2005.
- TOBIE, E. J. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 1961.
- TOBIE, E. J. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *The Journal of Parasitology*, p. 593–598, 1964.
- TOBIE, E. J. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Parasitology*, p. 837–841, 1965.
- TOBIE, E. J. Fate of some culture flagellates in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Parasitology*, p. 1040–1046, 1968.
- TOBIE, E. J. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 15, n. 1, p. 118–125, 1970.
- TOMAS, A. M.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *European Journal of Biochemistry*, v. 244, n. 2, p. 596–603, 1997.
- TOVAR, D.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: study of the effects of the parasite on the vector. *Acta Científica Venezolana*, v. 40, n. 3, p. 208–214, 1989.
- UEHARA, L. A. et al. Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, p. e1958, 2012.
- URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. *The Journal of Parasitology*, p. 409–414, 1985.
- URREA, D. A. et al. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallenscens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 5, n. 2, p. 123–129, 1 mar. 2005.
- URREA, D. A. et al. Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallenscens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. *Acta Tropica*, v. 120, n. 1, p. 59–66, 1 out. 2011.
- URSIC-BEDOYA, R. J. et al. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 3, p. 593–603, 2008.

VALLEJO, G. A. et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Tropica*, v. 81, n. 1, p. 77–82, 2002.

VALLEJO, G. A. et al. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, n. 1, p. 39–45, 2003.

VALLEJO, G. A. et al. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomédica*, v. 27, p. 110–118, 2007.

VALLEJO, G. A. et al. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 39, p. 111–122, 2015.

VARGAS, L. G.; ZELEDÓN, R. Effect of fasting on *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 22, n. 6, p. 683–683, 1985.

VIEIRA, C. S. et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.

VIEIRA, C. S. et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

WAINSZELBAUM, M. J. et al. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, v. 375, n. 3, p. 705–712, 2003.

WALTMANN, A. et al. Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, p. e0007383, 6 maio 2019.

WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M.; ARAÚJO, C. A. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 7, p. 845–847, 2011.

WATKINS, R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 17, n. 1, p. 59–66, 1971a.

WATKINS, R. *Trypanosoma rangeli*: effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 17, n. 1, p. 67–71, 1971b.

WHITTEN, M. et al. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, n. 5, p. 440–452, 1 maio 2007.

WHITTEN, M. M. A. et al. Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* Interactions. *Experimental Parasitology*, v. 98, n. 1, p. 44–57, 1 maio 2001.

WIGGLESWORTH, V. B. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stål. (Hemiptera, Triatomidae). *Parasitology*, v. 28, n. 2, p. 284–289, 1936.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em: 19 de abr. 2023.

XAVIER, A. A. P. et al. Relative humidity and water loss in *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*, v. 30, n. 4, p. 338–342, 2005.

ZELEDÓN, R. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Chagas Disease Vectors*, v. 2, p. 59–75, 1987.

ZELEDÓN, R. et al. Morphological evidence by scanning electron microscopy of excretion of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in vector's urine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, n. 3, p. 361–365, 1988.

ZELEDÓN, R.; BLANCO, E. Host-Parasite Relationships of *Trypanosoma rangeli*. I. Comparison of Intestinal and Haemolymphatic Infection of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Revista de Biología Tropical*, v. 13, n. 1, p. 143–56, 1965.

ZINGALES, B. et al. Endogenous and surface labeling of glycoconjugates from the three differentiation stages of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS letters*, v. 142, n. 2, p. 238–242, 1982.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 12

Interação do parasito *Trypanosoma cruzi* e seu ecossistema no inseto vetor

Natália Pereira de Almeida Nogueira
Carolina Silva Dias Vieira
Marcia Cristina Paes

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Natália Pereira de Almeida Nogueira, Carolina Silva Dias Vieira, Marcia Cristina Paes]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Um aspecto importante da Entomologia é a relação dos insetos com patógenos que, durante uma parte de seu ciclo biológico, utilizam os insetos como casa, estabelecendo uma bem-sucedida interação com seus ambientes internos. Por onde passam no interior dos insetos, seja na glândula salivar, no intestino, na hemolinfa ou no reto, esses patógenos encontram diferentes moléculas, partículas, variações de pH, de temperatura, tensão de O₂ e presença de outros microrganismos. Os desafios, tanto para os insetos quanto para os patógenos, são, em geral, superados, demonstrando a eficiência de suas adaptações. São várias as “bem-sucedidas” interações encontradas em vários insetos. Particularmente, uma que nos chama a atenção é a relação entre os vetores da doença de Chagas e o seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*. Essa é uma doença tropical descrita há mais de 100 anos, a qual, até agora, não conseguimos eliminar. Isso porque ela é negligenciada, apesar de debilitante e potencialmente letal (Chagas, 1909). Na fase do seu ciclo de vida dentro do inseto, esse patógeno se multiplica, se fortalece e se prepara para dar continuidade a sua nova fase, na qual terá que atravessar a corrente sanguínea dos mamíferos, invadir suas células e se replicar, estabelecendo, assim, a doença. Portanto, vencer todos os desafios encontrados dentro do vetor, de forma a garantir sua transmissão, tornando esse ambiente favorável ao seu desenvolvimento é uma tarefa importante, de fato, para esses organismos. Porém, o entendimento das relações e das permissões (ou não) estabelecidas entre o parasito e o vetor é também interessante para nós, estudiosos no tema.

Trypanosoma cruzi pertence à família Trypanosomatidae, que é composta por um repertório de parasitos que infectam vertebrados, invertebrados e plantas. Entre eles, são encontrados vários responsáveis por doenças animais de interesse na veterinária e por doenças humanas. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro dessa família, sendo dividido em dois grupos: (i) Stercoraria, que inclui aqueles que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, deslocando-se no sentido da porção intestinal e sendo liberados como formas infectantes pelas fezes dos insetos transmissores; e (ii) Salivaria, inclui tripanosomas que se desenvolvem, inicialmente, no tubo digestivo e que, posteriormente, atravessam o epitélio digestivo, atingindo a hemolinfa e/ou as glândulas salivares dos insetos, onde serão encontradas as formas infectantes transmitidas ao hospedeiro vertebrado. É nesse gênero, *Trypanosoma*, que são encontradas espécies causadoras das doenças humanas importantes, como o *T. cruzi*, agente da doença de Chagas, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e

Trypanosoma brucei gambiense, agentes da doença do sono, e também espécies causadoras de doenças em animais, como é o caso do *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* (De Souza, Vidal, 2017).

Entre os insetos infectados pela família Trypanosomatidae, encontram-se espécies de dípteros e hemípteros. *Trypanosoma cruzi* garante sua transmissão aos vertebrados através de insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Essa subfamília é composta por mais de uma centena de espécies hematófagas e potenciais vetores de *T. cruzi*. Porém, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* são considerados os vetores mais importantes para a sua transmissão para humanos (Gourbière et al., 2012; Guhl, 2017).

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* infecta o hospedeiro invertebrado triatomíneo e o vertebrado mamífero, incluindo os humanos. O parasito sofre alterações moleculares e morfológicas, sobrevivendo a esses ambientes. É no intestino do inseto vetor que o parasito pode ser encontrado em sua forma epimastigota (forma replicativa e não infectiva) e tripomastigota metacíclica (forma não replicativa e infectiva) (Ferreira et al., 2016; Guarniere, Lorenzo, 2017). Enquanto isso, no hospedeiro mamífero, são encontradas a forma intracelular amastigota (forma replicativa, podendo ser infectante) e tripomastigota sanguíneo (forma não replicativa e infectiva), que é a forma circulante presente na corrente sanguínea (Azambuja et al., 2005; Rassi et al., 2010).

É durante o repasto sanguíneo, quando o inseto triatomíneo pode ingerir grandes quantidades de sangue de um hospedeiro mamífero infectado, que chegam no intestino do vetor as formas tripomastigotas sanguíneas, as quais logo se diferenciam das formas replicativas epimastigotas. Essas formas proliferam-se ao longo do intestino e, especialmente no reto, sofrem um processo de diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica (Chagas, 1909). O ciclo recomeça durante um novo repasto sanguíneo em outro mamífero, quando haverá, simultaneamente, a sucção do sangue e a eliminação das fezes contendo essas formas infectantes. Os tripomastigotas metacíclicos, em contato com a pele lesionada, penetram no mamífero, infectando diversos tipos celulares. Ao invadir a célula hospedeira, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota, que é a forma proliferativa intracelular encontrada nos mamíferos (Tyler, Engman, 2001; Lidani et al., 2017).

As variações genóticas de *T. cruzi*, suas interações e capacidade de infecção dos hospedeiros

Desde a sua descoberta, há mais de um século, evidências da literatura indicam que a íntima interação parasito-vetor é essencial para o sucesso da propagação da doença de Chagas. Vários autores investigaram as associações entre *T. cruzi* e triatomíneos, relacionando diversos fatores e moléculas ao estabelecimento da infecção no inseto. É improvável que o *T. cruzi* e seus vetores triatomíneos tenham coevoluído, facilitando a transmissão do parasito. Porém, esse evento proporcionou balanço tanto para o inseto vetor quanto para o parasito, agindo no sentido do desenvolvimento e/ou controle do protozoário no interior do hospedeiro invertebrado, mantendo um equilíbrio.

A interação *T. cruzi*-triatomíneo parece ser ainda mais complexa do que se imaginava, uma vez que o parasito parece não constituir uma única entidade, mas corresponder a subgrupos genéticos altamente divergentes. O polimorfismo genético de *T. cruzi* foi, originalmente, demonstrado por eletroforese de isoenzimas, que levou à classificação de três grupos principais: o zimodema 1 (Z1), que aparecia espalhado por *habitats* silvestres; o zimodema 2 (Z2), que parecia estar mais associado às infecções humanas na região do cone sudeste; e o zimodema 3 (Z3), que parecia estar restrito à região amazônica (Devera et al., 2003). Análises posteriores, utilizando diversos marcadores e ferramentas de biologia molecular, confirmaram esse agrupamento, indicando, porém, duas linhagens principais denominadas *T. cruzi* I (=Z1) e *T. cruzi* II (=Z2), incluindo o Z3 dentro do *T. cruzi* II. Em 2009, durante o encontro satélite conhecido como XXXVI *Encontro Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas*, um comitê de especialistas reconheceu e unificou a nomenclatura das cepas de *T. cruzi*. A partir dessa data, os isolados e cepas de *T. cruzi* deveriam ser classificados dentro de seis diferentes unidades discretas de tipagem ou *discrete typing units* (DTU), denominadas *T. cruzi* I-VI, de acordo com a genotipagem de multilocus (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012).

Atualmente, a alta variabilidade genética de *T. cruzi* permite sua classificação em sete linhagens diferentes, sendo seis DTUs, de TcI a TcVI, e um sétimo genótipo, TcBat (Zingales et al., 2009; Marcili et al., 2009; Zingales, 2018). Inicialmente identificado em várias espécies de morcegos, o TcBat foi encontrado em uma criança na Colômbia (Ramírez et al., 2014). Qualquer linhagem de *T. cruzi* pode infectar humanos. Porém, em áreas endêmicas, TcI, TcII, TcV e TcVI são as DTUs mais associadas a infecções humanas em ciclos de transmissão domiciliar (Zingales et al., 2012; Messenger et al., 2015). No Brasil, TcII e TcVI são as DTU de

T. cruzi mais frequentemente identificadas em infecções humanas (Oliveira et al., 2015, Rodrigues-Dos-Santos et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

Em relação à associação entre as DTU de *T. cruzi* e as apresentações clínicas da doença de Chagas crônica (cardíaca, digestiva e/ou neurológica), estas variam de acordo com a região geográfica. Por exemplo, TcI, TcII, TcIV, TcV e TcVI foram identificados em pacientes com forma cardíaca crônica, nascidos na Argentina, no Brasil, na Bolívia e na Venezuela (Del Puerto et al., 2010, Cura et al., 2012, Carrasco et al., 2013, Rodrigues-Dos-Santos et al., 2018, Bizai et al., 2020), enquanto TcII, TcV e TcVI também foram identificados em pacientes com a forma digestiva, particularmente no Brasil, Argentina e Bolívia (Lages-Silva et al., 2006, Cura et al., 2012, Monje-Rumi et al., 2020). Já TcIII é, geralmente, encontrada em ciclos silvestres e foi identificada em pacientes com a forma crônica indeterminada no Brasil (Martins et al., 2015). A TcIV parece ter uma importância secundária, em pacientes com cardiomiopatia chagásica na Colômbia e Venezuela (Ramírez et al., 2010; Carrasco et al., 2013). Contudo, não existe um consenso correlacionando a DTU a uma apresentação clínica específica da doença de Chagas. Até o momento, os dados disponíveis sugerem que as cepas de *T. cruzi* detectadas em pacientes, independentemente da apresentação clínica, refletem a principal DTU que circula nos ciclos de transmissão domésticos de uma determinada região.

Os desafios encontrados pelo inseto vetor e o parasito durante a interação

Na natureza, não é possível prever o momento da próxima alimentação do vetor. Por isso, a oferta de nutrientes para o inseto e para o parasita sofre variações importantes (Kollien, Schaub, 2000). Quando os triatomíneos têm a chance de se alimentar no hospedeiro vertebrado, eles ingerem uma quantidade grande de sangue, que pode chegar a quase dez vezes o seu peso inicial (Friend et al., 1965). Dessa forma, vários desafios são impostos ao inseto e ao parasito.

A fim de diminuir a elevação do peso, o inseto rapidamente (em cerca de três minutos) elimina grande quantidade de água, concentrando, assim, os nutrientes no trato digestivo (Maddrell, 1972). Essa alteração do conteúdo de água pode levar à produção de urina com osmolaridade duas vezes maior após 48 horas, quando comparada ao momento imediatamente posterior à alimentação, demonstrando variações fisiológicas importantes para o inseto em um curto período de tempo. *Trypanosoma cruzi*, quando ingerido com o sangue durante o repasto, chega no intestino do vetor e passa por todo esse estresse osmótico (Kollien, Schaub, 2000). Essa alteração da osmolaridade é um dos primeiros desafios que o vetor e o parasito encontram com a alimentação.

Outros desafios iniciais são os componentes da saliva, as enzimas digestivas, o fator hemolítico e as fortes mudanças nas condições físico-químicas do ambiente, como, por exemplo, a variação da temperatura do mamífero para o inseto. No entanto, embora existam diferenças entre cepas, *T. cruzi* é resistente à lise, aos fatores hemolíticos e às variações de temperatura, mantendo sua infecção em *R. prolixus* favorável ao seu ciclo e sem prejudicar o inseto, que, por sua vez, também se ajusta às variações sofridas (revisado por Melo et al., 2020).

Já para a obtenção e distribuição do oxigênio atmosférico entre seus tecidos, os insetos apresentam um eficiente sistema respiratório traqueal. Esse sistema é uma rede tubular, que se ramifica em todo o corpo do inseto em ramos progressivamente mais finos, de modo a fornecer oxigênio diretamente a todos os tecidos e órgãos (revisado por Centanin et al., 2010). Nos triatomíneos, entre os órgãos supridos com oxigênio por esse sistema, estão o intestino e o reto (Eichler, Schaub, 1997). Durante a alimentação com sangue, *R. prolixus* consome mais oxigênio atmosférico e aumenta a troca de gases (Leis et al., 2016).

Até o momento, a oxigenação do trato digestivo de triatomíneos ainda não foi quantificada. Porém, vários trabalhos mediram os níveis de oxigênio no intestino de insetos fitófagos e xilófagos. Em algumas espécies desses tipos de insetos, o oxigênio que é ingerido durante a alimentação é rapidamente depletado à medida em que o alimento atravessa o trato digestivo, propiciando, assim, que esse ambiente, inicialmente aeróbico, se torne anaeróbico (Tegtmeier et al., 2015). Fatores como o tamanho do inseto e de seus compartimentos intestinais, a dieta e sua microbiota podem interferir nos níveis de oxigênio intestinal (Brune, 1998; Johnson, Barbehenn, 2000; Ceja-Navarro et al., 2014).

No sangue, a maior parte do oxigênio está ligada à hemoglobina e uma pequena quantidade não ligada está dissolvida (revisado por Lumb, Horncastle, 2019). O oxigênio molecular participa das reações oxidativas no trato intestinal do vetor, tais como as promovidas pela Heme Oxigenase (HO; responsável pela degradação da molécula de heme), pelos citocromos P450 (detoxificação) e pelas NADPH oxidases (regulação redox da digestão do sangue) (Paiva-Silva et al., 2006; Dulbecco et al., 2022; Gandara et al., 2021). Incluem-se, também, as reações oxidativas das bactérias da microbiota (Carels et al., 2017; Salcedo-Porras et al., 2020).

As oscilações dos níveis de oxigênio intestinais mediadas por bactérias foram vistas em outros insetos hematófagos. No intestino de larvas de *Aedes aegypti*, a flutuação do oxigênio promovida pela bactéria *Escherichia coli* é capaz de induzir o crescimento e a muda desse mosquito. Essa sinalização é mediada pelos baixos níveis de oxigênio no trato digestivo desses insetos, provocados pelo

metabolismo aeróbico da *E. coli*. Interessantemente, foi observada que essa hipóxia é o evento sinalizador para o desenvolvimento dos mosquitos (Coon et al., 2017). A maioria dos membros da microbiota são de bactérias gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas facultativas (revisado Scolari et al., 2019). Então, devido ao metabolismo fermentativo, o pH alterado causa a morte de algumas bactérias e propicia, novamente, o aumento dos níveis de oxigênio no intestino. Essa flutuação na tensão de oxigênio, possivelmente, engatilha eventos de sinalização para induzir outros processos fundamentais em larvas de mosquito (Coon et al., 2017). Mas, é interessante que, apesar desses microrganismos atuarem como os “causadores” das flutuações de oxigênio, evidências experimentais em baratas demonstraram que a variação de 0 a 2% da tensão deste gás também impacta o crescimento e o consumo de nutrientes, assim como os produtos finais da fermentação gerados pelas bactérias de sua microbiota intestinal (Tegtmeier et al., 2016).

Os efeitos diretos da oxigenação sobre o protozoário *T. cruzi*, por enquanto, só foram abordados por estudos *in vitro* (Saraiva et al., 2022). Quando a hipóxia é imposta (1% de oxigênio molecular), a proliferação da forma epimastigota é favorecida enquanto sua diferenciação para a forma infectiva é impedida. A modulação desses processos antagônicos de proliferação/diferenciação tem a participação indispensável das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), que são produzidos nos parasitos quando existe o evento de reoxigenação após a adaptação à hipóxia. Além do perfil fenotípico, esse ambiente também causa uma adaptação energética nesse estágio replicativo de *T. cruzi*. Em função dos baixos níveis de oxigênio atmosférico, organelas que consomem o oxigênio são afetadas, como no caso da mitocôndria. Como a mitocôndria é a maior geradora de ATP nos organismos aeróbicos, a hipóxia impacta a sua fisiologia no parasito, mas também o adapta para um metabolismo energético baseado na fermentação, permitindo-o sobreviver e se proliferar intensamente em cultura (Saraiva et al., 2022).

A molécula de heme e o ambiente oxidativo no intestino do vetor

Como dito anteriormente, a maioria dos animais hematófagos ingere grandes quantidades de sangue em uma única alimentação. A hemoglobina (Hb), a proteína mais abundante no sangue de mamíferos, atinge concentrações de cerca de 150 mg/mL, e é responsável por cerca de 60% do teor de proteína no sangue. Por essa razão, a degradação da Hb no trato digestivo desses insetos leva à liberação de grandes quantidades de heme (Graça, Souza et al., 2006). O

heme catalisa vários processos de oxidação nos sistemas biológicos, e é muito importante nas funções celulares e na homeostase dos organismos (Swenson et al., 2020). É um grupamento prostético essencial de enzimas envolvidas no metabolismo energético, no transporte e no armazenamento de oxigênio, bem como no transporte de elétrons facilitado por citocromo e guanilil ciclase (revisto por Ponka et al., 2017). Além disso, a molécula de heme funciona como um agente intercelular e intracelular e na molécula de sinalização (Reddi, Hamza, 2016; Perner et al., 2021).

Contudo, o heme livre é uma molécula potencialmente tóxica, devido a sua capacidade de gerar ROS. Além disso, como uma molécula lipofílica pequena, ele pode, facilmente, intercalar e romper as bicamadas lipídicas das membranas celulares (Hamza, Dailey, 2012; Roumenina et al., 2016; Immenschuh et al., 2017; Ponka et al., 2017). A potencial toxicidade do heme representa um desafio importante para insetos hematófagos, incluindo os triatomíneos, de modo que múltiplos mecanismos de redução de danos estão ativos. Por exemplo, o heme pode ser enzimaticamente catabolizado por uma atividade única da HO, resultando na produção de monóxido de carbono, ferro e dicisteinil-biliverdina IX (RpBv), que confere coloração esverdeada ao coração e ao trato digestivo do inseto (Paiva-Silva et al., 2006; Caiaffa et al., 2010). O heme pode, ainda, se ligar a proteínas específicas, como a proteína de ligação ao heme de *Rhodnius* (RHBP) (Dansa-Petretski et al., 1995; Paiva-Silva et al., 2002). Foi observado que o comprometimento da eliminação do heme pelo silenciamento da RHBP causou peroxidação lipídica, reduzindo a função mitocondrial e o fornecimento de energia, com efeitos diretos na embriogênese, mas não na ovogênese desses triatomíneos (Walter-Nuno et al., 2013). Ainda assim, apesar da RHBP fortemente reduzir seus efeitos pró-oxidantes (Dansa-Petretski et al., 1995), o heme ainda é capaz de induzir a peroxidação lipídica, através de uma reação de Quasi-lipoxigenase dependente de cálcio (Paes et al., 2015). Complementando esses mecanismos de prevenção de toxicidade, os triatomíneos também contam com defesas antioxidantes, incluindo a catalase e o urato (Souza et al., 1997; Paes et al., 2001; Whiten et al., 2018).

Entretanto, pelo menos em parte, as espécies reativas produzidas após a alimentação com sangue parecem ter um papel regulatório sobre a digestão de *R. prolixus*. Recentemente, Gandara e colaboradores (2021) demonstraram que, tanto o íon superóxido produzido pela NADPH oxidase (NOX5) quanto o urato produzido pela xantina desidrogenase (XDH) participam da regulação redox da digestão de sangue em *R. prolixus*, de forma a modular o peristaltismo do triatomíneo. Resumidamente, uma vez que o sangue atinge o intestino médio

anterior, a NOX5 é ativada, formando superóxido, que estimula o peristaltismo e a expressão de XDH. O urato produzido pode estimular a ativação de NOX5 e funcionar como antioxidante, antes de ser excretado como subproduto final do metabolismo do nitrogênio (Gandara et al., 2021).

Uma outra estratégia importante do vetor da doença de Chagas para lidar com a toxicidade do heme é a formação de hemozoína (Hz). Cerca de 95% do heme oriundo da digestão é transformado em Hz, cristais marrons escuros semelhantes aos encontrados em *Plasmodium* (agente causador da malária), como uma forma de proteger os tecidos do vetor dos efeitos deletérios da digestão da hemoglobina (Stiebler et al., 2010). Nos triatomíneos, esses cristais de Hz são produzidos pela interação do heme livre com estruturas anfífilas, como os fosfolípídios da membrana perimicrovilar (Silva et al., 2007; Steibler et al., 2014). De maneira interessante, triatomíneos alimentados com sangue enriquecido com um análogo do heme e inibidor da HO, Sn-protoporfirina (SnPP-IX), apresentaram inibição de maneira dose-dependente não apenas da produção de RpBv (biliverdina de *Rhodnius prolixus*) mas também da síntese de hemozoína. Essa inibição ocasionou o aumento do dano oxidativo ao epitélio do intestino médio e a inibição da oviposição, indicando que a formação da hemozoína e a degradação do heme são mecanismos de proteção que atuam em conjunto, contribuindo para a adaptação do inseto à hematofagia (Caiaffa et al., 2010).

Todavia, se assumirmos que a concentração de heme sanguíneo é de cerca de 10 mM (Graça-Souza et al., 2006), um cálculo simples nos leva a concluir que os 5% de heme livre (não cristalizado em Hz) corresponde a cerca de 500 μ M de heme. Parte desse heme livre pode se ligar à RHBP na hemolinfa (Paiva-Silva et al., 2002) e a parte considerável permanece no intestino, o que pode implicar a exposição à sua potencial toxicidade durante a digestão de uma refeição de sangue sobre as células do intestino médio, a microbiota e os tripanossomatídeos.

Trypanosoma cruzi vive uma parte significativa de seu ciclo de vida na presença do sangue, seja no trato digestivo do inseto vetor, ou como formas livres na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. De forma similar ao que ocorre com os triatomíneos, os tripanossomatídeos também estão expostos aos efeitos metabólicos desencadeados pelo heme. Esses parasitos são incapazes de sintetizar heme, uma vez que a via completa de biossíntese está ausente (Lombardo et al., 2003; El-Sayed et al., 2005). De fato, Arévalo e colaboradores, em 1985, demonstraram que a adição de heme ao meio de cultura aumenta a proliferação de formas epimastigotas. Esse fenômeno foi corroborado mais tarde, com a demonstração que a forma epimastigota, quando mantida em cultura, aumenta sua proliferação de maneira dose-dependente à suplementação de

heme (mas não de hemoglobina ou de seus peptídeos). Além disso, o heme funciona como uma molécula sinalizadora, estimulando a via da cálcio calmodulina quinase II (CaMKII) (Lara et al., 2007; Souza et al., 2009). O heme também modula a atividade eIF2 *alpha kinase*, se ligando especificamente ao domínio catalítico da enzima, inibindo a sua atividade, o que promove a proliferação do parasita. Em contraste, na ausência de heme, a eIF2 *alpha kinase* é ativada, bloqueando o crescimento celular e induzindo a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (da Silva Augusto et al., 2015). Nesse sentido, é razoável supor que o aporte de heme pelo *T. cruzi* depende, estritamente, da sua captação do ambiente do vetor. Foram identificados transportadores do tipo ABC em epimastigotas (Cupello et al., 2011) e outro transportador presente na bolsa flagelar de amastigotas e de epimastigotas, chamada TcHTE (Merli et al., 2016). Uma vez, no ambiente intracelular, o heme pode compor as hemeproteínas do parasito (Merli et al., 2017). Devido à sua característica oxidante, a proliferação de epimastigotas, induzida por heme, também foi observada, acompanhada de um aumento da concentração de ROS ao longo do tempo (Nogueira et al., 2011).

Por outro lado, antioxidantes, como o urato ou a glutathiona reduzida (GSH), revertem a produção de ROS induzida pelo heme e, também, diminuem a proliferação das formas epimastigotas *in vitro* e no vetor, *R. prolixus* (Nogueira et al., 2015). Conseqüentemente, a produção de ROS parece ser o mecanismo pelo qual o heme promove a proliferação de epimastigotas. Todavia, o mesmo ROS que promove a proliferação de epimastigotas, pode ter efeitos deletérios sobre o parasita se não obedecer à sinalização redox (Jones, 2006) para o controle dessas espécies reativas (estresse oxidativo). Ferreira e colaboradores (2018) demonstraram que triatomíneos alimentados com sangue enriquecido com quinidina (QND), um agente antimalárico que impede a formação dos cristais de Hz, apresentaram estresse oxidativo em diferentes tecidos, além da redução da produção e da postura de ovos, devido a uma sobrecarga sistêmica de heme. O tratamento com QND também impactou a infecção dos insetos por *T. cruzi*, reduzindo significativamente a contagem total de parasitas e destacando o duplo papel da Hz, como mecanismo protetor para permitir a reprodução do inseto e a infecção pelo *T. cruzi* (Ferreira et al., 2018).

O heme também promove modificações na fisiologia mitocondrial de *T. cruzi*. Além disso, diminui seu consumo de oxigênio, aumentando a atividade de transferência de elétrons entre os complexos mitocondriais II e III e diminuindo a atividade da citocromo c oxidase (complexo IV). Portanto, o aumento de superóxido mitocondrial induzido por heme parece ser uma consequência da

hiperpolarização da membrana interna mitocondrial, no intuito de manter a proliferação e a sobrevivência das formas epimastigotas (Nogueira et al., 2017). As mudanças no perfil bioenergético mitocondrial, induzidas pelo heme, também se assemelham às diferenças observadas entre epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos. As formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* também exibem aumento da atividade dos complexos II-III e diminuição da atividade do complexo IV, o que favorece o vazamento mitocondrial de elétrons e o aumento das taxas de produção de H_2O_2 , potencialmente conferindo maior tolerância aos desafios redox em relação aos epimastigotas (Gonçalves et al., 2011). Mais recentemente, Paes e colaboradores, em 2020, caracterizaram o transcriptoma de formas epimastigotas desafiadas com heme, utilizando *Deep Sequencing*. Os autores demonstraram que os genes envolvidos no metabolismo de glicídios estavam entre os principais genes positivamente expressos, especialmente os referentes ao processo de fermentação aeróbica, correlacionando, assim, a proliferação e a sobrevivência dos epimastigotas, a plasticidade metabólica do parasito e o ambiente oxidante dentro do vetor, promovido pela molécula de heme (Paes et al., 2020).

Além das ROS, as espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*), principalmente o óxido nítrico (NO), são moléculas de resposta imune envolvidas no controle da infecção parasitária de invertebrados e de hospedeiros vertebrados (Ascenzi, Gradoni 2002; Radi, 2004). As RNS também são capazes de modular a proliferação de *T. cruzi*. Batista e colaboradores (2020), observaram que tratamentos orais e de injeção com L-arginina, um aminoácido que estimula a produção de NO via a heme proteína óxido nítrico sintase (NOS), diminuíram o número de *T. cruzi* no trato digestivo de *R. prolixus*. Já o tratamento com L-NAME, um inibidor clássico da NOS, levou a uma maior proliferação do *T. cruzi* no inseto vetor, mostrando que a resposta imune do vetor relacionada aos níveis de NO interfere no desenvolvimento de *T. cruzi* no intestino médio (Batista et al., 2020).

O sangue e a oferta de nutrientes para o inseto e o parasito

O sangue dos mamíferos é um alimento rico em nutrientes. Ele é constituído, principalmente, por proteínas, mas também oferta açúcares, lipídeos e minerais para os insetos hematófagos. Entre os açúcares do sangue, a glicose possui uma concentração aproximada de 5 mM. Conforme o sangue é digerido no tubo digestivo dos triatomíneos, a expressão de enzimas envolvidas com a digestão dos carboidratos aumenta mais de 10 vezes (Ribeiro et al., 2014). Entre elas, as

glicosidases, que possuem papel fisiológico na digestão de oligossacarídeos do sangue e também da parede celular de bactérias simbiotes. Diferente da digestão das proteínas e dos lipídeos, a degradação dos carboidratos pelas glicosidases começa no intestino anterior do vetor, e é aumentada após alimentação com sangue (Ribeiro, Pereira, 1984), liberando os monossacarídeos no lúmen do intestino. Durante a digestão, as proteínas envolvidas com o transporte e o metabolismo dos carboidratos é alterada no trato digestivo dos insetos alimentados (Ouali et al., 2020). Com o aumento da captação desses carboidratos e da glicose liberada, as células do epitélio intestinal obtêm energia, principalmente pelo metabolismo desses açúcares e também de lipídeos (Gumiel et al., 2020). Nesse sentido, o metabolismo do vetor, da microbiota intestinal, mais a infecção pelo *T. cruzi*, que chega junto com o sangue do mamífero, causam uma redução do açúcar no intestino desses triatomíneos. Estudos demonstraram que, de 5,7 mM de glicose do sangue, restaram, aproximadamente, 1 mM desse açúcar no intestino do *R. prolixus* algumas horas após a alimentação (De Lima et al., 2008). Mesmo com o grande consumo, os açúcares ainda são encontrados nas fezes do inseto triatomíneo, junto com os ácidos graxos, esteroides, glicerolipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (Antunes et al., 2013).

Trypanosoma cruzi encontra múltiplos ambientes, nos quais a disponibilidade de nutrientes varia desde a grande oferta de glicose no sangue do mamífero, até um ambiente escasso desse açúcar, como no caso do intestino do triatomíneo. Ao chegar no trato digestivo do vetor, as formas tripomastigotas se diferenciam para as formas epimastigotas e se adaptam metabolicamente às novas condições ambientais (Chagas, 1909; Tyler, Engman, 2001; Melo et al., 2020). Comparados aos tripomastigotas sanguíneos, as formas epimastigotas aumentam seu metabolismo respiratório (Gonçalves et al., 2011). Porém, essa forma replicativa segue programada metabolicamente para fermentar os açúcares de forma rápida, mesmo em condições aeróbicas (revisado por Maugeri et al., 2011). Ou seja, ao invés de oxidar completamente a glicose em dióxido de carbono e água pelo metabolismo mitocondrial, essa forma replicativa fermenta esse açúcar e produz compostos ainda reduzidos, principalmente succinato e alanina, que são secretados para o ambiente. Esse metabolismo peculiar é conhecido como fermentação aeróbica da glicose e acontece em outros organismos proliferativos ou adaptados ao ambiente anaeróbico (revisado por Maugeri et al., 2011; Muller et al., 2012). Interessantemente, o grupo prostético derivado da digestão da hemoglobina mostrou influenciar o parasito a obter energia por esse metabolismo fermentativo (Paes et al., 2020).

Organismos adaptados às condições anaeróbicas normalmente reduzem ou inibem a captação de glicose quando os níveis de oxigênio aumentam (efeito Pasteur). Ao contrário da maioria dos organismos, *T. cruzi* não sofre tal efeito. Na realidade, realiza um efeito Pasteur reverso, ou seja, aumenta o consumo de glicose, mesmo em um ambiente com oxigênio (Cazzulo et al., 1988; 1992). Foi demonstrado, por calorimetria, que a atividade glicolítica de *T. cruzi* não é alterada pela regulação dos níveis de oxigênio, mesmo sob anoxia (0% de oxigênio molecular) (Cazzulo et al., 1988; Lerchner et al., 2019). Apesar dessa adaptação glicolítica, esses parasitos são bastante flexíveis metabolicamente. Com a flutuação dos nutrientes no intestino do vetor e em vias respiratórias funcionais, os parasitos conseguem oxidar aerobicamente outras fontes de carbono, quando isso é necessário para sobreviver.

Experimentos *in vitro* demonstram que, quando a glicose está presente em altas concentrações, formas epimastigotas continuam a se proliferar em fase exponencial, com alto consumo da glicose extracelular. Conforme esse açúcar é exaurido do meio, esse estágio replicativo entra em fase estacionária e dá preferência ao consumo de aminoácidos (Barisón et al., 2017). Nesse momento, ao entrar no estágio estacionário, os parasitos se preparam para a metacicloquênese (Hernández et al., 2012). Sendo assim, a atividade das enzimas chaves da glicólise no parasito diminui, ao mesmo tempo que a atividade das enzimas do ciclo de Krebs aumenta durante a diferenciação (Adroher et al., 1988; 1990). Reforçando esses achados, uma análise transcriptômica mostrou que uma das vias metabólicas mais afetadas é o metabolismo energético da glicose. Genes envolvidos com a glicólise e o metabolismo do piruvato são regulados negativamente na forma infectiva, quando comparados aos outros estágios (Cruz-Saavedra et al., 2020a; 2020b).

Além dos carboidratos, as proteínas e aminoácidos presentes no trato intestinal dos insetos hematófagos são nutrientes muito importantes. Sabe-se que as proteínas correspondem a cerca de 90% do peso seco do sangue de vertebrados, sendo a hemoglobina a mais abundante (Sterkel et al., 2017). A digestão desses componentes pela ação das proteases libera peptídeos, aminoácidos, e a molécula de heme, presente na hemoglobina. Entende-se, diante de tanta abundância proteica, que haja alguma toxicidade, caso nenhum mecanismo de controle dos níveis de aminoácidos ocorra.

Em 2014, Ribeiro e colaboradores analisaram os transcritos do trato digestivo de *R. prolixus*. Bastante curioso é que, dos 28 transcritos relacionados ao metabolismo de aminoácidos, 21 relacionados às vias de degradação de aminoácidos, como o triptofano, a fenilalanina e a tirosina, foram significativamente mais

expressos (Ribeiro et al., 2014). Em 2016, Sterkel e colaboradores silenciaram dois genes da via de degradação de fenilalanina/tirosina (tirosina aminotransferase e 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) de *R. prolixus*, e observaram a morte dos insetos após sua alimentação com sangue (Sterkel et al., 2016). Esses dados demonstram a capacidade do hematófago em contornar e equilibrar o repertório de aminoácidos encontrados no seu intestino.

O desafio imposto pelos componentes do sangue no intestino do inseto não está restrito apenas ao vetor. Sendo esse mesmo ambiente o *habitat* de *T. cruzi*, o parasita também lida com várias dessas moléculas de forma satisfatória, interagindo da melhor maneira com o hospedeiro invertebrado e garantindo o seu ciclo de vida. Ainda não se sabe, exatamente, o quanto de glicose está disponível no intestino do vetor ao longo da digestão. Entretanto, se tem ciência de que, nos parasitos, os aminoácidos têm papel relevante no que tange à sobrevivência e à resistência a variadas formas de estresse (nutricional, redox, osmótico e térmico) (Cazzulo et al., 1985, Silber et al., 2005 e Silva Paes et al., 2011).

Uma via importante, por exemplo, é Pro-Glu (Prolina – Glutamato). Glu, posteriormente, pode se tornar α -cetogluturato e, então, participar do ciclo de Krebs. Uma importante enzima dessa via, já bem caracterizada em *T. cruzi*, é a TcPRODH (prolina desidrogenase de *T. cruzi*), cuja reação fornece elétrons para a cadeia respiratória do protozoário, através da redução do FAD^+ (Paes et al., 2015). O balanço de α -cetogluturato e Glu é importante para equilibrar o ciclo de Krebs e a destoxificação de NH_4^+ produzido pelo metabolismo de aminoácidos, uma vez que *T. cruzi* não possui o ciclo da ureia funcional. Então, essa regeneração acontece por uma reação de transaminação com α -cetogluturato, na qual o piruvato é o principal acceptor do grupo amino, produzindo Ala (Alanina) (Zelada et al., 1996). A prolina é um dos aminoácidos mais bem estudados em *T. cruzi*, que contribuem no balanço redox (Paes et al., 2013) e no metabolismo energético para as formas epimastigotas. Trabalhos atuais com superexpressão de TcPRODH demonstram que a prolina é um importante fator de interação entre o vetor e o parasito (Mantilla et al., 2021).

A histidina (His) é o aminoácido livre predominante nas fezes dos triatomíneos (Antunes et al., 2013). Curiosamente, esse aminoácido não é sintetizado por *T. cruzi*, que faz sua captação através de transporte (Barrisón et al., 2016). Ela também pode ser convertida a Glu e, posteriormente, a α -cetogluturato, seguindo o ciclo de Krebs (Revisto por Marchese et al., 2018). A His é, também, fonte de energia e de carbono, durante o ciclo de *T. cruzi* no intestino do vetor (Barrisón et al., 2016).

A diferenciação de *T. cruzi* de epimastigota para tripomastigota metacíclico ocorre sob estresse nutricional. Uma hipótese é que a forma proliferativa seja

abastecida pelos nutrientes do intestino do inseto e que, na sua escassez, ocorra a diferenciação, favorecendo a infecção do hospedeiro vertebrado pelas formas não proliferativas e infectivas, os tripomastigotas metacíclicos (Contreras et al., 1985). Dessa forma, são os aminoácidos os principais responsáveis pela metaciclogênese e pela manutenção dos parasitos metacíclicos (Contreras et al., 1985 e Kassner et al., 1990).

Os lipídeos compreendem um grupo variado de moléculas, com estruturas diversas. Além disso, possuem múltiplas funções metabólicas e celulares, como a arquitetura de diferentes membranas das células, fonte de energia, estando também envolvidos em inúmeras vias de sinalização celular (Wymann, Schneider, 2008; Nakamura et al., 2014; Harayama, Riezman, 2018). Nos triatomíneos, os lipídeos são digeridos no lúmen do intestino médio e, então, absorvidos e metabolizados pelo epitélio intestinal. Posteriormente, os lipídeos são transportados na hemolinfa pela lipoforina (o principal transportador lipídico na hemolinfa de insetos) para serem armazenados no corpo gorduroso e nos oócitos durante a ovogênese (Ward et al., 1982, Grillo et al., 2007, Majerowicz, Gondim, 2013). Os lipídeos podem, também, ser sintetizados *de novo*, a partir de outros substratos, como os carboidratos e os aminoácidos e, então, absorvidos pelo epitélio do intestino médio (Gondim et al., 2018). Os ácidos graxos e os monoacilgliceróis (MG) derivados da dieta podem ser usados para a síntese de classes lipídicas mais complexas, como os triacilglicerós (TG), os diacilgliceróis (DG) e os fosfolipídeos (PL).

Após a síntese das diferentes classes de lipídeos, a lipoforina, então, distribui essas moléculas para os tecidos (Gondim et al., 2018; Toprak et al., 2020). Os lipídeos também são fonte de energia durante o voo de triatomíneos. A presença de gotículas lipídicas no músculo de voo foi relatada nos vetores da doença de Chagas, incluindo *T. infestans* e *R. prolixus* (Ward et al., 1982; Kaczmarek, Boguś, 2021). Ainda, pesquisas mostraram que, durante o voo de *R. prolixus* e *P. megistus*, ocorre a diminuição dos lipídeos musculares e do conteúdo lipídico do corpo gorduroso, além do aumento dos níveis de lipídeos na hemolinfa (Ward et al., 1982; Canavoso et al., 2004). Essas alterações no teor de lipídeos na hemolinfa parecem estar relacionadas à partícula de lipoforina de baixa densidade (LDLp) (Canavoso et al., 2004). De fato, uma análise de transcritos relacionados ao metabolismo lipídico de *R. prolixus* indicou que os lipídeos desempenham múltiplos papéis, sendo uma importante fonte de energia, substrato para a formação da membrana perimicrovilar e uma possível fonte de hidrocarbonetos para produzir a camada de cera do intestino posterior do barbeiro (Ribeiro et al., 2014).

O ambiente intestinal desses triatomíneos hematófagos e seus componentes obtidos da alimentação sanguínea contribuem com a oferta de lipídeos não só para os insetos, mas também para os parasitos. Diferentemente de seus vetores, *T. cruzi* não pode sintetizar alguns lipídeos, tornando-se dependente da captação das moléculas presentes em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (Ramakrishnan et al., 2013; Booth et al., 2020). É bem conhecido e descrito que *T. cruzi* tem um metabolismo flexível capaz de alternar o consumo de carboidratos (principalmente glicose) e aminoácidos, de forma a sustentar a proliferação e diferenciação do parasito (Cazzulo 1992; Barison et al., 2017; Aquino et al., 2021). Inicialmente, foi proposto que os ácidos graxos poderiam funcionar como sinais externos para induzir a metaciclologênese (Wainszelbaum et al., 2003). Contudo, os ácidos graxos parecem ser importantes fontes de carbono para o *T. cruzi* na ausência de glicose. Resumidamente, ácidos graxos absorvidos pelos epimastigotas, durante o estresse nutricional, levariam à formação de acetil-CoA e cofatores reduzidos, conseqüentemente, aumentando a síntese de ATP nessas células. Dessa forma, os ácidos graxos poderiam sustentar, energeticamente, a metaciclologênese (Souza et al., 2021).

O metabolismo de lipídeos vem sendo mais bem estudado nas formas do parasito que estão dentro do hospedeiro vertebrado. Fosfatidilcolina (PC) é o fosfolipídeo mais abundante nas membranas de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (Gazos-Lopes et al., 2017). Assim como as várias vias de biossíntese de lipídeos que existem em outros tripanossomatídeos, eles também são capazes de captar lipídeos e precursores lipídicos do hospedeiro mamífero ou da refeição sanguínea no inseto (Sukhareva-Buell, 2012; Aquino et al., 2021). Esses parasitos requerem quantidades substanciais de ácidos graxos, por exemplo, para construir as âncoras lipídicas das proteínas glicosiladas presentes na superfície da célula do parasito, como exemplo é o caso do miristoil e do palmitoil, que são sintetizados intracelularmente e esterificados em glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stillwell, 2016; Borges et al., 2021).

Além disso, *T. cruzi* não possui a capacidade de sintetizar colesterol e, como a maioria dos parasitos (revisado por Biagiotti et al., 2017), desenvolveu formas eficientes de captar e armazenar esse esteroide do hospedeiro (Pereira et al., 2011). Os epimastigotas de *T. cruzi* acumulam lipídeos exógenos nos reservossomos, o último compartimento da sua via endocítica (Pereira et al., 2011). O principal conteúdo dessas organelas únicas são lipídeos neutros, principalmente o colesterol e os ésteres de colesterol. Esses lipídeos neutros armazenados podem ser mobilizados para atender as demandas celulares, enquanto o colesterol é redistribuído para a membrana plasmática dos parasitos (Pereira et al., 2015).

A microbiota

À luz de crescentes tecnologias, várias abordagens vêm sendo ventiladas para interromper a transmissão vetorial de um agente patogênico, entre elas a modificação genética de organismos simbiotes da microbiota intestinal dos vetores (paratransgênese) (revisado por Ratcliffe et al., 2022). Para isso, faz-se necessária a identificação da comunidade microbiana que habita os triatomíneos. O trato digestivo é um órgão naturalmente repleto de microrganismos e pode estabelecer níveis distintos de interação do parasito com o hospedeiro invertebrado. A microbiota intestinal de insetos naturalmente é constituída por bactérias, vírus, fungos e protozoários, inclusive em insetos hematófagos (Marchesi, Ravel, 2015; Eberhard et al., 2022).

O microbioma cumpre vários papéis fundamentais para a fisiologia e o desenvolvimento de insetos vetores. Ele participa da nutrição, fornecendo nutrientes essenciais, auxilia na digestão dos alimentos, no suporte da resposta imunológica, na degradação de compostos xenobióticos, na manipulação do comportamento e, também, na competência vetorial do inseto hospedeiro. Esse último parâmetro representa a capacidade do inseto vetor adquirir, manter e transmitir os organismos patogênicos ao hospedeiro humano. O controle dessa característica pela microbiota acontece pela modulação da resposta imune do inseto, pela competição direta ou indireta pelos recursos e nutrientes presentes no intestino, ou também, pela geração de moléculas antiparasitárias (Dillon, Dillon, 2004; Azambuja et al., 2005; Garcia et al., 2010; Guarneri et al., 2021).

São vários os aspectos a serem analisados nessa convivência entre as bactérias e os insetos: a composição da comunidade bacteriana, que se difere entre as mais de 150 espécies de triatomíneos; se os insetos foram criados em laboratório ou coletados de ambiente selvagem; se estão infectados ou não por um agente patogênico; de qual região geográfica; o tipo de dieta; se estão alimentados ou em jejum; seu estágio de vida; entre outros. Em comparação com outros insetos, a maioria dos triatomíneos possui uma baixa diversidade em gêneros de bactérias. Neles, podem ser encontradas bactérias gram-negativas do filo Proteobacteria (dos gêneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Arsenophonus*, *Pseudomonas* e *Wolbachia*) e gram-positivas do filo Actinobacteria (dos gêneros *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Corynebacterium* e *Mycobacterium*). Outros filios de bactérias podem estar hospedados nesses insetos (revisado por Ratcliffe et al., 2022). Porém, essa composição bacteriana pode mudar entre as porções intestinais do *R. prolixus* após os dias de alimentação (Eberhard et al., 2022). Graças à coprofagia e ao

canibalismo praticado pelos triatomíneos, esses microrganismos são disseminados nas colônias desses insetos, compondo a diversidade da microbiota no seu trato digestivo (Schaub, 1988; 1989).

Como mencionado anteriormente, o intestino do inseto hematófago, além de receber o parasito responsável pela doença de Chagas, também abriga vários outros microrganismos, sendo necessário entender as relações entre eles. Ao longo do trato digestivo, o parasito sofre processos de diferenciação e multiplicação e interage com as diferentes bactérias da microbiota. Dois dias após o repasto sanguíneo, o número de bactérias no intestino do *R. prolixus* aumenta mais de 10.000 vezes em quantidade. Essa comunidade bacteriana provoca uma rápida lise dos parasitos da cepa Y de *T. cruzi*, causando uma redução da população parasitária no intestino do vetor (Azambuja et al., 2004). Nesse mesmo ambiente, já foi demonstrado que 80% dos parasitos ingeridos morrem após 24 horas de alimentação pelo *R. prolixus* (Ferreira et al., 2016).

Interessantemente, a cepa Y do *T. cruzi* tem dificuldade em infectar os triatomíneos. Segundo estudos, isso se deve à presença de *Serratia marcescens*, uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae naturalmente encontrada em grandes quantidades no trato digestivo de *Rhodnius*, *Panstrongylus* e de *Triatoma* (Da Mota et al., 2012; Gumiel et al., 2015). As cepas de *S. marcescens* com atividade tripanolítica produzem prodigiosina, um pigmento gerado como metabólito secundário (Azambuja et al., 2004). Esse pigmento inibe o crescimento de diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas do triatomíneo, promove uma perda da integridade das membranas e faz alterações morfológicas severas nos epimastigotas de *T. cruzi* (Genes et al., 2011; Herráez et al., 2021). Além da prodigiosina, o mecanismo de morte também pode acontecer pela ligação direta da bactéria ao *T. cruzi*. *Serratia marcescens* rapidamente adere à superfície do protozoário por longas estruturas filamentosas, identificadas como biofilme, gerando aglomerados bacterianos que causam a completa lise de *T. cruzi* (Castro et al., 2007). A citotoxicidade de *S. marcescens* contra *T. cruzi* também foi confirmada quando a microbiota bacteriana foi reduzida com antibióticos, permitindo um maior crescimento do parasito no vetor (Castro et al., 2012).

Ao contrário da cepa Y, a cepa Dm28c resiste à comunidade bacteriana presente no intestino e completa seu ciclo de vida com sucesso em *R. prolixus* (Azambuja et al., 2004). Para prevalecer, Dm28c desencadeia um aumento da atividade antibacteriana e da resposta imune do inseto, causando a redução da população bacteriana em geral e, também, da sua diversidade no intestino (Eberhard et al., 2022). Interessantemente, Dm28c causa um aumento

significativo na atividade antibacteriana do inseto contra a *S. marcescens*, resultando na sua redução no intestino de *R. prolixus* (Vieira et al., 2016). Contribuindo ainda mais para a diminuição das bactérias no intestino, Dm28c estimula a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais do intestino do vetor (Buarque et al., 2016). Esses peptídeos são um tipo de moléculas efectoras da imunidade humoral dos insetos, que são rapidamente produzidas após a invasão de um organismo estranho. Essa atividade antimicrobiana induzida pelo parasito diminui a competição entre ele e as bactérias, permitindo seu estabelecimento no inseto vetor (Castro et al., 2012; Vieira et al., 2016; Carmona-Peña et al., 2021).

Apesar da relevância médica do estudo da microbiota dos triatomíneos, o viroma desses insetos ainda é bastante negligenciado e pouco explorado (revisado por Cardoso et al., 2022). O primeiro vírus identificado em triatomíneos foi o Triatoma vírus (TrV), que se apresentou como pequenas partículas não-envelopadas com genoma de RNA de fita única positiva, semelhantes ao vírus VLP (do inglês, *viral-like particles*). Esse vírus é disseminado entre as colônias de triatomíneos por coprofagia, junto aos outros microrganismos, infectando e se replicando nas células epiteliais do intestino e causando uma alta taxa de morte dos insetos infectados (Muscio et al., 1987; 1998). A infecção pelo TrV parece ser restrita e específica aos triatomíneos. O vírus já foi detectado em várias espécies desses hematófagos nos insetários do Brasil e da Argentina e, também, em sete espécies selvagens da Argentina (Marti et al., 2015; Susevich et al., 2012). Porém, é incapaz de infectar mosquitos *Aedes spp.*, por exemplo (Marti et al., 2020). Apesar da alta mortalidade em insetos de laboratório, algumas espécies de triatomíneos carregam, naturalmente, o TrV e suportam a infecção viral (Marti et al., 2009; 2013).

Várias sequências de genomas virais nos triatomíneos foram descobertas, graças ao aprimoramento dos métodos moleculares. Por reanálise do transcriptoma de ovários de *R. prolixus*, foi identificado que esse inseto abriga um complexo viroma. Desses dados, sete novos vírus de genoma de fita única positiva de RNA foram caracterizados e chamados de *Rhodnius prolixus* vírus 1-7 (RpV1-7). Esses vírus pertencem às famílias *Flaviridae* (RpV1 e RpV2), *Permutotetraviridae* (RpV3, RpV4 e RpV7) e *Solemoviridae* (RpV5 e RpV6) (Brito et al., 2021; revisado por Cardoso et al., 2022). Na população de insetos do estudo, os RpV estabeleceram infecções persistentes e, possivelmente, foram propagadas, em parte, pela transmissão vertical. Porém, outras rotas de disseminação, como coprofagia, são viáveis, já que um dos vírus (RpV1) é detectado também no trato digestivo do triatomíneo e em outros órgãos (Brito et

al., 2021). Portanto, existe uma diversidade viral considerável, ainda desconhecida nos insetos vetores de tripanossomatídeos, cujo estudo pode contribuir para nossa compreensão da interação desses protozoários e seus hospedeiros.

Já foram encontrados VLP em vários tripanossomatídeos, entre eles, em espécies dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Phytomonas* (Grybchuk et al., 2018a). A aplicação dos métodos moleculares na pesquisa das viroses de tripanossomatídeos começou com estudos pioneiros em *Leishmania spp.*, nos quais foram identificados que *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* carregam o vírus de RNA de *Leishmania* (LRV, do inglês *Leishmania RNA Virus*) (Guilbride et al., 1992; Grybchuk et al., 2018b). Junto ao gênero *Trypanosoma*, o protozoário *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae. Esse protozoário é transmitido aos humanos pela picada de flebotomíneos (*Phlebotomus sp.* e *Lutzomyia sp.*) e causa as Leishmanioses. Os LRV já foram detectados em pacientes e sua infecção na *Leishmania* pode gerar um agravamento e uma severidade da Leishmaniose, uma resistência ao tratamento convencional e, também, uma modulação na resposta imune do hospedeiro (Grybchuk et al., 2018b; Cantanhêde et al., 2021).

Assim como estudos da interação entre vírus e triatomíneos são escassos (Cardoso et al., 2022), existem, ainda, menos trabalhos que investigaram a interação de vírus com *T. cruzi*. Foi pelo uso de microscopia eletrônica que foi observado, pela primeira vez, que os vírus podem infectar o *T. cruzi*. No citosol, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático do parasito foram identificados dois tipos de VLP. A maior delas era envelopada e a outra VLP era do tipo não-envelopada (Fernández-Presas et al., 2017). Outro trabalho que analisou a interação vetor-vírus-*T. cruzi* demonstrou que a infecção prévia de *T. infestans* com o TrV favorece a infecção pelo parasito no vetor. Por outro lado, o contrário não acontece. A prévia presença de *T. cruzi* impacta a infecção pelo TrV no inseto, mas ambos coinfetam o mesmo hospedeiro (Marti et al., 2017). Corroborando esses dados, quando *R. neglectus* foi alimentado com sangue infectado, houve uma redução da infecção pelo TrV no intestino do triatomíneo, resultando em uma menor quantidade de transcritos do vírus (Carvalho-Costa et al., 2021). Complementando todos esses dados, mais recentemente, pela análise do microbioma, foi visto que o *T. cruzi* reduz, de forma geral, as viroses em diferentes compartimentos intestinais de *R. prolixus* após a alimentação sanguínea (Ebheard et al., 2022).

Considerações finais

Nesse capítulo, apresentamos parte dos dados da literatura que demonstram a intrínseca e intrigante interação entre o agente etiológico da doença de Chagas e seus insetos vetores. O agente patogênico, o protozoário *T. cruzi*, vive parte do seu ciclo de vida no triatomíneo, se proliferando e se desenvolvendo para prosseguir com seu ciclo biológico. Hospedado no lúmen do intestino, o *T. cruzi* é exposto a vários fatores físico-químicos e moleculares resultantes da nutrição e digestão do inseto, bem como a microrganismos co-habitantes desse ambiente. Porém, nesse ecossistema, desafios também são impostos ao próprio vetor, especialmente pela hematofagia. Aqui, apresentamos uma visão das inter-relações entre o vetor e os microrganismos que habitam seu intestino, órgão principal para o ciclo do parasito. Estudar todos esses fatores e essas relações nos levarão ao entendimento de como eles influenciam e são fundamentais para a expansão do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados e para a consequente transmissão do parasito. Compreender a biologia da interação parasito–vetor, no contexto dos desafios físico-químicos e de suas inter-relações, é essencial para fornecer informações, de modo a identificar alvos e novas estratégias terapêuticas para erradicar a doença de Chagas. Tal doença repercute tão cruelmente na vida dos portadores, por ser uma enfermidade estigmatizada, negligenciada debilitante e de difícil tratamento.

Referências

- Adroher FJ, Osuna A, Lupiañez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-Isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase. Archives of Biochemistry and Biophysics, n. 267, 252-261, 1988.
- Adroher FJ, Osuna A, Lupiañez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II: Hexokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. Molecular and Cellular Biochemistry, n. 94, 71-82, 1990.
- Antunes LC, Han J, Pan J, Moreira CJ, Azambuja P, Borchers CH and Carels N. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. PLoS One, n. 8, e77283, 2013.
- Arévalo J, Panebra A, Santa Cruz C. Relevance of hemin for in vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool, n. 32, 553-5, 1985.
- Ascenzi P. and Gradoni L. Nitric oxide limits parasite development in vectors and in invertebrate intermediate hosts. IUBMB Life, n. 53, 121-123, 2002.
- Aquino GP, Gomes MAM, Salinas RK, Laranjeira-Silva MF. Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids. Microb Cell, n. 8, 262-275, 2021.
- 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, n. 107, 89-96, 2004.
- Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, n. 77, 397-404, 2005.
- Batista KKS, Vieira CS, Florentino EB, Caruso KFB, Teixeira PTP, Moraes CS, Genta FA, Azambuja P, Castro DP. Nitric oxide effects on *Rhodnius prolixus*'s immune responses, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* development. J Insect Physiol, n. 126, 104100, 2020.
- Barisón MJ, Damasceno FS, Mantilla BS, Silber AM. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. Biomembr, n. 48, 437-449, 2016.
- Barison MJ, Rapado LN, Merino EF, Furusho Pral EM, Mantilla BS, Marchese Let al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J Biol Chem, n. 292, 8964-8977, 2017.
- Biagiotti M, Dominguez S, Yamout N, Zufferey R. Lipidomics and anti-trypanosomatid chemotherapy Clin. Transl. Med, n. 6, 27, 2017.

- Bizai ML, Romina P, Antonela S, Oliveira LV, Arias EE, Josefina DC, et al. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. *Infect Genet Evol*, n. 78, 104–128, 2020.
- Booth, LA, Smith, TK. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Mol. Biochem. Parasitol*, n. 240, 111324, 2020.
- Borges AR, Link F, Engstler M, Jones NG. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Linchpin for Cell Surface Versatility of Trypanosomatids *Front Cell Dev Biol*, n. 1, 720536, 2021.
- Brito TF, Coelho VL, Cardoso MA, Brito IAA, Berni MA, Zenk FL, Iovino N, Pane A. Transovarial transmission of a core virome in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Pathog*, n. 18 1009780, 2021.
- Buarque, D.S., Gomes, C.M., Araujo, R.N., Pereira, M.H., Ferreira, R.C., Guarneri, A.A., Tanaka, A.S. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. *Biochimie*, n. 123, 138–143, 2016.
- Brune A. Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnol*, n. 16, 16–21, 1998.
- Caiaffa CD, Stiebler R, Oliveira MF, Lara FA, Paiva-Silva GO, Oliveira PL. Sn-protoporphyrin inhibits both heme degradation and hemozoin formation in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, n. 40, 855-60, 2010.
- Canavoso LE, Frede S, Rubiolo ER. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect. Biochemistry and Molecular Biology*, n. 34, 845-854, 2004.
- Cardoso MA, Brito TF, Brito IAdA, Berni MA, Coelho VL and Pane A. The Neglected Virome of *Triatomine Insects*. *Front. Trop. Dis*, n. 3, 828712, 2022.
- Carels N, Gumiel M, da Mota FF, de Carvalho Moreira CJ, Azambuja P. A. Metagenomic Analysis of Bacterial Microbiota in the Digestive Tract of Triatomines. *Bioinform Biol Insights*, n. 11, 1177932217733422, 2017.
- Carmona-Peña SP, Contreras-Garduño J, Castro DP, Manjarrez J, Vázquez-Chagoyán JC. The innate immune response of triatomines against *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* with an unresolved question: Do triatomines have immune memory? *Acta Trop*, n. 224, 106108, 2021.
- Carvalho-Costa TM, Tiveron RDR, Mendes MT, Barbosa CG, Nevoa JC, Roza GA, Silva MV, Figueiredo HCP, Rodrigues V, Soares SC, Oliveira CJF. Salivary and Intestinal Transcriptomes Reveal Differential Gene Expression in Starving, Fed and *Trypanosoma cruzi*-Infected *Rhodnius neglectus*. *Front Cell Infect Microbiol*, n. 17, 773357, 2021.
- Carrasco HJ, NessiAJ, Londono JC, Rodriguez AE, Moleiro F, Mendoza I. Molecular epidemiology of Chagas disease in Venezuela. *SOJ Microbiol Infect Dis*, n. 1, 6, 2013.

Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, de Souza W, Azambuja P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol*, n. 117, 201-7, 2007.

Castro, D.P., Morales, C.S., Gonz'alez, M.S., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P., Garcia, E.S. *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *PLoS ONE*, n. 7, e36591, 2012.

Cantanhêde LM, Mata-Somarribas C, Chourabi K, Pereira da Silva G, Dias das Chagas B, de Oliveira R Pereira L, Côrtes Boité M, Cupolillo E. The Maze Pathway of Coevolution: A Critical Review over the *Leishmania* and Its Endosymbiotic History. *Genes (Basel)*, n. 12, 657, 2021.

Cazzulo JJ. Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*, n. 18, 235–257, 1992.

Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, n. 16, 329–343, 1985.

Cazzulo JJ, Arauzo S, Franke de Cazzulo BM e Cannata JJB. On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FEMS Microbiol. Lett*, n. 51, 187-192, 1988.

Ceja-Navarro JA, Nguyen NH, Karaoz U, Gross SR, Herman DJ, Andersen GL, Bruns TD, Pett-Ridge J, Blackwell M, Brodie EL. Compartmentalized microbial composition, oxygen gradients and nitrogen fixation in the gut of *Odontotaenius disjunctus*. *ISME J*, n. 8, 6-18, 2014.

Centanin L, Gorr TA, Wappner P. Tracheal remodelling in response to hypoxia. *J Insect Physiol*, n. 56, 447-54, 2010.

Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, n. 1, 159–218, 1909.

Contreras VT; Salles JM; Thomas N; Morel CM; Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol*, n. 16, 315–327, 1985.

Coon KL, Valzania L, McKinney DA, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Bacteria-mediated hypoxia functions as a signal for mosquito development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, n. 114, E5362-E5369, 2017.

Cupello MP, de Souza CF, Buchensky C, Soares JBRC, Laranja GAT, Coelho MGP. et al. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Trop*, n. 120, 211–218, 2011.

Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, et al. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*, n. 139, 516–521, 2012.

Cruz-Saavedra L, Vallejo GA, Guhl F, Messenger LA, Ramírez JD. Transcriptional remodeling during metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi* I. *Virulence*, n. 11, 969-980, 2020.

Cruz-Saavedra L, Vallejo GA, Guhl F, Ramírez JD. Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. *PeerJ*, n. 8, e8947, 2020.

Dansa-Petretski M, Ribeiro JM, Atella GC, et al. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem*, n. 270, 10893–96, 1995.

da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJ, 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*, n. 6, e1631, 2012.

da Silva Augusto L, Moretti NS, Ramos TC, de Jesus TC, Zhang M, Castilho BA, Schenkman S. A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, n. 6, e1004618, 2015.

De Lima AR, Navarro MC, Arteaga RY, Contreras VT. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol*, n. 119, 336-42, 2008.

De Souza W e Vidal J. 2017. <http://chagas.fiocruz.br/parasita/taxonomia/delPuerto> R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Lihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*, n. 4, e687, 2010.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 2003.

Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: non pathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*, n. 49, 71-92, 2004.

Dulbecco AB, Calderón-Fernández GM, Pedrini N. Cytochrome P450 Genes of the CYP4 Clan and Pyrethroid Resistance in Chagas Disease Vectors. *Front Trop Dis*, n. 3, 2673-7515, 2022.

Eberhard FE, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ. Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Microbiome*, n. 10;10, 45, 2022.

Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*, 44, 131-140, 1997.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN e cols. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, n. 309, 409–415, 2005.

Fernández-Presas AM, Padilla-Noriega L, Becker I, Robert L, Jiménez JA, Solano S, Delgado J, Tato P, Molinari JL. Enveloped and non-enveloped viral-like particles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, n. 59, e46, 2017.

Ferreira CM, Stiebler R, Saraiva FM, Lechuga GC, Walter-Nuno AB, Bourguignon SC, et al. Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow insect reproduction and parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis*, n. 12, e0006661.

Ferreira, RC, Kessler, RL, Lorenzo, MG, Paim, RMM, Ferreira, LL, Probst, CM, et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*, n. 143, 434–443, 2016.

Friend WG, Choy CT and Cartwright E. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera: Reduviidae). *Can. J. Zool*, n. 43, 891–904, 1965.

Gandara ACP, Dias FA, de Lemos PC, Stiebler R, Bombaça ACS, Menna-Barreto R and Oliveira PL. Urate and NOX5 Control Blood Digestion in the Hematophagous Insect *Rhodnius prolixus*. *Front. Physiol*, n. 12, 633093, 2021.

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

Gazos-lopés F, Martin JL, Dumoulin PC, Burleigh BA. Host triacylglycerols shape the lipidome of intracellular trypanosomes and modulate their growth. *PLoS Pathog*, n. 13, 12-34, 2017.

Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya JD, Triana O. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasit Vectors*, n. 4, 66-74, 2011.

Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity*, n. 108, 190-202, 2012.

Gondim KC, Atella GC, Pontes EG, Majerowicz D. Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochem. Mol. Biol*, n. 101, 108–123, 2018.

Gonçalves RL et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr*, n. 43, 651-661, 2011.

Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C. , Paiva-Silva GO , Braz GRC , Paes MC , Sorgine MHF Oliveira MF , Oliveira PL. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*, n. 36, 322-35, 2006.

- Grillo LAM, Majerowicz D, Gondim KC. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, n. 37, 579-588, 2007.
- Grybchuk D, Kostygov AY, Macedo DH, d'Avila-Levy CM, Yurchenko V. RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, n. 113, e170487, 2018a.
- Grybchuk D, Akopyants NS, Kostygov AY, Konovalovas A, Lye LF, Dobson DE, Zangger H, Fasel N, Butenko A, Frolov AO, Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Kulich P, Moravcová J, Plevka P, Rogozin IB, Serva S, Lukeš J, Beverley SM, Yurchenko V. Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, n. 16, E506-E515, 2018b.
- Guarneri AA, e Lorenzo MG. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *J. Insect Physiol*, n. 97, 66–76, 2017.
- Guarneri AA, Schaub GA. Interaction of triatomines, trypanosomes and microbiota. In: Guarneri AA, Lorenzo MG, editors. *Triatominae—the biology of Chagas disease vectors*. New York: Springer Nature, 345–386, 2021.
- Guhl F. Geographical distribution of Chagas disease. *Am. Trypanosom. Chagas Dis*, 89-112, 2017.
- Guilbride L, Myler PJ, Stuart K. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, n. 54, 101-4, 1992.
- Gumiel M, de Mattos DP, Vieira CS, Moraes CS, Moreira CJC, Gonzalez MS, Teixeira-Ferreira A, Waghabi M, Azambuja P, Carels N. Proteome of the Triatomine Digestive Tract: From Catalytic to Immune Pathways; Focusing on Annexin Expression. *Front Mol Biosci*, n. 7, 589435, 2020.
- Gumiel M, da Mota FF, Rizzo Vde S, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM, Garcia Ede S, Carels N, Azambuja P. 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*, n. 8, 245, 2015.
- Hamza I and Dailey HA. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys*, n. 1823, 1617–1632, 2012.
- Harayama T and Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, n. 19, 281-296, 2018.
- Hernández R, Cevallos AM, Nepomuceno-Mejía T, López-Villaseñor I. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitol Res*, n. 111, 509-14, 2012.
- Herráez R, Quesada R, Dahdah N, Viñas M, Vinuesa T. Tambjamines and Prodiginines: Biocidal Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutics*, n. 12, 705, 2021.

Immenschuh S, Vijayan V, Janciauskiene S, Gueler F. Heme as a Target for Therapeutic Interventions. *Front Pharmacol*, n. 8, 146, 2017.

Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, n. 9&10, 2006.

Johnson KS, V Barbehenn R. Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous insects. *J Insect Physiol*, n. 46, 897-903, 2000.

Kaczmarek A. and Boguś M. The metabolism and role of free fatty acids in key physiological processes in insects of medical, veterinary and forensic importance. *Peer J*, n. 9, e12563, 2021.

Krassner, SM, Granger B, Phemsangngnam P, Le T, Linden V. Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool*, n. 37, 128–132, 1990.

Kollien A, and Schaub G. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*, n. 16, 381–387, 2000.

Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SDJ, et al. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol*, n. 44, 2167–2171, 2006.

Lara FA, Sant'Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, Reis Salles I, Michel A, Oliveira PL, Cunha-e-Silva N, Salmon D, Paes MC. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*, n. 355, 16–22, 2007.

Leis M, Pereira MH, Casas J, Menu F, Lazzari CR. Haematophagy is costly: respiratory patterns and metabolism during feeding in *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*, n. 219, 1820-6, 2016.

Lerchner J, Sartori MR, Volpe POL, Lander N, Mertens F, Vercesi AE. Direct determination of anaerobe contributions to the energy metabolism of *Trypanosoma cruzi* by chip calorimetry. *Anal Bioanal Chem*, n. 411, 3763-3768, 2019.

Lidani, KCF et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*, n. 8 607, 2017.

Lombardo ME, Araújo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem Cell Biol*, n. 35, 1263–1271, 2003.

Lumb AB, Horncastle E. chapter 29 - pulmonary physiology. H.C. Hemmings, T.D. Egan (Eds.), *Pharmacology and physiology for anesthesia (Second ed.)*, Elsevier, Philadelphia. 586-612, 2019.

Maddrell SHP. The mechanisms of insect excretory systems. *Adv. Insect Physiol*, n. 8, 199–331, 1972.

Majerowicz D, Gondim KC. Insect lipid metabolism: insights into gene expression regulation. In: Mandal SS, ed. Recent trends in gene expression. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 147-189, 2013.

Mantilla BS, Paes-Vieira L, De Almeida D, Felipe, C, Simone G, Elias MC, Cosentino-Gomes D, Meyer-Fernandes JR, Silber AM. Higher expression of proline dehydrogenase altered mitochondrial function and increased *Trypanosoma cruzi* differentiation in vitro and in the insect vector. Biochemical Journal, n. 478, 3891-3903, 2021.

Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome, n. 3, 31, 2015.

Marchese L, Nascimento JF, Damasceno FS, Bringaud F, Michels PAM and Silber AM, The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids. Pathogens, n. 7, 36, 2018.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome band Histone H2 B genes and genotyping based on ITS1rDNA. Parasitology, n. 136, 641-655, 2009.

Marti, G.A., Echeverría, M.G., Susevich, M.L., Becnel, J.J., Pelizza, S.A., García, J.J. Prevalence and distribution of parasites and pathogens of Triatominae from Argentina, with emphasis on *Triatoma infestans* and Triatoma virus TrV. J. Invertebr. Pathol, n. 102, 233–237, 2009.

Marti, G., Echeverría, M., Susevich, M., Ceccarelli, S., Balsalobre, A., Rabinovich, J.E., Diotaiuti L, Guérin, D. Exploration for Triatoma virus (TrV) infection in laboratory-reared triatomines of Latin America: A collaborative study*. International Journal of Tropical Insect Science, n. 33, 294-304, 2013.

Marti, G.A., Balsalobre, A., Susevich, M.L., Rabinovich, J.E., Echeverría, M.G. Detection of triatomine infection by Triatoma virus and horizontal transmission: Protecting insectaries and prospects for biological control. J. Invertebr. Pathol, n. 124, 57–60, 2015.

Marti GA, Ragone P, Balsalobre A, Ceccarelli S, Susevich ML, Diosque P, Echeverría MG, Rabinovich JE. Can Triatoma virus inhibit infection of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in *Triatoma infestans* (Klug)? A cross infection and co-infection study. J Invertebr Pathol, n. 150, 101-105, 2017.

Marti GA, Bonica MB, Susevich ML, Reynaldi F, Micieli MV, Echeverría MG. Host range of Triatoma virus does not extend to *Aedes aegypti* and *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol, n. 173, 107383, 2020.

Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Chiari E, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. Int J Infect Dis, n. 39, 68–75, 2015.

Maugeri DA; Cannata JJ, Cazzulo JJ. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Essays Biochem, n. 51, 15-30, 2011.

Melo RFP, Guarneri AA and Silber AM. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, n. 10, 27, 2020.

Merli ML, Pagura L, Hernández J, Barisón MJ, Pral EF, Silber AM, et al. The *Trypanosoma cruzi* protein TcHTE is critical for heme uptake. *PLoS Negl. Trop. Dis*, n. 10, e0004359, 2016.

Merli ML, Cirulli BA, Menéndez-Bravo SM and Cricco JA. Heme A synthesis and CcO activity are essential for *Trypanosoma cruzi* infectivity and replication. *Biochem*, n. 474, 2315–2332, 2017.

Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*, n. 13, 995–1029, 2015.

Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Branda'n CM, Nuñez S, et al. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol*, n. 84, 104329, 2020.

Muller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, n. 76, 444–495, 2012.

Muscio OA, La Torre JL, Scodeller EA. Small nonoccluded viruses from triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, n. 49, 218–220, 1987.

Muscio OA, La Torre JL, Scodeller EA, Characterization of Triatoma virus, a picorna-like virus isolated from the triatomine bug *Triatoma infestans*. *J. Gen. Virol*, n. 69, 2929–2934, 1998.

Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res*, n. 53, 124-144, 2014.

Nogueira NP, de Souza CF, Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, Gonçalves RL, Laranja GA, Leal LH, Coelho MG, Masuda CA, Oliveira MF, Paes MC. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One*, n. 6, e25935, 2011.

Nogueira NP, Saraiva FMS, Sultano PE, Cunha PRBB, Laranja GAT, Justo GA, et al. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. *PLoS ONE*, n. 10, e0116712, 2015.

Nogueira NP, Saraiva FMS, Oliveira MP, Mendonça APM, Inacio JDF, Almeida-Amaral EE, Menna-Barreto RF, Laranja GAT, Torres EJL, Oliveira MF, Paes MC. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. *Free Radic Biol Med*, n. 108, 183-191, 2017.

Oliveira MT, de Assis GF, Oliveira e Silva JC, Machado EMM, da Silva GN, Veloso VM, et al. *Trypanosoma cruzi*. Discret Typing Units (TcII and TcVI) in samples of patients from two municipalities of the Jequitinhonha Valley, MG, Brazil, using two molecular typing strategies. *Parasit Vectors*, n. 8, 568, 2015.

Ouali R, Valentim de Brito KC, Salmon D, Bousbata S. High-Throughput Identification of the *Rhodnius prolixus* Midgut Proteome Unravels a Sophisticated Hematophagic Machinery. *Proteomes*, n. 8, 16, 2020.

Paes LS, Suárez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EMF, Diogo de Melo, P, Tahara, EB, Kowaltowski AJ, Elias MC, Silber AM. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, n. 8, e69419, 2013.

Paes LS, Suarez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, de Melo D, Tahara P. et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, n. 8, e69419, 2015.

Paes MC, Oliveira MB, and Oliveira PL. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*, n. 48, 63–71, 2001.

Paes MC, Silveira AB, Ventura-Martins G, et al. Calcium-induced lipid peroxidation is mediated by *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) and prevented by vitellin. *Arch Insect Biochem Physiol*, n. 90, 104–15, 2015.

Paes MC, Saraiva FMS, Nogueira NP, Vieira CSD, Dias FA, Rossini A, Coelho VL, Pane A, Sang F, Alcocer M. Gene expression profiling of *Trypanosoma cruzi* in the presence of heme points to glycosomal metabolic adaptation of epimastigotes inside the vector. *PLoS Negl Trop Dis*, n. 14(1), e0007945, 2020.

Paiva-Silva GO, Cruz-Oliveira C, Nakayasu ES, Maya-Monteiro CM, Dunkov BC, Masuda H, et al. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, n. 103, 8030–8035, 2006.

Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Benedetti CE, Meneghini R, Almeida IC, Machado EA, Dansa-Petretski M, Yepiz-Plascencia G, Law JH, Oliveira PL and Masuda H. On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein *Insect Biochem Mol Biol*, n. 32(11), 1533-41, 2002.

Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *PloS one*, n. 6(7), e22359, 2011.

Pereira MG, Visbal G, Salgado LT, Vidal JC, Godinho JLP, De Cicco NNT, Atella GC, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to manage internal cholesterol levels under nutritional lipid stress conditions. *PLoS One*, n. 10, e0128949, 2015.

Perner J. Gasser RB, Oliveira PL, Kopáček P. Haem Biology in Metazoan Parasites. The Bright Side of Haem. *Trends Parasitol*, 35(3), 213-225, 2019.

- Ponka P, Sheffel AD, English AM, Bohle DS and Garcia-Santos D. Do Mammalian Cells Really Need to Export and Import Heme? Trends in Biochemical Sciences, n. 42 (5), 395-402, 2017.
- Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. Proc Natl Acad Sci U S A, n. 101 (12), 4003-4008, 2004.
- Rassi A, de Rezende JM, Luquetti AO and Rassi A. Clinical phases and forms of Chagas disease. Am. Trypanosom, 709–741, 2010.
- Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Bütikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. Prog. Lipid Res, n. 52 (4), 488–512, 2013.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendo´n LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis, n. 4(11), e899, 2010.
- Ramírez JD, Herná´ndez C, Montilla M, Zambrano P, Flo´rez AC, Parra E, et al. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. Zoonoses Public Health, n. 61(7), 477479.
- Ratcliffe NA, Furtado Pacheco JP, Dyson P, Castro HC, Gonzalez MS, Azambuja P, Mello CB. Overview of paratransgenesis as a strategy to control pathogen transmission by insect vectors. Parasit Vectors, n. 15(1), 112, 2022.
- Reddi AR and Hamza I. Heme mobilization in animals: a metallolipid's journey. ACC Chem. Res, n. 49, 1104–1110, 2016.
- Ribeiro JMC, Pereira MEA. Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem, n. 14, 103–108, 1984.
- Ribeiro JM, et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. PLoS Negl. Trop. Dis., 2014; 8, p. e2594.
- Rodrigues-Dos-Santos I, Melo MF, de Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Brasil PEAA, Sousa AS, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. PLoS Negl Trop Dis, n. 12(11), e0006939, 2018.
- Roumenina L T, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, and Dimitrov JD. Heme: modulator of plasma systems in hemolytic diseases. Trends Mol. Med, n. 22, 200–213, 2016.
- Salcedo-Porras N, Umaña-Diaz C, Bitencourt ROB, Lowenberger C. The Role of Bacterial Symbionts in Triatomines: An Evolutionary Perspective. Microorganisms, n. 8(9), 1438, 220.
- Saraiva FMS, Consentino-Gomes G, Inacio JDF, Ameida-Amaral EE, Louzada-Neto O, Rossini AM, Nogueira NPA, Meyer-Fernandes JR, Paes MC. Hypoxia effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes proliferation, differentiation, and energy metabolism. Pathogens, n. 11(8), 897-912, 2022.

Schaub GA. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Trop*, n. 45(1), 11-9, 1988.

Schaub GA, Böker CA, Jensen C, Reduth D. Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) between triatomines. *J Protozool*, n. 36(2), 171-5, 1989.

Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front Microbiol*, n. 4 (10), 2036, 2019.

Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJM, Pereira CA, Manso Alves M, Pereira CA. Aminoacid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr. Drug Target Infect. Disord*, n. 5, 53-64, 2005.

Silva JR, Mury FB, Oliveira MF, Oliveira PL, Silva CP, Dansa-Petretski M. Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, n. 37, 523-531, 2007.

Silva Paes L, Mantilla BA, Barison MJ, Wrenger C, Silber AM. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: Opportunities to target new drugs against Chagas' disease. *Curr. Pharm. Des*, n. 17, 2074-2099, 2011.

Souza CF, Carneiro AB, Silveira AB, Laranja GAT, Silva-Neto MAC, Gonçalves da Costa SC, Paes MC. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Bioch Bioph Res Comm*, n. 390, 541-546, 2009.

Souza AV, Petretski JH, Demasi M, et al. Urate protects a blood-sucking insect against heme-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, n. 22, 209-14, 1997.

Souza ROO, Marsiccobetre S, Biran M, Murata G, Rui Curi, Bringaud F, Silber AM. Fatty acid oxidation participates in resistance to nutrient-depleted environments in the insect stages of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, n. 17(4), e1009495, 2021.

Sterkel M. et al. Tyrosine detoxification is an essential trait in the life history of blood-feeding arthropods. *Curr. Biol*, n. 26, 2188-2193, 2016.

Sterkel M, Oliveira JHM, Bottino-Rojas VV, Paiva-Silva GO, and Oliveira PL. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. *Trends Parasitol*, n. 33, 633-644, 2017.

Stiebler R, Timm BL, Oliveira PL, Hearne GN, Egan TJ, Oliveira MF. On the physico-chemical and physio-logical requirements of hemozoin formation promoted by peri-microvillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol*, n. 40, 284-292, 2010.

Stiebler R, Majerowicz D, Knudsen J, Gondim KC, Wright DW, et al. Unsaturated Glycerophospholipids Mediate Heme Crystallization: Biological Implications for Hemozoin Formation in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. *PLoS ONE*, n. 9(2), e88976, 2014.

- Stillwell, W. An Introduction to Biological Membranes. Amsterdam: Elsevier Science, 2016.
- Susevich, M.L., Marti, G.A., Serena, M.S., Echeverría, M.G. New Triatoma virus hosts in wild habitats of Argentina. J. Invertebr. Pathol, n. 110, 405–407, 2012.
- Sukhareva-Buell NN, Biologically Active Substances of Protozoa, Springer Science & Business Media, 2012.
- Swenson SA , Moore CM , Marcero JR , Medlock AE , Reddi AR, Khalimonchuk O. From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme. Cells, n. 29, 579, 2020.
- Tegtmeier D, Thompson CL, Schauer C, Brune A. Oxygen affects gut bacterial colonization and metabolic activities in a gnotobiotic cockroach model. Appl Environ Microbiol, n. 82, 1080 –1089, 2016.
- Toprak U, Hegedus D, Dogan C, Güney G. A journey into the world of insect lipid metabolism. Arch. Insect Biochem. Physiol, n. 104(2), e21682, 2020.
- Tyler KM, Engman, DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol, n. 31, 472–481, 2001.
- Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. Parasit Vectors, n. 9, 119-131, 2016.
- Wainszelbaum MJ, Belaunzara'n ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Isola ELD. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. Biochem J, n. 375, 705–712, 2003.
- Ward JP, Candy DJ, Smith SN. Lipid storage and changes during flight by triatomine bugs (*Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*). Journal of Insect Physiology, 28(6), 527-534, 1982.
- Walter-Nuno AB, Oliveira MP, Oliveira MF, Gonçalves RL, Ramos IB, Koerich LB, et al. Silencing of maternal heme-binding protein causes embryonic mitochondrial dysfunction and impairs embryogenesis in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. J Biol Chem, n. 288, 29323–29332, 2013.
- Whiten SR, Eggleston H and Adelman ZN. Ironing out the Details: Exploring the Role of Iron and Heme in Blood-Sucking Arthropods. Front. Physiol, n. 8, 1134, 2018.
- Wymann MP and Schneider R. Lipid signalling in disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, n. 9(2), 162-76, 2008.
- Zelada C, Jo J, Montemartini M, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol, n. 79, 225–228, 1996.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, n. 104(7), 1051–1054, 2009.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol, n. 12(2) 240–253, 2012.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Trop, n. 184, 38–52, 2018.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 13

O conhecimento atual da biologia da interação *Leishmania* spp. e flebotomíneos vetores

Nágila F. C. Secundino¹
Raquel S. M. Godoy¹
Thais B. Campolina¹
Barbara A. Chaves¹
Paulo F. P. Pimenta¹

¹Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Minas Gerais, Belo Horizonte.

Considerações iniciais

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* e é transmitida pela picada de flebotomíneos vetores. Dependendo da espécie de *Leishmania*, o ciclo de transmissão pode envolver humanos (antropnose) ou animais silvestres e domésticos (zoonose). Os parasitos podem sobreviver persistentemente nesses hospedeiros, tornando-os reservatórios, e servindo como fontes recorrentes de infecção e reinfecção para flebotomíneos vetores (Maia et al., 2018).

As fêmeas de flebotomíneos, além de se alimentarem de néctar, seiva de plantas e secreções de afídeos, necessitam de alimentação sanguínea para a ovogênese. Suas peças bucais penetram na pele do vertebrado, lacerando a epiderme em diferentes pontos, formando uma “poça de sangue”, que será sugada pelo inseto. Quando o flebotomíneo pica um hospedeiro infectado, o sangue contendo os parasitos no estágio amastigota, dentro dos macrófagos, é ingerido e armazenado no intestino médio do inseto. Diferentemente do que ocorre nos vertebrados, o ciclo de vida da *Leishmania* nos flebotomíneos é extracelular e ocorre totalmente no trato digestório desses insetos. Após o repasto sanguíneo, o sangue do vertebrado ingerido é processado no intestino médio do vetor, onde os amastigotas (sem flagelo aparente) escapam dos macrófagos contidos no sangue, e ficam livres. Dessa forma, eles imediatamente diferenciam-se em parasitos flagelados chamados promastigotas (Figura 1).

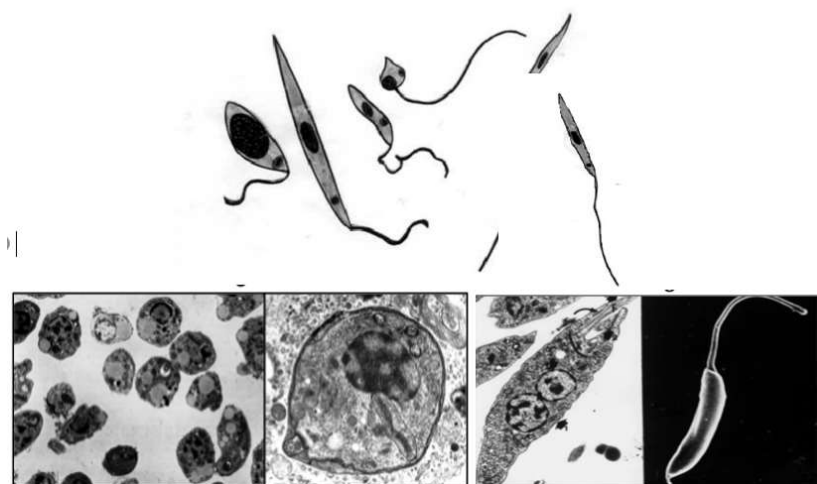


Figura 1: Alterações morfológicas da *Leishmania* durante o seu ciclo de vida. Os morfotipos encontrados dentro dos flebotomíneos vetores. Observa-se da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota, promastigota metacíclica e promastigota retroleptomonda (Desenho esquemático baseado em esfregaços de promastigotas obtidos de vetores infectados e corados pelo Giemsa)

Fonte: Paulo Pimenta e Thais Bonifácio. Micrografia amastigota vertebrado e promastigota invertebrado

As formas promastigotas derivadas da diferenciação das amastigotas, ingeridas durante a alimentação sanguínea, são chamadas de procíclicas (Figura 2 - A). Essas amastigotas possuem alta capacidade multiplicativa por divisão binária e, posteriormente, durante o ciclo de vida do parasito, diferenciam-se em formas flageladas, morfologicamente distintas. Poucos dias após o repasto sanguíneo, uma nova população de promastigotas distingue-se progressivamente, as nectomonas (Figura 2 - B). Durante a colonização do intestino médio por nectomonas, a população diminui e surge uma nova forma de promastigotas, as haptomonas (Lawyer et al., 1990).

Alguns autores utilizam uma nomenclatura diferente da apresentada anteriormente para os morfotipos de parasitos de *Leishmania*, observados tanto em cultura, quanto *in vivo*, dentro do vetor (Walters, 1993; Nieves, Pimenta, 2000, 2002; Rogers et al., 2002; Gossage et al., 2003; Bates, Rogers, 2004). Durante a migração das nectomonas para o intestino médio, que ocorre de 4 a 5 dias após a alimentação sanguínea, elas diferenciam-se em outra forma, curta e larga, denominada promastigotas leptomonas (Figura 2 - C). Esta é uma forma replicativa, responsável por um grande aumento dos parasitos em número, além de ser responsável pela produção de PSG (gel secretor de promastigotas), que tem papel fundamental na transmissão (Bates, Rogers, 2004; Bates, 2007; Kamhawi, 2006). A forma precursora de haptomonas, nectomonas ou leptomonas ainda é discutida por alguns autores, devido ao seu tamanho, forma e aparência (Gossage, Rogers, Bates, 2003).

Gradualmente, após a excreção total do sangue, surgem os metacíclicos, a forma infecciosa dos vertebrados (Figura 2 - D). Os metacíclicos migram para a região do intestino anterior do vetor, onde estarão aptos para serem transmitidos para um novo hospedeiro vertebrado através da picada do flebotomíneo, juntamente com bactérias intestinais (Figura 2 - E). No entanto, se o flebotomíneo realizar um novo repasto sanguíneo, agora com sangue não infectado, esses promastigotas metacíclicos se tornarão novamente promastigotas retroleptomonados (ou seja, serão leptomonizados novamente) (Figura 2 - F). Após ocorrer essa metaciclogênese reversa ou uma segunda metaciclogênese, os promastigotas, rapidamente, se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicos (Figura 2 - G), aumentando a infecciosidade dos flebotomíneos (Serrafim et al., 2018).

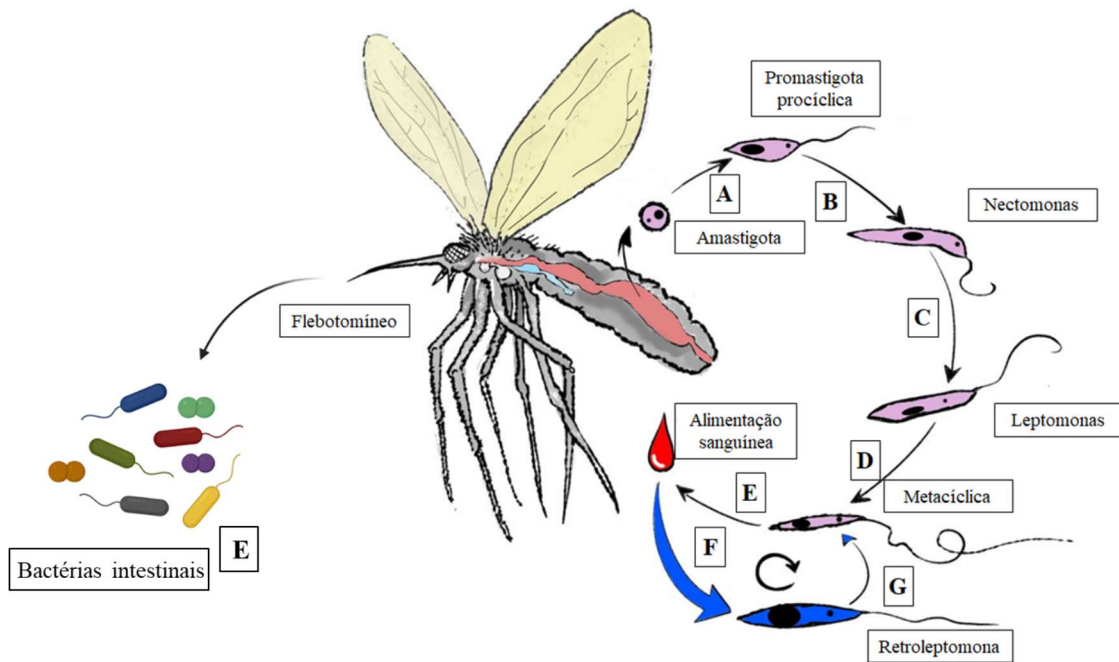


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* no flebotomíneo vetor. Existem vários tipos de promastigotas até o surgimento dos metacíclicos, forma infectante que será transmitida aos vertebrados pela picada do flebotomíneo.

Fonte: Arquivo pessoal

Os parasitos *Leishmania* serão transmitidos para os hospedeiros vertebrados, se conseguirem completar seu ciclo de vida dentro do flebotomíneo. No entanto, vários eventos ocorrem para dificultar a capacidade do vetor de transmitir o patógeno. Os eventos considerados pontos críticos para o desenvolvimento da infecção por *Leishmania* no flebotomíneo incluem:

- (a) a diferenciação da forma amastigota para promastigotas procíclicas;
- (b) a ruptura da estrutura quitinosa que envolve o sangue ingerido pelo flebotomíneo, chamada de matriz peritrófica (PM), e o escape dos parasitos do sangue para a superfície do epitélio do intestino médio do inseto (Walter et al., 1993; Pimenta et al., 1997; Secundino et al., 2005, Schlein et al., 1991);
- (c) a resistência e a sobrevivência do parasito à ação de enzimas digestivas (Borovsky, Schlein, 1987; Secundino et al., 2010.);
- (d) a adesão das promastigotas ao epitélio do intestino médio pelo flagelo através da ligação de lipofosfoglicano (LPG) do parasito de forma espécie-específica (Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994a) ou o mecanismo descrito para susceptíveis ou permissivos, que consiste na ligação das promastigotas às células do epitélio intestinal do vetor (Adler, Teodor, 1927; Warburg, 2008);
- (e) a competição dos parasitos com a microbiota nativa do flebotomíneo (Dillon et al., 1996; Volf et al., 2002; Sant'Anna et al., 2014; Maleki-Ravasan et al., 2015; Monteiro et al., 2016; Pires et al., 2017);

(f) a diferenciação dos parasitos em promastigotas metacíclicos, forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Turco, Descoteaux, 1992);

(g) o descolamento e a migração dos parasitos da região posterior do intestino médio para a probóscide, passando pela válvula estomodeal, a qual pode causar danos físicos a eles (Volf et al., 2004; Schlein et al., 1992) e;

(h) a influência de um segundo repasto não infectante, alteração de morfotipos (Serafim et al., 2018).

Todos esses eventos, juntos, influenciam a competência vetorial do flebotomíneo para transmitir parasitos *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado. Um conjunto de fatores auxiliam ou promovem o sucesso da transmissão da *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado. Entre eles, destacam-se:

(i) a ação da saliva do flebotomíneo no local da picada. A saliva dos flebotomíneos contém substâncias com diferentes atividades, tais como: anti-hemostática, vasodilatadora, anti-inflamatória, imunossupressora, anti-coagulante, anti-agregação plaquetária, fator de modulação da patogenicidade e indutor de infectividade de *Leishmania* para o vertebrado (Belkaid et al., 1998, Kamhawi review em 2000, Charlab et al., 1999; Hamasaki et al., 2009; Valenzuela et al., 2001);

(ii) a secreção de proteofosfoglicanos (PSG) pelos parasitos forma uma substância gelatinosa, a PSG, que otimiza e aumenta a eficiência do estabelecimento da infecção. A secreção de PSG aumenta a pressão que a massa de parasitos exerce sobre a válvula estomodeal, causando disfunção mecânica de sua estrutura, que, por sua vez, altera o comportamento alimentar do flebotomíneo (Warburg et al., 1986; Lawyer et al., 1987, 1990; Walters et al., 1987, 1989; Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002; Bates, 2007);

(iii) os danos físico e biológico provocados pelo parasito à válvula do estomodeu do inseto, ocasionados pela ação de quitinases produzidas pela *Leishmania* (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008). O dano físico dificultaria o repasto e favoreceria a regurgitação de promastigotas infectantes na pele do vertebrado.

Somados os fatores citados anteriormente, a própria infecção do vetor faz com que o flebotomíneo aumente o número de tentativas para se alimentar e também aumenta o tempo de alimentação; o que amplia as chances de regurgitação do parasito durante um repasto sanguíneo (Killick-Kendrick et al., 1977b; Beach et al., 1985; Rogers et al., 2002; Rogers, Bates, 2007; Rogers et al., 2009).

Aspectos cruciais para o desenvolvimento de parasitos *Leishmania* no trato digestivo do flebotomíneo: o escape das enzimas digestivas

Após o repasto sanguíneo e durante o processo digestivo, a concentração de enzimas digestivas aumenta de maneira expressiva. Para digerir o sangue ingerido, o flebotomíneo produz amilases, glicosidases, lipases e proteases (principalmente tripsina e quimotripsina), que são secretadas pelas células epiteliais do intestino médio. A sobrevivência e a infectividade de todos os microrganismos transmitidos por insetos hematófagos, incluindo a *Leishmania*, está associada à resistência do parasito à ação de enzimas digestivas produzidas pelos vetores. Portanto, como essas enzimas afetam negativamente os parasitos, o processo digestivo dos flebotomíneos tende a reduzir a taxa de infecção a porcentagem de flebotomíneos infectados.

Uma das barreiras mais críticas para o desenvolvimento de *Leishmania* no vetor é a diferenciação de amastigotas em promastigotas procíclicas (Figura 1). Um estudo pioneiro indicou que, em *Phlebotomus papatasi* infectado com *Leishmania major*, há uma redução dramática do número de parasitos em cerca de 50% durante esta diferenciação (Pimenta et al., 1997). Embora o glicocálice celular do parasito lhes dê alguma proteção contra proteases do intestino médio de flebotomíneos, a diferenciação de amastigotas em promastigotas procíclicas é um passo importante, já que muitos parasitos não conseguem diferenciar. Assim, imediatamente após a digestão do sangue infectado ingerido, o número de parasitos pode reduzir drasticamente ou ser destruído dentro do vetor, e alguns insetos podem até perder completamente a infecção.

A modulação da atividade enzimática do vetor foi estudada, em detalhes, no gênero *Phlebotomus*. Adler (1938) observou que, quando *Phlebotomus papatasi* é infectado por várias espécies de *Leishmania* cujo vetor não é suscetível, os parasitos são mortos durante a digestão do sangue oriundo do repasto. A investigação sobre a interação entre *P. papatasi* e *Leishmania sp.* foi retomada, posteriormente, por Schlein e colaboradores em 1986, 1987 e 1990, os quais demonstraram que *Le. major* pode bloquear parcialmente a síntese de enzimas digestivas em seu vetor natural *P. papatasi*. Diferentemente, *Le. donovani* induziu um nível maior de produção da enzima, causando a destruição do parasito dentro do intestino médio de *P. papatasi*. Estudos semelhantes desenvolvidos por Pimenta e colaboradores (1997) demonstraram que a sobrevivência de *Le. major* no vetor *P. papatasi* está associada à produção da enzima tripsina. Assim, concluiu-se que existe compatibilidade específica vetor-

parasito entre as espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos, e que ela pode estar associada à capacidade dos parasitos de estimular ou bloquear a síntese enzimática no intestino médio do flebotomíneo pós-repasto sanguíneo (Pimenta et al., 2018).

A modulação da síntese enzimática também foi demonstrada para vetores do Novo Mundo, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. Telleria e colaboradores (2010) mostraram que a expressão de tripsinas diminui cerca de 20% em *Lutzomyia longipalpis* infectado com *Leishmania infantum*. Isso reafirma que os parasitos *Leishmania* são capazes de modular a síntese de proteases, ação que depende da interação vetor-parasito e é espécie-específica. Corroborando os achados mencionados, foi visto que a morte dos parasitos pode ser evitada pela adição de inibidores proteolíticos específicos no repasto sanguíneo infectado (Borosvsky, Schlein, 1987; Pimenta et al., 1997). Curiosamente, também foi demonstrado que a resistência do parasito à ação das enzimas digestivas é específica do estágio do parasito. As formas promastigotas são mais resistentes que as amastigotas (Pimenta et al., 1997). Essa questão foi explorada comparando as diversas fases de diferenciação de amastigotas até promastigotas totalmente diferenciadas. As formas transicionais (amastigotas diferenciando-se em promastigotas) apresentam maiores taxas de mortalidade do que as promastigotas quando submetidas à ação de enzimas digestivas, sendo o estágio mais crítico para a sobrevivência do parasito no flebotomíneo vetor (Pimenta et al., 1997). Após completar a diferenciação em promastigotas, os parasitos adquirem maior resistência às enzimas digestivas sintetizadas pelo epitélio intestinal (Pimenta et al., 2018).

A resistência dos promastigotas contra danos causados por enzimas digestivas está relacionada à presença de um lipofosfoglicano (LPG), que não está presente em amastigotas. O LPG e outros fosfoglicanos (PG) cobrem a superfície promastigota, protegendo-os da lise por proteases (Schlein et al., 1990, Pimenta et al., 1991). O LPG é o principal glicoconjugado na superfície de promastigotas de *Leishmania* e está localizado em toda a superfície do parasito, incluindo o flagelo. O LPG está organizado como um glicocálice filamentososo (Figura 3) (Pimenta et al., 1992; Turco, Descoteaux, 1992; Pimenta et al., 1994a; Mahoney et al., 1999; Sacks et al., 2000; Soares et al., 2002; Coelho-Finamore et al., 2011). Experimentos detectaram que mutantes de *Le. major* e *Le. donovani* deficientes em LPG podem sobreviver em seus vetores naturais, enquanto o sangue ainda está presente. No entanto, nota-se uma redução na sobrevivência do mutante durante a infecção inicial (Sacks et al. 2000; Boulanger et al., 2004; Myskova et al., 2007; Svárovská et al., 2010; Secundino et al., 2010).

Além disso, Secundino e colaboradores (2010) observaram que a adição experimental de PG derivado de LPG fornece resistência contra a lise promovida por proteases aos parasitos mutantes *Le. major* deficientes em LPG no flebotomíneo *Phlebotomus duboscqi*. Em conjunto, esses resultados reforçam o envolvimento do LPG na resistência de *Leishmania* contra danos causados pelas enzimas digestivas.

Apesar de muitos parasitos ingeridos com o repasto sanguíneo serem mortos no intestino médio do flebotomíneo, devido à condição natural adversa do processo digestivo, um número suficiente resiste à ação enzimática, sobrevive e se multiplica dentro do trato digestivo, atravessando as demais barreiras, e, portanto, mantendo a infecção no vetor.

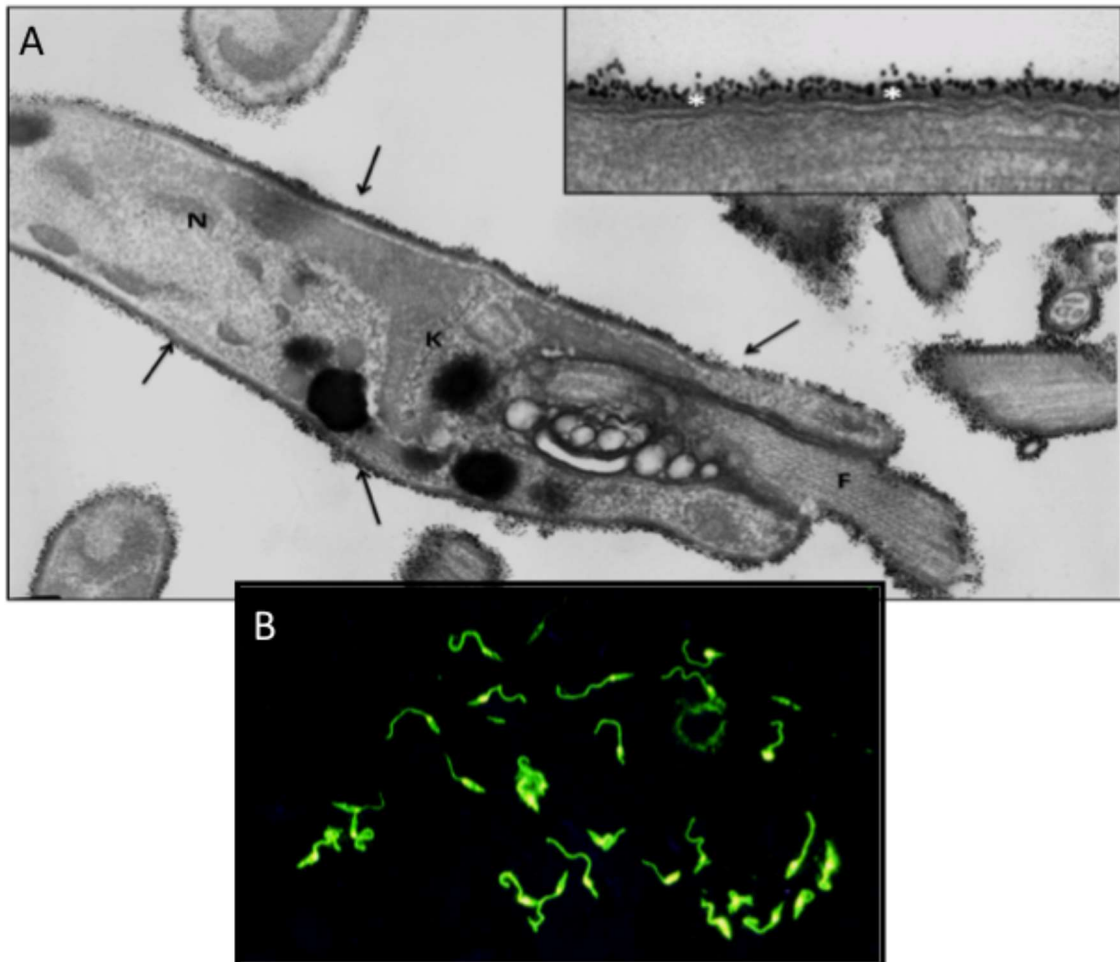


Figura 3: Ultraestrutura das moléculas de LPG observada por imunomarcagem da superfície promastigota (A). As partículas de LPG marcadas com anticorpos acoplados com partículas de ouro estão distribuídas em toda a superfície do parasito (setas). A inserção mostra uma grande ampliação com detalhes das partículas de LPG no glicocálice (asteriscos brancos). N = núcleos, K = Cinetoplasto, F = Flagelo. B: Promastigotas marcados por imunofluorescência através de anticorpos anti-LPG acoplados com FITC (cor verde).

Fonte: Arquivo pessoal

Aspectos cruciais para o desenvolvimento de parasitos *Leishmania* no trato digestivo do flebotomíneo: a matriz peritrófica

Imediatamente após a ingestão do sangue, as células epiteliais do intestino médio começam a sintetizar os componentes da matriz peritrófica (MP). A síntese da MP estará completa 24 horas após o repasto sanguíneo (Figura 4). Sua estrutura completamente formada persistirá até o final do processo digestivo, quando o último vestígio do sangue ingerido é excretado. Assim como em outros insetos da ordem Diptera, como os mosquitos, a MP dos flebotomíneos é constituída, principalmente, por quitina, proteoglicanos e por algumas outras proteínas (Gemetchu 1974; Secundino et al., 2005).

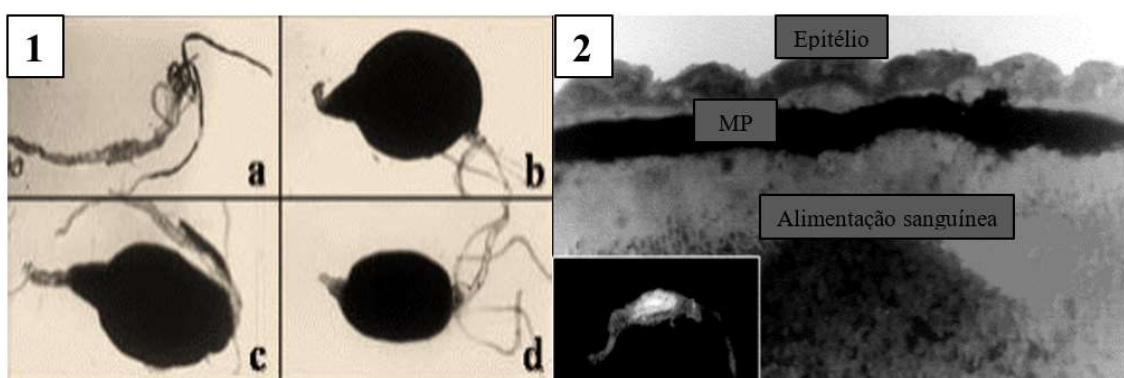


Figura 4: 1 (a-d) Intestino médio dissecado em diferentes tempos após a alimentação sanguínea: a) não alimentado, b) 0.5 h, c) 12 h e d) 24 h. 2 Corte histológico 24 horas após o repasto sanguíneo: a MP encontra-se completamente estruturada durante 24 h nos flebotomíneos (microscopia ótica). Detalhe (Inset): a MP consiste em uma rede formada principalmente por quitina, como pode ser visto em um intestino médio marcado por anticorpo fluorescente anti-quitina.

Fonte: Arquivo pessoal

Algumas funções clássicas da MP dos insetos são: i) proteção do epitélio contra a abrasão alimentar (Richards, Richards 1997, Berner et al., 1983); ii) compartimentação de alimentos e permeabilização do intestino médio a enzimas digestivas (Terra, 1990; Terra, Ferreira, 1994); iii) proteção do epitélio do intestino médio contra patógenos, potencialmente ingeridos com os alimentos (Peters, 1992; Miller, Lehane, 1993; Pimenta et al., 1997); iv) controle de fluxo de pequenas moléculas como enzimas digestivas e produtos da digestão (Tellam, 1996; Hegedus et al., 2009; Klowden, 2013; Terra, Ferreira, 2012) e v) destoxificação de resíduos da digestão de hemoglobina por sequestro de heme (Pascoa et al., 2002).

Os promastigotas de *Leishmania* precisam atravessar a estrutura da MP. Para isso, os promastigotas produzem enzimas para perfurar a barreira da MP (Schlein et al., 1991; Shakarian, Dwyer 1998, Malta et al., 2016, Pimenta et al., 2018). Schlein e colaboradores (1991) descobriram que a quitinase e a N-acetilglucosaminidase são secretadas por promastigotas de *Le. major* cultivadas em meio de cultura, e sugeriram que essas enzimas podem catalisar a degradação da MP, permitindo o escape do parasito. Shakarian e Dwyer (2000) identificaram um gene de quitinase em *Le. donovani* e demonstraram que o locus gênico e as atividades enzimáticas são conservadas em todas as espécies. Para *Leishmania mexicana*, a quitinase tem sido considerada um fator de virulência multifuncional, que auxilia sua sobrevivência em *Lu. longipalpis*. Isso ocorre porque a enzima quitinase permite que muitos parasitos colonizem o intestino médio anterior do flebotômíneo mais rapidamente, modificando a válvula estomodeal e afetando seu comportamento hematófago (processo já explicado anteriormente), de forma a potencializar a transmissão da *Leishmania* (Rogers et al., 2008).

Apesar de ser uma barreira que precisa ser superada por *Leishmania* para continuar a infecção, a estrutura da MP parece ser necessária para promover a sobrevivência do parasito nos vetores (Pimenta et al., 2018). Anteriormente, discutimos o papel das enzimas digestivas em *Leishmania*, as quais reduzem drasticamente o número de parasitos durante a digestão do sangue. No entanto, apesar da ação protetora contra patógenos dada pela MP ao vetor, o parasito evoluiu para utilizar a MP como estratégia de proteção contra as enzimas digestivas. Esse fato foi bem demonstrado em flebotômíneos infectados com *Le. major* (Pimenta et al., 1997), pois, no processo inicial de infecção, as promastigotas são retidas pela MP, evitando a ação das enzimas digestivas. Além disso, ao impedir a formação da MP através da alimentação dos flebotômíneos com sangue contendo quitinase exógena, quase todos os parasitos morrem. Se a MP não for sintetizada, os parasitos são rapidamente destruídos pela ação das enzimas digestivas, e os poucos sobreviventes são excretados, juntamente com os produtos finais da digestão (Pimenta et al., 1997).

Pimenta e colaboradores, em 1997, mostraram que a MP é crucial para a sobrevivência inicial de *Le. major* em *P. papatasi*, pois a presença de sua estrutura reduz a difusão de enzimas digestivas no repasto sanguíneo, retardando a exposição dos parasitos a elas. No entanto, comparando diferentes cepas de *Le. major*, Cihaková e Volf (1997) observaram que a presença uma cepa mais lenta para escapar da MP promoveu a perda da infecção, indicando que os parasitos têm um tempo específico para atravessar a PM e escaparem das adversidades do

espaço endoperitrófico (local onde o sangue é armazenado). Em outro estudo, o tempo de desintegração da MP em *P. duboscqi* infectadas por *Le. major* não diferiu em relação aos insetos não-infectados, mostrando que a presença dos parasitos não acelera a destruição da estrutura da MP (Sádlová, Volf, 2009). Esses resultados sugerem que, apesar de *Le. major* secretar quitinase para romper a estrutura da MP, essa secreção não perturba o processo natural de sua permanência no intestino médio do flebotomíneo (Walters et al., 1993, 1995; Warburg, 2008; Sádlová, Volf, 2009).

Outro fato importante relacionado à MP é a capacidade dos parasitos *Leishmania* aderirem ou não à superfície das células epiteliais do intestino médio. A adesão ao epitélio do intestino médio é um fenômeno vital para a manutenção da infecção por *Leishmania*. Os promastigotas precisam romper a MP, em um intervalo de tempo limitado, e aderir ao epitélio do intestino médio. Caso essa adesão não ocorra, o parasito será excretado com o restante do sangue não digerido, o que impede sua proliferação e, posterior diferenciação.

Considerando os aspectos discutidos nesta seção, vimos que há um delicado equilíbrio MP-dependente na interação entre o vetor flebotomíneo e o parasito *Leishmania*, que é crucial para a eficiência do estabelecimento da infecção no vetor. Inicialmente, a MP protege os parasitos da ação direta de enzimas digestivas durante sua diferenciação em promastigotas. No entanto, as promastigotas precisam produzir uma quitinase no momento certo para atravessar a PM e, então, aderirem-se ao epitélio do intestino médio, para não serem excretados na etapa final do processo digestivo (Pimenta et al., 1992).

Aspectos cruciais para o desenvolvimento de *Leishmania* no trato digestivo do flebotomíneo: adesão do parasito ao epitélio do intestino médio

A capacidade vetorial dos flebotomíneos pode ser controlada pela capacidade dos promastigotas se ligarem às microvilosidades do intestino médio do inseto (Figura 5). Conforme mencionado no item anterior, em algumas espécies de *Leishmania*, essa adesão é determinada pelo polimorfismo espécie-específico de um LPG do parasito. Nas espécies cuja ligação do LPG do parasito às microvilosidades do intestino médio é necessária, elas são denominadas vetores “não-permissivos”. Já os vetores que albergam mais de uma espécie de parasitos são os vetores “permissivos”. Essa distinção se dá devido à variabilidade da molécula LPG, que está relacionada à seletividade, permissividade e função como ligante aos receptores do intestino médio, e pode

explicar a competência vetorial específica da espécie (Dobson et al., 2010; Volf et al., 2014). A variabilidade intraespecífica do LPG também foi observada em várias espécies, incluindo *Leishmania infantum*, obtido a partir de diferentes isolados. Essa espécie apresenta três tipos de LPG: do tipo I, que não possui cadeias laterais; do tipo II, com um resíduo de β -glicose que se ramifica das unidades repetidas de dissacarídeo-fosfato; e do tipo III, que possui até três moléculas de glicose. Entre as espécies, verificou-se que o LPG de *Le. mexicana* contém β -glicosos, o de *Le. major* possui 1-4 β -galactoses, frequentemente com arabinose terminal, e o de *Le. braziliensis* não possui cadeias laterais (Coelho-Finamore et al., 2011, Soares et al., 2002, 2005, McConville et al., 1990).

A molécula do LPG consiste em um núcleo de glicano com uma âncora lipídica altamente conservada e unidades de oligossacarídeos variáveis. A ligação do LPG da promastigota ao intestino médio no flebotomíneo é feita através de suas unidades de sacarídeos (receptores de LPG), ligando-se, especificamente, às microvilosidades das células epiteliais (Figura 5) (Pimenta et al., 1992; revisto por Sacks et al., 1995). O papel do LPG na mediação da adesão foi confirmado por estudos utilizando mutantes promastigotas deficientes na expressão de unidades de sacarídeos específicos (Butcher et al., 1996), ou deficientes na expressão total da molécula (Pimenta et al., 1994; Svárovská et al., 2010; Secundino et al., 2010). Nos experimentos com mutantes deficientes em LPG, foi impossível manter a infecção do flebotomíneo após a excreção do repasto sanguíneo, pois não houve adesão de promastigotas ao epitélio do intestino médio. Outros estudos mostraram que a capacidade dos flebotomíneos de se infectarem por espécies específicas de *Leishmania* é totalmente controlada pelo polimorfismo do LPG na superfície promastigota (Pimenta et al., 1994). A molécula de LPG apresenta um polimorfismo significativo na superfície do parasito, variando suas unidades sacarídicas de acordo com a espécie de *Leishmania* (Turkish 1992, McConville, 1991). Inicialmente, foi sugerido que o LPG de *Leishmania* possuía receptores celulares específicos no intestino médio do vetor, as glicoproteínas (tipos de lectina). Este receptor seria responsável pela adesão de promastigotas no epitélio (Pimenta et al., 1994). Mais tarde, Kamhawi e colaboradores (2004) demonstraram que tais receptores específicos participam do mecanismo de adesão via LPG no par natural *P. papatasi* e *L. major*. Nesse estudo, foi demonstrado que o LPG de *Le. major* liga-se a uma galectina presente nas microvilosidades das células digestivas do intestino médio de *P. papatasi*.



Figura 5: 1Micrografia do intestino de uma fêmea de *P. papatasi* infectada com *L. major*, mostrando a ligação do parasito (P) ao epitélio intestinal (Ep), através do seu flagelo (F) aderido às microvilosidades (Mv). As setas estão mostrando a marcação da molécula LPG presente em toda a superfície do parasito. O inset destaca os receptores para o LPG purificado de *L. major* ligado às microvilosidades (Mv no inset).

Fonte: Foto de Paulo Pimenta IRR, Fiocruz-MG e publicada em Saraiva et al., 1995

Conforme descrito anteriormente, apesar das descobertas sobre a adesão intestinal dependente de LPG, reconhece-se que, em algumas espécies de flebotômíneos permissivos (de laboratório), o mecanismo de adesão do parasito não é dependente de LPG. De acordo com Myskova e colaboradores (2007), alguns flebotômíneos podem permitir ou não o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania*. Sua interação com os parasitos não resulta da ligação LPG-lectina, como proposto para o vetor natural. Dessa forma, o modelo da adesão em vetores permissivos parece ser diferente. Os autores mostraram que a N-acetilgalactosamina (GalNAc) estava presente em flebotômíneos permissivos, mas ausente nos não-permissivos. Portanto, uma hipótese provável é que a ancoragem do parasito ao intestino médio nos flebotômíneos de campo seja realizada pela interação entre as GalNAc das microvilosidades e as lectinas ligadas ao parasito (Myskova et al., 2007; Svárovská et al., 2010).

A metaciclologênese no intestino médio de flebotomíneos: diferenciação de promastigotas procíclicos para metacíclicos, a forma infectante de vertebrados

A diferenciação dos parasitos em promastigotas metacíclicos ou semelhantes a leptomonas/retroleptomonas (nome dos parasitos após a metaciclologênese reversa; Serafim et al., 2018) e sua subsequente transmissão para hospedeiros vertebrados são as duas últimas etapas da interação *Leishmania*-flebotomíneos. Estudos realizados por Sacks e colaboradores (1984, 1987) compararam promastigotas obtidos em dias subsequentes após a infecção do flebotomíneo (via repasto sanguíneo infeccioso). Eles demonstraram que populações de promastigotas capazes de infectar vertebrados foram obtidas, gradativamente, somente após o 4º dia da infecção do vetor. Os parasitos *Leishmania* passam por um processo dentro dos flebotomíneos chamado metaciclologênese, permitindo o desenvolvimento de promastigotas infectantes para iniciar a infecção nos hospedeiros vertebrados. Assim, os parasitos se diferenciam em promastigotas metacíclicos infectantes para o vertebrado e podem ser transmitidos aos hospedeiros, através da picada do flebotomíneo (Pimenta et al., 2018).

Muitos estudos têm contribuído para o melhor conhecimento do processo de metaciclologênese. Foi possível obter promastigotas metacíclicos em culturas axênicas e purificá-los por métodos de aglutinação por lectina (Sacks et al., 1985). Esses estudos demonstraram que as promastigotas metacíclicas são altamente diferenciadas, apresentando características morfológicas distintas, como um revestimento celular muito denso constituído, principalmente, por LPG (Pimenta et al., 1989, 1991, 2018). Posteriormente, foi demonstrado que, durante a metaciclologênese, a superfície do promastigota sofre consideráveis mudanças estruturais, com o LPG alterando os tipos e o número de unidades sacarídicas. As moléculas de LPG de promastigotas metacíclicos tornam-se cerca de três a cinco vezes mais longas do que as de promastigotas no estágio inicial da metaciclologênese, proporcionando, assim, um aumento da espessura do revestimento celular da *Leishmania* (Pimenta et al., 1989). O uso de diferentes técnicas associadas à microscopia eletrônica, imunomarcagem e criofatura, por Pimenta e colaboradores (1989), revelou que, apesar do LPG estar presente na superfície de todos os promastigotas, eles possuem estruturas densamente filamentosas, exclusivamente na superfície dos promastigotas metacíclicos (Figura 6).

Estudos adicionais envolvendo diferentes frações de LPG demonstraram que a estrutura específica dessa molécula em cada estágio de promastigota é

crucial para o desenvolvimento do parasito no trato digestivo do flebotomíneo. O promastigota procíclico usa a LPG para aderir ao intestino médio. Posteriormente, o parasito sofre diferenciação celular até se transformar em promastigotas metacíclicas, os quais são, então, liberados das microvilosidades das células digestivas do flebotomíneo. Pouco antes dessa liberação, a estrutura do LPG das promastigotas começa a mudar através da adição de resíduos de β (1,3) glicose (Pimenta et al., 1992; Soares et al., 2002, 2010). Essas mudanças estruturais da camada do LPG permitem que os promastigotas, agora chamados de promastigotas metacíclicas, se desprendam das microvilosidades do intestino médio e se movam em direção à porção anterior do trato digestivo do flebotomíneo, reforçando a ideia de que os promastigotas metacíclicos são a forma infectante para os hospedeiros vertebrados. Um estudo *in vitro* mostrou que, quando flebotomíneos infectados foram forçados a se alimentar por microcapilares, eles regurgitaram apenas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. Esse estudo também revelou que esses parasitos metacíclicos, obtidos *in vivo*, tinham morfologia celular e expressão de LPG típica daquela obtida *in vivo* (Saraiva et al., 1995).

Em conclusão, a metaciclogênese, que ocorre no intestino médio do flebotomíneo, confere uma morfofisiologia específica à *Leishmania*. Essa nova morfofisiologia pode ser considerada um processo de pré-adaptação dos parasitos para sobreviver dentro do hospedeiro vertebrado, um ambiente totalmente diferente daquele vivenciado no vetor.

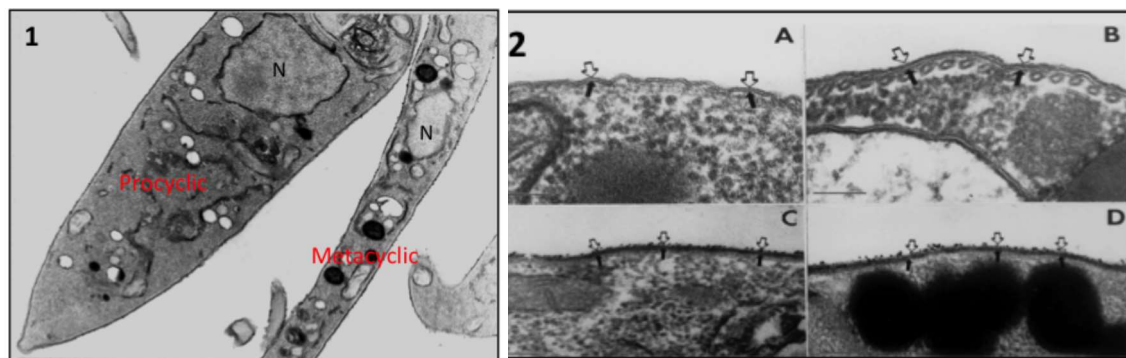


Figura 6: Item 1: Ultraestrutura geral de um promastigota procíclico e metacíclico. O metacíclico é delgado e longo comparado ao procíclico. Item 2: detalhes da superfície celular de um procíclico (A) e um metacíclico (B). C-D: partículas de LPG-ouro ligadas à superfície celular das duas formas promastigotas. As promastigotas metacíclicas apresentam um glicocálice denso com maior quantidade de moléculas de LPG.

Fonte: Arquivo pessoal

O impacto de um segundo repasto sanguíneo no desenvolvimento do parasito no vetor flebotomíneo

Os insetos silvestres podem realizar sucessivos repastos sanguíneos. Shortt (1928) demonstrou que o segundo repasto sanguíneo com sangue não-infectado não causa efeitos negativos para o desenvolvimento e transmissão de *Leishmania* pelo vetor, e Adler (1964) confirmou que a realimentação do flebotomíneo não reduz a taxa de infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, Elnaiem et al. (1997) demonstraram que há um aumento na proporção metacíclica de *Le. infantum* em *Lu. longipalpis* infectado após repasto adicional, reforçando que os efeitos nocivos das enzimas digestivas não foram observados nos promastigotas cuja infecção já tenha sido estabelecida. Similarmente, Vivenes e colaboradores (2001) mostraram que o repasto adicional favorece *Le. mexicana*, aumentando o número de promastigotas dentro do trato digestivo de *Lutzomyia evansi*. Nieves e Pimenta (2002) confirmaram que a realimentação aumenta o número de promastigotas metacíclicos no intestino médio, oferecendo um papel importante na transmissão de *Leishmania*. Finalmente, um estudo mais recente de Serafim e colaboradores (2018) demonstrou que múltiplas realimentações de *P. dubosqui* infectados com *Le. major* resultaram em infecções mais maciças, com maior proporção de metacíclicos. A probabilidade de transmissão do parasito também aumentou, uma vez que a frequência de lesões aumentou quatro vezes nos camundongos picados por flebotomíneos que foram alimentados duas vezes em comparação com aqueles alimentados apenas uma vez (Serafim et al., 2018). Os autores mostraram que, quando um flebotomíneo infectado ingere sangue não infectado, os promastigotas metacíclicos sofrem desdiferenciação *in vivo* em um estágio replicativo semelhante a leptomonas (retroleptomonas), e, depois disso, eles se rediferenciam em promastigotas metacíclicos. Esse processo amplifica o número de parasitos infecciosos localizados no trato digestivo do flebotomíneo, exacerbando a capacidade de transmissão de *Leishmania*.

Nosso grupo avaliou os efeitos de repastos adicionais com sangue derivado de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados em flebotomíneos infectados por *Leishmania*. Um estudo utilizando *Lutzomyia intermedia* (*Nissomyia intermedia*) infectado com *Le. braziliensis* mostrou que esses vetores parecem ingerir a mesma quantidade de sangue, independentemente da fonte animal. Porém, os padrões de infecção nos vetores mudam de acordo com a fonte de sangue do repasto adicional (Miranda et al., 2008) (Tabela 1). Houve um aumento expressivo no número de parasitos em flebotomíneos que foram realimentados com sangue de galinha e de burro, e um aumento moderado

naqueles que foram realimentados em humanos, cavalos, cães e bovinos. Em contraste, o número de parasitos diminuiu em vetores infectados que foram realimentados com sangue de porco e cordeiro. Esses resultados sugerem que o efeito de realimentação no flebotomíneo infectado por *Leishmania* depende da espécie de hospedeiro vertebrado utilizada como fonte de sangue. Apesar da redução do número de parasitos devido à realimentação de flebotomíneos com sangue de porcos e cordeiros, houve um aumento do número relativo de promastigotas metacíclicos, promovendo, assim, uma exacerbação na infecção de flebotomíneos por *Leishmania*. Assim, é provável que, em grande parte das fontes de sangue de hospedeiros vertebrados, o repasto sanguíneo adicional sirva como nova fonte de nutrientes, estimulando o crescimento da população total de parasitos *Leishmania*.

Fonte sanguínea	% flebotomíneos infectados	Número de parasitos	Proporção de metacíclico (%)
<i>Mus musculus</i>	47	6.2X10 ⁴	17
<i>Homo sapiens</i>	64	1.7X10 ⁵	12
<i>Equus asinus</i>	87,5	1.1X10 ⁵	13
<i>Bos taurus</i>	50	1.2X10 ⁵	16
<i>Equus caballus</i>	58,5	1.2X10 ⁵	14
<i>Ovis aries</i>	30,5	3.4X10 ⁴	15
<i>Sus scrofa</i>	27	5.6X10 ⁴	15
<i>Canis familiares</i>	50	2.3X10 ⁴	13
<i>Gallus domesticus</i>	90	4.7X10 ⁴	16

Tabela 1: Efeito do repasto sanguíneo adicional no número de parasitos e na metaciclogênese de acordo com o animal doméstico utilizado como fonte de sangue.

Fonte: Arquivo pessoal

Por fim, vimos que os flebotomíneos alimentam-se de sangue oriundo de diferentes vertebrados de forma oportunista. Em geral, o segundo repasto sanguíneo de vetores infectados aumenta sua capacidade de transmitir *Leishmania*. Esse fato pode fornecer uma vantagem seletiva para a competência vetorial de algumas espécies de flebotomíneos, na transmissão de *Leishmania* para hospedeiros vertebrados.

A transmissão

Vários eventos podem interferir na transmissão da *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado. Um deles consiste no bloqueio físico ou biológico do lúmen da válvula estomodeal do flebotomíneo devido ao acúmulo de parasitos

Leishmania. Como já mencionado nesse capítulo, esse bloqueio aumenta a eficiência de transmissão da *Leishmania* pelos flebotomíneos por perturbar seu comportamento hematófago, fazendo-os picar a pele dos vertebrados diversas vezes. Esse processo ocorre porque os parasitos causam danos físicos na válvula estomodal, provavelmente devido à ação da quitinase de *Leishmania*, e facilitam a regurgitação dos promastigotas metacíclicos infectantes na pele dos vertebrados (Schlein et al., 1992; Volf 2004). Somado a isso, um estudo realizado por Killick-Kendrick e Molyneaux (1981) revelou que os promastigotas metacíclicos interferem diretamente nas sensilas do aparelho bucal, controlando a sondagem e alimentação, influenciando a taxa e direção do sangue no canal alimentar e, assim, promovendo a liberação dos parasitos na pele dos vertebrados.

Após a laceração do vaso, a saliva é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo, promovendo uma alimentação rápida. Esses eventos físicos e biológicos podem causar mudanças no comportamento dos insetos para facilitar a inoculação de parasitos. Fatores como a lesão do tecido vertebrado causada pela picada, a PSG e a saliva facilitam a entrada bem-sucedida do parasito, exacerbando a infecção (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2004; Peters et al., 2008; Oliveira et al., 2008). Outros fatores que podem influenciar na transmissão de *Leishmania* são a microbiota nativa e a rápida produção de interleucina-1 β (IL-1 β). A microbiota do intestino médio inicia uma resposta pró-inflamatória precoce, via ativação do inflamassoma e produção de IL-1 β . Isso intensifica o recrutamento sustentado de neutrófilos para o local da picada. Essa resposta inflamatória precoce facilita os eventos que gerenciam a visceralização bem-sucedida dos parasitos e promove o estabelecimento da leishmaniose (Dey et al., 2018). Esses estudos elucidaram o mecanismo de transmissão de *Leishmania*, por picadas de flebotomíneos do Novo e Velho Mundo.

Um modelo de estudo de transmissão experimental de *Le. major* para camundongos hospedeiros de *P. papatasi* só foi obtido em 2003. Antes disso, todo o conhecimento gerado sobre o processo de infecção e estabelecimento de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados ocorria por meio de inoculação experimental dos parasitos de forma subcutânea ou intradérmica. Esse modelo permitiu que vários grupos entendessem o ponto de vista da transmissão de *Leishmania* do vetor para o hospedeiro vertebrado de forma natural (picada infecciosa). Em resumo, três aspectos foram relevantes: a duração do repasto, o número de picadas e a dose de *Leishmania* transmitida ao hospedeiro.

Os experimentos de rotina tradicionais usam diferentes quantidades de parasitos para obter a transmissão para o hospedeiro vertebrado (10^2 - 10^7 parasitos/mL) (Belkaid et al., 1998 e 2000). Um estudo realizado com um modelo

experimental, que coleta parasitos por meio de membrana, demonstrou que existe uma variação na quantidade de *Le. mexicana* regurgitada por *Lu. longipalpis* (variação de 10 a 10^3 parasitos) (Rogers et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que *P. papatasi* pode inocular de 10^2 a 10^4 parasitos *L. major* no tecido do hospedeiro (Warburg e Schlein, 1986). Outro fato observado é que o número de parasitos transmitidos pelo vetor flebotomíneo varia: cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 6×10^2 promastigotas ou menos, enquanto os outros 25% injetaram mais de 10^3 . Um estudo semelhante estabeleceu que *Le. infantum* pode ser transmitida eficientemente para camundongos e hamsters pela picada de *Lu. longipalpis* (vetor da leishmaniose visceral americana), indicando que ambos os animais são bons modelos experimentais. A quantidade/dose de *Le. infantum* que foi transmitida em cada picada variou de 10 a 10^4 parasitos, mas 75% dos flebotomíneos transmitiram menos de 3×10^2 parasitos (Secundino et al., 2012).

Na natureza, além da variação na quantidade de parasitos que os flebotomíneos podem transmitir, o número de parasitos adquiridos por eles (por repasto sanguíneo infectante no hospedeiro vertebrado) provavelmente também ocorre em quantidades variadas. Além disso, estudos mostraram que grupos de flebotomíneos infectados com quantidades iniciais maiores de parasitos tiveram infecções mais intensas e mais chance de transmiti-los durante uma segunda tentativa de alimentação. Da mesma forma, foi demonstrado que os níveis altos de infecção de vertebrados têm associação com flebotomíneos, que apresentavam, pelo menos, 3×10^4 parasitos por intestino médio (Kimblin et al., 2008). Portanto, a quantidade de parasitos que é transmitida ao hospedeiro vertebrado parece estar diretamente relacionada à gravidade da leishmaniose (Stamper et al., 2011).

Em conclusão, após a picada e transmissão do parasito *Leishmania* do vetor para o vertebrado, as formas infectantes promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele, e macrófagos e neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da picada. Imediatamente após, os parasitos são fagocitados por essas células de defesa, dando continuidade ao ciclo do parasito, agora no corpo do hospedeiro vertebrado (van Zandbergen et al., 2004; Peters et al., 2008).

O papel da saliva na dinâmica da transmissão

O papel da saliva do flebotomíneo na transmissão de parasitos *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado foi, inicialmente, demonstrado por Titus e Ribeiro (1988), dando início uma linha de estudos que chegou ao ápice com a possível produção das vacinas de DNA produzidas a partir de componentes da saliva para combater a leishmaniose. Durante a repasto sanguíneo, o flebotomíneo introduz

as peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado e injeta saliva. Depois que os vasos sanguíneos são lacerados, a saliva é responsável por manter o fluxo sanguíneo e garantir um repasto sanguíneo rápido e eficiente. A maioria dos componentes da saliva modula a resposta do vertebrado à infecção e auxilia na diferenciação dos parasitos.

As principais funções da saliva são: (a) inibição da agregação plaquetária pela destruição do agonista difosfato de adenosina (ADP); (b) bloqueio da hemostasia do hospedeiro pela inibição da cascata da coagulação sanguínea (inibição da ativação plaquetária, produção do fator de coagulação e conversão de fibrinogênio em fibrina); (c) vasodilatação; (d) função anestésica para evitar que o hospedeiro perceba a picada; e (e) um inibidor da via clássica da cascata do complemento (Ribeiro et al., 1995; Ribeiro, Francischetti, 2003, revisão de Kamhawi em 2000, Charlab et al., 1999; Hamasaki et al., 2009; Valenzuela et al., 2001b, Cavalcante et al., 2003).

Nas últimas décadas, foi descrito que a adição experimental de pequenas quantidades de saliva de flebotomíneos poderia aumentar a infecção de vertebrados por *Leishmania*, demonstrando, pela primeira vez, o papel da saliva no desenvolvimento da doença, denominado “efeito potencializador” (Ribeiro, Titus, 1988). Além disso, o tamanho da lesão e o número de parasitos aumentam dramaticamente quando a saliva é adicionada ao inóculo durante a infecção experimental de murinos de laboratório, e um maior número de neutrófilos e macrófagos são recrutados (Peters et al., 2009). Curiosamente, o papel da saliva do vetor em aumentar a infectividade do parasito *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado é restrito aos flebotomíneos, uma vez que os componentes da saliva de outros artrópodes não produzem o mesmo efeito (Howard 1986; Ribeiro, Titus 1988). A saliva de *Aedes aegypti*, *Rhodnius prolixus* ou *Ixodes scapularis* não aumenta a infectividade de camundongos por *Le. major* (Titus et al., 1988, Lestnova et al., 2017). O aumento da infectividade devido à saliva do flebotomíneo foi demonstrado através de experimentos que utilizaram camundongos suscetíveis e resistentes co-inoculados com *Le. major* e saliva no *P. papatasi* (Mbow et al., 1998; Belkaid et al., 1998). Resultados semelhantes foram observados nas seguintes combinações parasito/vetor: *Le. braziliensis*/*Lu. intermedia* (Samuelson et al., 1991), *Le. mexicana*/*Lu. longipalpis* (Theodos et al., 1991), *Le. braziliensis*/*Lu. longipalpis* (Samuelson et al., 1991), *L. infantum chagasi*/*L. amazonensis* (Theodos et al., 1991; Warburg et al., 1994), *L. mexicana*/*Lu. longipalpis* (Samuelson et al., 1991), *Le. braziliensis*/*Lu. whitmani* (Bezerra et al., 2001) e *Le. maior*/*P. duboscqi* (Rohoušová et al., 2011). Os flebotomíneos vetores mais estudados em relação às propriedades da saliva são

Lu. longipalpis, *P. papatasi*, e *P. dubosqui*, amplamente reconhecidos por produzirem saliva com alta atividade imunomoduladora (ver revisão em Kamawahi 2000, Lestinova et al., 2017). A abundância de estudos com essas espécies se deve ao fato de serem massivamente colonizados.

Warburg & Lanzaro (1994) demonstraram que um componente da saliva de flebotomíneos chamado maxadilan, com efeito vasodilatador e indutor de eritema, poderia induzir a manifestação clínica da visceralização de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. Esse efeito foi descoberto com a observação inicial de que *Le. infantum* transmitida por *Lu. longipalpis* do Brasil, espécie que possui maxadilan na saliva pode facilitar a visceralização. No entanto, quando os mesmos parasitos são transmitidos por *Lu. longipalpis* da Colômbia, que apresenta atividade maxidilan menos potente, as infecções geralmente resultam apenas em lesões cutâneas. Os autores também testaram a saliva de flebotomíneos da Costa Rica e verificaram que seu componente maxadilan é deficiente e gera uma atividade vasodilatadora muito baixa, mas sua saliva aumenta fortemente a proliferação cutânea de infecções por *Leishmania*. Os autores concluíram que a quantidade de maxidilan inoculada por *Lu. longipalpis* infectados com *Le. infantum* determina se os parasitos migram para órgãos internos ou permanecem na pele dos vertebrados (Warburg, Lanzaro, 1994).

Em 1998, Belkaid e colaboradores desenvolveram um novo modelo de leishmaniose cutânea em camundongos para estudar, em detalhes, o efeito da saliva. Os autores infectaram orelhas de camundongos para observar o desenvolvimento da lesão, bem como a inflamação aguda e crônica. Os resultados mostraram que a saliva de *P. papatasi* e de *Lu. whitmani* aumentam a infecção por *Le. major* e *Le. braziliensis*, respectivamente (Bezerra, Teixeira 2001). Adicionalmente, foi reportado que algumas substâncias antigênicas da saliva de flebotomíneos podem induzir um tipo de hipersensibilidade retardada (DTH), a qual foi observada tanto em hospedeiros murinos quanto humanos (Belkaid et al., 2000). Corroborando esse resultado, foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de IgG anti-saliva e a resposta de DTH em crianças de uma área brasileira endêmica para leishmaniose visceral (Barral et al., 2000).

Estudos experimentais apontaram os componentes da saliva como fortes candidatos para uma vacina contra a leishmaniose. Foi demonstrado que uma pré-exposição de camundongos com a saliva não infectada de *P. papatasi* lhes confere um efeito protetor contra *Le. major* (Volf et al., 2000; Belkaid et al., 1998). Outros resultados, nesse campo, também mostraram uma redução no número de parasitos *Le. major* em camundongos pré-expostos à saliva de *P. papatasi*. Além

disso, uma proteína salivar de *P. papatasi* foi capaz de proteger camundongos contra infecção por *L. major* (Valenzuela et al., 2001, Valenzuela et al., 2002; Kamhawi et al., 2000; Elnaiem et al., 2005).

Atualmente, há inúmeros candidatos experimentais para vacinas derivadas de componentes da saliva de flebotomíneos, tais como: (a) o anti-complemento salivar de *Lu. longipalpis* (SALO); (b) um componente proteico da saliva denominado lufaxina; e (c) uma proteína salivar denominada PdSP15. As vacinas produzidas a partir de (SALO) (Gomes et al., 2008, Asojo et al., 2017) e lufaxina (Collin et al., 2009, Mendes-Sousa et al., 2017) de *Lu. longipalpis* podem proteger hamsters e cães contra *Le. infantum*, enquanto a proteína PdSP15 de *P. duboscqi* e *P. papatasi* pode proteger camundongos (Valenzuela et al., 2001) e primatas não humanos (Oliveira et al., 2015) contra a infecção por *Le. major*. A SALO é mais provável de funcionar como uma vacina específica para *Lu. longipalpis* e a vacina baseada em PdSP15 é restrita para proteger contra a transmissão de *Le. major* por flebotomíneos dos subgêneros *Phlebotomus* e *Paraphlebotomus*. Já a lufaxina, até agora, é considerada a melhor candidata à vacina, por ser uma proteína conservada e compartilhada entre flebotomíneos do Velho e do Novo Mundo (Coutinho-Abreu, Valenzuela, 2018).

Existem inúmeras vacinas experimentais sendo desenvolvidas para proteger contra as formas cutânea e visceral da leishmaniose em humanos. Vários fatores precisam ser abordados para se ter uma vacina bem-sucedida. Peters et al. (2009) mostraram que, para ser protetora, uma vacina precisa ser testada através da picada de flebotomíneos. Devemos ter em mente que a imunogenicidade de proteínas salivares, do PSG, e de outros produtos secretados pelo parasito em conjunto são elementos que podem conferir proteção em vários modelos animais e podem ser úteis para o desenvolvimento de vacinas contra *Leishmania* (Collin et al., 2009, Abdeladhim et al., 2014). Uma atualização da literatura mais detalhada sobre este assunto pode ser encontrada nos artigos do grupo do Dr. Valenzuela (Anderson et al., 2006; Oliveira et al., 2008, 2015; Teixeira et al., 2010, Hosseini-Vasoukolaei et al., 2016; Ferreira et al., 2016, Karmakar et al., 2021; Serafim et al., 2021).

Finalmente, além de servir na imunização de hospedeiros vertebrados, outra utilidade das propriedades da saliva é monitorar a exposição de humanos e de outros hospedeiros vertebrados às picadas de flebotomíneos. Através de ensaios imunogênicos, foram detectados anticorpos contra a saliva de flebotomíneos, o que sugere que alguns componentes da saliva podem ser usados como marcador de risco para transmissão de *Leishmania* em áreas endêmicas (Barral et al., 2000; Clements et al., 2010).

A microbiota nativa: seu efeito na infecção e transmissão

O vetor flebotomíneo é exposto a uma comunidade microbiana diversificada durante sua vida, contribuindo para a formação de sua microbiota intestinal. Nas últimas décadas, estudos sobre bactérias e fungos associados aos flebotomíneos ganharam relevância. Observou-se que a microbiota desempenha um papel essencial no desenvolvimento de *Leishmania* no trato digestivo dos vetores. A microbiota nativa do intestino médio do vetor flebotomíneo pode regular negativa ou positivamente o desenvolvimento, a colonização e a transmissão do patógeno *Leishmania* (Dillon et al., 1996; Volf et al., 2002; Sant'Anna et al., 2014; Maleki-Ravasan et al., 2015).

A fauna microbiana de flebotomíneos, assim como de outros dípteros, é uma comunidade dinâmica. Sua composição muda ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (larva, pupa e adulto). A microbiota é fortemente influenciada pelo ambiente e pelas fontes de alimentos que são utilizadas durante o ciclo de vida do vetor. Por exemplo, os flebotomíneos podem adquirir bactérias simbióticas durante seus estágios imaturos, alimentando-se da matéria orgânica do solo úmido em que crescem. Desse alimento larval, alguns dos simbiossitos permanecem como parte da microbiota adulta, sugerindo que a transmissão transestadial ocorre após o processo de pupação (Volf et al., 2002; Dillon, Dillon, 2004; Peterkova-Koci et al., 2012; Hassan et al., 2014). Outro fator que pode modificar a diversidade da microbiota do flebotomíneo adulto é a fonte alimentar e os hábitos dos indivíduos, já quando adultos. Tanto as fêmeas quanto os machos se alimentam de seiva de plantas e néctar de pulgões, podendo adquirir uma variedade de microrganismos. Além disso, durante a alimentação sanguínea, microrganismos, tais como bactérias, fungos e parasitos podem ser ingeridos, estabelecendo-se na comunidade microbiana pré-existente (Review Sacks, Kamhawi 2001, Serafim et al., 2018).

As interações entre as comunidades microbianas e *Leishmania* durante o ciclo de vida do parasito no flebotomíneo permanecem pouco conhecidas. Alguns estudos demonstraram que os componentes bacterianos da microbiota interferem no desenvolvimento de *Leishmania* no vetor flebotomíneo. Por exemplo, a bactéria *S. marcescens*, conhecidamente patogênica para muitos insetos (Grimont et al., 1979), interagiu negativamente com *Le. infantum chagasi* e *Le. braziliensis*, induzindo a lise da membrana celular do parasito (Moraes et al., 2008, 2009). Adicionalmente, um estudo *in vivo* revelou que, quando *Lu. longipalpis* foi previamente alimentado com uma suspensão microbiana de *Pseudozyma* sp., *Asaia* sp. ou *Ochrobactrum intermedium*, suas taxas de infecção com *Le.*

mexicana foram reduzidas em comparação com os controles sem tratamento bacteriano (Santana et al., 2014). Outro estudo mostrou que, quando os flebotômíneos pré-infectados são desafiados com um título elevado da bactéria *S. marcescens* (5×10^7 UFC/ml), eles sobrevivem por mais tempo em comparação com o controle (não infectado, mas desafiado com bactérias). Esse fato sugere que a *Leishmania* pode proteger diretamente o flebotômíneo da infecção bacteriana ou modular seu efeito ao estimular a resposta imune do hospedeiro, como observado em outros modelos, por exemplo, em *Anopheles gambiae* infectados com *Plasmodium* (Simoes, Dimopoulos, 2015).

Um estudo recente, utilizando o sequenciamento de rRNA 16S demonstrou o perfil da microbiota intestinal de *Lu. longipalpis*, o principal vetor da LV no Brasil, e revelou treze gêneros bacterianos distintos (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Pseudocitrobacter*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Solibacillus*) (Campolina et al., 2020). Após um co-cultivo das bactérias identificadas com distintas espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*, foi observada uma redução no crescimento de todos os parasitos testados, sugerindo um potencial papel da microbiota intestinal de impedir a transmissão do parasito pelo vetor flebotômíneo (Campolina et al., 2020). Em contraste com os estudos que mostram um efeito negativo da microbiota no desenvolvimento de *Leishmania*, resultados mais recentes sugerem que a microbiota normal é essencial para o desenvolvimento e a sobrevivência do parasito, uma vez que o tratamento de flebotômíneos com antibiótico inibe o crescimento e a diferenciação do parasito na forma metacíclica infecciosa (Kelly et al., 2017, Louradour et al., 2017).

Usando uma análise metagenômica de alto rendimento, McCarthy e colaboradores (2011), Pires e colaboradores (2017) e Monteiro e colaboradores (2016) relataram que as bactérias gram-negativas são predominantes em flebotômíneos alimentados com sangue. Além disso, foi demonstrado que em diferentes espécies de flebotômíneos, a riqueza e a abundância de bactérias modulam o estado fisiológico e são reguladas pela presença ou pela ausência de *Leishmania* no trato digestivo (Monteiro et al., 2016; Pires et al., 2017). Também foi visto que existe uma clara separação da comunidade bacteriana entre os flebotômíneos que possuem sangue no intestino médio e aqueles que não possuem (Pires et al., 2017).

A presença de bactérias no intestino médio de flebotômíneos pode influenciar o desenvolvimento e a sobrevivência de *Leishmania*. Isso porque a microbiota intestinal desempenha um papel importante no estabelecimento de infecções por *Leishmania*. A natureza dinâmica da comunidade bacteriana pode

ser uma arma muito útil na modulação das interações tripartite hospedeiro-microbiota-patógeno, possibilitando a identificação de microrganismos com potencial para serem utilizados no desenvolvimento de estratégias de controle da leishmaniose.

Estudos recentes sobre a importância e o papel da microbiota rompem a antiga ideia de que o flebotômíneo seria apenas a “ponte” que leva os parasitos da *Leishmania* entre os diferentes hospedeiros. Hoje, sabe-se do potencial efeito da microbiota da pele de hospedeiros e intestinais do flebotômíneo na progressão da leishmaniose. Também se entende como a microbiota intestinal dos flebotômíneos está associada à fisiologia desses insetos vetores e do papel que ela tem no desenvolvimento do parasito no flebotômíneo (Kelly et al., 2017; Louradour et al., 2017; Pires et al., 2017; Telleria et al., 2018; Omondi, Demir, 2020; Campolina et al., 2020; Serrafim et al., 2021). Embora ainda haja muito a ser elucidado sobre os efeitos da microbiota, atualmente, entende-se que ela apresenta um papel muito mais crítico e complexo, no desenvolvimento da *Leishmania* e no sucesso da transmissão.

Reconhecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da FIOCRUZ, do CNPq, FAPEMIG, de Raquel Maia Godoy, Thais Bonifácio Campolina e Barbara Chaves, que são pós-doutorandas pelo INCTEM, CAPES e da Inova Fiocruz, respectivamente.

Referências

- Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG (2014) What's behind a sandfly bite? The profound effect of sandfly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol* 28: 691-703. PM:25117872.
- Adler S (1938) Factors determining the Behaviour of *Leishmania* sp. in Sandflies. *Harefuah* 14.
- Adler S. (1964) *Leishmania*. *Adv Parasitol*; 2: 35-91.
- Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, Lawyer P, Garfield M, Pham MV, Valenzuela JG. (2006) Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*. 7:52.
- Asojo OA, Kelleher A, Liu Z, Pollet J, Hudspeth ME, Rezende WC, Groen MJ, Seid CA, Abdeladhim M, Townsend S, Castro W, Mendes-Sousa A, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Bottazzi MT, Hotez PJ, Zhan B, Oliveira F, Kamhawi S, Valenzuela JG. (2017) Structure of SALO, a leishmaniasis vaccine candidate from the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS Negl Trop Dis*;11:e0005374. doi: 10.1371/journal.pntd.0005374.
- Atayde V.D., Suau H.A., Townsend S., Hassani K., Kamhawi S., Olivier M. (2015) Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sandfly midgut. *Cell Rep*;13:957–967. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.058.
- Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro JM (2000) Human immune response to sandfly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745. PM:11304066
- Bates PA, Rogers ME. (2004) New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*; 4:601-9.
- Bates, PA. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106. Epub Apr 18.
- Beach, R; Kiilu, G; Leeuwenburg, J. (1985) Modifications of sandfly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg*; 34:27882.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*; 10.1084/jem.188.10.1941.
- Belkaid, Y; Valenzuela, JG; Kamhawi, S; Rowton, E; Sacks, DL; Ribeiro, JM. (2000) Delayed type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sandfly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97(12):6704–9.

Berner R, Rudin W, Hecker H (1983) Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta: Diptera) under normal and experimental conditions. *J Ultrastruct Res* 83: 195-204.

Bezerra HS, Teixeira MJ. (2001) Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;96(3):349–51.

Borovsky D, Schlein Y (1987) Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1: 235-242. PM:2979536.

Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, Svobodova M, Beverley SM, Spath G, Brun R (2004) Characterization of a defensin from the sandfly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72: 7140-7146. PM:15557638.

Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL (1996) Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the Leishmania-sandfly interaction. *J Biol Chem* 271: 20573-20579. PM:8702802.

Campolina, Thais Bonifácio, et al. "Tripartite interactions: Leishmania, microbiota and Lutzomyia longipalpis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14.10 (2020): e0008666.

Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF (2003) Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol* 127: 87-93.

Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JMC (1999) Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci* 96: 15155-15160.

Ciáková J, Volf P. (1997) Development of different *Leishmania major* strains in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Ann Trop Med Parasitol*; 91(3):267-79.

Clements MF, Gidwani K, Kumar R, Hostomska J, Dinesh DS, Kumar V, Das P, Müller I, Hamilton G, Volfova V, Boelaert M, Das M, Rijal S, Picado A, Volf P, Sundar S, Davies CR, Rogers ME. (2010) Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg*; 82(5):801–7.

Coelho-Finamore, JM; Freitas, VC; Assis, RR; Melo, MN; Novozhilova, N; Secundino, N F; Pimenta, PF; Turco, SJ; Soares, RP (2011) *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International Journal for Parasitology*, v. 41, n. 3-4, p. 333-342.

Coutinho-Abreu IV and Valenzuela JG (2018) Comparative Evolution of Sandfly Salivary Protein Families and Implications for Biomarkers of Vector Exposure and Salivary Vaccine Candidates.

Dey R, Joshi AB, Oliveira F, Pereira L, Guimaraes-Costa AB, Serafim TD, de Castro W, Coutinho-Abreu IV, Bhattacharya P, Townsend S, Aslan H, Perkins A, Karmakar S, Ismail N, Karetnick M, Meneses C, Duncan R, Nakhasi HL, Valenzuela JG and Kamhawi S (2018) Gut microbes egested during bites of infected sandflies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1beta. *Cell Host & Microbe* 23, 134–143 e136.

Dillon, RJ; Dillon, VM (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 49:71-92.

Dillon, RJ; el Kordy, E; Shehata, M; Lane, RP (1996) The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol*. Dec; 90(6):669-73.

Dobson DE, Kamhawi S, Lawyer P, Turco SJ, Beverley SM, Sacks DL. (2010) *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sandfly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. *PLOS pathogens*. 6(11): e1001185.

Elnaiem DA, Hassan HK, Ward RD (1997) Phlebotomine sandflies in a focus of visceral leishmaniasis in a border area of eastern Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 91: 307-318. PM:9229023.

Elnaiem DE, Meneses C, Slotman M, Lanzaro GC (2005) Genetic variation in the sandfly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* 14: 145-150. PM:15796747.

Ferreira VP, Fazito V, V, Pangburn MK, Abdeladhim M, Mendes-Sousa AF, Coutinho-Abreu IV, Rasouli M, Brandt EA, Meneses C, Lima KF (2016) SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Sci Rep* 6: 19300. PM:26758086.

Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. (2008) Immunity to a salivary protein of a sandfly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105:7845-50.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*; 33: 1027-34.

Grimont PA, Grimont F, Le Minor S, Davis B, Pigache F. (1979) Compatible results obtained from biotyping and serotyping in *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol*; 10:425-32; PMID:393712.

Hassan, MI; Al-Sawaf, BM; Fouda, MA; Al-Hosry, S; Hammad, KM. (2014) A recent evaluation of the sandfly, *Phlebotomus papatasi* midgut symbiotic bacteria effect on the survivorship of *Leishmania major*. *J Anc Dis Prev Rem*;2 (Suppl. 1):110.

- Hegedus, D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. (2009) New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. 1, p. 285–302.
- Hosseini-Vasoukolaei N, Idali F, Khamesipour A, Yaghoobi-Ershadi MR, Kamhawi S, Valenzuela JG, Edalatkhah H, Arandian MH, Mirhendi H, Emami S (2016) Differential expression profiles of the salivary proteins SP15 and SP44 from *Phlebotomus papatasi*. *Parasit Vectors* 9: 357. PM:27342811.
- Howard JG (1986) Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *Int Rev Exp Pathol*;28:79–116.
- Kamhawi S (2000) The biological and immunomodulatory properties of sandfly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2: 1765-1773. PM:11137049.
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000a.) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354. PM:11082061.
- Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E, Sacks DL (2000b.) The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121 (Pt 1): 25-33. PM:11085222.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG (2004) A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119: 329-341. PM:15543683.
- Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*; 22 (9): 439-45.
- Karmakar S, Nath S, Sarkar B, Chakraborty S, Paul S, Karan M, Pal C. Insect vectors' saliva and gut microbiota as a blessing in disguise: probability versus possibility. *Future Microbiol.* 2021 Jun;16:657-670.
- Kelly, PH; Bahr, SM; Serafim, TD; Ajami, NJ; Petrosino, JF; Meneses, C, Kirby JR, Valenzuela JG, Kamhawi S, Wilson ME. (2017) The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*;8(1): e01121–16.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH (1981) Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 152-154. PM:7268854.
- Killick-Kendrick, R; Leaney, AJ; Ready, PD. (1977) The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 13: 429-440.
- Killick-Kendrick, RR; Leaney, AJ; Ready, PD; Molyneux, DH. (1977b) *Leishmania* in Phlebotominae sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamster by bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B*; 196:105-15.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 10125-10130. PM:18626016.

Klowden, MJ. (2013) Metabolic Systems. In: Klowden, MJ (Ed.). . Physiological Systems in Insects. Third ed. [s.l.] Academic Press. p. 305–364.

Lainson, R; Shaw, JJ (1979) The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: WHR Lumsden and DA Evans, Biology of the Kinetoplastida, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 1-120.

Lawyer PG, Rowton ED, Perkins PV, Johnson RN, Young DG (1990) Recent advances in laboratory mass rearing of phlebotomine sand flies. Parassitologia 33 Suppl: 361-364. PM:1841228.

Lawyer, PG; Ngumbi, PM; Anjili, CO; Odongo, SO; Mebrahtu, YB; Githure, JI; Koech, DK; Roberts, CR. (1990) Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg; 43(1): 31-43.

Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. (2017) Insights into the sandfly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):e0005600. Published Jul 13. doi:10.1371/journal.pntd.0005600.

Louradour I, Monteiro CC, Inbar E, Ghosh K, Merkhofer R, Lawyer P, Paun A, Smelkinson M, Secundino N, Lewis M, Erram D, Zurek L and Sacks D (2017) The midgut microbiota plays an essential role in sandfly vector competence for *Leishmania major*. Cell Microbiology 19, e12755, doi: 10.1111/cmi.12755.

Maia C., Dantas-Torres F., Campino L. (2018) Parasite Biology: The Reservoir Hosts. In: Bruschi F., Gradoni L. (eds) The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. Springer, Cham.

Mahoney, AB; Sacks, DL; Saraiva, E; Modi, G; Turco, SJ. (1999) Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sandfly interactions. Biochemistry. Aug 3;38(31):9813-23.

Maleki-Ravasan N; Oshaghi MA; Afshar D; Arandian MH, Hajikhani S , Akhavan AA, Yakhchali B, Shirazi MH, Rassi Y, Jafari R, Aminian K, Fazeli-Varzaneh RA, Durvasula R., (2015) Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. Parasit Vectors. Jan 29; 8:63.

Malta J, Martins GF, Weng JL, Fernandes KM, Munford ML, Ramalho-Ortigao M (2016) Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sandfly vector *Phlebotomus papatasi*. Acta Trop 159: 161-169. PM:27012717.

Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG (1998) *Phlebotomus papatasi* Sandfly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, but Up-Regulates a Th2, Response in Mice Infected with *Leishmania major*. J Immunol 161: 5571- 5577.

McCarthy, CB; Diambra, LA; Pomar, RVR. (2011) Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, using an unbiased High- Throughput Approach. PLoS Negl Trop Dis. 5(9): e1304.

McConville, MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. (1990) Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. Journal Biological Chemistry, Baltimore, v. 265, p. 19611-19623.

McConville MJ, Blackwell JM (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. J Biol Chem 266: 15170-15179. PM:1831200.

Mendes-Sousa AF, Vale VF, Silva NC, Guimarães-Costa AB, Pereira MH, Sant'anna MR, Oliveira F, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Andersen JF, Valenzuela JG, Araujo RN.. (2017) The sandfly salivary protein lufaxin inhibits the early steps of the alternative pathway of complement by direct binding to the proconvertase C3b-B. 1065; Front Immunol;8.

Miller N, Lehane MJ (1993) Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. Parasitol Today 9: 45-50. PM:15463702.

Miranda JC, Secundino NF, Nieves E, Souza AP, Bahia AC, Prates DB, Miranda ND, Nacif-Pimenta R, Pinto LC, Barral A, Pimenta PFP., (2008) Studies of the influence of the presence of domestic animals on increasing the transmission probabilities of leishmaniasis. Ann Med Entomol 17: 9-15.

Monteiro, CC, Villegas LE, Campolina TB, Pires AC, Miranda JC, Pimenta PF, Secundino NF. (2016) Bacterial diversity of the American sandfly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. Parasites & Vectors, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, v. 480, n. 9, p.1-6, 31 ago.

Moraes, CS; Seabra, SH; Albuquerque-Cunha, JM; Castro, DP; Genta, FA; de Souza, W; Brazil, RP; Garcia, ES; Azambuja, P. (2009) Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. Experimental Parasitology, 122 84–90.

Moraes, CS; Seabra, SH; Castro, DP; Genta, FA; Brazil, RP; de Souza, W; Garcia, ES; Azambuja, P.(2008) *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. Experimental Parasitology, 118 561–568.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P (2007) A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect 9: 317-324. PM:17307009.

Nieves E, Pimenta PF (2000) Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sandfly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 37: 134-140. PM:15218917.

Nieves E, Pimenta PF (2002) Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sandfly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 67: 640-647. PM:12518856.

Nogueira P. M., Assis R. R., Torrecilhas A. C., Saraiva E. M., Pessoa N. L., Campos M. A., Marialva EF, Ríos-Velasquez CM, Pessoa FA, Secundino NF, Rugani JN, Nieves E, Turco SJ, Melo MN, Soares RP. (2016). Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sandfly infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–17. 10.1371/journal.pntd.0004848 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].

Nogueira P. M., Guimarães A. C., Assis R. R., Sadlova J., Myskova J., Pruzinova K., Hlavackova J, Turco SJ, Torrecilhas AC, Volf P, Soares RP. (2017). Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites Vectors* 10:608 10.1186/s13071-017-2568-8.

Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG (2008) Immunity to distinct sandfly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e226. PM:18414648.

Oliveira F, Rowton E, Aslan H, Gomes R, Castrovinci PA, Alvarenga PH, Abdeladhim M, Teixeira C, Meneses C, Kleeman LT, Guimarães-Costa AB, Rowland TE, Gilmore D, Doumbia S, Reed SG, Lawyer PG, Andersen JF, Kamhawi S, Valenzuela JG. (2015) A sandfly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 7:290ra90. 10.1126/scitranslmed.aaa3043 .

Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, Lemos FJ (2002) *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 517-523. PM:11891128.

Peterkova-Koci, K; Robles-Murguía, M; Ramalho-Ortigao, M; Zurek, L. (2012) Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors.* Jul 24; 5():145.

Peters N.C., Kimblin N., Secundino N., Kamhawi S., Lawyer P., Sacks D.L. (2009) Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog.* ;5:e1000484. doi: 10.1371/journal.ppat.1000484.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970-974. PM:18703742.

Peters W. (1992) Peritrophic membranes, Zoophysiology series. V30, Springer, Berlin, 238pp.

Pimenta P. F., Saraiva E. M., Sacks D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.* 72, 191–204 10.1016/0014-4894(91)90137-L .

Pimenta PF, da Silva RP, Sacks DL, Da Silva PP (1989) Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur J Cell Biol* 48: 180-190. PM:2743996.

Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology* 115 (Pt 4): 359-369. PM:9364562.

Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9155-9159. PM:8090785.

Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815. PM:1615326.

Pimenta P.F.P., de Freitas V.C., Monteiro C.C., Pires A.C.M.A., Secundino N.F.C. (2018) Biology of the *Leishmania*–Sand Fly Interaction. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_6.

Pires, ACAM; Villegas, LEM; Campolina, TB; Orfanó, AS; Pimenta, PFP; Secundino, NFC. (2017) Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis *Parasit Vectors.*; 10: 627.

Pruzinova K, Sadlova J, Seblova V, Homola M, Votypka J, Volf P (2015) Comparison of Blood meal Digestion and the Peritrophic Matrix in Four Sandfly Species Differing in Susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS One* 10: e0128203. PM:26030610.

Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA (1995) Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem J* 308 (Pt 1): 243-249. PM:7755571.

Ribeiro JMC, Francischetti IMV (2003) Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.

Richards AG, Richards PA (1997) The peritrophic membranes of insects. *Annu Rev Entomol* 22: 219-240. PM:319739.

Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I (2009) Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog* 5: e1000555. PM:19696894.

Rogers ME, Bates PA (2007) *Leishmania* manipulation of sandfly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog 3: e91. PM:17604451.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA (2002) The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology 124: 495-507. PM:12049412.

Rogers ME, Hajmova M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, Bates PA (2008) *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sandfly vectors and enhances transmission to mice. Cell Microbiol 10: 1363-1372. PM:18284631.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature 430: 463-467. PM:15269771.

Rohoušová I, Hostomská J, Vlková M, Kobets T, Lipoldová M, Volf P. (2011) The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sandfly bites is limited to short-term exposure. Int J Parasitol;41(5):481–5. S0020-7519(11)00033-6 [pii] .

Sacks DL (2001) *Leishmania*-sandfly interactions controlling species-specific vector competence. Cell Microbiol 3: 189-196. PM:11298643.

Sacks DL, da Silva RP (1987) The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. J Immunol 139: 3099-3106. PM:3312412.

Sacks DL, Hieny S, Sher A (1985) Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. J Immunol 135: 564-569. PM:2582050.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sandfly interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 406-411. PM:10618431.

Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 223: 1417-1419. PM:6701528.

Sadlova J, Hajmova M, Volf P. (2003) *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. Med Vet Entomol. 17:244–250. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00434.x.

Sádlová J, Volf P. (2009) Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell Tissue Res; 337(2):313-25.

Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. (1991) A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sandfly saliva. Journal of Experimental Medicine;173(1):49–54.

Sant'Anna, MR; Diaz-Albiter, H; Aguiar-Martins, K; Al Salem, WS; Cavalcante, RR; Dillon, VM; Bates PA, Genta FA, Dillon RJ. (2014) Colonisation resistance in the sandfly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. Parasit Vectors; 7:329.

Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL (1995) Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. Parasitology 111 (Pt 3): 275-287. PM:7567096.

Schlein Y, Borut S, Greenblatt CL (1987) Development of sandfly forms of *Leishmania major* in sucrose solutions. J Parasitol 73: 797-805. PM:3625431.

Schlein Y, Jacobson RL, Messer G (1992) Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 9944-9948. PM:1409724.

Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. Proc Biol Sci 245: 121-126. PM:1682935.

Schlein Y, Romano H (1986) *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). Exp Parasitol 62: 376-380. PM:3780930.

Schlein Y, Schnur LF, Jacobson RL (1990) Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 84: 353-355. PM:2260168.

Schlein Y, Warburg A (1986) Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J Med Entomol 23: 11-15. PM:3950922

Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks D (2010) Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. Cell Microbiol 12: 906-918. PM:20088949.

Secundino NF, de Freitas VC, Monteiro CC, Pires AC, David BA, Pimenta PF (2012) The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. Parasit Vectors 5: 20. PM:22260275.

Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J Med Entomol 42: 928-938. PM:16465730.

Serafim T.D., Coutinho-Abreu I.V., Oliveira F., Meneses C., Kamhawi S., Valenzuela J.G. (2018) Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. Nat Microbiol.

Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, Kamhawi S. Leishmaniasis: the act of transmission. Trends Parasitol. 2021 Nov;37(11):976-987.

Shakarian AM, Dwyer DM (1998) The *Ld Cht1* gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. Gene 208: 315-322. PM:9524285.

Shakarian AM, Dwyer DM (2000) Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol* 94: 238-242. PM:10831391.

Shortt HE, Swaminath CS (1928) The Method of Feeding of *Phlebotomus Argentipes* with Relation to Its Bearing on the Transmission of Kala-azar. *The Indian Journal of Medical Research* 15: 827-836.
https://books.google.com.br/books?id=oK_6OwAACAAJ.

Simoës, M. L., & Dimopoulos, G. (2015). A mosquito mediator of parasite-induced immune priming. *Trends in Parasitology*, 31(9), 402-404.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.07.004>.

Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araujo MS, Pimenta PF, Turco SJ (2005) *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol* 35: 245-253. PM:15722076.

Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, Pimenta PF, Turco SJ (2002) *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 213-224. PM:12034455.

Soares R. P., Margonari C., Secundino N. C., MacÊdo M. E., Da Costa S. M., Rangel E. F., Pimenta PF, Turco SJ . (2010). Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:827851.

Stamper LW, Patrick RL, Fay MP, Lawyer PG, Elnaiem D-EA, Secundino N, Debrabant A, Sacks DL, Peters NC. (2011) Infection Parameters in the Sandfly Vector That Predict Transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(8): e1288. doi:10.1371/journal.pntd.0001288.

Stierhof, YD; Bates, PA; Jacobson, RL; Rogers, ME; Schlein, Y; Handman, E. (1999) Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel like threedimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol*; 78:675-89.

Svárovská, A; Ant, TH; Seblová, V; Jecná, L; Beverley, SM; Volf, P. (2010) *Leishmania (L.) major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sandfly vectors. *PLoS Negl TropDis*.

Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, (2010) Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4: e638.

Tellam RL (1996) The peritrophic matrix. 1: 86-114.

Telleria EL, de Araujo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM and Traub-Cseko YM (2010) Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* – expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS ONE* 5, e10697.

Terra WR (1990) Evolution of Digestive Systems of Insects. Annual review of entomology 35: 181-200. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001145>.

Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 109: 1-62.

Terra, WR.; Ferreira, C. (2012) Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: Insect Molecular Biology and Biochemistry. [s.l.] Elsevier B.V. p. 365–418.

Theodos CM, Ribeiro JMC, Titus RG. (1991) Analysis of enhancing effect of sandfly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infection and Immunity;59(5):1592–8.

Titus RG, Ribeiro JM (1988) Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science 239: 1306-1308. PM:3344436.

Turco SJ, Descoteaux A (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol 46: 65-94. PM:1444269.

Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. J Exp Med 194: 331-342. PM:11489952.

Valenzuela, JG., Charlab R., Gonzalez EC., De Miranda-Santos IKF, Marinotti O, Francischetti IMB, Ribeiro JMC. (2002) The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. Insect Mol Biol, v .II, n.2, p.149-55.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol; 173:6521-5.

Vieira Td S., Rugani J. N., Nogueira P. M., Torrecilhas A. C., Gontijo C. M. F., Descoteaux A, Soares RP. (2019). Intraspecies polymorphisms in the lipophosphoglycan of *L. braziliensis* differentially modulate macrophage activation via TLR4. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:240. 10.3389/fcimb.2019.00240.

Vivenes A, Oviedo M, Márquez JC, Montoya-Lerma J (2001) Effect of a second bloodmeal on the oesophagus colonization by *Leishmania mexicana* complex in *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 281-283.

Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J (2004) Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. Int J Parasitol 34: 1221-1227. PM:15491584.

Volf P, Skarupová S, Man P. (2002) Characterization of the lectin from female of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. Eur J Biochem; 269:6294-301.

Volf P, Tesarova P, Nohynkova EN (2000) Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* 14: 251-256. PM:11016431.

Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. (1989) Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (*Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg*; 40:19-39.

Walters, LL; Irons, KP; Guzman, H; Tesh RB. (1993) Formation and composition of the peritrophic membrane in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 30:179-198.

Walters, LL; Irons, KP; Guzman, H; Tesh, RB. (1995) Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*; 32:711-25.

Walters, LL; Modi, GB; Tesh, RBM; Burrage, T. (1987) Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*; 36 (2): 294-314.

Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. (1986) Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Z Parasitenkd*; 72:423-31.

Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. (1986) The effect of post-blood-meal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*; 35:926-30.

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345: 223-230. PM:7972360

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*;345(1312):223–30.

Warburg A. (2008) The structure of the female sandfly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 102:161-6.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 14

Interação entre *Aedes aegypti* – vírus Dengue

Ana C. Bahia¹
Carla Polycarpo¹
Gabriela de Oliveira Paiva e Silva¹
Marilvia Dansa-Petretski²
Raquel Juliana Vionette do Amaral¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

² Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

Copyright: © 2024 [Ana C. Bahia, Carla Polycarpo, Gabriela de Oliveira Paiva e Silva, Raquel Juliana Vionette do Amaral, Marilvia Dansa-Petretski]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

A dengue é uma doença causada por 4 sorotipos diferentes do vírus Dengue (DENV1-4), que é transmitido por mosquitos fêmeas, portanto, uma arbovirose (*arthropod-borne-virus*). O principal transmissor do vírus da dengue é o mosquito *Aedes aegypti*, que vive em centros urbanos de regiões tropicais e subtropicais do globo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais da metade da população mundial se encontra sob o risco de ser infectada e estima-se que entre 100 e 400 milhões de infecções ocorrem todos os anos. A incidência global de casos de dengue aumentou de 30,67 milhões, em 1990, para 56,87 milhões, em 2019 (Du et al., 2021). No Brasil, o número de infecções anuais aumentou, significativamente, desde 2010. Em 2022, o Brasil registrou o maior surto de Dengue, com mais de 2 milhões de casos reportados (OPAS, acessado em março de 2022) e 1.017 óbitos (Ministério da Saúde, 2023), mais que o triplo, em relação a 2021. Os piores anos foram 2016, com 2,22 milhões de casos, e 2019, com 2,25 milhões de casos (Figura 1). Estima-se uma média de 40.000 mortes por ano¹.

A prevenção e o controle da dengue dependem, principalmente, de medidas de controle de vetores e se sabe que o envolvimento da comunidade é essencial para que elas sejam implementadas e mantidas. Atualmente, há apenas uma vacina aprovada com o vírus atenuado e que protege contra os 4 sorotipos de dengue (Rivera et al., 2022). Embora a maior parte das pessoas (80%) não desenvolva a doença grave, os DENVs causam um largo espectro de sintomas, variando desde uma doença subclínica (a maioria nem sabe que esteve infectado) a sintomas parecidos a uma gripe forte. Algumas pessoas desenvolvem a dengue severa, que tem várias complicações associadas, como hemorragia grave, disfunção grave dos órgãos e/ou extravasamento de plasma. É importante ressaltar que a dengue severa pode levar à morte.

Devido ao aquecimento global, existe uma grande preocupação de que a dengue se intensifique em áreas endêmicas, em decorrência de uma rápida amplificação viral e do aumento da sobrevivência, da taxa de picada e da reprodução do principal vetor, que é mais adaptado a ambientes mais quentes. Esses fatores levarão à ampliação das estações de transmissão, atingindo um número maior de pessoas e aumentando a probabilidade do surgimento do quadro severo da doença em uma população maior. Além disso, a expansão das

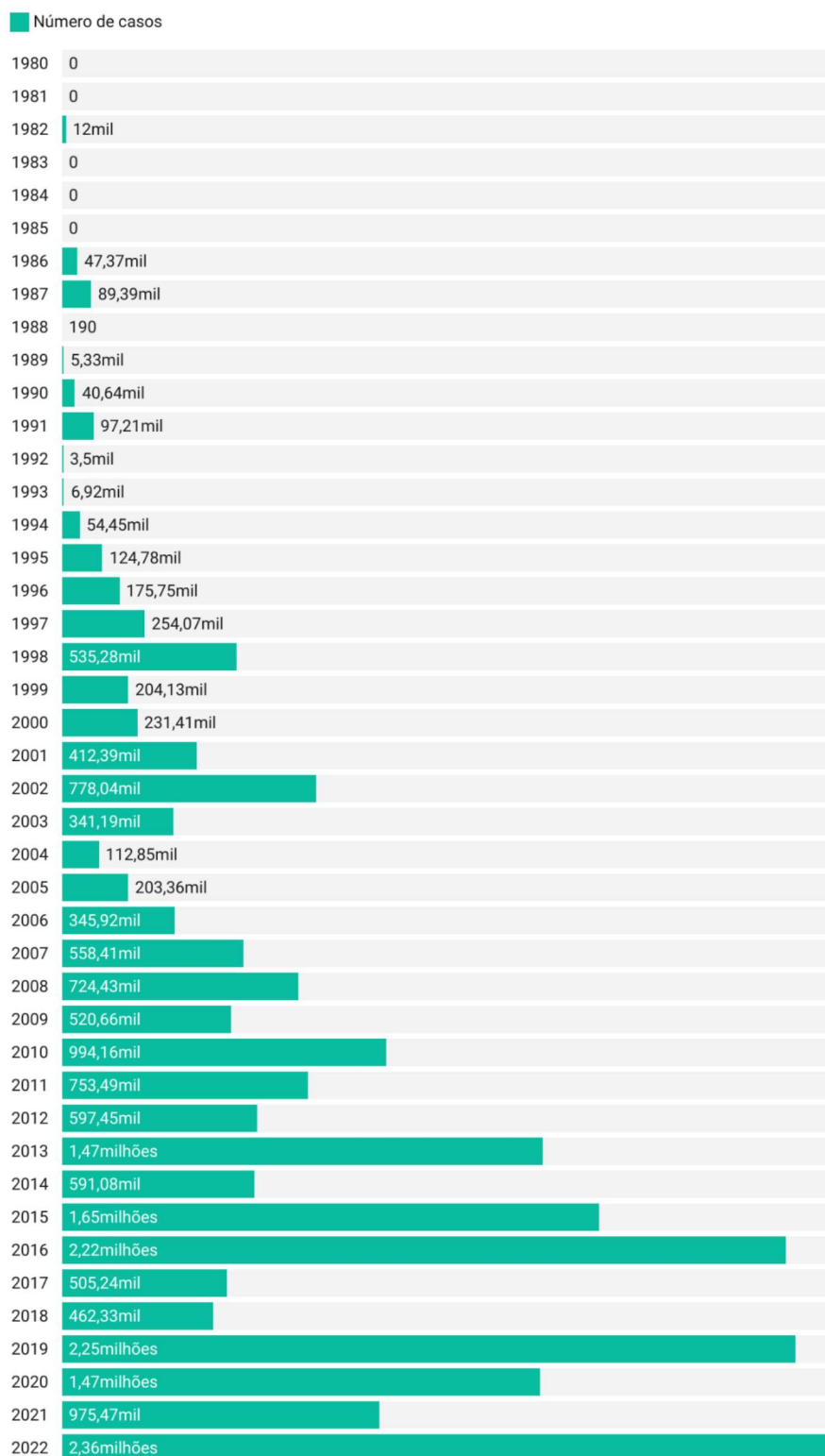
¹Fonte: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2015. Disponível em <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. Acessado [03/2023].

temperaturas mais altas para outros lugares do globo pode exacerbar essa situação, permitindo uma maior disseminação e transmissão de dengue para locais que, hoje, apresentam baixo risco ou não tem dengue autóctone, como a Austrália, a América do Norte, a Ásia e a Europa. Por outro lado, embora o aquecimento global contribua para a expansão da dengue, fatores como o crescimento populacional e o aumento da urbanização descontrolada em áreas tropicais serão as principais forças que ditarão quem estará sob risco no futuro. Um estudo de 2019, de Messina e colaboradores, mostrou que, provavelmente, haverá poucas mudanças na área global que possivelmente será afetada pela dengue até 2080, mas com mudanças significativas dentro de diversos países.

A maior parte dos Estados Unidos da América (EUA), lugares de altas altitudes no México central, norte da Argentina, interior da Austrália e grandes cidades da costa leste da China e do Japão devem passar a ser adequados para a disseminação de dengue. O continente com maior mudança em relação ao risco de dengue é a África, principalmente as áreas sul e oeste de Sahel, devido a temperaturas mais favoráveis e ao aumento de chuvas. Acredita-se que, até 2080, 60% da população mundial esteja sob risco de se infectar por DENV. O aumento será devido, principalmente, ao crescimento populacional em áreas já endêmicas (Messina et al., 2019). A expansão mundial da dengue é um desafio ao sistema de saúde pública que, se levado a sério pelos governos dos países afetados, pode ser evitada. Isso já aconteceu durante a década de 60 e início da década de 70, quando a doença foi considerada erradicada. A partir de 1970, diversos países descontinuaram os programas de controle e erradicação, resultando em reinfestações dos mosquitos e em surtos de dengue no Caribe, na América Central e na América do Sul. Desde então, a doença se propaga em epidemias cíclicas, que ocorrem a cada 3 ou 5 anos.

O desenvolvimento de mais vacinas, de novas estratégias de controle vetorial e do tratamento da doença é algo mais do que necessário e depende de investimento em pesquisa e saúde pública.

Número de casos de Dengue no Brasil desde 1980



Fonte: PLISA Health Information Platform for the Americas • Criado com Datawrapper

Figura 1: Casos de Dengue no Brasil ao longo dos anos.

Fonte: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2015. Available from <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. (Accessed [09/2022])

Dengue

Os artrópodes responsáveis pela transmissão da dengue são os mosquitos do gênero *Aedes*. As duas principais espécies transmissoras são: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que podem ser encontradas em diferentes localidades, sendo *Ae. aegypti* o vetor primário da dengue nas Américas. Esses mosquitos são predominantes em áreas urbanas e periurbanas, onde a alta densidade populacional favorece a expansão da doença.

A transmissão da dengue ocorre, essencialmente, através da picada da fêmea do mosquito vetor, que necessita se alimentar de sangue para produção dos seus ovos e tem preferência pelo sangue humano (Figura 2).

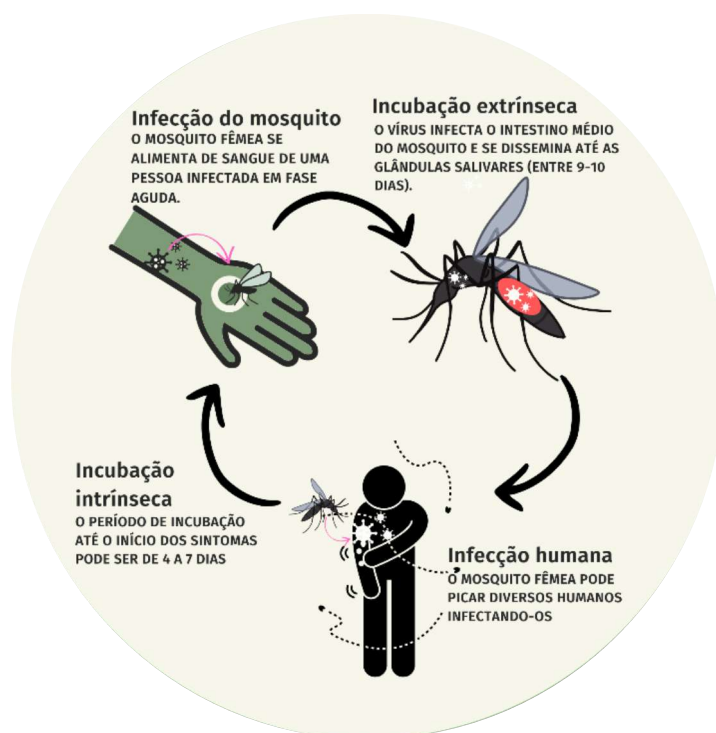


Figura 2: Ciclo do vírus da dengue.

Fonte: Arquivo pessoal

Essa doença possui uma ampla variedade de apresentações clínicas de evolução imprevisível. A última classificação da doença, publicada pela organização mundial de saúde, em 2009, considera importante a separação diagnóstica da doença em dengue severa e não-severa. A primeira é dividida em dois grandes grupos, por razões práticas: dengue com sinais de alerta e dengue sem sinais de alerta, que permitem que os médicos tomem decisões sobre quão intensivamente devem observar e tratar o paciente para evitar o óbito (Figura 3).

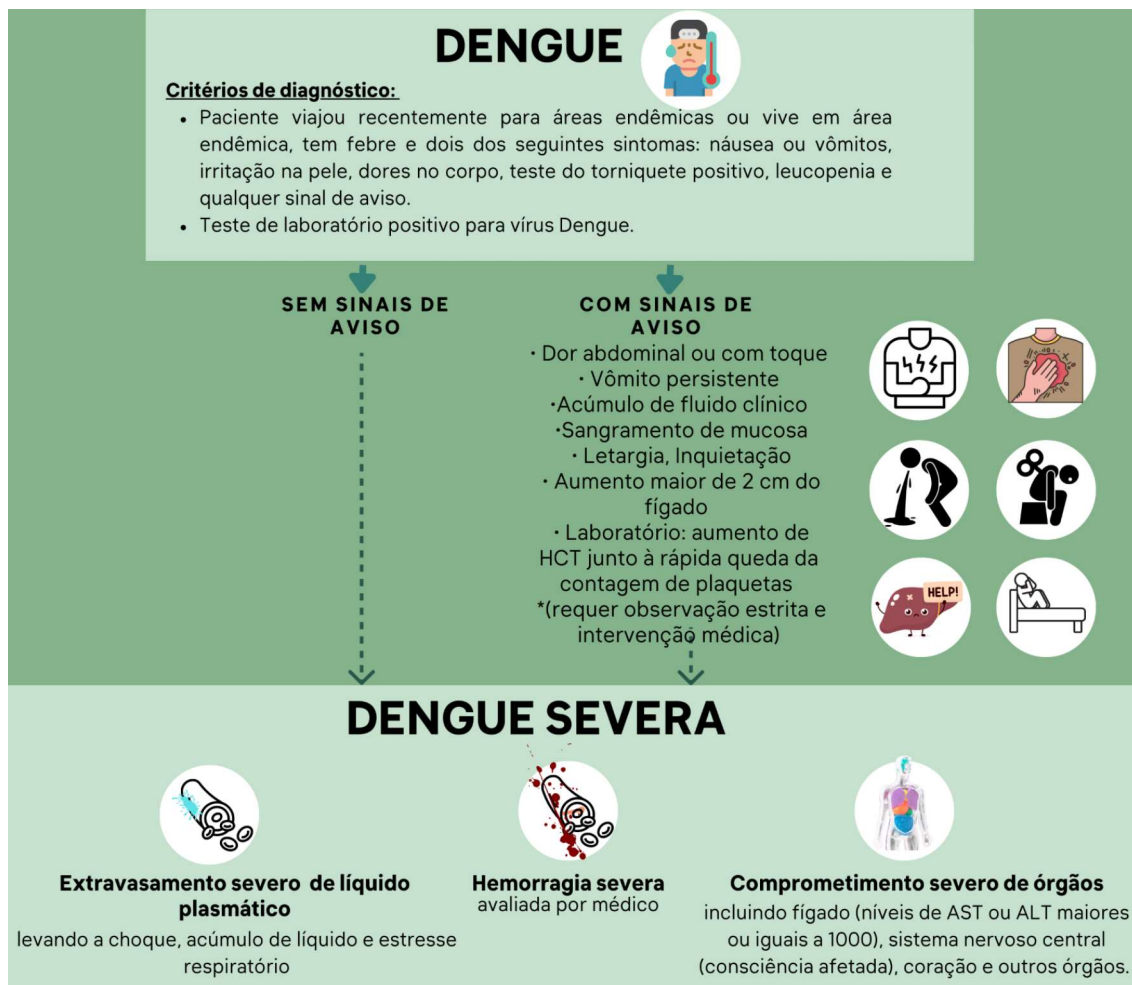


Figura 3: Apresentação clínica da dengue.

Fonte: Arquivo pessoal

Histórico e situação atual

Os primeiros registros de sintomas de dengue foram publicados na Enciclopédia Chinesa, durante os anos de 265 a 420 d.C. (Nobuchi, 1979). Inicialmente, a doença ficou conhecida pelos chineses como “água envenenada”, pois eles a relacionavam a insetos voadores associados à água. Em 1635, a doença apareceu nas Índias Francesas Ocidentais e, em 1699, no Panamá. Em 1903, Graham ganhou destaque ao caracterizar a Dengue como uma doença transmitida por mosquitos, e apontou a espécie *Culex quinquefasciatus* como vetor. Em 1906, Bancroft aponta a possibilidade de *A. aegypti*, na época conhecido como *Stegomyia fasciata*, ser o vetor da doença, o que foi provado por Cleland, Briery e McDonald, em 1916 (Mackerras, 1946). Até hoje, foram registradas oito pandemias, com duração de três a sete anos, no período

compreendido entre 1779 e 1916. Em 1964, após 20 anos sem registro da doença, um pequeno surto de DENV3 foi diagnosticado no Taiti, ilha do Pacífico Sul, mas a doença não se disseminou para as outras ilhas próximas. Nos anos seguintes, epidemias de DENV2 ocorreram em várias ilhas do Pacífico e, em 1975, o DENV1 foi introduzido nessa região. Na Austrália, registros de dengue vêm sendo feitos desde 1800, com múltiplas epidemias ocorrendo até 1955. Em 1981, a virose reapareceu no local, provocando epidemias severas em várias cidades (Howe, 1977).

Diversas epidemias de dengue ocorreram também durante o século XX. Após a Segunda Guerra Mundial, epidemias de dengue hemorrágica reapareceram no sudeste da Ásia e, subsequentemente, nas Ilhas do Pacífico e nas Américas. Nas Américas, a dengue tem sido relatada há mais de 200 anos (Gubler, 1988; Henschal, Putnak, 1990). Na década de 50, a dengue hemorrágica (FHD) foi descrita, pela primeira vez, na Tailândia e nas Filipinas e, após a década de 60, intensificou-se nas Américas. A partir de 1963, houve a circulação comprovada de DENV2 e DENV3 em vários países. O sorotipo 3 foi isolado, primeiramente, em Porto Rico, causando, em seguida, epidemias na Jamaica e no leste do Caribe. Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, inicialmente na Jamaica. A partir de 1980, foram notificadas epidemias em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema. O acontecimento epidemiológico mais relevante na história da dengue nas Américas foi a epidemia de dengue hemorrágica e a síndrome de choque da dengue, que ocorreu em Cuba em 1981. Nessa epidemia, foram notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações. Dentre os 10.312 casos considerados graves, 158 resultaram em óbitos e, desses, 101 foram crianças (Donalísio, 1995). Antes de 1970, somente nove países sofreram epidemia de dengue severa e, atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países. As Américas, o sudeste da Ásia e as regiões do oeste do pacífico são as mais afetadas, com a Ásia representando, aproximadamente, 70% da carga global da doença.

O número de casos não está só aumentando com o avanço da doença para novas áreas, incluindo a Europa, mas estão ocorrendo surtos explosivos. Casos autóctones, além dos importados, têm sido detectados, anualmente, em alguns países Europeus. O maior número de casos já reportado foi em 2019, quando todas as regiões da Europa foram afetadas. A transmissão de dengue foi observada no Afeganistão, pela primeira vez, nesse mesmo período. Somente nas Américas foram reportados 3,1 milhões de casos, com mais de 25.000 deles classificados como severos, embora o número de mortes tenha sido menor do que em 2018. Em 2020, a dengue afetou diversos países, com o aumento no número

de casos observados em Bangladesh, Brasil, Cook Islands, Equador, Índia, Indonésia, Maldivas, Mauritânia, Mayotte (Fr), Nepal, Cingapura, Sri Lanka, Sudão, Tailândia, Timor-Leste e Yemen. Em 2021, os países que continuaram sendo afetados foram o Brasil, a Índia, o Vietnã, as Filipinas, as Ilhas Cook, a Colômbia, o Fiji, o Quênia, o Paraguai, o Peru e as Ilhas de Reunião. Embora o número total de casos tenha diminuído nos anos de 2020 e 2021, assim como o de mortes, os dados ainda não estão completos e a pandemia de COVID-19 pode ter impactado o número de casos reportados em diversos países. Só conseguiremos avaliar o impacto combinado da epidemia de dengue e da pandemia de COVID-19 nos próximos anos².

A Figura 4 mostra a evolução dos casos de dengue ao longo dos anos no mundo, com a clara predominância da doença em países asiáticos e da América do Sul, mas com expansão, também, na África e em outros lugares do mundo.

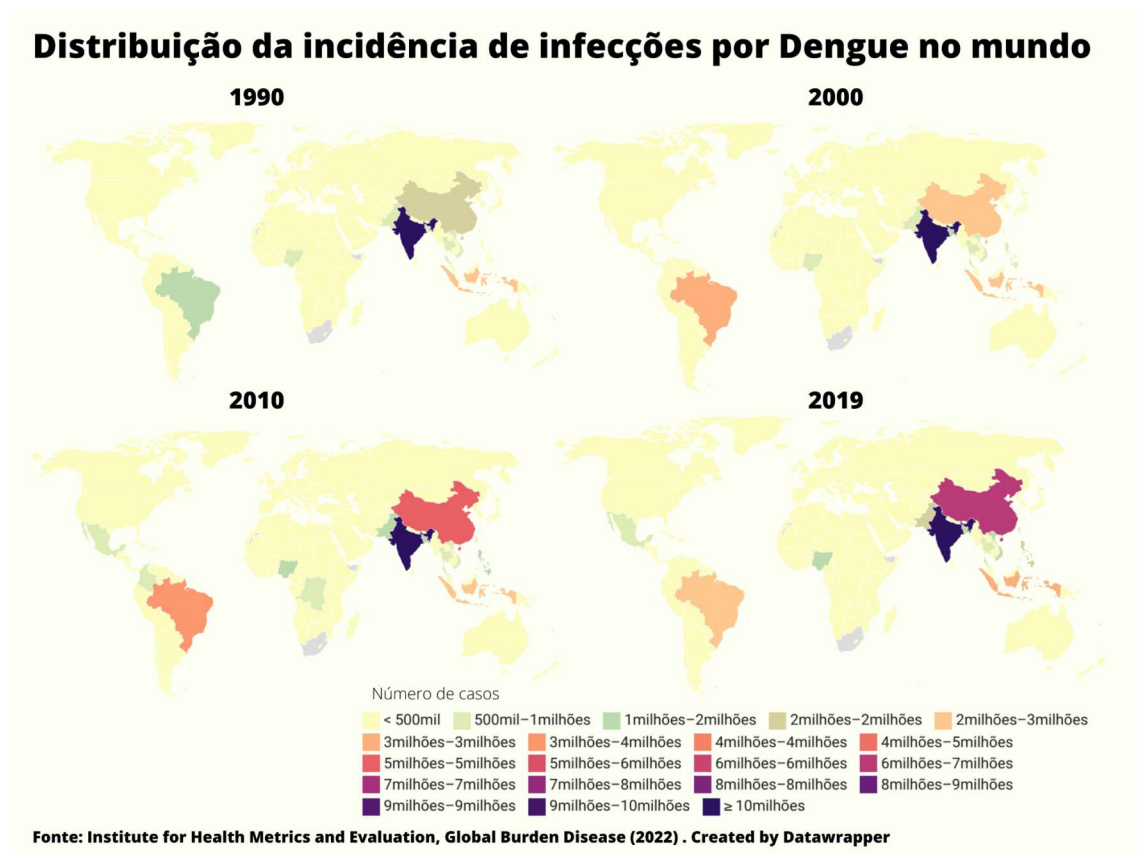


Figura 4. Representação da evolução do número de casos de dengue no mundo de 1990 a 2019.

Fonte: Institute for Health Metrics and Evaluation

²WHO 2022 - Dengue and severe dengue (who.int).

A reinfestação por *Ae. aegypti* no Brasil ocorreu a partir de Roraima, em 1981/1982 (Teixeira et al., 2009). Em 1980, no Brasil, apenas 12 municípios estavam infectados pelo mosquito e, ao fim de 1998, esse número aumentou para, aproximadamente, 2.910. Em 2001, 3.587 municípios das 27 unidades federadas encontravam-se infestados com o mosquito e a transmissão da dengue já ocorria em 2.262 municípios de 24 Estados (Gonçalves Neto, 2004). Na região sudeste, o Rio de Janeiro foi o primeiro estado a ter notificações de casos, no ano de 1986, seguido de Minas Gerais e de São Paulo.

O Rio de Janeiro foi o primeiro estado do país a registrar a circulação concomitante de três dos quatro sorotipos do vírus: DENV1, DENV2 e DENV3. Nos anos de 1986 e 1987, com a introdução do DENV1, foram notificados 93.910 casos da doença. Em 1990, a identificação do DENV2 em Nova Iguaçu (município do estado do Rio de Janeiro) desencadeou uma nova epidemia de grandes proporções, com o surgimento dos primeiros casos de dengue hemorrágica (Lenzi, Coura, 2004).

O evento mais importante dos últimos anos foi a introdução do sorotipo 4 do vírus dengue (DENV4) no Brasil. Em 2008, um trabalho publicado por Figueiredo e colaboradores revelou três casos de DENV4 em pacientes sem histórico de viagens para fora de Manaus. As autoridades de saúde alegaram que os laboratórios brasileiros não foram capazes de reproduzir os resultados e que não existia nenhuma epidemia aparente de DENV4 no Brasil. Em 2010, o mesmo sorotipo foi identificado em Roraima, também sem aparente epidemia relacionada, com menos de 20 casos da doença notificados na região. Em março de 2011, o DENV4 foi notificado em sete pacientes do município de Niterói, Rio de Janeiro (Nogueira, Eppinghaus, 2011). O mesmo sorotipo foi identificado, ainda, no Pará, em São Paulo e em três estados do nordeste: Pernambuco, Bahia e Piauí.

O vírus Dengue

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, na qual se encontram três gêneros distintos: *Flavivirus* (gênero ao qual pertence o vírus dengue, da febre amarela, da zika entre outros), *Pestivirus* (vírus de suínos e ruminantes) e *Hepacivirus* (vírus da hepatite C em Humanos). Além disso, existem quatro sorotipos de DENV distribuídos no mundo: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Um quinto sorotipo foi descoberto em 2013 (Normile, 2013). Os diferentes sorotipos de DENV possuem em torno de 65 % de similaridade genômica (Hwang et al., 2020), mas a infecção se manifesta de forma diferente, a depender de qual

seja o DENV. Além disso, devido a eventos de amplificação dependente de anticorpos, a infecção por um sorotipo diferente após a primeira exposição pode desencadear a dengue severa (Figura 2), assim como dificulta o desenvolvimento de vacinas.

O Dengue é um vírus envelopado e com 50 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única fita de RNA, de sentido positivo, que mede aproximadamente 11 kb (Figura 5a). Esse genoma é formado de 10.664 nucleotídeos, que são organizados em uma única fase de leitura aberta (ORF - do inglês *Open Reading Frame*), a qual codifica uma única poliproteína de 3.386 aminoácidos, flanqueadas por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR). A região 5' UTR (do inglês *untranslated regions*, região não traduzidas) possui 96 nucleotídeos e a região não poliadenilada 3'UTR possui 451. A poliproteína produzida a partir da ORF é, posteriormente, processada em dez proteínas por proteases virais e celulares. Três dessas proteínas são estruturais e estão envolvidas na formação da partícula viral [capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)]; enquanto as outras sete proteínas não são estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Kuhn et al., 2002; Edigil et al., 2006; Clydes, Harris, 2006) (Figura 5b).

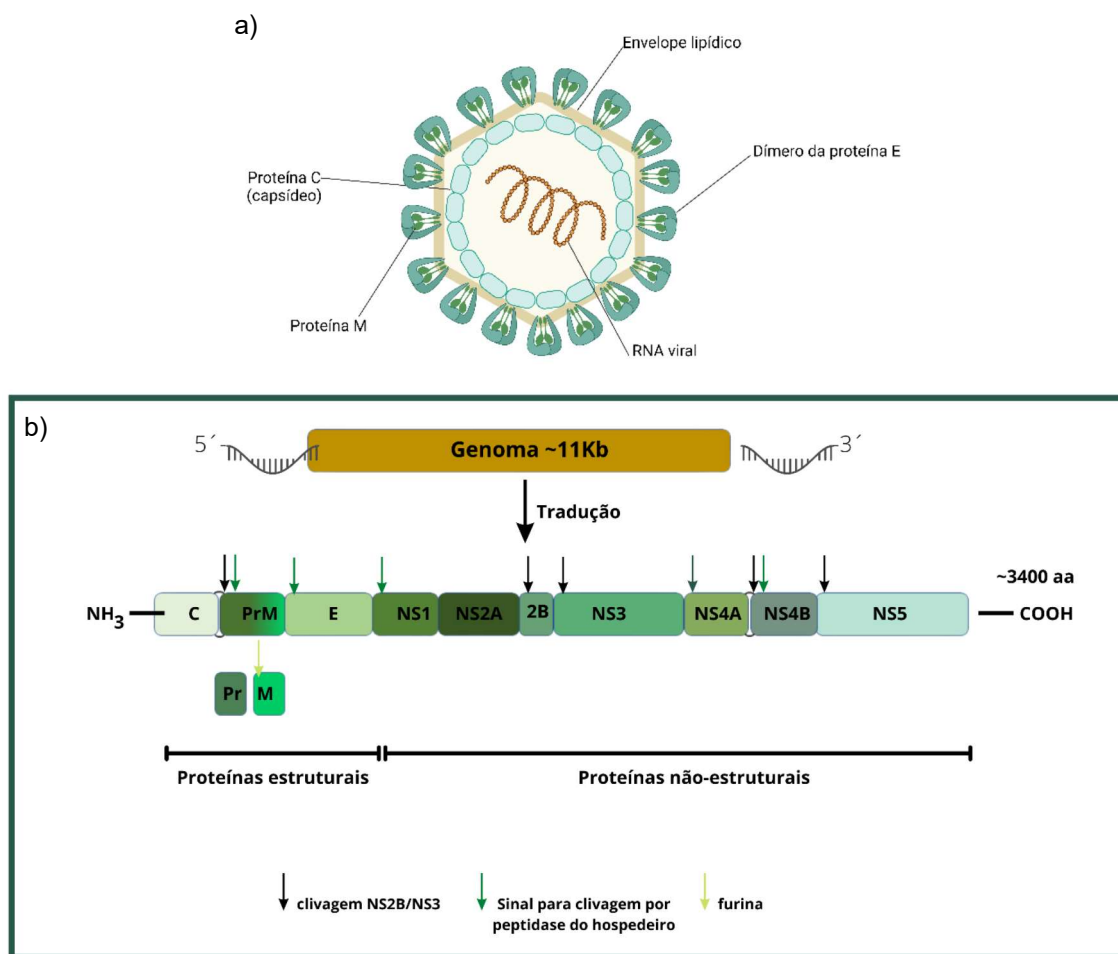


Figura 5: Estrutura e organização genômica do vírus da dengue. a) Estrutura viral: o vírus da dengue tem uma estrutura quase esférica. Dentro dele está o nucleocapsídeo, que contém o genoma viral e as proteínas do capsídeo. O nucleocapsídeo está envolvido por uma membrana (envelope viral), uma bicamada lipídica, que se origina da membrana celular do hospedeiro, quando o vírus sai da célula. Ligadas ao envelope viral, estão as proteínas E e M, que formam uma camada externa protetora que controla a entrada do vírus nas células. Feita com Biorender. b) Organização genômica: uma única poliproteína é traduzida e posteriormente clivada por proteases virais e celulares. As abreviações C, E, prM e NS indicadas na figura representam os genes que codificam para proteínas do Capsídeo (C), Envelope viral (E) e pré-membrana (prM), relacionadas à montagem da partícula viral e finalmente, as proteínas não-estruturais (NS), que relacionam-se à replicação do vírus.

Fonte: Adaptado de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925/>

As proteínas NS são responsáveis pela replicação do RNA viral, e também auxiliam na montagem da partícula e na evasão da resposta imune do hospedeiro (Puig-BasAgoiti et al., 2006). NS1 é uma glicoproteína necessária no processo de replicação do RNA viral. NS2A e NS2B são dois polipeptídeos hidrofóbicos, clivados por proteases virais. A NS3 é uma proteína multifuncional, com atividade de serino-protease, que tem NS2B como um co-fator. O domínio intermediário da NS3 é uma nuclease necessária para a replicação do RNA e o domínio C-terminal possui uma atividade RNA trifosfatase. NS4A e NS4B são polipeptídeos

hidrofóbicos que estão associados à membrana (Nemésio et al., 2012). NS5 tem a função de uma RNA polimerase RNA-dependente (Puig-BasAgoiti et al., 2006).

A proteína C interage com o RNA genômico do vírus para formar o nucleocapsídeo. A glicoproteína prM forma um heterodímero intracelular, estabilizando a proteína E. Já a proteína prM é clivada durante a liberação do vírus pela célula, deixando a pequena proteína estrutural M ancorada no envelope viral. Dessa forma, a proteína E é a principal proteína do envelope protéico, é glicosilada e é a maior proteína estrutural exposta na superfície do envelope do vírion maduro. Ela é composta por 495 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 60 kDa. Além disso, é essencial para a ligação do vírus ao receptor de membrana da célula hospedeira, atuando como hemaglutinina viral, visto que induz uma resposta imune e medeia o ataque do vírus à superfície da célula hospedeira (Wei et al., 2003; Heinz, Stiasny, 2012).

Assim como acontece com os Alphavirus e com o vírus Influenza, os Flavivirus entram nas células hospedeiras por endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido do endossoma é responsável por desencadear uma mudança conformacional nas glicoproteínas de fusão. Nesse caso, a mudança ocorre na proteína E, que é a responsável tanto pela ligação ao receptor quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e a liberação dos componentes virais no citoplasma celular. A partícula viral passa pela via secretória, onde suas proteínas estruturais mudam de conformação e a saída do vírus acontece por exocitose (Modis et al., 2003). O ciclo de replicação do vírus em uma célula pode ser observado na Figura 6.

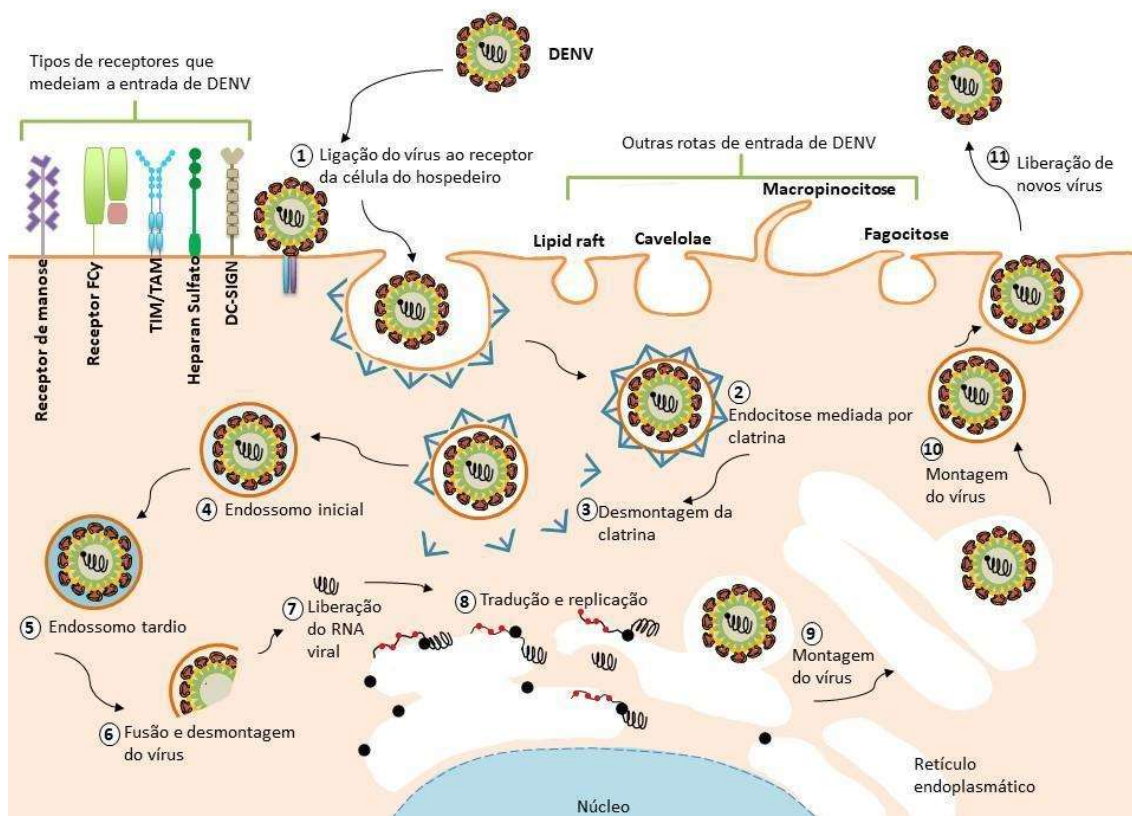


Figura 6: Ciclo de replicação do vírus Dengue em células hospedeiras.

Fonte: Adaptado de Nanaware et al., 2021

O Vetor *Aedes*: a biologia

Os mosquitos são insetos classificados dentro da família Culicidae, subordem Nematocera e ordem Diptera. Essa família possui mais de 3.200 espécies descritas e, tipicamente, é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. O *Aedes* é o principal gênero de relevância médica da subfamília Culicinae, que compreende 34 gêneros dos 38 gêneros conhecidos de mosquitos (Foster, Walker, 2022).

Os mosquitos são holometábolos, isto é, sofrem metamorfose completa com estágios de desenvolvimento de ovo, larva, pupa e adulto (macho e fêmea) (Rogers, 2023). Embora machos e fêmeas se alimentem de néctar na vida adulta, as fêmeas necessitam das proteínas do sangue para o desenvolvimento dos ovários e dos ovos. A fêmea do mosquito adulto está apta para se alimentar de sangue 48 horas após a sua emergência, e a oviposição ocorre de dois a cinco dias após o repasto sanguíneo. Uma única fêmea pode colocar de 60 a 100 ovos na postura que é realizada em ambiente úmido. Do ovo, eclode a larva, que passa por quatro estágios (ou sofre quatro ecdises) até alcançar o estágio de pupa, do

qual emerge o mosquito adulto alado, como ilustrado na Figura 7. Todos os estádios larvais e de pupa são aquáticos. O ciclo de desenvolvimento do *Aedes* de ovo até o adulto é rápido e requer apenas sete dias em condições ambientais ideais. Estima-se que a sobrevivência dos mosquitos adultos é de 20 dias para machos e de 30 para fêmeas de *Aedes*.

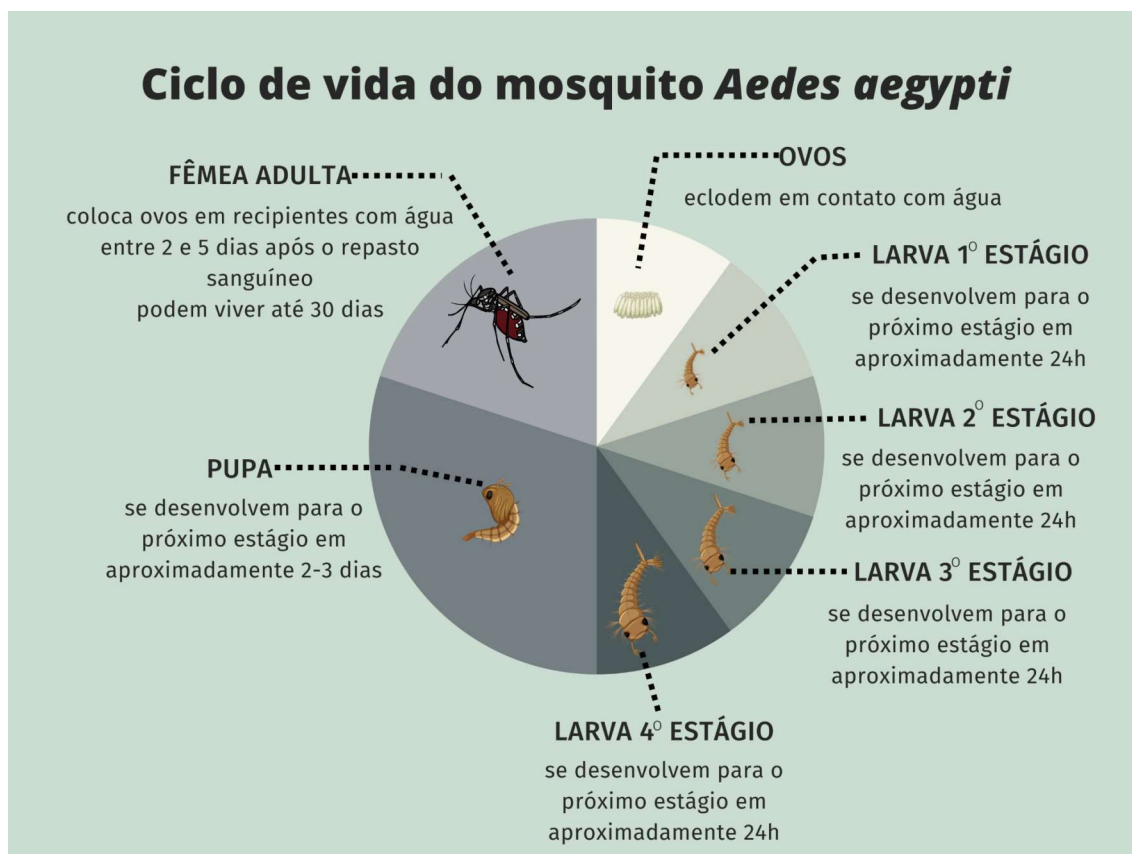


Figura 7: Ilustração das diferentes fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Larvas e pupas são aquáticas.

Fonte: Arquivo pessoal

Muitas espécies de *Aedes* são vetores de arboviroses que infectam vários vertebrados, inclusive humanos. O *Ae. aegypti* é uma das espécies de maior relevância médica do mundo, por ser o principal vetor do vírus da febre amarela urbana e o vetor primário do vírus da dengue nas Américas. Ele apresenta uma ampla distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais.

O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor da dengue devido à sua antropofilia, seus hábitos urbano-domésticos (domiciliares) e sua alta eficiência na transmissão do vírus (Gubler, 1998). É uma espécie de atividade diurna, alimenta-se dentro e fora das casas durante todo o tempo, especialmente em dias

nublados. Além de seus ovos serem resistentes à dessecação (Gubler, 1998), as fêmeas realizam oviposição em múltiplos locais (Christophers, 1960), o que aumenta as chances de sobrevivência. Ele foi identificado pela primeira vez no Brasil durante o período colonial, sendo combatido em nosso território até ser considerado erradicado em 1955, ressurgindo nos anos 70 devido à finalização dos programas de mitigação nos diferentes países.

No momento, só há uma vacina disponível para dengue. Não há, também, medicamentos específicos para tratar a infecção. Dessa forma, a prevenção e o controle da dengue e da dengue hemorrágica dependem, principalmente, do combate ao *Ae. aegypti* em torno dos domicílios. Inseticidas em spray para mosquitos adultos não são tão eficazes em ambientes abertos, além dos mosquitos desenvolverem mecanismos de resistência. Metodologias de controle biológico com larvicidas, soltura de insetos infectados com *Wolbachia* ou de insetos transgênicos, que reduzem a população de mosquito ou bloqueiam o estabelecimento e a transmissão de arbovírus, têm sido também utilizadas. Ademais, a participação de agentes de saúde e da própria população no combate dos criadouros de mosquitos também têm sido importantes. Mesmo com todas as metodologias descritas, a transmissão de arbovírus por esses insetos ainda acontece. O caminho mais eficaz para reduzir a transmissão das arboviroses é a integração das diferentes metodologias existentes, somada à vigilância entomológica, que mantém a população de mosquitos e a circulação de arbovírus reduzidas.

A erradicação do mosquito *Ae. aegypti* é difícil, porque ele se adapta facilmente ao ambiente e tem a habilidade de, rapidamente, recuperar-se após os distúrbios resultantes de fenômenos naturais (por exemplo, secas) ou intervenções humanas (por exemplo, medidas de controle), o que o torna altamente resistente. Durante a alimentação com sangue, a fêmea aumenta seu tamanho entre 2-3 vezes, um evento que leva a diferentes mudanças fisiológicas e metabólicas.

É, também, durante a alimentação com sangue que a fêmea do mosquito pode se infectar com os diversos vírus que é capaz de transmitir. Uma vez ingerido pelo mosquito, os vírus se replicam nas células epiteliais do intestino, alcançam a hemolinfa, as glândulas salivares e o sistema nervoso. Nesse percurso, se deparam com diversas barreiras, que precisam ser vencidas para que a infecção se estabeleça nas glândulas salivares e o vírus seja, então, transmitido a um novo hospedeiro (Mukherjee et al., 2019). A capacidade do patógeno em ultrapassar essas barreiras imunofisiológicas é um fator determinante no sucesso da infecção do vetor e da sua transmissão para um novo hospedeiro (Black, Severson, 2005).

Ciclo de vida do DENV no *Ae. aegypti*

Os vírus dependem de uma célula hospedeira para a sua própria sobrevivência e replicação. Uma infecção persistente e duradoura requer a interação do vírus com os vários tecidos do hospedeiro e a transposição dos mecanismos de proteção contra patógenos apresentados pelo vetor. A composição desses tecidos precisa ser de uma espécie e linhagem específicas e essas características desempenham um importante papel na competência vetorial do inseto, ou seja, na permissividade à infecção, na replicação e na transmissão de patógenos específicos. A interação biológica vírus-vetor é, portanto, resultado de um processo de coevolução contínua, que envolve o sistema imune do vetor, os microrganismos associados, suas barreiras físicas e moleculares, os mecanismos de reparo e as estratégias virais de escape dessas defesas. Esse é um processo dinâmico, que, a longo prazo, resulta na seleção de espécies ou populações que funcionam como vetores de um arbovírus. É necessário o estabelecimento de um balanço entre a multiplicação viral e a fisiologia do mosquito, para que os vírus possam persistir na população.

Inicialmente, o vírus deve ser capaz de penetrar e atacar as células epiteliais e, então, se replicar nelas até atingir um alto título viral nessas células. Fatores que bloqueiam um desses dois eventos constituem uma barreira de infecção no intestino (do inglês, *midgut infection barrier* - MIB). Posteriormente, o vírus deve ser capaz de ultrapassar a lâmina basal que envolve o epitélio intestinal e, assim, infectar e se replicar nos tecidos vizinhos. Fatores que bloqueiam esses eventos impedem a disseminação da infecção nos tecidos, atuando como uma barreira de escape do intestino (do inglês, *midgut escape barrier* - MEB). Por último, o arbovírus deve infectar e se replicar nas glândulas salivares, antes de invadir o seu lúmen para a transmissão final na próxima picada. Fatores que impedem essa etapa constituem a barreira de transmissão (do inglês, *transmission barrier* - TB). Cada uma dessas barreiras deve ser compreendida do ponto de vista bioquímico e molecular, para que seja possível entender os mecanismos que levam à infecção, à replicação e à transmissão do vírus no mosquito vetor, e, conseqüentemente, à sua competência vetorial (Bennett et al., 2002; Black et al., 2002). A figura 8 mostra as barreiras à infecção no mosquito. Outra porta de saída dos vírus do inseto, que deve possibilitar a sua disseminação e manutenção na população de mosquitos, é a transmissão transovariana e venérea desses patógenos (Rosen et al., 1983 e Sánchez-Vargas et al., 2018).

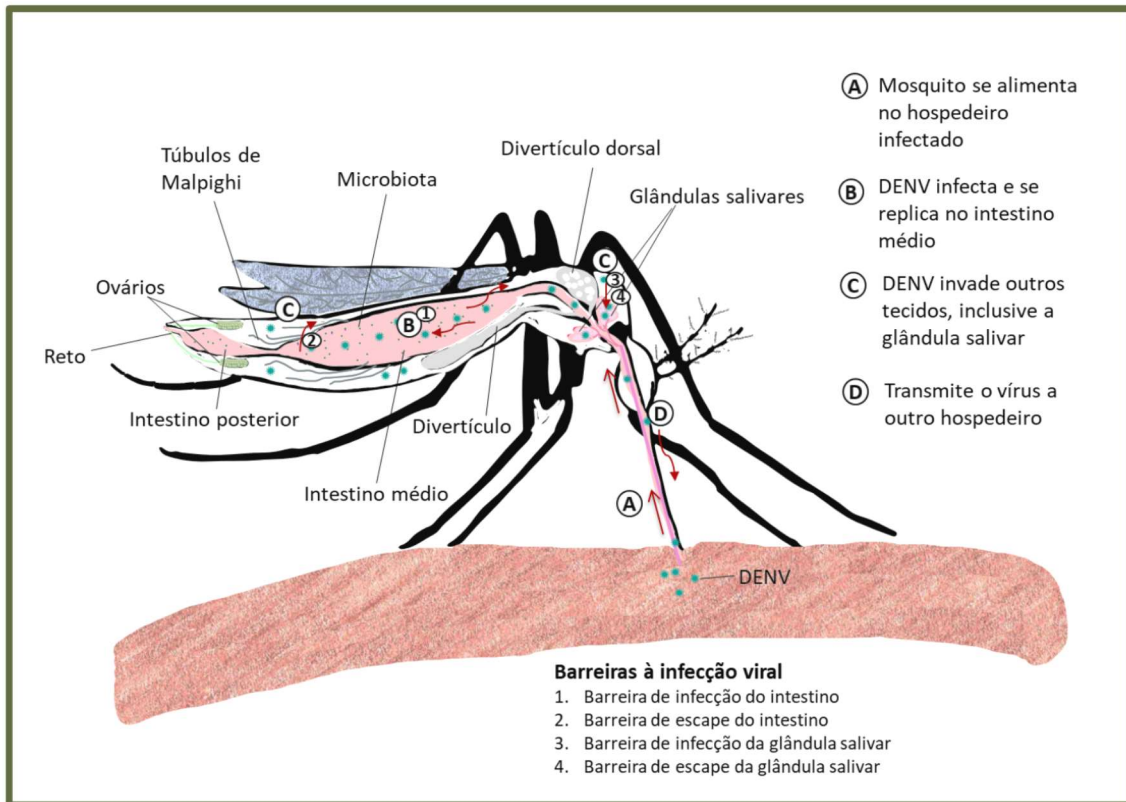


Figura 8: Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo. Os vírus (verde) e a microbiota (pontos), estão representados fora de escala para fins didáticos.

Fonte: Arquivo pessoal

A primeira linha de defesa dos insetos é constituída de barreiras estruturais. Elas são representadas, em primeiro lugar, pelo exoesqueleto rígido de quitina que, na injúria, serve como porta de entrada para possíveis infecções, e o revestimento quitinoso das traquéias (Lehane, 1997). A matriz peritrófica (MP) também representa uma importante barreira física capaz de limitar a entrada de patógenos de importância médica, pois o intestino do mosquito é a rota mais comum de infecção. A MP é composta, em grande parte, por quitina e glicoproteínas, e nono adulto, é produzida em resposta à alimentação sanguínea, (Devenport e Jacobs-Lorena, 2004). Outras barreiras de infecção e transmissão são os epitélios do tubo digestivo e das glândulas salivares, respectivamente. Caso os vírus recém-formados não sejam capazes de cruzar a lâmina basal das células epiteliais e se espalhem na hemolinfa ou em outros tecidos do inseto, temos formada a barreira de escape do intestino médio. Para tanto, os mosquitos desenvolveram mecanismos antivirais sistêmicos e locais, que limitam a propagação viral a um nível tolerável.

A jornada do vírus da dengue dentro do seu vetor *Ae. aegypti* se inicia com a ingestão de sangue contendo partículas virais, provenientes de um hospedeiro vertebrado infectado que se encontra em fase virêmica da doença (fase aguda de infecção, em torno de 4 a 5 dias, após a picada infectiva). O mosquito realiza a digestão e a metabolização do sangue em poucos dias. Já a infecção do epitélio pelo vírus se estabelece, provavelmente, nas primeiras horas após a alimentação. Os mosquitos não são passivos durante o ciclo de vida do vírus em seu interior, e montam uma resposta antiviral, que modula a infecção. Os vírus, em contrapartida, também possuem estratégias para conter a resposta imune do mosquito, o que reduz o *fitness* do vetor e mantém a carga viral em níveis satisfatórios para uma transmissão eficiente (revisado por Olson, Blair, 2015).

No caso da interação *Aedes*-DENV, temos um modelo que resulta de uma interação eficiente, pois o mosquito não apresenta alterações fenotípicas que o levam à morte quando infectado pelo vírus. Entretanto, alguns trabalhos recentes mostram diferentes alterações fisiológicas nos insetos infectados, como o aumento na atividade locomotora, o aumento da taxa de picada e a redução da fecundidade (Lima-Camara et al., 2011; Maciel-Freitas et al., 2013). Uma alteração molecular observada é a mudança do padrão de expressão de proteínas do intestino médio de *Ae. aegypti*, que é significativamente alterada após a infecção por DENV2 ou pelo vírus Chikungunya (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010), além da modulação de genes do sistema imune (Sim, Dimopoulos, 2010). Perera e colaboradores (2012) já verificaram que a infecção de *Ae. aegypti* por DENV perturba a homeostase lipídica do inseto. Dessa forma, alguns dados têm detectado que os arbovírus são capazes de subverter o comportamento e o metabolismo celular do inseto, e que é possível supor que essas mudanças sejam, de alguma maneira, importantes para a dinâmica da transmissão da dengue (Perera et al., 2012; Chotiwan et al., 2018).

Fatores determinantes na interação Dengue-*Aedes aegypti*

O estabelecimento inicial da infecção do mosquito pelo vírus é afetado por múltiplos fatores extrínsecos e intrínsecos presentes no ambiente intestinal. Alguns desses fatores encontram-se no lúmen intestinal, tais como os componentes do sangue do hospedeiro vertebrado e a microbiota residente. Outros fatores são representados por mecanismos de resposta à infecção, como a manutenção da homeostase intestinal e o sistema imune do vetor. A combinação de todos esses fatores determina a competência do vetor de transmitir arbovírus na natureza (Yu et al., 2019).

Os componentes do sangue

Componentes do sangue do hospedeiro vertebrado, como IgM e IgG contra proteínas virais (Nguyet et al., 2013), LDL (Wagar et al., 2017) ou ferro sérico (Zhu et al., 2019), podem prejudicar a capacidade de infecção do mosquito pelo vírus. Já GABA (ácido gama-aminobutírico) e a proteína não estrutural S1 do vírus, também presentes no sangue do hospedeiro vertebrado, suprimem a imunidade do intestino do inseto e facilitam o estabelecimento viral (Zhu et al., 2017; Liu et al., 2016; respectivamente). Além disso, foi demonstrado que o microRNA hsa-miR-150-5p, derivado do sangue de humanos, é capaz de facilitar a infecção por DENV2 através da supressão de genes codificadores de quimiotripsinas (Zhu et al., 2021).

A microbiota

Os insetos encontram-se em constante interação com o ambiente em que vivem e com uma variedade de microrganismos com os quais podem estabelecer relações mutualísticas, comensais e patogênicas. Essa exposição acontece, principalmente, através da ingestão de microrganismos oriundos das suas dietas alimentares. Por isso, o trato gastrointestinal é considerado a sua maior interface imunológica com o meio ambiente.

Logo após a emergência do inseto do ovo, em sua forma de larva ou ninfa, os microrganismos não patogênicos (microbiota) colonizam o seu trato intestinal. Pressões seletivas, como o ambiente intestinal, os hábitos alimentares, a disponibilidade de nutrientes e a presença de patógenos, moldam o estabelecimento da microbiota residente. Nessa íntima relação, o hospedeiro oferece habitat e nutrientes provenientes da sua dieta e secreções intestinais. Os microrganismos (bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários), por sua vez, exercem papéis cruciais para a saúde do hospedeiro, influenciando na sua fisiologia e no seu desenvolvimento (Sommer, Bäckhed, 2013). Essa microbiota habitante pode promover (1) a decomposição alimentar e a degradação da celulose (Warnecke et al., 2007); (2) o catabolismo de toxina (Ping et al., 2007; Kikuchi et al., 2012); (3) a renovação e crescimento celular intestinal (Buchon et al., 2009; Shin et al., 2011); (4) a reciclagem de resíduos nitrogenados (Hongoh et al., 2008); (5) a suplementação e a fixação de nitrogênio (Hongoh et al., 2008; Nikoh et al., 2011); assim como influenciar a colonização do hospedeiro por microrganismos patogênicos (Cirimotich et al., 2011; Bahia et al., 2014; Ramirez et al., 2014).

A depleção da microbiota (por tratamento com antibiótico ou ambiente asséptico) tem sido associada ao retardo do desenvolvimento de insetos (Ben-Yakir, 1987; Storelli et al., 2011, Pais et al., 2018), além de estar sendo relacionada à susceptibilidade e a infecções, com favorecimento da replicação viral, por exemplo, (Xi et al., 2008; Dong et al., 2009), e falha reprodutiva (Sharon et al., 2010; Gaio et al., 2011; Morimoto et al., 2017).

A primeira vez que foi observado o aumento da susceptibilidade do mosquito *Ae. aegypti* ao vírus da dengue foi em um experimento em que a microbiota bacteriana endógena foi depletada, o que levou à redução dos níveis basais de genes de imunidade do mosquito, aumentando a replicação viral (Xi et al., 2008). Diversos trabalhos subsequentes apontaram tanto bactérias (*Chromobacterium* sp., *Proteus* sp., *Serratia marcescens* ou *Serratia odorifera*), quanto fungos (*Talaromyces*, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) como moduladores da susceptibilidade à infecção por arbovírus. A bactéria *S. marcescens* secreta uma proteína chamada de *Smenhancin*, que degrada a camada de mucina associada ao epitélio intestinal e favorece o estabelecimento e a replicação de DENV (Wu et al., 2019). A *S. odorifera* secreta um polipeptídeo de 40 Kda, que, possivelmente, se liga à molécula proibitina encontrada no epitélio intestinal do inseto, causando uma regulação negativa do sistema imune e favorecendo a replicação viral (Apte-Deshpande et al., 2012).

Outras bactérias influenciam negativamente a infecção viral. Por exemplo, a bactéria *Chromobacterium* sp. inibe a replicação viral no mosquito *Ae. aegypti*, por meio da secreção de aminopeptidase (Ramirez et al., 2014; Saraiva et al., 2018). Já *Proteus* sp. aumenta a expressão de peptídeos antimicrobianos do mosquito, também resultando na redução da sua infecção por vírus Dengue (Ramirez et al., 2012). A bactéria intracelular *Wolbachia pipientis*, naturalmente distribuída em populações de insetos, mas não em *Aedes*, quando introduzida em laboratório no *Ae. aegypti*, foi capaz de inibir a replicação do DENV (Moreira et al., 2009). Tem sido apontados como importantes fatores envolvidos na inibição do DENV em insetos colonizados por *Wolbachia*: i) a produção de espécies reativas de oxigênio pela ativação da via imune Toll, induzida pela presença da bactéria (Pan et al., 2012); ii) a degradação do RNA viral por redução da inibição da exoribonuclease celular XRN1 (Thomas et al., 2018); e iii) mudanças no perfil metabólico, como o decréscimo dos níveis de acilcarnitinas, necessárias para replicação eficiente do vírus (Manokaran et al., 2020).

Fungos da microbiota intestinal também podem influenciar o estabelecimento de arbovírus em mosquito. A infecção do mosquito *Ae. aegypti* pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana* ativa as vias de sinalização imunes

Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK-STAT) e Toll e a produção de genes efetores, que, indiretamente, agem inibindo o DENV (Dong et al., 2012). O fungo *M. anisopliae* também é capaz de reduzir a infecção de *Ae. aegypti* com o DENV (Garza-Hernandez et al., 2013). Ao contrário, o fungo *Talaromyces* sp. aumenta a susceptibilidade do inseto ao DENV através da modulação da atividade de tripsinas (Angleró-Rodríguez et al., 2017).

Oliveira e colaboradores (2011) mostraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo epitélio intestinal de *Ae. aegypti* controlam o crescimento da microbiota intestinal. A ingestão de sangue ativa eventos que controlam negativamente o nível de ROS no intestino. Esse controle pode ter um papel importante na modulação do sistema imune do inseto e, em consequência, da competência vetorial dessa espécie ao vírus Dengue e outros patógenos

Homeostase intestinal

A competência vetorial de um artrópode refere-se à sua permissividade à infecção, replicação e transmissão de patógenos específicos. Diferentes linhagens de *Ae. aegypti*, por exemplo, apresentam grandes diferenças com relação à competência vetorial para Flavivírus, incluindo DENV (Black IV et al., 2002, Lourenço-de-Oliveira et al., 2004).

Após se alimentarem do sangue do hospedeiro, os insetos hematófagos enfrentam um desafio imposto pela digestão: a liberação de concentrações potencialmente tóxicas de heme, o grupo prostético da hemoglobina, ferro, aminoácidos e amônia (Graça-Souza et al., 2006; Sterkel et al., 2017). Além disso, com o aumento do aporte nutricional, ocorre um crescimento exponencial da microbiota residente no lúmen intestinal (Oliveira et al., 2011; Talyuli et al., 2021). Ocasionalmente, esses eventos podem causar danos às células do epitélio intestinal, comprometendo a integridade desse tecido. Nesse caso, as células danificadas devem ser constantemente substituídas por novas células, de forma a manter a integridade do epitélio intestinal, o que é alcançado pela coordenação de eventos que incluem apoptose, proliferação, diferenciação celular e endoreplicação.

A MP recobre o bolo alimentar, separando o alimento do epitélio intestinal. Por essa razão, ela permite a compartimentalização da digestão, controlando o tráfego das moléculas obtidas pela ingestão e digestão do sangue (Terra, 2001, Terra et al., 2018). Além disso, a MP atua como uma barreira imune, ao restringir o acesso da microbiota, de seus bioprodutos e de outras moléculas potencialmente tóxicas às células intestinais (Buchon et al., 2009). Em *Ae. aegypti*, quando a

secreção da MP é comprometida pela inibição da quitina sintase, a microbiota entra em contato com o epitélio. Em resposta a essa exposição, as células intestinais secretam ROS, que reduzem a população microbiana, mas acabam por causar danos teciduais (Taracena et al., 2018). A produção de ROS pelo intestino é, normalmente, inibida pela molécula de heme obtida pela degradação da hemoglobina ingerida na alimentação (Oliveira et al., 2011; Talyuli et al., 2023). Entretanto, com a ausência da MP, o ambiente oxidativo gerado no lúmen se assemelha ao observado em fêmeas alimentadas com solução açucaradas, nas quais há grande produção de ROS por peroxidases de membranas chamadas DUOX (dual oxidases) (Oliveira et al., 2011) e altas taxas de proliferação celular no epitélio intestinal (Taracena et al., 2018).

O epitélio intestinal dos insetos é uma monocamada celular formada por quatro tipos celulares que incluem: i) enterócitos (EC), células poliplóides e majoritárias, que são as células digestivas; ii) as células enteroendócrinas (EE), com funções endócrinas; iii) e as células progenitoras indiferenciadas (células-tronco intestinais e os enteroblastos), que são as responsáveis por gerar os outros dois tipos celulares diferenciados (Micchelli, Perrimon, 2006; Olhstein, Spradling, 2006). Recentemente, as caracterizações de transcriptomas dos tipos celulares isolados (*single-cell RNA sequencing*) realizadas em intestinos de *Drosophila melanogaster* (Hung et al., 2020) e de *Ae. aegypti* (Cui, Franz, 2020) identificaram células com diferentes perfis transcricionais semelhantes aos enterócitos e às células enteroendócrinas, sendo chamadas de EC e EE-likes respectivamente. Esses dados sugerem a existência de vários graus e tipos de diferenciação celular e que, possivelmente, os processos que mantêm tamanha diversidade devem responder, pelo menos em parte, aos ambientes a que esse tecido está submetido, sejam eles fisiológicos ou patológicos. Dessa forma, a manutenção da homeostase e da integridade desse epitélio e a reposição de células danificadas ou senescentes deve envolver as diversas populações celulares.

Após o sucesso de entrada nas células do intestino médio do inseto, o vírus começa o seu processo de replicação e montagem de novas partículas virais. Estudos com mosquitos do gênero *Aedes* demonstraram que, quando submetidos a estresses químicos ou bióticos, há ativação do processo de proliferação celular (Janeh et al., 2017; Taracena et al., 2018). Em *Ae. albopictus*, há a ativação da expressão gênica de proteínas sinalizadoras das vias de JAK-STAT e do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR), sugerindo o envolvimento dessas vias no processo de renovação tecidual (Janeh et al., 2017).

Em *Ae. aegypti*, por sua vez, a proliferação das células tronco (ISC) envolve a via do receptor Notch (Delta-Notch), já que o silenciamento da expressão do seu

ligante Delta reduz a taxa mitótica do epitélio intestinal (Taracena et al., 2018). O silenciamento da expressão do gene *delta* em fêmeas de uma linhagem refratária ao vírus DENV2 leva ao bloqueio da mitose das ISCs e ao aumento da susceptibilidade à infecção por esse vírus. Por sua vez, a promoção de danos ao epitélio intestinal por um agente químico em uma linhagem susceptível ao mesmo vírus causa o aumento da proliferação celular e um aumento da refratariedade ao vírus (Taracena et al., 2018).

De modo semelhante, a ativação da proliferação celular e o aumento da resistência à infecção pelo vírus Zika foi observado em fêmeas submetidas a um desbalanço redox, causado pelo silenciamento da expressão do fator de transcrição de resposta antioxidante Nrf2 (do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor*; Bottino-Rojas et al., 2018). O conjunto desses dados revela que, quanto maior as taxas mitóticas do intestino frente a um desafio infeccioso viral, menor é a susceptibilidade desse vetor ao vírus. Finalmente, durante o processo de diferenciação dos enterócitos, que sucede a proliferação celular, ocorre endoreplicação do DNA genômico, tornando essa célula poliplóide, com até 16 cópias de cada cromossomo nos ECs totalmente diferenciados. Dados na literatura demonstram que a infecção de *Ae. aegypti* com DENV dispara o processo de endoreplicação de enterócitos, favorecendo a replicação do DNA genômico e limitando a replicação viral. De modo inverso, a inibição desse processo leva a um aumento da carga viral nos mosquitos, sugerindo que a endoreplicação pode atuar como um mecanismo antiviral (Serrato-Salas et al., 2018).

A proliferação das células progenitoras do epitélio intestinal, normalmente, ocorre em condições de crescimento tecidual ou reposição de células danificadas e ou senescentes. A divisão das ISCs, no caso de regeneração celular, é ativada por fatores liberados pelas células danificadas destinadas à morte e à exclusão do tecido. Dentre os processos responsáveis pela morte celular, a apoptose é o mais estudado em insetos. Essa via é considerada um componente da resposta imune em insetos.

Estudos em modelos de infecção de mosquitos com arbovírus têm mostrado que a modulação da apoptose impacta a competência vetorial. Quando alimentadas com sangue contendo DENV2, a linhagens Cali-MIB de *Ae. aegypti*, refratária à infecção, expressa níveis mais altos de genes pró-apoptóticos quando comparada à resposta de fêmeas susceptíveis da linhagem Cali-S (Ocampo et al., 2013). A produção de RNAm subgenômicos pelo ZIKV inibe a apoptose, aumentando a sua infectividade em mosquitos (Slonchak et al., 2020). A utilização de vírus Sindbis (Alphavirus) geneticamente modificado para a expressão de

genes pró-apoptóticos, mostrou que a ativação da apoptose limita a infecção de *Ae. aegypti* (O'Neill et al., 2015). Finalmente, dados da literatura demonstram que a infecção de mosquitos com vírus DENV2 ou ZIKV, induz apoptose em células epiteliais intestinais em tempos bem precoces (2-4 horas pós-infecção), quando a replicação e a produção de partículas virais ainda são limitadas (Ayers et al., 2021).

Todos esses relatos sugerem que a apoptose atua como um mecanismo antiviral. Entretanto, um dos estudos, avaliando linhagens de *Ae. aegypti* com diferentes graus de susceptibilidade à infecção com DENV2, demonstrou que a inibição da expressão do gene do ativador de apoptose DRONC leva à diminuição do título e da frequência da disseminação viral (Eng et al., 2016). Vários fatores podem ser responsáveis pelas diferenças encontradas nos dados coletados, tais como perfis genéticos e condições ambientais. Dessa forma, apesar das correlações demonstradas entre apoptose e infectividade viral, ainda pouco se sabe sobre as condições nas quais a infecção viral altera a homeostase celular, ativando ou inibindo o processo de morte celular programada no epitélio intestinal.

Sistema imune

O sistema imune de insetos, embora menos complexo que o de vertebrados, desempenha um papel importante ao limitar a infecção por organismos invasores. Apesar do sistema imune inato dos insetos ser considerado incapaz de estabelecer memória imunológica, trabalhos recentes vêm mostrando características de resposta duradoura, através da diferenciação de hemócitos, induzida por lipoxina complexada com evokina em mosquitos *Anopheles gambiae* (Ramirez et al., 2015; Smith et al., 2015; Barletta et al., 2019). Além disso, a caracterização de proteínas que possuem domínios de imunoglobulinas semelhantes a anticorpos desempenham um papel importante no combate a infecções bacterianas e com *Plasmodium falciparum* (Dong et al., 2006; Garver et al., 2008).

Populações (naturais e de laboratório) de insetos possuem graus diferentes de susceptibilidade a invasores, que variam de resistentes a susceptíveis (Collins et al., 2002; Hume et al., 2007). Essa resistência à infecção encontrada nessas populações pode ser atribuída, em parte, à existência do sistema imune com capacidade de destruir ou impedir o desenvolvimento de invasores.

A resposta inata dos insetos baseia-se no reconhecimento de padrões de moléculas associadas a patógenos (do inglês *pathogen associated molecular*

patterns - PAMPs), presentes em sua superfície, através de receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (do inglês *pattern recognition receptors* - PRRs), que reconhecem os PAMPs e ativam as vias de imunidade (Barrilas-Mury et al., 2005).

O sistema imune inato dos insetos possui dois tipos de resposta: 1) a resposta humoral – relacionada a componentes solúveis, como lectinas, cascata da profenoloxidase (PPO), e a produção de moléculas efetoras, tais como os peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides* - AMP -) e as ROS; e 2) a resposta celular: relacionada à fagocitose, à agregação de hemócitos e à encapsulação dos patógenos (Lee et al., 2019). O corpo gorduroso é o principal sítio humoral de insetos, onde ocorre a maior síntese de AMP. Os hemócitos e o epitélio intestinal produzem AMP. O último tecido citado produz, ainda, ROS (Gillespie et al., 1997).

As vias moleculares clássicas envolvidas na resposta de invertebrados são as vias de sinalização Toll, da imunodeficiência (IMD) e a JAK-STAT (Figura 9), embora somente as duas primeiras estejam bem descritas em *D. melanogaster* (Revisado por Yu et al., 2022).

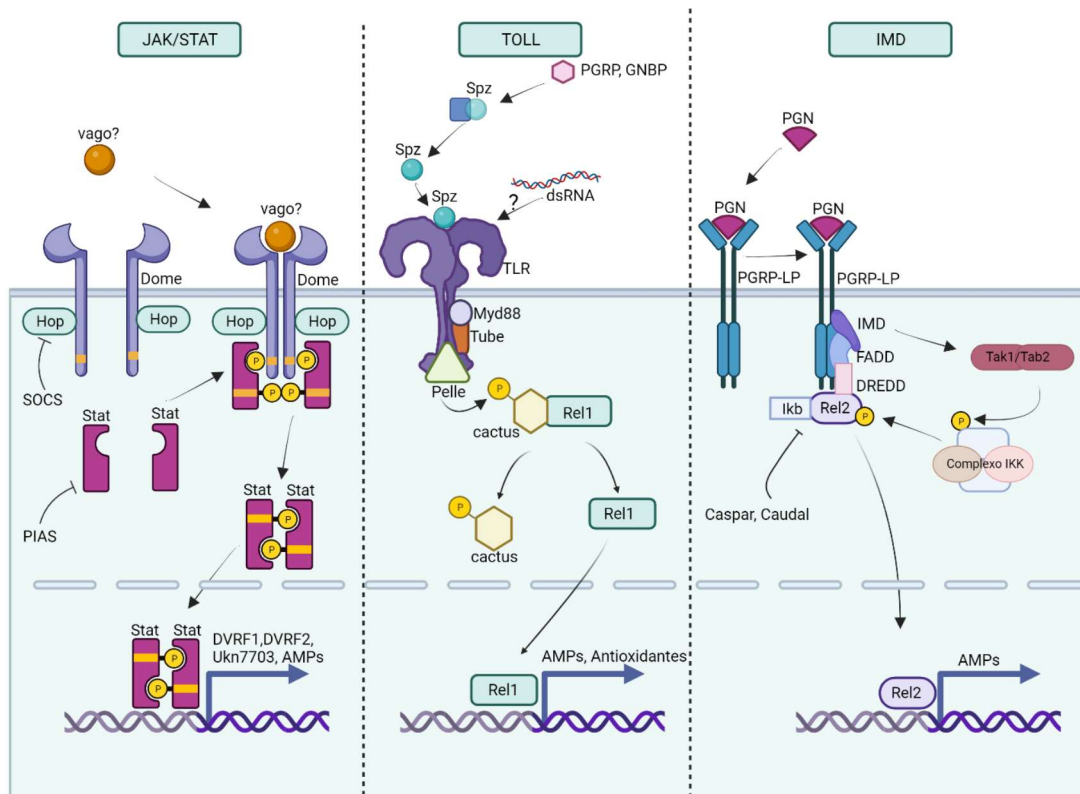


Figura 9: As três principais vias de sinalização imune em insetos.: JAK/STAT, Toll e IMD. As três vias são ativadas após o reconhecimento de patógenos e levam à alteração da expressão de genes efetores e de reguladores do sistema imune inato.

Fonte: Arquivo pessoal

A via Toll foi descrita como a principal via de defesa contra fungos, bactérias gram-positivas e vírus em *Drosophila* (Zambon et al., 2005). Existem vários receptores Toll, mas esses não são capazes de reconhecer, diretamente, o patógeno. Para serem ativados, necessitam da presença de um peptídeo endógeno – Spätzle. Após ativação da via Toll, a proteína adaptadora MyD88 se liga tanto ao receptor Toll quanto a uma proteína quinase – Pelle. Outra proteína adaptadora – Tube – interage com MyD88, juntamente com Pelle, e essa sinalização induz a ubiquitinação e, posteriormente, a degradação de uma proteína inibidora homóloga de I-kappa B – Cactus. Quando a proteína Cactus é degradada, o fator de Transcrição REL1, homólogo de NF-kappa-B p50 e p65, antes mantido no citoplasma, é translocado para o núcleo, promovendo a transcrição de genes efetores da resposta imune (Figura 9).

A via IMD produz AMP que controlam a infecção por bactérias gram-negativas (Avadhanula et al., 2009). A resposta é iniciada por peptídeo glicano do tipo DAP, um componente importante da parede celular bacteriana. Essas moléculas são reconhecidas por uma proteína transmembrana chamada proteína de reconhecimento de peptídeo glicanos (PGRP-LC). Após o reconhecimento inicial, o sinal é propagado para o domínio citoplasmático de PGRP-LC, que ativa Imd, uma proteína contendo um domínio death (*DD death domain*). O DD de Imd é o mediador do recrutamento de outras proteínas, contendo DD, entre elas Dredd. Dredd cliva Imd, o que, aparentemente, contribui para sua ativação. Essa proteína contribui, ainda, para a clivagem do fator de transcrição Relish, uma proteína homóloga à NF-κB de mamíferos. Relish contém um domínio homólogo a Rel (RHD) na sua extremidade amino-terminal, e uma região inibidora IκB, na extremidade carboxi-terminal. A região inibidora IκB deve ser removida por clivagem proteolítica, para liberar a região NF-κB, que é, então, translocada para o núcleo e inicia a transcrição dos seus genes alvo, enquanto a extremidade carboxi-terminal permanece no citoplasma. A ativação de Relish requer a fosforilação da sua região amino terminal pelo complexo IKK. A fosforilação parece ser essencial para sua atividade na ativação da transcrição (Figura 9).

Em *Drosophila*, a via JAK/STAT é ativada quando um ligante Upd, que é uma glicoproteína ativadora dessa via, se associa ao receptor transmembrana Domeless (DOME). DOME sofre uma mudança conformacional, que leva à autofosforilação de quinases associadas do tipo JAK (Janus kinase) (Hop). Hop ativada fosforila DOME, resultando no aparecimento de um sítio de acoplamento para STAT citoplasmática. Esse recrutamento de STAT produz sua fosforilação e dimerização, que leva o dímero a se translocar para o núcleo, onde irá funcionar como fator de transcrição, regulando a expressão de genes alvo (Tikhe,

Dimopoulos, 2021; Figura 9). Embora ortólogos de *upd* ainda não tenham sido encontrados no genoma desse mosquito, acredita-se que a sinalização se dá de forma semelhante à drosófila. Alguns trabalhos mostram que a via de JAK-STAT também está envolvida na resposta contra DENV em *Ae. aegypti* (Xi et al., 2008; Sim e Dimopoulos, 2010). A expressão constitutiva de Dome ou Janus kinase, que mantém a via JAK/STAT ativa, inibe a infecção de diversos sorotipos de DENV nesse mosquito (Jupatanakul et al., 2017). Além disso, o silenciamento específico de PIAS, modulador negativo desta via, diminui os títulos de DENV, três e sete dias após infecção. A resposta anti-Dengue, mediada por JAK/STAT, parece ser independente da resposta mediada pela via Toll, já que nenhum dos genes de resposta imune corregulados por DENV2 e a via Toll são regulados pela depleção de PIAS (Souza-Neto et al., 2009).

A capacidade do mosquito de adquirir arbovírus é, também, determinada pela imunidade antiviral, modulada pela via Toll. Em 2008, Xi e colaboradores mostraram uma forte participação da via Toll na defesa contra a infecção viral de DENV em mosquitos *Ae. aegypti*. O trabalho mostra que o silenciamento de Cactus reduz em até quatro vezes os títulos virais, após sete dias de infecção (Xi et al., 2008). Por outro lado, o silenciamento de MyD88, a proteína adaptadora, aumenta tanto a infecção por DENV2 quanto por DENV4 (Ramirez, Dimopoulos, 2010). Esses estudos demonstraram que a ativação dessa via resulta na produção de moléculas efetoras, como AMP, três e setes dias após a infecção, momento em que os vírions são liberados do intestino e passam a infectar outros tecidos do inseto.

A via IMD produz AMP que controlam a infecção por bactérias gram-negativas. Experimentos de silenciamento do gene *Caspar*, que atua como regulador negativo da via IMD, não mostraram diferenças nos títulos de vírus DENV2 (Xi et al., 2008). Sim e Dimopoulos (2010) mostraram que, quando células de mosquitos são coinfetadas com DENV e *Escherichia coli* (uma bactéria gram negativa), as últimas crescem melhor que em células não infectadas com DENV, sugerindo que o vírus promova a diminuição da produção de AMP pela via IMD. A resposta à ativação dessa via parece ser mediada pela produção de, pelo menos, um peptídeo similar à cecropina, que possui atividade antibacteriana, anti-DENV e anti-Chikungunya e é, também, capaz de matar *Leishmania in vitro* (Luplertlop et al., 2011).

Uma vez que o DENV tenha evadido a barreira intestinal, replicando-se e chegando na hemolinfa, ele é capaz de se disseminar para diversos tecidos. Contudo, na hemolinfa, os hemócitos atuam produzindo óxido nítrico e inibindo a replicação viral (Ramos-Castañeda et al., 2008). Ainda na hemolinfa, o vírus ativa

uma cascata de reconhecimento viral, composta por duas proteínas homólogas ao sistema complemento de vertebrados e à família das TEP (*thioester-containing proteins*) de insetos. A proteína de *Ae. aegypti* homóloga ao *scavenger receptor-C* (AaSR-C) interage, simultaneamente, com o DENV e com uma macroglobulina (AaMCR). Esse reconhecimento do DENV pelo eixo AaSR-C/AaMCR regula a expressão de AMP, que exercem potente atividade anti-DENV (Cheng et al., 2011, Xiao et al., 2014).

Se o vírus conseguir evadir a resposta imune gerada na hemolinfa, ele se dissemina para diferentes órgãos, que são importantes para a transmissão do vírus, como, por exemplo: a) as glândulas salivares, de onde o vírus é inoculado, juntamente com a saliva, no novo hospedeiro, durante o repasto sanguíneo do inseto; b) os ovários, pelos quais ocorre a transmissão vertical do vírus para a prole; c) o órgão sexual, de onde ocorre a transmissão venérea entre fêmeas e machos (Sánchez-Vargas et al., 2018); d) o sistema nervoso, onde a presença do vírus é capaz de modificar o comportamento do inseto (Lima-Camara et al., 2011, Wei Xiang et al., 2022). Foi demonstrado que o DENV1 aumenta a atividade locomotora de *Ae. aegypti*, nos estágios iniciais pós-infecção, o que provavelmente os ajuda a evitar a predação e aumentar a exploração espacial. Como resultado, tem-se uma maior facilidade em encontrar hospedeiros nos estágios mais avançados da infecção e a ampliação das chances de transmissão do vírus (Tallon et al., 2020).

Uma vez na hemolinfa, para ser transmitido pela picada, o vírus tem que alcançar as glândulas salivares e conseguir se estabelecer nesse local. A barreira para isso pode ser o baixo título viral na hemolinfa ou uma possível incompatibilidade genética receptor/ligante. Além dos fatores mencionados, a infecção das glândulas salivares de *Ae. aegypti* por DENV ativa as vias de sinalização IMD e Toll, que induzem a expressão de um AMP similar à cecropina, que tem atividade anti-DENV (Luplertlop et al., 2011). Fatores do tipo complemento AaMCR/AaSR-C, que também agem na hemolinfa, medeiam o reconhecimento viral e a produção de AMP (Xiao et al., 2014). Já foram identificados genes codificadores de proteínas que modulam a replicação do DENV nas glândulas salivares de *Ae. aegypti*: uma catepsina, que aumenta a replicação do vírus; duas outras proteínas que reduzem o número de partículas virais; uma provável cistatina; e uma proteína hipotética contendo repetições de anquirina (Sim et al., 2012).

Uma vez capaz de evadir as barreiras das glândulas salivares e de nelas se estabelecer, o DENV se replica ativamente, alcançando um alto título viral, e se deposita nas cavidades dos ductos das células acinares. Dessa forma, poderá ser

transmitido para um novo hospedeiro vertebrado durante o novo repasto sanguíneo do mosquito.

Outra via de resposta imune e antiviral é a de RNA de interferência (RNAi, Figura 10). É um mecanismo pós-transcricional de modulação da expressão gênica por meio de diferentes classes de pequenos RNAs. Três vias de RNAi vêm sendo caracterizadas: a via dos pequenos RNAs (siRNA - *small interference RNA*), a dos microRNAs (miRNAs) e a dos RNAs que interagem com Piwi (piRNAs - *PIWI-interacting RNAs*). A via dos siRNAs tem sido descrita como a principal das três vias de defesa antiviral. As contribuições das vias de piRNA e miRNA na defesa antiviral ainda são menos esclarecidas.

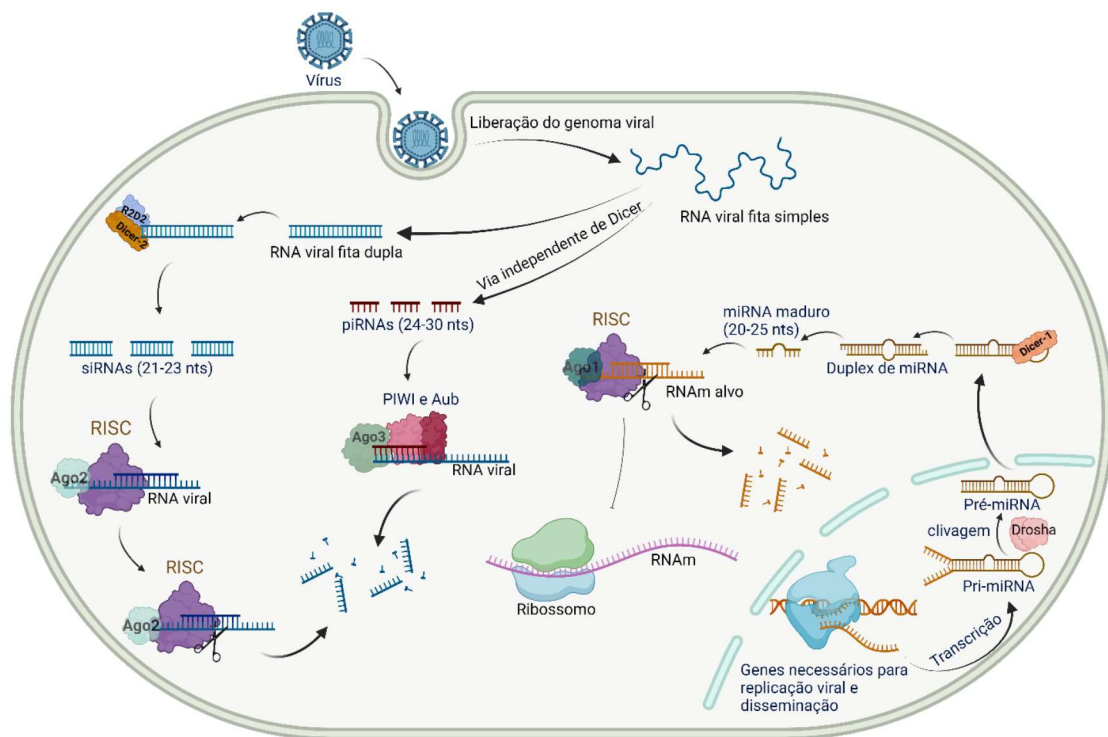


Figura 10: As vias de RNAi em insetos: miRNA, siRNA e piRNA. A função primordial das vias de RNAi é a de eliminar o RNA viral ou alterar a expressão de genes pró- ou antivirais.

Fonte: Arquivo pessoal

A via dos siRNAs se inicia pelo reconhecimento de fitas duplas de RNA (dsRNA - *double-strand RNA*) exógenas ou endógenas, que circulam no citoplasma celular, e sua digestão em pequenas moléculas de RNA (siRNA - *small interference RNA*, Figura 10) dá início ao silenciamento de genes com sequências homólogas (Gammon, Mellon, 2015). A via de RNAi é altamente conservada e é encontrada em uma ampla variedade de organismos eucariotos. Sua principal característica é o uso de RNA de 21-23 nucleotídeos (nt), que possuem alta

especificidade para sequência alvo (Napoli et al., 1990). O mesmo processo já foi descrito como parte de um fenômeno de co-supressão em plantas ou inativação na levedura *Neurospora crassa* (Romano et al., 1992). Em animais, foi primeiramente descoberto no nematoide *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998).

Visto que dsRNA não são produzidas, normalmente, por células eucarióticas, a presença dessas moléculas dispara uma série de eventos, que culminam na destruição de moléculas de RNA com sequências homólogas. Portanto, é considerado o principal mecanismo anti-viral em mosquitos por vários autores (Sánchez-Vargas et al., 2004; Blair 2011; Steinert, Levashina, 2011).

O processo de interferência se inicia após a detecção da dsRNA, que será clivada em siRNAs de 21-25 nt por uma enzima similar à RNase III, chamada Dicer (Dcr). Os siRNAs são incorporados ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*), que possui atividade helicase. A fita antissenso do siRNA guia o RISC para o RNA alvo complementar e o componente nuclease do complexo o cliva (Hannon, 2002; Haasnoot et al., 2007). Além disso, os siRNAs podem funcionar como moldes para a síntese de mais dsRNAs, a partir da fita simples (ssRNA – *single stranded RNA*), uma reação catalisada por uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do hospedeiro (Vaistij et al., 2002; Lipardi, Peterson, 2010). Esse sistema permite, por *feedback* positivo, amplificar o sinal inicial, estimulando a via do RNAi (Figura 10).

Mutantes dos genes chaves da via de siRNA em drosófilas, *Dcr2* e *Argonauta (Ago) 2*, mostraram-se altamente susceptíveis à infecção com vírus de RNA (Galiana-Arnoux et al., 2006; van Rij et al., 2006). Em *Drosophila* há duas Dicers - Dicer1 e Dicer2 - codificadas por *Dcr1* e *Dcr2*, respectivamente. O gene *Dcr1* desempenha o papel da biogênese de miRNA, uma via alternativa que leva regulação da expressão gênica. A *Dcr2* é a enzima que está envolvida com a produção de siRNA. A função da Dicer não é somente a de clivar a dsRNA, mas também de liberar as moléculas de siRNA para o complexo RISC. RISC é um complexo de multiproteínas de 200 - 500 kDa e está, diretamente, ligado à clivagem do mRNA alvo (Bernstein et al., 2001). RISC é formado, principalmente, por proteínas da família Ago, que são essenciais para o complexo (Bohmert et al., 1998).

A primeira evidência da existência da via de defesa antiviral de RNAi em *Ae. aegypti* foi obtida por Olson e colaboradores (1996), a partir de estudos para gerar células que fossem resistentes a DENV2. Foi observado que o vírus Sindbis (família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, complexo WEEV) recombinante, que apresenta uma região codificante para o gene prM do DENV2 em seu genoma,

tanto na orientação senso como na antisenso, torna as células resistentes a um desafio com DENV2, mas não com DENV3. Os mesmos resultados foram observados quando fêmeas adultas de *Ae. aegypti* foram co-injetadas com 10^3 UFC/mL de vírus Sindbis recombinante e DENV2. Em outro trabalho do mesmo grupo, Sánchez-Vargas e colaboradores (2004) mostraram que o vírus Sindbis pode silenciar genes endógenos como o da tripsina inicial em *Ae. aegypti*.

Sánchez-Vargas e colaboradores (2009) mostraram que a infecção por DENV é modulada pela via do siRNA e, portanto, este é o principal determinante da transmissão de DENV pelo vetor *Ae. aegypti*. Eles mostraram que a infecção oral de mosquitos e de células de *Ae. aegypti* por DENV2 gera dsRNA e produz siRNA específicos para DENV2. Além disso, o silenciamento dos genes *Dcr2*, *R2D2* ou *Ago2* causa aumento da replicação viral no vetor e diminui o período de incubação extrínseco requerido para a transmissão. Carvalho-Leandro e colaboradores (2012) observaram que a expressão de *Dcr2* varia entre as populações naturais de *Ae. aegypti* e que é significativamente menor em amostras de mosquitos de campo infectados com DENV2, quando comparada ao controle, sugerindo que esse mecanismo pode ser essencial na infecção viral. Dong e colaboradores (2022) demonstraram que mosquitos transgênicos expressando *Dcr2* ou *R2d2* produziam uma variedade maior de genes antimicrobianos, além de apresentarem redução significativa de DENV e outros arbovírus.

Em mosquitos, a via de siRNA não é capaz de silenciar eficazmente a replicação de DENV no intestino de *Ae. aegypti*, embora seja essencial para restringir a sua replicação sistêmica. Uma proteína importante para o controle da replicação sistêmica de DENV, *Loqs2*, paróloga de *Loquacious* e *r2d2*, não é expressa no intestino desses mosquitos e impede a biogênese de pequenos RNAs provenientes de DENV nesse tecido (Olmo et al., 2018).

Muitos vírus codificam proteínas virais supressoras de silenciamento (*Viral suppressors of RNA silencing* - VSRs) e podem interferir com a produção de siRNA e/ou sequestrar estas moléculas (Li, Ding, 2006; Bortolamiol et al., 2008).

Os mecanismos virais de supressão de RNAi conhecidos levam sempre à inibição de um dos passos da via por meio da produção VSRs, que podem inibir a síntese de siRNA, desestabilizá-la ou inibir a função das proteínas Argonata e RNAase II-type Dicer-like (DCL). Isso pode degradar a AGO1 via autofagia ou degradação mediada por proteassoma, além de também poder inibir a transmissão dos sinais de RNAi (Bortolamiol et al., 2008; Rawlings et al., 2011, Zhao et al., 2018). Entre algumas proteínas virais supressoras de RNAi descritas, podemos citar a proteína P19 dos tombusvirus (Silhavy et al., 2002), a P21 de Closterovirus, a HC-Pro de Potyvirus (Anandalakshmi et al., 1998) e a proteína 2b,

essa última produzida por diversos vírus (Li, Ding, 2006). Recombinantes de proteínas 2B de Flock House Virus (FHV) de insetos, quando inoculadas em culturas ou no adulto de *Ae. aegypti*, inibem a via do RNAi e o título viral aumenta. Em adultos, observam-se mudanças fisiológicas e comportamentais, como a diminuição do tempo de vida e a oviposição (Cirimotich et al., 2008).

A regulação negativa da Dcr2 após a infecção com DENV pode indicar uma manipulação viral de defesas do mosquito. Foi identificado um supressor de RNAi produzida por DENV e pelo vírus do Oeste do Nilo (Schnettler et al., 2012). O trabalho mostra que uma molécula de RNA subgenômico (sfRNA, RNAs genômicos virais, parcialmente degradados) suprime, eficientemente, as vias de RNAi induzidas tanto por siRNA, como por miRNA, em células de mamíferos e de insetos. O mecanismo supressor é a inibição da atividade de clivagem da dsRNA, promovida por Dicer.

Os miRNA são uma classe de moléculas de RNA não codificantes que contêm 22 nucleotídeos (nt) e são transcritos pela RNA polimerase II celular (Liu et al., 2017, Figura 10). Os transcritos primários (pri-miRNA) são clivados por uma enzima Rnase, chamada de Drosha, e a proteína de ligação ao RNA, Pasha, produz intermediários de aproximadamente 60-70 nt em forma de grampo, chamados pré-miRNAs. Eles são transportados para o citoplasma pela Exportina-5. As proteínas Loquacious e Dcr-1 reconhecem o dsRNA e clivam os pré-miRNAs em duplexes de miRNA de, aproximadamente, 22 nt (Liu et al., 2017). A diversidade funcional dos miRNAs é amplificada pela capacidade de cada locus de miRNA de gerar dois miRNAs. Uma dessas fitas é, então, recrutada pela proteína Ago1 ou Ago2 e forma um complexo conhecido como miRISC (miRNA contendo RISC; Denli et al., 2004, Figura 10).

A função primordial dos miRNA parece ser a regulação do desenvolvimento e da fisiologia do organismo (Liu et al., 2019). Contudo, já foi demonstrado que os miRNAs possuem um papel importante na interação entre os genomas virais e seus hospedeiros. Os miRNAs dos hospedeiros podem ter os genomas virais como alvo ou regular fatores dos hospedeiros que, por sua vez, podem promover ou inibir a replicação viral (Lee et al., 2017; Su et al., 2021). Diversos miRNAs têm sido implicados com a inibição ou indução da replicação de DENV em hospedeiros vertebrados (Su et al., 2021).

Yan e colaboradores (2014) demonstraram que o microRNA miR-252 é altamente expresso em células C6/36 infectadas por DENV2, e que é capaz de regular, negativamente, a expressão da proteína E do vírus, inibindo sua replicação. Em contrapartida, Zhou e colaboradores (2014) observaram um aumento do miR-281 em intestinos e células C6/36 de *Ae. albopictus*, seguido

pela indução da replicação de DENV2. Avila-Bonilla e colaboradores, também demonstraram que o miR-927 promove a replicação de DENV2 através da filamina, que é essencial para a reorganização de actina e a regulação da via de Toll (Avila-Bonilla et al., 2020).

Zhu e colaboradores (2021) mostraram que o miRNA hsa-miR-150-5p, derivado de sangue humano, é capaz de interferir no sistema antiviral de *Ae. aegypti*, facilitando a infecção por DENV. Estudos mecanísticos indicaram que esse miRNA sequestra a proteína Argonauta-1 do mosquito, suprimindo a expressão de quimioproteínas com potente atividade antiviral.

A via dos piRNA é importante na resposta antiviral em mosquitos, e já foi demonstrado que ela pode ser suficiente para montar uma resposta antiviral em células, na ausência da via de siRNA (Hess et al., 2011; Varjak et al., 2017, Walsh et al., 2022, Figura 10). Os piRNA são a maior classe de pequenos RNAs (sRNAs, 23–30 nt) não codificantes expressos em células animais, e estão envolvidos em epigenética, silenciamento de transposons e de sequências repetitivas e, também, na regulação de elementos genéticos em linhagens germinativas (Li et al., 2009).

A via dos piRNA começa com pequenos RNA de fita simples (ssRNA) precursores de diferentes origens, que são processados a piRNAs primários. Isso ocorre através de um mecanismo independente de Dicer, mas utilizando a ribonuclease Zucchini (Zuc), que carrega os piRNAs nas proteínas Piwi. A proteína Piwi4 ativa a produção de piRNA secundários pelo mecanismo de amplificação de ciclos de *ping-pong*, que regulam a abundância dos transcritos e envolvem as proteínas Piwi5, Piwi6, Argonauta3 (Ago3) e aubergina (Aub) (Czech, Hannon, 2016, Figura 10).

Aedes aegypti possui um repertório vasto de proteínas da via Piwi1-7 (Liu et al., 2018) quando comparado a outros insetos, como, por exemplo, *D. melanogaster*, que possui apenas três, Piwi, Aubergine (Aub), and Ago3 (Rozhkov et al., 2013). Hess e colaboradores (2011) mostraram que os sRNAs são mais abundantes em mosquitos infectados por DENV, quando comparados a não-infectados (controle). Além disso, tais pesquisas mostraram que processos celulares, como metabolismo mitocondrial, transcrição/tradução e transporte, foram afetados, indicando a atuação da via dos piRNAs na defesa antiviral do mosquito.

Elementos virais endógenos (EVE) são sequências de vírus RNA não retrovirais que são inseridas no genoma dos mosquitos e agem como moldes para a produção de piRNAs. Estudos em culturas de células de *Ae. aegypti*, assim como em mosquitos adultos, mostram a presença de piRNAs produtores de EVE

que são remanescentes de outros sistemas de defesa antivirais, baseados em ácidos nucleicos. Esses sistemas tiram vantagem do material genético do patógeno invasor para criar pequenos RNA capazes de restringir a replicação viral. Eles ainda envolvem a endogenização das sequências virais, e podem fornecer proteção contra infecções entre gerações (Vodovar et al., 2012; Suzuki et al., 2017; Whitfield et al., 2017).

Considerações finais

O controle e a prevenção de doenças causadas por arbovírus requerem uma série de medidas, entre elas o controle das populações do vetor, o monitoramento da sua resistência a inseticidas e o desenvolvimento de vacinas e fármacos eficazes contra os diferentes arbovírus. No caso da dengue, as ferramentas de combate à doença, quando disponíveis, não têm conseguido reduzir os casos a números satisfatórios até o momento. Existe somente uma vacina recém-liberada para a população no sistema privado.

Não há fármacos disponíveis no mercado para toda a população, embora vários estejam em teste. As atividades de prevenção da dengue, no Brasil, contam com o monitoramento contínuo dos índices de infestação pelo *Ae. aegypti* nos municípios, como forma de se identificar áreas de maior densidade vetorial, a eliminação de criadouros e o controle de adultos e a soltura de mosquitos com *Wolbachia*. Além disso, temos um sistema bastante confiável de monitoramento da resistência a inseticidas. A situação epidemiológica dos sorotipos circulantes também é realizada. Essa é uma informação importante para que medidas de controle e alerta sejam adequadas. Entretanto, não se observa redução do número de casos de uma maneira consistente, mas um decréscimo no número de casos como resultado da característica cíclica da doença.

Assim, é urgente o desenvolvimento de novas ferramentas e o ajuste de velhas metodologias para a realidade atual. Ainda há muito que se entender sobre os processos celulares e moleculares na interação DENV-*Ae. aegypti*, como o impacto da infecção no metabolismo do mosquito, o impacto dos componentes do sangue sobre a infecção viral, e o impacto da replicação viral sobre os processos de síntese de proteínas, além de outros aspectos que podem contribuir para a competência vetorial. Desse modo, embora o controle do vetor seja o principal meio de mitigação da doença, estudos de pesquisa básica, que permitem entender melhor o mecanismo pelo qual os vírus se estabelecem no vetor, são fundamentais, podendo levar ao desenvolvimento de novas ferramentas de controle.

Referências

- ABDULJALIL, J.M., ABD AL GALIL, F.M. Molecular pathogenesis of dengue virus infection in *Aedes* mosquitoes. *J Insect Physiol*, 138:104367, 2022.
- ANANDALAKSHMI, R., G. J., PRUSS, X., GE, R., MARATHE, A. C., MALLORY, T. H. SMITH, and VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13079-13084, 1998.
- ANGLERO-RODRIGUEZ, Y.I., TALYULI, O.A, BLUMBERG, B.J., KANG S., DEMBY C., SHIELDS, A., CARLSON, J., JUPATANAKUL, N., DIMOPOULOS, G. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity *eLife*, 6, p. e28844, 2017.
- APTE-DESHPANDE, A., PAINGANKAR, M., GOKHALE, M.D., DEOBAGKAR, D.N. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus *PLoS One*, 7, p. e40401, 2012.
- AVADHANULA, V., WEASNER, B.P., HARDY, G.G., KUMAR, J.P., HARDY, R.W. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the IMD pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog.*, 5, e1000582, 2009.
- AVILA-BONILLA, R.G., YOCUPICIO-MONROY, M., MARCHAT, L.A., PÉREZ-ISHIWARA, D.G., CERECEDO-MERCADO, D.A., DEL ÁNGEL, R.M., SALAS-BENITO, J.S. miR-927 has pro-viral effects during acute and persistent infection with dengue virus type 2 in C6/36 mosquito cells. *J Gen Virol.*, 101(8):825-839, 2020.
- AYERS, J.B., COATSWORTH, H.G, KANG, S., DINGLASAN, R.R., ZHOU, L. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. *Commun Biol*, 4(1):69, 2021.
- BARILLAS-MURY, C., KUMAR S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol*, 7(11):1539-45, 2005.
- BAHIA, A.C., DONG, Y., BLUMBERG, B.J., MLAMBO, G., TRIPATHI, A., BENMARZOUK-HIDALGO, O.J., CHANDRA, R., DIMOPOULOS, G. Exploring *Anopheles* gut bacteria for Plasmodium blocking activity. *Environ Microbiol*, 16, 2980-2994, 2014.
- BARLETTA, A.B.F., TRISNADI, N., Ramirez, J.L., BARILLAS-MURY, C. Mosquito Midgut Prostaglandin Release Establishes Systemic Immune Priming. *iScience*, 19:54-62, 2019.
- BEN-YAKIR, D. Growth and retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizin host against nocardia (*Rhodococcus*) *rhodnii*. *J Insect Physiol*, 33(6):379–83, 1987.
- BENNETT, K.E., OLSON, K.E., MUÑOZ, M.L., FERNANDEZ-SALAS, I., FARFAN-ALE, J.A., HIGGS, S., BLACK, W.C. 4th, BEATY, B.J. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg*, 67(1):85-92, 2002.

BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M, HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409(6818):363-6, 2001.

BLAIR, C.D. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*, 2011.

BLACK, W.C. 4th., BENNETT, K.E., GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N., Barillas-Mury, C.V., FERNÁNDEZ-SALAS, I., MUÑOZ, M.L., FARFÁN-ALÉ, J.A., OLSON, K.E., BEATY, B.J. Flavivirus Susceptibility In *Aedes Aegypti*. *Arch Med Res*, 33 (4): 379– 388, 2002.

BLACK, W.C. 4th., SEVERSON, D., Genetics of Vector Competence. in: Beaty, B.J.,Marquardt, W.C. (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*, University Press, Colorado, p415-448, 2005.

BOHMERT, K., CAMUS, I., BELLINI, C., BOUCHEZ, D., CABOCHE, M., BENNING, C. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J*, 17(1):170-80, 1998.

BORTOLAMIOL, D., PAZHOUHANDEH, M., ZIEGLER-GRAFF, V. Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant Signal Behav*, 3(9):657-9, 2008.

BOTTINO-ROJAS, V., TALYULI, O.A.C., CARRARA, L., MARTINS. A.J., JAMES. A.A., OLIVEIRA, P.L., PAIVA-SILVA, G.O. The redox-sensing gene *Nrf2* affects intestinal homeostasis, insecticide resistance, and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*, 293(23):9053-9063, 2018.

BUCHON, N., BRODERICK, N.A., CHAKRABARTI, S., LEMAITRE, B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev*, 23, 2333-2344,2009.

BUCHON, N., BRODERICK, N.A., CHAKRABARTI, S., LEMAITRE, B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev*, 23(19):2333-44, 2009.

CARVALHO-LEANDRO, D., AYRES, C.F., GUEDES, D.R., SUESDEK, L., MELO-SANTOS, M.A., OLIVEIRA, C.F., CORDEIRO, M.T., REGIS, L.N., MARQUES, E.T., GIL, L.H., MAGALHAES, T. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop*, 124(2):113-9, 2012.

CIRIMOTICH, C.M., DONG, Y., CLAYTON, A.M., SANDIFORD, S.L., SOUZANETO, J.A., MULENGA, M., DIMOPOULOS, G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332, 855-858, 2011.

CHENG, G., LIU, L., WANG, P., Zhang, Y., ZHAO, Y.O., COLPITTS, T.M., Feitosa, F., ANDERSON, J.F., Fikrig, E. An in vivo transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. *PLoS ONE*, 6, e22786, 2011.

- CHOTIWAN, N., ANDRE, B.G., SANCHEZ-VARGAS, I., ISLAM, M.N., GRABOWSKI, J.M., HOPF-JANNASCH, A., GOUGH, E., NAKAYASU, E., BLAIR, C.D., BELISLE, J.T., HILL, C.A., KUHN, R.J., PERERA, R. Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog*, 14(2):e1006853, 2018.
- CLYDE, K., KYLE, J.L., HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, 80(23):11418-31, 2006.
- COLLINS, W.E., SULLIVAN, J.S., NACE, D., WILLIAMS, T., SULLIVAN, J.J., et al. Experimental infection of *Anopheles farauti* with different species of *Plasmodium*. *J Parasitol*, 88(2):295-8, 2002.
- CUI, Y, FRANZ, A.W.E. Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 127:103496, 2020.
- CZECH, B., HANNON, G.J. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem Sci*, 41(4):324-337, 2016.
- DEVENPORT, M., JACOBS-LORENA, M. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. In: *The Biology of Diseases Vectors Second Edition*, Elsevier, 289-296, 2004.
- DENLI, A.M., TOPS, B.B., PLASTERK, R.H., KETTING, R.F., HANNON, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, ;432(7014):231-5, 2004.
- DONALISIO, M.R. de C.-O. Enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, mimeo, 1995.
- DONG, Y., MANFREDINI, F., DIMOPOULOS, G.. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*, 5(5):e1000423, 2009.
- DONG, Y., MORTON, J.C. Jr, RAMIREZ, J.L., SOUZA-NETO, J.A., DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 42(2):126-32, 2012.
- DONG, Y., DONG, S., DIZAJI, N.B., RUTKOWSKI, N., POHLENZ, T., MYLES, K., DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* siRNA pathway mediates broad-spectrum defense against human pathogenic viruses and modulates antibacterial and antifungal defenses. *PLoS Biol*, 20(6):e3001668, 2022.
- DONG, Y., TAYLOR, H.E., DIMOPOULOS, G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol*, 4(7):e229, 2006.

DU, M., JING, W., LIU, M., LIU, J. The Global Trends and Regional Differences in Incidence of Dengue Infection from 1990 to 2019: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Infect Dis Ther*, 10(3):1625-1643, 2021.

EDIGIL, D., POLACEK, C., HARRIS, E. Dengue Virus A Novel Strategy For Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *J Virol*, 80(6):2976-86, 2006.

ENG, M.W., VAN ZUYLEN, M.N., SEVERSON, D.W.. Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 76:70-83, 2016.

FIGUEIREDO, R.M., NAVECA, F.G., BASTOS, M.S., MELO, M.N., VIANA, S.S., MOURÃO, M.P., COSTA, C.A., FARIAS, I.P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14(4):667-9, 2008.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806-11, 1998.

FOSTER, W.A., WALKER, E.D. Mosquitoes (Culicidae) In Mullen G & Durden L (Eds). *Medical and Veterinary Entomology*, Academic Press, Pages 203-262, 2002.

GAIO, A. de O., GUSMÃO, D.S., SANTOS, A.V., BERBERT-MOLINA, M.A., PIMENTA, P.F.P., LEMOS, F.J.A. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *Parasit Vectors* 4: 105, 2011.

GARZA-HERNÁNDEZ, J.A., RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A., SALAZAR, M.I., RUSSELL, T.L., ADELEKE, M.A., DE LUNA-SANTILLANA EDE, J., REYES-VILLANUEVA F. Vectorial capacity of *Aedes aegypti* for dengue virus type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3):e2013, 2013.

GARVER, L.S., XI, Z., DIMOPOULOS, G. Immunoglobulin superfamily members play an important role in the mosquito immune system. *Dev Comp Immunol*, 32(5):519-31, 2008.

GALIANA-ARNOUX, D., DOSTERT, C., SCHNEEMANN, A., HOFFMANN, J.A., IMLER, J.L. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat Immunol*, 7(6):590-7, 2006.

GAMMON, D.B., MELLO, C.C. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr. Opin. Insect Sci*, 8, 111–120, 2015.

GILLESPIE, J.P., KANOST, M.R., TRENCZEK, T. Biological Mediators of Insect Immunity. *Annu Rev Entomol*, 42:611–43, 1997.

GONÇALVES NETO, V.S., REBÊLO, J.M. Aspectos epidemiológicos do dengue no Município de São Luís, Maranhão, Brasil, 1997-2002 [Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil, 1997-2002]. *Cad Saude Publica*, 20(5):1424-31, 2004.

GRAÇA-SOUZA, A.V., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G.O., BRAZ, G.R., PAES, M.C., SORGINE, M.H., OLIVEIRA, M.F., OLIVEIRA, P.L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*, 36(4):322-35, 2006.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*, 11(3): 480-496, 1998.

HANNON, G.J. RNA interference. *Nature*, 418(6894):244-51, 2002.

HAASNOOT, J., DE VRIES, W., GEUTJES, E.J., PRINS, M., DE HAAN, P., BERKHOUT, B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 3(6):e86, 2007.

HEINZ, F.X., STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, 30(29):4301-6, 2012.

HENCHAL, E.A., PUTNAK, J.R. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, 3(4):376-96, 1990.

HESS, A.M., PRASAD, A.N., PTITSYN, A., EBEL, G.D., OLSON, K.E., BARBACIORU, C., MONIGHETTI, C., CAMPBELL, C.L. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiol*, 11:45, 2011.

HONGO, Y., SHARMA, V.K., PRAKASH, T., NODA, S., TOH, H., TAYLOR, T.D., KUDO, T., SAKAKI, Y., TOYODA, A., HATTORI, M., OHKUMA, M. Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, 322, 1108-1109, 2008.

HOWE, G.M., A world geography of human diseases. New York: Academic Press, 271–317, 1977.

HUME, J.C., TUNNICLIFF, M., RANFORD-CARTWRIGHT, L.C., DAY, K.P. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, 24;6:139, 2007.

HUNG, R.J., HU, Y., KIRCHNER, R., LIU, Y., XU, C., COMJEAN, A., TATTIKOTA, S.G., LI, F., SONG, W., HO SUI, S., Perrimon, N. A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117(3):1514-1523, 2020.

HWANG, E., KIM, G., OH, H., AN, Y.J., KIM, J., KIM, J.H., HWANG, E.S., PARK, J.H., HONG, J., KOO, B.S. Molecular and evolutionary analysis of dengue virus serotype 2 isolates from Korean travelers in 2015. *Arch Virol*, 165(8):1739-1748, 2020.

JANEH, M., OSMAN, D., KAMBRIS, Z. DAMAGE-INDUCED CELL REGENERATION IN THE MIDGUT OF *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Sci Rep*, 16;7:44594, 2017.

JUPATANAKUL, N., SIM, S., ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y.I., SOUZA-NETO, J., DAS, S., POTI, K.E., ROSSI, S.L., BERGREN, N., VASILAKIS, N., DIMOPOULOS, G. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 12;11(1):e0005187, 2017.

KIKUCHI, Y., HAYATSU, M., HOSOKAWA, T., NAGAYAMA, A., TAGO, K., FUKATSU, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 8618-8622, 2012.

KOPP, E.B., MEDZHITOV, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Cur Opin Immunol*, 11:13–18, 1999.

KUHN, R.J., ZHANG, W., ROSSMANN, M.G., PLETNEV, S.V., CORVER, J., LENCHES, E., JONES, C.T., MUKHOPADHYAY, S., CHIPMAN, P.R., STRAUSS, E.G., BAKER, T.S., STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108:717-725, 2002.

LEE, W.S., WEBSTER, J.A., MADZOKERE, E.T., STEPHENSON, E.B., HERRERO, L.J. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasit Vectors*, 12(1):165, 2019.

LEE, M., ETEBARI, K., HALL-MENDELIN, S., VAN DEN HURK, A.F., HOBSON-PETERS, J., VATIPALLY, S., SCHNETTLER, E., HALL, R., ASGARI, S. Understanding the role of microRNAs in the interaction of *Aedes aegypti* mosquitoes with an insect-specific flavivirus. *J Gen Virol*, 98(7):1892-1903, 2017.

Lehane, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*, 42:525-50, 1997

LI, F., DING, S.W. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol*, 60:503-31, 2006.

LI, C.; VAGIN, V.V.; LEE, S.; XU, J.; MA, S.; XI, H.; SEITZ, H.; HORWICH, M.D.; SYRZYCKA, M.; HONDA, B.M.; et al. Collapse of Germline piRNAs in the Absence of Argonaute3 Reveals Somatic piRNAs in Flies. *Cell*, 137, 509–521, 2009.

LIMA-CAMARA, T.N., BRUNO, R.V., LUZ, P.M., CASTRO, M.G., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., Sorgine, M.H., Peixoto, A.A. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*, 6(3):e17690, 2011.

LIPARDI, C., PATERSON, B.M. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* establishes a common theme in RNA silencing. *Fly*, 4(1):30-5, 2010.

LIU, J., LIU, Y., NIE, K., DU, S., QIU, J., PANG, X., WANG, P., CHENG, G. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat Microbiol*, 1, 6087, 2016.

- LIU, W.W., MENG, J., CUI, J., LUAN, Y.S. Characterization and Function of MicroRNAs in Plants. *Front Plant Sci*, 22;8:2200, 2017.
- LIU, T., XU, Y., WANG, X., GU, J., YAN, G., CHEN, X.G. Antiviral systems in vector mosquitoes. *Dev Comp Immunol*, 83:34-43, 2018.
- LIU, Y., CHENG, Z., PANG, Y., CUI, L., QIAN, T., QUAN, L., ZHAO, H., SHI, J., KE, X., FU, L. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 24;12(1):51, 2019.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., VAZEILLE, M., DE FILIPPIS, A.M., FAILLOUX, A.B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(1):43-54, 2004.
- LUPLERTLOP, N., SURASOMBATPATTANA, P., PATRAMOOL, S., DUMAS, E., WASINPIYAMONGKOL L., et al. Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog*, 7(1): e1001252, 2011.
- LIMA-CAMARA, T.N., BRUNO, R.V., LUZ, P.M., CASTRO, M.G., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., SORGINE, M.H., PEIXOTO, A.A. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*, 6(3):e17690, 2011.
- MACIEL-DE-FREITAS, R., SYLVESTRE, G., GANDINI, M., KOELLA, JC. The influence of dengue virus serotype-2 infection on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) motivation and avidity to blood feed. *PLoS One*, 8(6):e65252, 2013.
- MACKERRAS, I.M. Transmission of dengue fever by *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* Walk. in New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 40(3):295-312, 1946.
- MANOKARAN, G., FLORES, H.A., DICKSON, C.T., NARAYANA, V.K., KANOJIA, K., DAYALAN, S., TULL, D., MCCONVILLE, M.J., MACKENZIE, J.M., SIMMONS, C.P. Modulation of acyl-carnitines, the broad mechanism behind Wolbachia-mediated inhibition of medically important flaviviruses in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117(39):24475-24483, 2020.
- MESSINA, J.P., BRADY, O.J., GOLDING, N., KRAEMER, M.U.G., WINT, G.R.W., RAY, S.E., PIGOTT, D.M., SHEARER, F.M., JOHNSON, K., EARL, L., MARCZAK, L.B., SHIRUDE, S., DAVIS WEAVER, N., GILBERT M, VELAYUDHAN R, JONES P, JAENISCH T, SCOTT TW, REINER RC JR, HAY SI. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol*, 4(9):1508-1515, 2019.
- MICCHELLI, C.A., PERRIMON, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, 26;439(7075):475-9, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Ministério da Saúde 2,54, 2023.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(12):6986-91, 2003.

MOREIRA, L.A., ITURBE-ORMAETXE, I., JEFFERY, J.A., LU, G., PYKE, A.T., HEDGES, L.M., ROCHA, B.C., HALL-MENDELIN, S., DAY, A., RIEGLER, M., HUGO, L.E., JOHNSON, K.N., KAY, B.H., MCGRAW, E.A., VAN DEN HURK, A.F., RYAN, P.A., O'NEILL, S.L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 24;139(7):1268-78, 2009.

MORIMOTO, J., SIMPSON, S.J., PONTON, F. Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett*, 13(7):20160966, 2017.

MUKHERJEE, D., DAS, S., BEGUM, F., MAL, S., RAY, U. The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens*, 8(2):77, 2019.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.

NANAWARE, N., BANERJEE, A., MULLICK BAGCHI, S., BAGCHI, P., MUKHERJEE, A. Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses*, 13(10):1967, 2021.

NEMÉSIO, H., PALOMARES-JEREZ, F., VILLALÁIN, J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochim Biophys Acta*, ;1818(11):2818-30, 2012.

NGUYET, M.N., DUONG, T.H., TRUNG, V.T., NGUYEN, T.H., TRAN, C.N., LONG, V.T., DUI LE., T, NGUYEN, H.L., FARRAR, J.J., HOLMES, E.C., RABAA, M.A., BRYANT, J.E., NGUYEN, T.T., NGUYEN, H.T., NGUYEN, L.T., PHAM, M.P., NGUYEN H.T., LUONG, T.T., WILLS, B., NGUYEN, C.V., WOLBERS, M., SIMMONS, C.P. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(22):9072-7, 2013.

NIKOH, N., HOSOKAWA, T., OSHIMA, K., HATTORI, M., FUKATSU, T. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. *Genome Biol Evol*, 3:702-14, 2011.

NOBUCHI, H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. *Kanpo Rinsho*, 26:422–425, 1979.

NOGUEIRA, R.M., EPPINGHAUS, A.L. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(3):255-6, 2011.

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*, 342(6157):415, 2013.

OCAMPO, C.B., CAICEDO, P.A., JARAMILLO, G., URSIC BEDOYA, R., BARON, O., SERRATO I.M., COOPER, D.M., LOWENBERGER, C. Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. *PLoS One*, 8(4):e61187, 2013.

OHLSTEIN, B., SPRADLING, A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, 439(7075):470-4, 2006.

OLIVEIRA JH, GONÇALVES RL, LARA FA, DIAS FA, GANDARA AC, MENNA-BARRETO RF, EDWARDS MC, LAURINDO FR, SILVA-NETO MA, SORGINE MH, OLIVEIRA PL. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog*, 7(3):e1001320, 2011.

OLMO, R.P., FERREIRA, A.G.A., IZIDORO-TOLEDO, T.C., AGUIAR, E.R.G.R., DE FARIA, I.J.S., DE SOUZA, K.P.R., OSÓRIO, K.P., KUHN. L., HAMMANN. P., DE ANDRADE, E.G., TODJRO, Y.M., ROCHA, M.N., LEITE, T.H.J.F., AMADOU, S.C.G., ARMACHE, J.N., PARO, S., DE OLIVEIRA, C.D., CARVALHO, F.D., MOREIRA, L.A., MAROIS, E., IMLER, J.L., MARQUES, J.T. Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. *Nat Microbiol*, 3(12):1385-1393, 2018.

OLSON, K.E.; BLAIR, C.D. Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. *Curr Opin Virol*, 15, 119–126, 2015.

OLSON, K.E., HIGGS, S., GAINES, P.J., POWERS, A.M., DAVIS, B.S., KAMRUD, K.I., CARLSON, J.O., BLAIR, C.D., BEATY, B.J. Genetically engineered resistance to dengue-2 virus transmission in mosquitoes. *Science*, 272(5263):884-6, 1996.

O'NEILL, K., OLSON, B.J., HUANG, N., UNIS, D., CLEM, R.J. Rapid selection against arbovirus-induced apoptosis during infection of a mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(10):E1152-61, 2015.

PAIS, I.S., VALENTE, R.S., SPORNIK, M., TEIXEIRA, L. *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. *PLoS Biol*, 16(7):e2005710, 2018.

PAN, X., ZHOU, G., WU, J., BIAN, G., LU, P., RAIKHEL, A.S., Xi, Z. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(1):E23-31, 2012.

PERERA, R., RILEY, C., ISAAC, G., HOPF-JANNASCH, A.S., MOORE, R.J., WEITZ, K.W., PASA-TOLIC, L., METZ, T.O., ADAMEC, J., KUHN, R.J. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathog*, 8(3):e1002584, 2012.

PETIT, M., MONGELLI, V., FRANGEUL, L., BLANC, H., JIGGINS, F., SALEH, M.C. piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(29):E4218-27, 2016.

PING, L., BUCHLER, R., MITHOFER, A., SVATOS, A., SPITELLER, D., DETTNER, K., GMEINER, S., PIEL, J., SCHLOTT, B., BOLAND, W. A novel Dps-type protein from insect gut bacteria catalyses hydrolysis and synthesis of N-acyl amino acids. *Environ Microbiol*, 9, 1572-1583, 2007.

PUIG-BASAGOITI, F., TILGNER, M., FORSHEY, BM., PHILPOTT, S.M., ESPINA, N.G., WENTWORTH, D.E., GOEBEL, S.J., MASTERS, P.S., FALGOUT, B., REN, P., FERGUSON, D.M., SHI, P.Y. Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4):1320-9, 2006.

RAMIREZ, J.L., SHORT, SM, BAHIA, A.C., SARAIVA, R.G., DONG, Y., KANG, S., TRIPATHI, A., MLAMBO, G., DIMOPOULOS, G. *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities *PLoS Pathog*, 10 p. e1004398, 2014.

RAMIREZ, J.L., DE ALMEIDA OLIVEIRA, G., CALVO, E., DALLI, J., COLAS, R.A., SERHAN, C.N., RIBEIRO, J.M., BARILLAS-MURY, C. A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in *Anopheles gambiae*. *Nat Commun*, 23;6:7403, 2015.

RAMIREZ, J.L., DIMOPOULOS, G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev Comp Immunol*, 34(6):625-9, 2010.

RAMIREZ, J.L., SOUZA-NETO, J., TORRES COSME, R., ROVIRA, J., ORTIZ, A., PASCALE, J.M., DIMOPOULOS, G. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*, 6 p. e1561, 2012.

RAMIREZ, J.L., DE ALMEIDA OLIVEIRA, G., CALVO, E., DALLI, J., COLAS, R.A., SERHAN, C.N., RIBEIRO, J.M., BARILLAS-MURY, C. A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in *Anopheles gambiae*. *Nat Commun*, 23;6:7403, 2015.

RAMOS-CASTAÑEDA. J., GONZÁLEZ. C., JIMÉNEZ. M.A., DURAN. J., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ. S., RODRÍGUEZ. M.H., LANZ-MENDOZA. H. Effect of nitric oxide on Dengue virus replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Intervirology*, ;51(5):335-41, 2008.

RAWLINGS, R.A., KRISHNAN, V., Walter, N.G. Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple-turnover *J Mol Biol*, 408(2): 262–276, 2011.

RIVERA, L., BISWAL, S., SÁEZ-LLORENS, X., REYNALES, H., LÓPEZ-MEDINA, E., BORJA-TABORA, C., BRAVO, L., SIRIVICHAYAKUL, C., KOSALARAKSA, P., MARTINEZ VARGAS, L., YU, D., WATANAVEERADEJ, V., ESPINOZA, .F, DIETZE, R., FERNANDO, L., WICKRAMASINGHE, P., DUARTE MOREIRA JR, E., FERNANDO, A.D., GUNASEKERA, D., LUZ, K., VENÂNCIO DA CUNHA, R., RAUSCHER, M., ZENT, O., LIU, M., HOFFMAN, E., LEFEVRE, I., TRICOU, V., WALLACE, D., ALERA, M., BORKOWSKI, A.

Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003). *Clin Infect Dis*, 75(1):107-117, 2022.

ROGERS, K. "Aedes". *Encyclopedia Britannica*, 19 Jul. 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/Aedes>. Acessado 27 de março de 2023.

ROMANO, N., MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 6:3343–53, 1992.

ROSEN, L., SHROYER, D.A., TESH, R.B., FREIER, J.E., LIEN, J.C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 32(5):1108-19, 1983.

ROZHKOVA, N.V., HAMMELL, M., HANNON, G.J. Multiple roles for Piwi in silencing *Drosophila* transposons. *Genes Dev*, 15;27(4):400-12, 2013.

SARAIVA, R.G., FANG, J., KANG, S., ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y.I., DONG, Y., DIMOPOULOS, G. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein PLoS Negl Trop Dis, 12 p. e0006443, 2018.

SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E.A., KEENE, K.M., FRANZ, A.W., BEATY, B.J., BLAIR, C.D., OLSON, K.E. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res*, 102(1):65-74, 2004.

SÁNCHEZ-VARGAS, I., SCOTT, J.C., POOLE-SMITH, B.K., FRANZ, A.W., BARBOSA-SOLOMIEU, V., WILUSZ, J., OLSON, K.E., BLAIR, C.D. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*, 5(2):e1000299, 2009.

SÁNCHEZ-VARGAS, I., HARRINGTON, L.C., DOTY, J.B., BLACK, W.C. 4th, OLSON, K.E. Demonstration of efficient vertical and venereal transmission of dengue virus type-2 in a genetically diverse laboratory strain of *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(8): e0006754, 2018.

SCHNETTLER, E., STERKEN, M.G., LEUNG, J.Y., METZ, S.W., GEERTSEMA, C., GOLDBACH, R.W., VLAK, J.M., KOHL, A., KHROMYKH, A.A., PIJLMAN, G.P. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J Virol*, 86(24):13486-500, 2012.

SERRATO-SALAS, J, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, S., MARTÍNEZ-BARNETCHE, J., CONDÉ, R., ALVARADO-DELGADO, A., ZUMAYA-ESTRADA, F., LANZ-MENDOZA, H. *De Novo* DNA Synthesis in *Aedes aegypti* Midgut Cells as a Complementary Strategy to Limit Dengue Viral Replication. *Front Microbiol*, 26;9:801, 2018.

SEBAYANG, A.A., FAHLENA, H., ANAM, V., KNOPOFF, D., STOLLENWERK, N., AGUIAR, M., SOEWONO, E. Modeling Dengue Immune Responses Mediated by Antibodies: A Qualitative Study. *Biology (Basel)*, 20;10(9):941, 2021.

SHARON, G., SEGAL, D., RINGO, J.M., HEFETZ, A., ZILBER-ROSENBERG, I., ROSENBERG, E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 20051–20056, 2010.

SHIN, S.C., KIM, S.H., YOU, H., KIM, B., KIM, A.C., LEE, K.A., YOON, J.H., RYU, J.H., LEE, W.J. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334, 670-674, 2011.

SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., BURGYÁN, J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*, 21(12):3070-80, 2002.

SIM, S., DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One*, 5(5):e10678, 2010.

SIM, S., RAMIREZ, J.L., DIMOPOULOS G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathog*, 8(3):e1002631, 2012.

SLONCHAK, A., HUGO, L.E., FRENEY, M.E., HALL-MENDELIN, S., AMARILLA, A.A., TORRES, F.J., SETOH, Y.X., PENG, N.Y.G., SNG, J.D.J., HALL, R.A., VAN DEN HURK, A.F., DEVINE, G.J., KHROMYKH, A.A. Zika virus noncoding RNA suppresses apoptosis and is required for virus transmission by mosquitoes. *Nat Commun*, 5;11(1):2205, 2020.

SMITH, R.C., BARILLAS-MURY, C., JACOBS-LORENA, M. Hemocyte differentiation mediates the mosquito late-phase immune response against *Plasmodium* in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 30;112(26):E3412-20, 2015.

SOMMER, F., BÄCKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 11(4):227-38, 2013.

SOUZA-NETO, J.A., SIM, S., DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, , 20;106(42):17841-6, 2009.

STEINERT, S., LEVASHINA, E.A. Intracellular immune responses of dipteran insects. *Immunol Rev*, 240(1):129-40, 2011.

STERKEL, M., OLIVEIRA, J.H.M., BOTTINO-ROJAS, V., PAIVA-SILVA, G.O., OLIVEIRA, P.L. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. *Trends Parasitol*, 33(8):633-644, 2017.

STORELLI, G., DEFAYE, A., ERKOSAR, B., HOLS, P., ROYET, J., LEULIER, F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*, 14: 403–414, 2011.

- SU, Y., LIN, T., LIU, C., CHENG, C., HAN, X., JIANG, X. MicroRNAs, the Link Between Dengue Virus and the Host Genome. *Front Microbiol*, 11;12:714409, 2021.
- SUZUKI, Y., FRANGEUL, L., DICKSON, L.B., BLANC, H., VERDIER, Y., VINH, J., LAMBRECHTS, L., SALEH, M.C. Uncovering the Repertoire of Endogenous Flaviviral Elements in Aedes Mosquito Genomes. *J Virol*, 91(15):e00571-17, 2017.
- TALLON, A.K., LORENZO, M.G., MOREIRA, L.A., MARTINEZ VILLEGAS, L.E., HILL, S.R., IGNEILL, R. Dengue infection modulates locomotion and host seeking in Aedes aegypti. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(9): e0008531, 2020.
- TARACENA, M.L., BOTTINO-ROJAS, V., TALYULI, O.A.C., WALTER-NUNO, A.B., OLIVEIRA, J.H.M., ANGLERÓ-RODRIGUEZ, Y.I., WELLS, M.B., DIMOPOULOS, G., OLIVEIRA, P.L., PAIVA-SILVA, G.O. Regulation of midgut cell proliferation impacts Aedes aegypti susceptibility to dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5):e0006498, 2018.
- TALYULI O.A.C., BOTTINO-ROJAS, V., POLYCARPO, C.R., OLIVEIRA, P.L., PAIVA-SILVA, G.O. Non-immune Traits Triggered by Blood Intake Impact Vectorial Competence. *Front Physiol*, 12:638033, 2021.
- TALYULI, O.A.C., OLIVEIRA, J.H.M., BOTTINO-ROJAS, V., SILVEIRA, G.O., ALVARENGA, P.H., BARLETTA, A.B.F., KANTOR, A.M., PAIVA-SILVA GO, BARILLAS-MURY, C., OLIVEIRA, P.L. The Aedes aegypti peritrophic matrix controls arbovirus vector competence through HPx1, a heme-induced peroxidase. *PLoS Pathog*, 19(2):e1011149, 2023.
- TCHANKOUO-NGUETCHEU, S., KHUN, H., PINCET, L., ROUX, P., BAHUT, M., HUERRE, M., GUETTE, C., CHOUMET, V. Differential protein modulation in midguts of Aedes aegypti infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One*, 5(10). pii: e13149, 2010.
- TEIXEIRA, M.G., COSTA, M.D.A. C., BARRETO, F., BARRETO, M.L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*, 25 Suppl 1:S7-18, 2009.
- TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol*, 47(2):47-61, 2001.
- TERRA, W.R., DIAS, R.O., OLIVEIRA, P.L., FERREIRA, C., VENANCIO, T.M. Transcriptomic analyses uncover emerging roles of mucins, lysosome/secretory addressing and detoxification pathways in insect midguts. *Curr Opin Insect Sci*, 29:34-40, 2018.
- THOMAS, S., VERMA, J., WOOLFIT, M., O'NEILL, S.L. Wolbachia-mediated virus blocking in mosquito cells is dependent on XRN1-mediated viral RNA degradation and influenced by viral replication rate. *PLoS Pathog*, 14, e1006879, 2018.
- TIKHE, C.V., DIMOPOULOS, G. Mosquito antiviral immune pathways. *Dev Comp Immunol*, 116:103964, 2021.

VARJAK, M.; MARINGER, K.; WATSON, M.; SREENU, V.B.; FREDERICKS, A.C.; PONDEVILLE, E.; DONALD, C.; STERK, J.; KEAN, J.; VAZEILLE, M.; FAILLOUX, A.B.; KOHL, A.; SCHNETTLER, E. *Aedes aegypti* Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. *mSphere*, 2, e00144-17, 2017.

VAISTIJ, F.E., JONES, L., BAULCOMBE, D.C. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, 14(4):857-67, 2002.

VAN RIJ, R.P., SALEH, M.C., BERRY, B., FOO, C., HOUK, A., ANTONIEWSKI, C., ANDINO, R. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, 20(21):2985-95, 2006.

VODOVAR, N., BRONKHORST, A.W., VAN CLEEF, K.W., MIESEN, P., BLANC, H., VAN RIJ, R.P., SALEH, M.C. Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *PLoS One*, 7(1):e30861, 2012.

WANG, Y.-H., CHANG, M.-M., WANG, X.-L., ZHENG, A.-H., ZOU, Z. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Dev Comp Immunol*, 83, 12–21, 2018.

WAGAR, Z.L., TREE, M.O., MPOY, M.C., CONWAY, M.J. Low density lipopolyprotein inhibits flavivirus acquisition in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 26(6):734-742, 2017.

WALSH, E., TORRES, T.Z.B., RÜCKERT, C. *Culex* Mosquito Piwi4 Is Antiviral against Two Negative-Sense RNA Viruses. *Viruses*, 14(12):2758, 2022.

WARNECKE, F., LUGINBUHL, P., IVANOVA, N., GHASSEMIAN, M., RICHARDSON, T.H., STEGE, J.T., CAYOUE, M., MCHARDY, A.C., DJORDJEVIC, G., ABOUSHADI, N., SOREK, R., TRINGE, S.G., PODAR, M., MARTIN, H.G., KUNIN, V., DALEVI, D., MADEJSKA, J., KIRTON, E., PLATT, D., SZETO, E., JSALAMOV, A., BARRY, K., MIKHAILOVA, N., KYRPIDES, N.C., MATSON, E.G., OTTESEN, E.A., ZHANG, X., HERNANDEZ, M., MURILLO, C., ACOSTA, L.G., RIGOUTSOS, I., TAMAYO, G., GREEN, B.D., CHANG, C., RUBIN, E.M., MATHUR, E.J., ROBERTSON, D.E., HUGENHOLTZ, P., LEADBETTER, J.R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a woodfeeding higher termite. *Nature*, 450, 560-565, 2007.

WEI, H.Y., JIANG, L.F., FANG, D.Y., GUO, H.Y. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol*, 84(Pt 11):3095-8, 2003.

WEI XIANG, B.W., SARON, W.A.A., STEWART, J.C., HAIN, A., WALVEKAR, V., MISSÉ, D., THOMAS, F., KINI, R.M., ROCHE, B., CLARIDGE-CHANG, A., ST JOHN, A.L., POMPON, J. Dengue virus infection modifies mosquito blood-feeding behavior to increase transmission to the host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 18;119(3):e2117589119, 2022.

- WHITFIELD, Z.J., DOLAN, P.T., KUNITOMI, M., TASSETTO, M., SEETIN, M.G., OH, S., HEINER, C., PAXINOS, E., ANDINO, R. The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr Biol*, 27(22):3511-3519.e7, 2017.
- WU, P., SUN, P., NIE, K., ZHU, Y., SHI, M., XIAO, C., LIU, H., LIU, Q., ZHAO, T., CHEN, X., ZHOU, H., WANG, P., CHENG, G. A gut commensal bacterium promotes mosquito permissiveness to arboviruses. *Cell Host Microbe*, 25:101-112.e5, 2019.
- XI, Z., RAMIREZ, J.L., DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*, 4(7):e1000098, 2008.
- XIAO, X., LIU, Y., ZHANG, X., WANG, J., LI, Z., PANG, X., WANG, P.; CHENG, G. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 10, e1004027, 2014.
- YAN, H., ZHOU, Y., LIU, Y., DENG, Y., CHEN, X. miR-252 of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* regulates dengue virus replication by suppressing the expression of the dengue virus envelope protein. *J Med Virol*, 86, 1428–1436, 2014.
- YU, X., ZHU, Y., XIAO, X., WANG, P., CHENG, G.. Progress towards Understanding the Mosquito-Borne Virus Life Cycle. *Trends Parasitol*, 35(12):1009-1017, 2019.
- ZAMBON, R.A., NANDAKUMAR, M., VAKHARIA, V.N., WU, L.P. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102: 7257– 7262, 2005.
- ZHAO, J.H., LIU, X.L., FANG, Y.Y., FANG, R.X., GUO, H.S. CMV2b-Dependent Regulation of Host Defense Pathways in the Context of Viral Infection. *Viruses*, 10(11):618, 2018.
- ZHOU, Y., LIU, Y., YAN, H., LI, Y., ZHANG, H., XU, J., PUTHIYAKUNNON, S., CHEN, X. miR-281, an abundant midgut-specific miRNA of the vector mosquito *Aedes albopictus* enhances dengue virus replication. *Parasit Vectors*, 7:488, 2014.
- ZHU, Y., ZHANG, R., ZHANG, B., ZHAO, T., WANG, P., LIANG, G., CHENG, G. Blood meal acquisition enhances arbovirus replication in mosquitoes through activation of the GABAergic system. *Nat Commun*, 8: 1262, 2017.
- ZHU, Y., TONG, L., NIE, K., WIWATANARATANABUTR, I., SUN, P., LI, Q., YU, X., et al. Host serum iron modulates dengue virus acquisition by mosquitoes. *Nat Microbiol*, 4(12):2405, 2019.
- ZHU, Y., ZHANG, C., ZHANG, L., YANG, Y., YU, X., WANG, J., LIU, Q., WANG, P., CHENG, G. A human-blood-derived microRNA facilitates flavivirus infection in fed mosquitoes. *Cell Rep*, 37(11):110091, 2021.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Interação vetor-hospedeiro vertebrado





Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 15

Interação entre os Insetos Hematófagos e seus Hospedeiros Vertebrados

Ricardo Nascimento Araújo¹
Nelder de Figueiredo Gontijo¹
Grasielle Caldas D`Ávila Pessoa¹
Leonardo Barbosa Koerich¹
Maurício Roberto Viana Sant'Anna¹
Claudio R. Lazzari²
Marcos Horácio Pereira¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

²Université François Rabelais, França.

Copyright: © 2024 [Ricardo Nascimento Araújo, Nelder de Figueiredo Gontijo, Grasielle Caldas D`Ávila Pessoa, Leonardo Barbosa Koerich, Maurício Roberto Viana Sant'Anna, Claudio R. Lazzari e Marcos Horácio Pereira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

O sangue é uma suspensão altamente nutritiva e, conseqüentemente, vários animais, particularmente artrópodes, o adotaram como alimento principal ou único. Entretanto, o sangue não está disponível livremente. Ele circula dentro dos vasos sanguíneos de animais vertebrados, capazes de se defender de agressores.

Para a maioria dos insetos hematófagos, a ingestão de repastos grandes é vantajosa, uma vez que representa economia de tempo e energia na visita aos seus hospedeiros, tempo que poderia ser mais bem utilizado em outras atividades, como, por exemplo, na reprodução (Lehane, 2005). Além disso, o tempo gasto para ingerir um repasto sanguíneo deve ser o menor possível, a fim de reduzir o risco de ser detectado e morto pelo hospedeiro (Gillett, 1967). Sendo assim, pressões seletivas conduziram os artrópodes hematófagos a desenvolver características particulares que os levassem a reduzir, ao máximo possível, a duração dos eventos alimentares. Essas adaptações estão relacionadas à: (i) morfologia (como, por exemplo, as bombas de sucção potentes); (ii) fisiologia (tem-se o exemplo da plasticização da cutícula); e (iii) adaptações de comportamento (exemplificado, ao se alimentarem em períodos de repouso do hospedeiro).

Insetos hematófagos transmitem patógenos causadores de doenças debilitantes para os humanos, incluindo malária, doença de Chagas, doença do sono, filariose, leishmaniose, tifo murino, peste bubônica, dengue e outras arboviroses. Portanto, os hospedeiros vertebrados podem ser afetados, diretamente, pelo hábito hematofágico dos insetos (espoliação sanguínea e reações alérgicas), bem como por problemas resultantes das doenças causadas pelos patógenos transmitidos. De maneira geral, é durante a hematofagia que o agente etiológico circula entre o hospedeiro vertebrado e o seu vetor. Além disso, o sangue obtido pode representar a única fonte de nutrientes para alguns insetos (como é o caso dos triatomíneos, dos piolhos e dos percevejos) ou servir de estímulo para o desenvolvimento dos ovócitos (como os flebotomíneos e os mosquitos). Assim, diferenças no desempenho alimentar interferem, diretamente, na competência vetorial e na dinâmica populacional de insetos vetores.

Neste capítulo, abordaremos como as diferenças na fisiologia dos vertebrados podem afetar a mecânica do processo alimentar dos insetos hematófagos. Elas modulam o desempenho do repasto sanguíneo, tendo como modelo básico os triatomíneos.

Características gerais do processo hematofágico

O hábito hematofágico surgiu nos artrópodes em, pelo menos, 20 ocasiões diferentes (Wheeler et al., 2001), durante os períodos Jurássico e Cretáceo (145 a 65 milhões de anos) (Balashov, 1984; Ribeiro, 1995). A evolução múltipla e independente da hematofagia entre os insetos pode ser observada por análises evolutivas de relação das espécies hematófagas. Por exemplo, entre os barbeiros (subfamília Triatominae) e mosquitos (família Culicidae) existe uma infinidade de espécies e de grupos de insetos não hematófagos, o que sugere que a hematofagia não é uma característica ancestral, entre eles. A pele dos vertebrados apresenta duas camadas distintas, uma mais externa, chamada de epiderme e a derme, que é a camada mais interna. Somente a derme é vascularizada e os insetos, em busca de sangue, precisam, inicialmente, introduzir a abertura do canal alimentar (boca funcional) na pele do hospedeiro. As peças bucais dos insetos hematófagos são adaptadas para perfurar a pele do hospedeiro. Além disso, a presença de um canal salivar, independente do canal alimentar, permite a ingestão do sangue e a secreção da saliva de forma simultânea.

Os insetos hematófagos podem utilizar duas estratégias para a obtenção de sangue. A solenofagia (ou *vessel-feeding*) é uma estratégia em que a abertura do canal alimentar é colocada dentro dos vasos sanguíneos, e é usada por barbeiros, piolhos, pulgas e mosquitos. Nesses grupos de insetos, as mandíbulas e/ou maxilas foram modificadas para formar estiletes longos, finos e perfurantes, que são interconectados para formar um tubo longo, por onde o sangue é sugado. A segunda estratégia é denominada telmofagia (ou *pool-feeding*) e consiste em posicionar a abertura do canal alimentar dentro de uma pequena poça de sangue formada pelo rompimento dos vasos pela ação das peças bucais adaptadas para rasgar, dilacerar ou cortar a pele do hospedeiro. Essas peças bucais são encontradas em flebotomíneos, tabanídeos, simulídeos, cerapotogonídeos e moscas picadoras (Lehane, 2005; Lavoipierre, 1965).

De maneira geral, os artrópodes hematófagos, ao introduzirem suas peças bucais na pele do hospedeiro em busca do sangue, induzem várias reações reparadoras no hospedeiro. Entre elas, estão a agregação plaquetária, a contração do vaso lesado, a coagulação sanguínea (sendo esses três os componentes da hemostasia), o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia leucocitária. Além disso, as reações inflamatórias podem ser exacerbadas, com o desenvolvimento de uma resposta imune contra os antígenos presentes na saliva destes artrópodes (Ribeiro, 1987; Ribeiro, 1995).

Portanto, durante o processo hematofágico, os insetos podem encontrar algumas ou todas essas reações, que dificultam tanto a localização como a ingestão do sangue do hospedeiro.

Do ponto de vista do hospedeiro, a telmofagia produz maior irritação no local da picada, devido à maior agressão aos tecidos, que favorece a liberação de mediadores desencadeadores dos fenômenos hemostáticos. Já a solenofagia pode ser comparada à canulação de um vaso por uma agulha de seringa (Jones, 1996), o que produz um menor dano tecidual, minimizando o desencadeamento das respostas fisiológicas de reparo no sítio da alimentação.

Após a localização do sangue, o inseto precisa bombeá-lo dos vasos sanguíneos do hospedeiro para o intestino médio, onde o repasto é inicialmente armazenado. Os insetos hematófagos possuem duas bombas de alimentação (cibarial e faríngea), que são regiões modificadas da porção anterior do canal alimentar, apresentando paredes reforçadas conectadas a feixes musculares (Chapman et al., 2013). Os movimentos de dilatação e contração do canal alimentar na região das bombas de alimentação são controlados pela atividade muscular, e permitem que o inseto sugue o sangue do sítio de alimentação e o empurre em direção ao seu intestino médio. Nos triatomíneos, a bomba cibarial é bem mais desenvolvida do que a bomba faríngea. Já nos mosquitos, as duas bombas são bem desenvolvidas (Kim et al., 2011; Lahondère et al., 2017).

Biomecânica da alimentação e características do sangue dos hospedeiros vertebrados

Nesta seção, forneceremos uma visão geral dos parâmetros que interferem no processo de bombeamento do sangue através do estreito canal alimentar dos insetos. Informações mais detalhadas sobre esse assunto podem ser encontradas em Lehane (2005), Kingsolver e Daniel (1995) e Kim et al. (2011).

Vários insetos satisfazem seus requisitos nutricionais através de uma dieta totalmente líquida, ao se alimentarem de fluidos, como o néctar e a seiva de plantas, ou do sangue de vertebrados. Para os insetos hematófagos, a biomecânica da alimentação ainda é pouco compreendida. A utilização de técnicas sofisticadas (Velocimetria por Imagens de Partículas (PIV) e Micro-Imagens de Raios-X, utilizando Radiação Síncrotron) permitiu uma análise detalhada durante o funcionamento das duas bombas de sucção (cibarial e faríngea) de mosquitos (Kim et al., 2011). Nesse estudo pioneiro, foi possível mostrar que a diferença de pressão gerada pelo funcionamento sincronizado das duas bombas alimentares determina uma grande variação da velocidade do fluxo

dentro do canal alimentar do inseto ($1,6 \text{ a } -0,15 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), condição em que o sangue poderia se comportar como um fluido não newtoniano.

Entretanto, a maioria dos trabalhos sobre a mecânica da alimentação dos insetos se baseia na equação de Hagen–Poiseuille, empregada para fluidos newtonianos (Bennet-Clark, 1963; Daniel, Kingsolver, 1983; Lehane, 2005; Smith, 1979). De acordo com Lehane (2005), o tamanho do repasto nos insetos hematófagos pode ser, razoavelmente, estimado pela equação:

$$Q = \frac{\pi r^4 p t}{8 \eta l}$$

Na equação, Q é o tamanho do repasto (volume ingerido), p é a diferença de pressão entre a extremidade do canal alimentar e o lúmen da bomba de sucção, r é o raio do canal alimentar, l é o comprimento do canal alimentar, t é o tempo de alimentação e η é a viscosidade dinâmica do sangue.

Apesar de simplificado, esse modelo permite inferir parâmetros que atuam na interação dos insetos com os seus hospedeiros vertebrados, interferindo no processo hematofágico. Entre eles, destacam-se aqueles que modificam a viscosidade do sangue no canal alimentar durante o seu bombeamento para o intestino médio do inseto em questão (como é o exemplo da temperatura corporal, do hematócrito, da agregação eritrocitária, da coagulação e da agregação plaquetária).

Nos líquidos chamados de newtonianos, como a seiva e o néctar, a viscosidade depende somente da temperatura e da concentração de solutos. Por outro lado, nos fluidos não-newtonianos, como o sangue, além da temperatura e da concentração, a viscosidade também varia, de acordo com a velocidade de escoamento (que determina a sua taxa de cisalhamento).

Do ponto de vista mecânico, o sangue é uma suspensão de partículas (basicamente hemácias) diluídas em uma solução proteica (plasma). A viscosidade do sangue decresce com o aumento de temperatura, com a diminuição do hematócrito e com o aumento da velocidade de escoamento. Esse último comportamento decorre, principalmente, da forma como as células sanguíneas se movem dentro dos vasos (ou canal alimentar do inseto em questão). As hemácias tendem a se agregar e a aderir umas às outras (agregação eritrocitária), com intensidade variável entre as espécies. Quanto menos agregadas estiverem as hemácias, menor será a dificuldade do sangue se movimentar (menor viscosidade). Em velocidades de escoamento muito baixas, a agregação eritrocitária pode se tornar tão pronunciada que aumenta muito a viscosidade do sangue.

Outro parâmetro importante que influencia na viscosidade do sangue é o diâmetro do tubo pelo qual ele flui. Para tubos com menos de 100 μm de diâmetro, a viscosidade do sangue humano decresce com a redução do diâmetro, atingindo um valor mínimo em tubos de aproximadamente 7 μm (diâmetro aproximado da hemácia humana). A seguir, desse valor ocorre um aumento dramático na viscosidade. Portanto, o diâmetro do tubo em que a viscosidade do sangue é mínima decorre, principalmente, do tamanho da hemácia do hospedeiro vertebrado em questão.

O hematócrito (fração do volume de sangue ocupada pelas hemácias) também varia de acordo com o diâmetro do vaso. Por exemplo, em humanos, o hematócrito nas artérias pulmonares é de aproximadamente 40%, enquanto nos capilares é de aproximadamente 20% ou menos (Goldsmith et al., 1989).

O tamanho e a forma das hemácias variam entre os vertebrados. De maneira geral, nos mamíferos elas são menores e anucleadas, enquanto nas demais classes de animais são maiores e apresentam núcleo (Tabela I). Em algumas espécies de anfíbios (como a enguia do congo), as hemácias podem chegar a 54,2 μm de diâmetro (Lewis, 1996).

Classe	Diâmetro das células (μm)	Formato das células	Formato do núcleo
Mamíferos	3,2-9,2	Achatado- cilíndrico	Sem núcleo
Aves	10-14	Achatado-oval	Achatado-oval
Répteis	14-20	Achatado-oval	Cilíndrico-oval
Anfíbios	19-55	Achatado-oval	Achatado-oval

Tabela I: Diâmetro e formato dos eritrócitos e do seu núcleo em diferentes classes de vertebrados (modificado de Lewis, 1996).

Fonte: Arquivo pessoal

Existe também uma grande variação na viscosidade do sangue de diferentes espécies de vertebrados (Windberger, Baskurt, 2007). Um estudo comparativo com nove espécies de mamíferos mostrou que, em baixas taxas de cisalhamento ($0,7 \text{ s}^{-1}$ e $2,4 \text{ s}^{-1}$), cavalos, porcos, cães e gatos possuem altos valores de viscosidade do sangue, enquanto em ovinos, coelhos e camundongos, são muito baixas. As diferenças da viscosidade do sangue entre essas espécies são muito maiores em baixa taxa de cisalhamento ($0,7 \text{ s}^{-1}$), variando de 6,56 (bovinos) a 38,17 mPas (equinos), do que quando o sangue é submetido à alta taxa de cisalhamento (94 s^{-1}), na qual a variação foi de 4,04 (coelhos) a 6,29 mPas (ratos) (Tabela II). A agregação eritrocitária, que exerce grande influência sobre a viscosidade, também varia enormemente entre as espécies de hospedeiro. Mesmo em baixa taxa de cisalhamento ($0,7 \text{ s}^{-1}$), a agregação eritrocitária é indetectável em espécies como camundongos, bovinos, ovinos e coelhos, baixa

em ratos e alta em cavalos e gatos (Tabela III) (Windberger et al., 2003). Em mamíferos, o hematócrito varia de 30 a 50%, que são valores altos em comparação às aves, que, geralmente, apresentam valores menores de hematócrito e viscosidade do sangue. Já a viscosidade dos vertebrados pecilotérmicos não apresenta valores fixos, pois este parâmetro varia de acordo com a temperatura corporal que depende do ambiente (Windberger & Baskurt, 2007).

Os parâmetros reológicos do sangue (ex. viscosidade) podem apresentar variações importantes em processos patológicos (ex. malária) ou durante fenômenos fisiológicos (ex. hemostasia). O sangramento ocorre em locais de dano tecidual (ex. pela movimentação das peças bucais dos insetos) nos hospedeiros vertebrados. O sangramento é estancado por uma série de mecanismos inter-relacionados, que envolvem os vasos sanguíneos, a coagulação e a atividade plaquetária. Logo no início do processo de coagulação, observa-se um grande aumento na viscosidade do sangue (Puckett et al., 2005), o que dificulta o seu bombeamento através do tubo digestivo para o intestino médio do inseto (Araujo et al., 2007; Paim et al., 2011).

Espécie	WBV ^b (0,7 s ⁻¹) (mPa s)	WBV (2,4 s ⁻¹) (mPa s)	WBV (94 s ⁻¹) (mPa s)	PV ^c (10 s ⁻¹) (mPa s)
Equino	38,17	20,18	5,18	1,66
Suíno	24,69	14,86	4,94	1,58
Canino	22,89	14,58	5,59	1,61
Felino	30,18	15,35	4,44	1,71
Rato	35,40	19,75	6,29	1,59
Bovino	6,56	6,29	4,80	1,72
Ovino	6,59	6,09	4,37	1,49
Leporino	8,31	7,44	4,04	1,30
Murino	13,37	10,56	4,88	1,31
Humano	33,49	18,53	6,0	1,24

Tabela II: Viscosidade total do sangue^a e do plasma de espécies de vertebrados em diferentes taxas de cisalhamento (modificado de Windberger et al., 2003).

^aSangue com hematócrito a 40%; ^bWBV - viscosidade do sangue total (do inglês *Whole Blood Viscosity*); ^cPV - viscosidade do plasma (do inglês *Plasma Viscosity*); a viscosidade do plasma não varia com a taxa de cisalhamento (fluido newtoniano).

Fonte: Arquivo pessoal

Espécie	Alb (0,7 s-1)	AI (2,4 s-1)
Equino	0,30	0,32
Suino	0,05	0,04
Canino	0,07	0,11
Felino	0,17	50,10
Rato	0,01	0,01
Bovino	0	0
Ovino	0,01	0
Leporino	0,02	0
Murino	0	0
Humano	0,09	0,10

Tabela III: Índice de agregação eritrocitária do sangue^a de espécies de vertebrados, em baixas taxas de cisalhamento (modificado de Windberger et al., 2003).

^aSangue com hematócrito a 40%; ^bO índice de agregação eritrocitária (do inglês *Aggregation Index*) foi calculado usando a seguinte fórmula: $AI = (WBV - WBV \text{ após } 45 \text{ minutos}) / WBV$, sendo WBV a viscosidade do sangue total.

Fonte: Arquivo pessoal

Apesar dos mecanismos básicos de hemostasia serem conservados entre os vertebrados, existem diferenças marcantes entre as diversas classes. Por exemplo, a via intrínseca da cascata da coagulação é um importante mecanismo hemostático em mamíferos, mas, aparentemente, tem menor importância nas aves, nas quais vários fatores dessa via estão ausentes ou em concentrações muito baixas (Tabela IV) (Lewis, 1996). Além disso, os trombócitos das aves, células que realizam funções similares às plaquetas de mamíferos, são menos eficientes e, praticamente, não respondem ao ADP e à trombina, importantes indutores da agregação plaquetária (Tabela V). Mesmo entre as espécies de mamíferos, são encontradas variações importantes no número de plaquetas, nas concentrações dos fatores de coagulação e, conseqüentemente, em parâmetros hemostáticos (é o exemplo do tempo de sangramento) (Lewis, 1996).

	I	II	V	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Modelo	mg/dL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL
Procionídeo	288	0,1	..	0,03	≥2	1,2	1,8	≥1,5
Humano ^a	150-450	0,7-1,3	0,6-1,5	0,5-1,3	0,7-1,4	0,6-1,7	0,7-1,3	0,7-1,4	0,5-1,4
Leporino	193	2,4	≥100	3	3,2	1,2	1,8	2,5	0,8
Murino	164	0,45	2,82	3,91	1,74	0,3	0,77	0,63	1,28
Canino	215	1,43	6,02	4,7	4,49	1,12	2,18	2,79	1,06
Bovino	180	0,42	≥2	0,19	≥2	0,76	1,09	1,01	0,97
Galináceo	371	0,14	0,06	≤0,01	0,31	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01
Columbiforme	243	0,21	0,07	0,03	0,55	≤0,01	≤0,01	0,08	0,03
Anurano	337	0,04	0,04	≤0,01	0,04	0,16	≤0,01	≤0,01	0,18
Urodela	363	0,11	0,2	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01

Tabela IV: Presença e concentração dos fatores da cascata da coagulação em diferentes espécies de vertebrados (modificado de Lewis, 1996).

^aValores de referência mínimos e máximos para humanos.

Fonte: Arquivo pessoal

Indutores/reagentes	Galinha	Peru	Humano ^a
ADP (5 µM)	0	0	80
Colágeno bovino (0,19 mg/mL)	5-8	0-5	93
Colágeno de peru (0,2 mg/mL)	0	0-10	75
Ácido aracdônico (0,5 mg/mL)	5-23	3	68

Tabela V: Agregação trombocitária (%), em aves na presença de diferentes indutores (modificado de Lewis, 1996).

^aValores de referência da agregação plaquetária humana (%) em condições semelhantes.

Fonte: Arquivo pessoal

Fatores que influenciam no desempenho alimentar dos triatomíneos

Os triatomíneos (barbeiros) são insetos paurometábolos grandes e, por isso, necessitam de quantidades consideráveis de sangue para completar seu desenvolvimento (Schofield, 1994). Enquanto uma fêmea adulta de *Triatoma infestans* ingere em torno de 0,41 mL de sangue (Schofield, 1981), o volume aproximado de sangue ingerido por espécies do gênero *Anopheles* é de 0,002 mL, em *Culex* é de 0,003 mL e em *Glossina* é de 0,03 mL (Lehane, 2005). A duração do processo alimentar dos triatomíneos pode levar de poucos minutos até aproximadamente meia hora, dependendo da espécie do hospedeiro e do inseto, bem como do estágio evolutivo e do volume de sangue ingerido.

Os barbeiros são insetos solenofágicos, retirando o sangue diretamente de vênulas ou arteríolas (Lavoipierre et al., 1959). Seu rostro (ou probóscide) engloba o fascículo (duas maxilas e duas mandíbulas) que penetra na pele do hospedeiro. As mandíbulas ancoram o fascículo dentro da região superficial da pele, enquanto

as maxilas penetram na derme e canulam um vaso sanguíneo. Os canais salivar e alimentar são formados pela justaposição dos sulcos, presentes em cada maxila (Figura 1). Durante a fase de sondagem, as maxilas permanecem juntas, realizando movimentos oscilatórios, à procura do vaso sanguíneo. Após a penetração no vaso sanguíneo, a maxila esquerda coloca-se numa posição retraída em relação à maxila direita, formando a boca funcional, o que antecede a sucção do sangue (Lavoipierre et al., 1959). Segundo Friend e Smith (1971), durante a fase de sondagem, *Rhodnius prolixus* retira, periodicamente, amostras do líquido que envolve as maxilas, analisando-o com os quimiorreceptores epifaríngeos e, ao encontrar e penetrar em vaso adequado, inicia-se a fase de ingurgitamento. Na fase de ingurgitamento, o alimento entra no canal alimentar devido à diferença de pressão gerada pela bomba cibarial que, juntamente com a sua musculatura associada, ocupa grande parte da cabeça do inseto. Para o enchimento da bomba, os músculos associados à bomba cibarial se contraem, deformando a parede dorsal do cibário e, com o relaxamento desses músculos, a parede da bomba cibarial retorna à posição original devido à sua elasticidade, e o sangue é bombeado em direção ao intestino. A atividade da bomba cibarial de *R. prolixus* pode ser registrada a partir da análise da passagem do sangue pela cabeça do inseto durante o repasto sanguíneo (Figura 2). Cálculos conservadores sugerem que a bomba cibarial de *R. prolixus* é capaz de gerar pressões maiores do que duas atmosferas durante o processo alimentar.

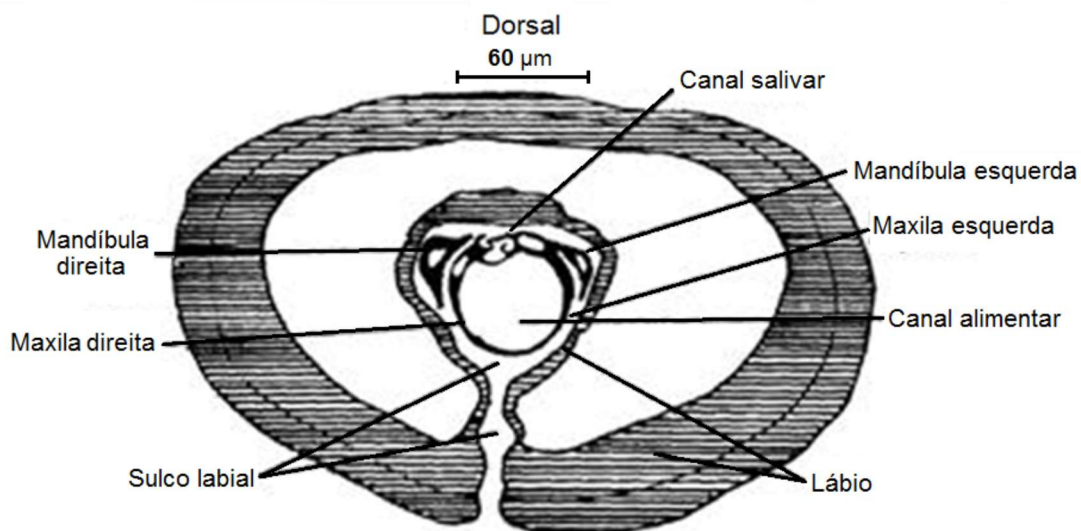


Figura 1: Seção transversal próxima à base da probóscide de uma ninfa de quinto estágio de *R. prolixus*.

Fonte: Redesenhado de Lavoipierre et al., 1959

As dificuldades enfrentadas pelos insetos hematófagos, durante o repasto sanguíneo irão se refletir nos parâmetros alimentares. Estudos de comportamento alimentar indicam que o parâmetro que melhor representa o processo alimentar é a taxa de ingestão (TI = tamanho do repasto (mg)/tempo total de contato (min)), pois qualquer influência nos outros parâmetros é refletida na TI (Pereira et al., 2006).

Apesar de, geralmente, representar menos de 10% do tempo de contato com o hospedeiro, o tempo de sondagem é um período crítico para o processo alimentar dos triatomíneos. A inserção das peças bucais e os movimentos das maxilas na pele vão levar ao dano tecidual, responsável pela liberação de mediadores e exposição de moléculas e que vão desencadear a hemostasia e a inflamação (Ribeiro, 1995). Além disso, esses eventos mecânicos induzem a geração de impulsos nas terminações nervosas próximas ao local da picada. Trabalhos com voluntários humanos sugerem que o período de maior percepção corresponde à inserção das peças bucais na pele do hospedeiro (Schofield et al., 1986). Neste sentido, um prolongamento no tempo de sondagem pode influenciar na capacidade de obter sangue de hospedeiro vertebrado não imobilizado ou anestesiado.

A maior parte do tempo de um repasto completo dos triatomíneos (maior que 90%), geralmente é gasta no processo de bombeamento do sangue para o intestino médio anterior. Portanto, o principal parâmetro que interfere no desempenho alimentar de uma espécie de triatomíneo, em determinado hospedeiro, é a sua capacidade de manter e de regular a frequência de bombeamento elevada durante toda a fase de ingurgitamento (Araujo et al., 2009c; Paim et al., 2011; Sant'Anna et al., 2001). Nessa fase, as paredes dos vasos canulados pulsam em sincronia com as contrações da bomba cibarial, devido à passagem do sangue para o canal alimentar do inseto (Lavoipierre et al., 1959; Soares et al., 2014). Quanto menor for o diâmetro do vaso canulado, menor será o seu fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, maior será a amplitude da movimentação da sua parede durante a alimentação do inseto. Experimentos de microscopia intravital na pele de camundongos mostraram a formação de agregados de plaquetas e o recrutamento de linfócitos junto ao endotélio venular nas regiões onde ocorre maior vibração da parede do vaso durante a alimentação do inseto (Soares, 2008, Soares et al., 2014). Portanto, o estresse mecânico causado no endotélio durante o bombeamento do sangue pelo inseto, sobretudo em vasos menores, favorece a liberação de mediadores trombogênicos e inflamatórios.

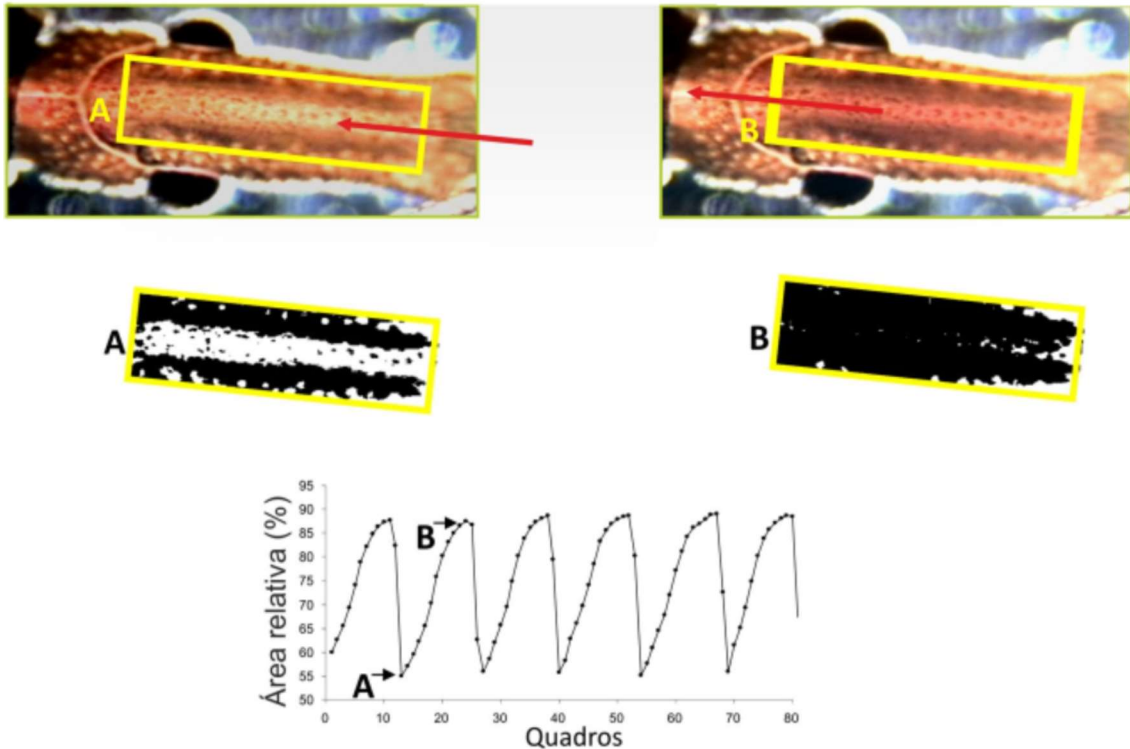


Figura 2: Esquema da análise utilizada para obtenção do registro gráfico da atividade da bomba cibarial durante a alimentação sanguínea de uma ninfa de quinto estágio de *R. prolixus*, a partir de imagens captadas por microscopia intravital (modificado de Araújo et al., 2011). Painel superior: Imagens da cabeça do inseto, com a região da bomba cibarial selecionada (retângulo), mostrando a bomba vazia (A) e cheia de sangue (B). Painel inferior: Representação em preto e branco das imagens da bomba cibarial vazia (A) e cheia de sangue (B). A representação gráfica da atividade da bomba cibarial pela variação (%) da área ocupada pelo sangue dentro da bomba (área escura), ao longo do tempo (25 quadros/segundo). As setas vermelhas nas imagens coloridas indicam o sentido do fluxo de sangue. As setas pretas no gráfico indicam um momento em que a bomba cibarial apresenta-se vazia (A) ou cheia de sangue (B).

Fonte: Arquivo pessoal

A taxa de ingestão (mg/min) dos triatomíneos é influenciada por uma série de fatores inerentes aos insetos, à fonte alimentar, à dieta e ao sítio da picada (Tabela VI). Smith (1979) mostrou que a variação da viscosidade da dieta oferecida em alimentador artificial de 0,8 a 6,5 cP reduz a taxa de ingestão de *R. prolixus* em, aproximadamente, 8x (Tabela VI). Lazzari e Nunes (1989) mostraram que a elevação da temperatura do sangue no alimentador artificial de 6 para 35°C aumentou a taxa de ingestão de *T. infestans* em, aproximadamente, quatro vezes. Provavelmente, esse aumento deve-se, principalmente, à diminuição da viscosidade da dieta pelo aumento da temperatura.

Nos triatomíneos estudados, a taxa de ingestão tende a ser maior (exceto *Rhodnius nasutus*) em pombos do que em camundongos (Tabela VI). Essa diferença na taxa de ingestão afeta, diretamente, o tempo necessário para o inseto completar o repasto sanguíneo e, conseqüentemente, o tempo de contato com o hospedeiro. Por exemplo, ninfas de quinto estágio de *Triatoma brasiliensis*

gastaram 29.3 ± 4 e 20.2 ± 2.2 minutos para se alimentarem em camundongos (murino) e pombos (columbiforme), respectivamente, representando um aumento de mais de 45% no tempo de contato com o hospedeiro mamífero (Guarneri et al., 2000b). Essa maior taxa de ingestão decorre do fato da fase de ingurgitamento, do tempo de sondagem acumulativo e do número de interrupções durante a alimentação também tenderem a ser menores em aves, em comparação aos mamíferos (Pereira et al., 2006). A menor duração da fase de ingurgitamento dos triatomíneos em pombos é devido, principalmente, à maior frequência de contração da bomba cibarial nesse hospedeiro (Guarneri et al., 2000b; Sant'Anna et al., 2001; Souza et al., 2011). Nos triatomíneos, tanto a frequência de contração da bomba cibarial, como as interrupções durante o repasto, são influenciados por fatores ligados ao hospedeiro.

Espécie	Est.	Taxa de ingestão (mg/mim)			Sítio*	Ref.
		Alimentador Artificial (dieta)	Ave (espécie)	Mamífero (espécie)		
<i>R. robustus</i>	5°	16,9 (salina/ATP)	13,3 (P)	7,4 (C)	Pele (ventre)	3
<i>R. nasutus</i>	5°	11,9 (salina/ATP)	8,3 (P)	8,5 (C)	Pele (ventre)	3
<i>R. neglectus</i>	5°	8,3 (salina/ATP)	5,7 (P)	3,1 (C)	Pele (ventre)	3
<i>R. prolixus</i>	5°	~26,2 ^a (salina/ATP) a 0,8 ^b	-	-	-	1
		~21,6 ^a (salina/ATP) a 2,2 ^b	-	-	-	1
		~14,9 ^a (salina/ATP) a 3,6 ^b	-	-	-	1
		~12,9 ^a (salina/ATP) a 4,5 ^b	-	-	-	1
		~8,5 ^a (salina/ATP) a 6,5 ^b	-	-	-	1
		24,1 (salina/ATP)	19,5 (P)	11,9 (C)	Pele (ventre)	3
		-	-	11,8 (C)	Pele (dorso)	6
		-	-	16,0 (C)	Veia da cauda	6
<i>T. pseudomaculata</i>	5°	-	5,0 (P)	3,3 (C)	Pele (ventre)	2
<i>T. vitticeps</i>	2°	-	2,1 (P)	1,7 (C)	Pele (ventre)	10
<i>T. infestans</i>	5°	-	25,2 (P)	15,0 (C)	Pele (ventre)	2
<i>T. brasiliensis</i>	5°	-	14,5 (P)	10,8 (C)	Pele (ventre)	2
		-	-	11,3 (H)	Pele (antebraço)	8
		-	-	4,5 (T)	Pele (ventre)	8
<i>T. brasiliensis</i>	4°	6,0 (suspensão 1) ^c	-	5,8 (R)	Pele (dorso)	5
		4,0 (suspensão 2) ^d	-	3,0 (T)	Pele (dorso)	5
		-	-	3,7 (H)	Pele (antebraço)	4
<i>T. brasiliensis</i>	3°	-	-	2,3 (C)	Veia da cauda	9
		-	-	4,2 (C) ^e	Veia da cauda	9
<i>C. lectularius</i>	F	-	-	0,9 (C)	Pele (ventre)	7
	M	-	1,0 (P)	0,9 (C)	Pele (ventre)	7
		-	-	0,7 (C)	Pele (dorso)	7
<i>C. hemipterus</i>	M	1,2 (sangue humano) ^f	0,4 (P)	0,6 (C)	Pele (ventre)	7
			0,7 (P) ^g		Pele (ventre)	7

TABELA VI: Taxa de ingestão de diferentes espécies de triatomíneos e cimicídeos, ao se alimentarem em hospedeiro vivo (mamíferos e aves) ou em alimentador artificial. Est. - estágio evolutivo: 2°, 3°, 4° e 5° - ninfas de segundo, terceiro, quarto e quinto ínstar, respectivamente. F- adulto fêmea; M – adulto macho.

*A alimentação nos pombos foi realizada na face ventral do tórax. Observações: P – pombo; C – camundongo; H – humano; T - *Thrichomys* sp; R – rato; ^apara o cálculo da taxa de ingestão (mg/min) considerou-se 1 mg/ μ L a densidade das diferentes soluções utilizadas; ^bviscosidade (cP); ^chemácias de rato; ^dhemácias bovina; ^etratado com heparina; ^fdiluído em salina (3:1); ^gtratado com Marevan. Ref. - Referências: (1) Smith, 1979; (2) Guarneri et al., 2000; (3) Sant'Anna et al., 2001; (4) Guarneri et al., 2003; (5) Araújo et al., 2009a; (6) Araújo et al., 2009b; (7) Araújo et al., 2009c; (8) Guarneri et al., 2011; (9) Paim et al., 2011; (10) Souza et al., 2011.

Fonte : Arquivo pessoal

Além de diferenças entre hospedeiros, o local onde a hematofagia é realizada também interfere no desempenho alimentar dos insetos. Um fator importante relacionado ao local de alimentação é o diâmetro do vaso canulado pelos insetos solenofágicos. *Rhodnius prolixus* alimentados na base da veia da cauda de camundongos, onde o vaso possui um diâmetro superior a 500 μm , apresentaram maior taxa de ingestão (por volta de 30%) e maior frequência de batimentos da bomba cibarial (em torno de 20%) a mais que os alimentados na pele da superfície dorsal (Araujo et al., 2009c). Nesse último local, as vênulas e arteríolas apresentam um diâmetro médio de 38 a 20 μm , respectivamente (Kalambur et al., 2004).

Como, mesmo na pele, existem vasos de maior calibre (Kalambur et al., 2004), esse fato poderia ajudar a explicar a grande variação observada em parâmetros alimentares dos triatomíneos nesse sítio de alimentação, sobretudo em hospedeiros mamíferos (Guarneri et al., 2000a, 2003; Sant'Anna et al., 2001). Além disso, triatomíneos podem trocar de vaso durante o processo alimentar, modificando significativamente os parâmetros alimentares, durante um mesmo repasto (Araujo et al., 2009c). Uma justificativa plausível para a maior dificuldade dos insetos em se alimentar em vasos de menor calibre é o seu menor fluxo sanguíneo (Ushiyama et al., 2004). Esse fato poderia levar o inseto a diminuir a sua taxa de ingestão devido a um menor fluxo sanguíneo ao redor das suas peças bucais (Araujo et al., 2009c). Ademais, um menor fluxo sanguíneo acarretaria um maior estresse mecânico do endotélio e, conseqüentemente, uma maior liberação de mediadores da hemostasia, dificultando a tomada de sangue (Soares, 2008).

À medida que o alimento vai sendo depositado no intestino médio anterior, ocorre um aumento de pressão, devido ao estiramento da cutícula abdominal dos insetos. Essa pressão interfere no esvaziamento da bomba cibarial (bombeamento para o intestino), que, ao atingir um valor crítico correspondente a 25 cm de mercúrio, interrompe a fase de ingurgitamento. Esse seria um dos mecanismos que determinaria o tamanho do repasto nos triatomíneos (Bennet-Clark, 1963b).

Foi demonstrado que a inibição da atividade anticoagulante no intestino médio anterior (onde o sangue é armazenado) dos triatomíneos, por RNA interferente (RNAi) ou pela ingestão prévia de trombina, levou à redução significativa da quantidade de sangue ingerido pelos insetos em camundongos (Araujo et al., 2007). Essa redução do tamanho do repasto foi acompanhada de uma menor capacidade do inseto em manter a sua frequência inicial de bombeamento do sangue. Esses dois problemas foram revertidos quando os insetos silenciados para o anticoagulante intestinal foram colocados para se alimentar em camundongos previamente tratados com heparina (anticoagulante)

(Paim et al., 2011). Resultado semelhante foi obtido com o percevejo *Cimex hemipterus*, que melhorou o seu desempenho alimentar quando alimentado em pombos previamente tratados com um anticoagulante sistêmico (warfarin). Essa melhora ocorreu devido à maior capacidade de manter a frequência da bomba cibarial elevada durante um período maior, em comparação aos insetos alimentados em pombos não tratados (Araujo et al., 2009a).

Considerando que, uma vez iniciada a cascata da coagulação, a viscosidade do sangue aumenta rapidamente (Puckett et al., 2005), a explicação mais simples para que o inseto invista na produção de potentes anticoagulantes intestinais seria evitar um aumento da viscosidade do sangue ingerido dentro do tubo digestivo. Aparentemente, esse aumento prejudica o processo de bombeamento do sangue da bomba cibarial para o intestino médio anterior. Por outro lado, a presença de grandes coágulos no intestino não impede o processo digestivo, nem a continuidade do ciclo de ninfas de *T. brasiliensis* (Araujo et al., 2007). Provavelmente, como descrito para *R. prolixus* (Hellmann, Hawkins, 1964), *T. brasiliensis* também possui moléculas com atividades fibrinolíticas no intestino

Outro processo que ocorre no ambiente intestinal, e que interfere no desempenho alimentar dos triatomíneos por alterar a viscosidade do sangue ingerido durante o repasto, é a aglutinação das hemácias. Essa atividade aglutinante intestinal está presente em todos os triatomíneos estudados, mas ela não aglutina as hemácias de todos os vertebrados testados (Araujo et al., 2009b; Gregorio, Ratcliffe, 1991). Foi demonstrado que, quando o inseto se alimenta em um hospedeiro cujas hemácias se aglutinam ao entrar em contato com o conteúdo intestinal (é o exemplo do rato), ou quando colocado para se alimentar de uma suspensão de hemácias desse hospedeiro (onde não há interferência da hemostasia), a sua taxa de ingestão é maior do que quando se alimenta de uma suspensão de hemácias que não se aglutinam no intestino médio anterior (ex: bovinos) (Tabela VI) (Araujo et al., 2009b). Curiosamente, o conteúdo do intestino médio anterior do *T. brasiliensis* é incapaz de aglutinar as hemácias do roedor *Thrichomys apereoides*, uma espécie silvestre abundante que habita o mesmo ecótopo do inseto no nordeste do Brasil, (Roque et al., 2005). O fato de não conseguir aglutinar as hemácias pode ajudar a explicar o baixo desempenho alimentar apresentado nesse hospedeiro, em comparação com ratos e humano (Araujo et al., 2009b; Guarneri et al., 2011), e poderia indicar uma clara vantagem adaptativa desenvolvida pelo hospedeiro, a fim de reduzir a perda de sangue para o inseto hematófago (Araujo et al., 2009b). A importância da atividade hemaglutinante no desempenho alimentar também foi relatada em mosquitos do gênero *Anopheles*. *Anopheles albimanus* e *Anopheles freeborni*, que aglutinam

hemácias de humanos, apresentaram tempo de alimentação inferior a *Anopheles gambiae*, que não possui atividade hemaglutinante no intestino (Chege, Beier, 1998).

Considerações finais

O estudo dos fatores relacionados à alimentação de insetos hematófagos é de extrema importância, pois pode estar diretamente relacionado à escolha do hospedeiro e à dinâmica de transmissão de patógenos (Keesing et al., 2006). Pesquisas apontam que a escolha do hospedeiro está ligada à interação vetor-hospedeiro, que é influenciada por vários fatores, dentre eles a disponibilidade e o comportamento de defesa do hospedeiro, bem como o comportamento alimentar do vetor (Lyimo, Ferguson, 2009; Pereira et al., 2006).

Em triatomíneos, o tamanho da colônia associada ao homem é um fator importante na eficiência de transmissão da doença de Chagas. As diferenças na taxa de ingestão são importantes, porque elas determinam o tempo de contato com o hospedeiro e, conseqüentemente, a dinâmica populacional dos triatomíneos, já que esses insetos necessitam de uma quantidade considerável de sangue para completar seu ciclo (Schofield, 1994). *Triatoma infestans* e *R. prolixus*, que são os principais vetores do *Trypanosoma cruzi*, possuem altas taxas de ingestão, fator chave para permitir que essas espécies atinjam altas densidades populacionais no interior das habitações humanas (Pereira et al., 2006). Esse padrão de alimentação também influencia na dinâmica de dejeções e, por conseguinte, na transmissão do *T. cruzi*, pois insetos que obtêm grandes repastos tendem a defecar mais rapidamente (Trumper, Gorla, 1991).

Estudos sobre moléculas salivares e intestinais, que facilitam a ingestão de sangue em determinados hospedeiros, poderão ajudar no melhor entendimento dos processos envolvidos na interação vetor-hospedeiro. Com o crescente número de sequências gênicas de artrópodes hematófagos depositadas nos bancos de dados, espera-se que estudos nessa área avancem numa escala maior do que tem acontecido nos últimos anos. Além disso, o desenvolvimento de ferramentas que permitam identificar com exatidão a(s) espécie(s) utilizada(s) como hospedeiro pelos artrópodes hematófagos, principalmente para aqueles que se utilizam de vários hospedeiros, irão, indiscutivelmente, facilitar o entendimento sobre a escolha da fonte alimentar e dos fatores relacionados, bem como a dinâmica de transmissão de patógenos. Novas ferramentas baseadas em métodos moleculares de tipificação do sangue poderão estimar com mais exatidão, qualitativamente e quantitativamente, quais os hospedeiros preferenciais de cada espécie de vetor (Gomez-Diaz, Figuerola, 2010).

Em triatomíneos, por exemplo, é sabido que várias espécies exercem hemolinfagia em hospedeiros invertebrados, sendo eles triatomíneos da mesma espécie, de outras espécies ou outros insetos, como blaberídeos (Alves et al., 2011; Brumpt, 1914; Ryckman, 1951; Sandoval et al., 2004). Esse hábito possui importância epidemiológica por prolongar a sobrevivência de ninfas em períodos de escassez de sangue, e por constar como um método de disseminação de tripanossomatídeos entre os triatomíneos (Alves et al., 2011; Anez, 1982; Phillips, 1960; Schaub, 1988). Entretanto, as dificuldades de se estudar tais fenômenos no campo pelo desconhecimento das fontes alimentares *in loco*, limitam a construção de conclusões mais definitivas sobre o assunto.

Referências

- Alves, C.L., Araujo, R.N., Gontijo, N.F., Pereira, M.H., 2011. Importance and physiological effects of hemolymphagy in triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 48, 372-381.
- Anez, N., 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. III. Direct transmission of *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs. *Ann Trop Med Parasitol* 76, 641-647.
- Araujo, R.N., Campos, I.T., Tanaka, A.S., Santos, A., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2007. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int J Parasitol* 37, 1351-1358.
- Araujo, R.N., Costa, F.S., Gontijo, N.F., Gonçalves, T.C.M., Pereira, M.H., 2009a. The feeding process of *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) and *Cimex hemipterus* (Fabricius 1803) on different bloodmeal sources. *J Insect Physiol* 55, 1151-1157.
- Araujo, R.N., Pereira, M.H., Soares, A.C., Pereira, I.D., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Guarneri, A.A., 2009b. Effect of intestinal erythrocyte agglutination on the feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 55, 862-868.
- Araujo, R.N., Soares, A.C., Paim, R.M., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2009c. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 39, 83-89.
- Araujo, R.N., Gontijo, N.F., Guarneri, A.A., Gontijo, A.F., Soares, A.C., Pereira, M.H. 2011. Electromyogram of the Cibarial Pump and the Feeding Process in Hematophagous Hemiptera. In: Mizrahi, J. (Ed.) *Advances in Applied Electromyography*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 137-158.
- Balashov, Y., 1984. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Ann Rev Ent* 29, 137-156.
- Barth, R., 1952. Anatomy and histology of the subfamily Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). I. The head of the *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 50, 156-196.
- Bennet-Clark, H.C., 1963a. Negative pressures produced in the pharyngeal pump of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* 40, 223-229.
- Bennet-Clark, H.C., 1963b. The control of meal size in the blood sucking bug. *Rhodnius Prolixus*. *J Exp Biol* 40, 741-750.
- Brumpt, E., 1914. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. *Bull Soc Pathol Exot* 7, 702-705.

Chapman R.F., Stephen J., Simpson A. et al (2013) The insects: structure and function, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Chege, G.M., Beier, J.C., 1998. Blood acquisition and processing by three *Anopheles* (Diptera: Culicidae) species with different innate susceptibilities to *Plasmodium falciparum*. J Med Entomol 35, 319-323.

Daniel, T.L., Kingsolver, J.G., 1983. Feeding strategy and the mechanics of blood sucking in insects. J Theor Biol 105, 661-677.

Friend, W.G., Smith, J.J., 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. J Insect Physiol 17, 233-243.

Gillett, J.D., 1967. Natural selection and feeding speed in a blood-sucking insect. Proc R Soc Lond B Biol Sci 167, 316-329.

Goldsmith, H.L., Cokelet, G.R., Gaetgens, P., 1989. Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology. Am J Physiol 257, H1005-1015.

Gomez-Diaz, E., Figuerola, J., 2010. New perspectives in tracing vector-borne interaction networks. Trends Parasitol 26, 470-476.

Gregorio, E.A., Ratcliffe, N.A., 1991. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. Mem Inst Oswaldo Cruz 86, 181-186.

Guarneri, A.A., Araujo, R.N., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Pereira, M.H., 2011. Feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) on habitual hosts: *Thrichomys laurentius* (Rodentia: Echimyidae) and humans. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 443-445.

Guarneri, A.A., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F., Pereira, M.H., 2000a. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. J Insect Physiol 46, 1121-1127.

Guarneri, A.A., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F., Pereira, M.H., 2003. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. Acta Trop 87, 361-370.

Guarneri, A.A., Pereira, M.H., Diotaiuti, L., 2000b. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). J Med Entomol 37, 373-379.

Hellmann, K., Hawkins, R.I., 1964. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius Prolixus* Stal. Nature 201, 1008-1009.

Jones, C.J., 1996, Immune responses to fleas, bugs and sucking lice, In: Wikel, S.K. (Ed.) The immunobiology of host-ectoparasitic arthropod relationships. CAB International, Wallingford, pp. 150-174.

Kalambur, V.S., Mahaseth, H., Bischof, J.C., Kielbik, M.C., Welch, T.E., Vilback, A., Swanlund, D.J., Hebbel, R.P., Belcher, J.D., Vercellotti, G.M., 2004. Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am J Hematol* 77, 117-125.

Keesing, F., Holt, R.D., Ostfeld, R.S., 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett* 9, 485-498.

Kim, B.H., Kim, H.K., Lee, S.J., 2011. Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes. *J Exp Biol* 214, 1163-1169.

Kingsolver, J.G., Daniel, T.L., 1995, Mechanics of fluid handling by fluid-feeding insects, In: Boer, R.F.C.G.d. (Ed.) *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Chapman & Hall, New York, pp. 32-73.

Lahondère C., Insausti T.C., Paim R.M., Luan X., Belev G., Pereira M.H., Ianowski, J.P., Lazzari C.R. (2017) Countercurrent heat exchange and thermoregulation during blood-feeding in kissing bugs. *Elife* 6:pii: e26107. <https://doi.org/10.7554/eLife.26107>.

Lavoipierre, M.M., Dickerson, G., Gordon, R.M., 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. *Ann Trop Med Parasitol* 53, 235-250.

Lavoipierre M.M. (1965) Feeding mechanism of blood-sucking arthropods. *Nature* 208:302–303.

Lazzari, C.R., Nunez, J.A., 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 35, 525-529.

Lehane, M.J., 2005, *The biology of blood-sucking in insects*, Second Edition. Cambridge University Press, New York, NY, 336 p.

Lewis, J.H., 1996, *Comparative hemostasis in vertebrates*. Plenum Press, New York and London, 426 p.

Lyimo, I.N., Ferguson, H.M., 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol* 25, 189-196.

Paim, R.M., Araujo, R.N., Soares, A.C., Lemos, L.C., Tanaka, A.S., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2011. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *Int J Parasitol* 41, 765-773.

Pereira, M.H., Gontijo, N.F., Guarneri, A.A., Sant' Anna, M.R., Diotaiuti, L., 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol* 22, 516-520.

- Phillips, N.R., 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material, and of the origin and course of infection in the vector. *Ann Trop Med Parasitol* 54, 397-414.
- Puckett, L.G., Lewis, J.K., Urbas, A., Cui, X., Gao, D., Bachas, L.G., 2005. Magnetoelastic transducers for monitoring coagulation, clot inhibition, and fibrinolysis. *Biosens Bioelectron* 20, 1737-1743.
- Ribeiro, J.M., 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32, 463-478.
- Ribeiro, J.M.C., 1995. Insect saliva: function, biochemistry and physiology, In: Boer, R.F.C.a.G.d. (Ed.) *Regulatory Mechanisms of Insect Feeding*. Chapman & Hall, London, pp. 74-97.
- Roque, A.L., D'Andrea, P.S., de Andrade, G.B., Jansen, A.M., 2005. *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 111, 37-46.
- Ryckman, R.E., 1951. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol* 37, 433-434.
- Sandoval, C.M., Duarte, R., Gutierrez, R., Rocha Dda, S., Angulo, V.M., Esteban, L., Reyes, M., Jurberg, J., Galvao, C., 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99, 137-140.
- Sant'Anna, M.R., Diotaiuti, L., de Figueiredo Gontijo, A., de Figueiredo Gontijo, N., Pereira, M.H., 2001. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol* 47, 1459-1465.
- Schaub, G.A., 1988. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Trop* 45, 11-19.
- Schofield, C.J., 1981. Chagas disease, triatomine bugs, and bloodloss. *Lancet* 1, 1316.
- Schofield, C.J., 1994. *Triatominae, biología y control*, 1 Edition. Eurocommunica Publications, 76 p.
- Schofield, C.J., Williams, N.G., Marshall, T.F., 1986. Density-dependent perception of triatomine bug bites. *Ann Trop Med Parasitol* 80, 351-358.
- Smith, J.J., 1979. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* 82, 93-104.
- Soares, A.C., 2008. Alterações vasculares na pele do hospedeiro, influência de lipocalinas salivares e do ambiente intestinal no processo de hematofagia dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae). Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Soares, A.C., Araujo, R.N., Carvalho-Tavares, J., Gontijo, N.F. Pereira, M.H., 2014. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitol Int* 63, 22-236.

Souza, R.C., Soares, A.C., Alves, C.L., Lorosa, E.S., Pereira, M.H., Diotaiuti, L., 2011. Feeding behavior of *Triatoma vitticeps* (Reduviidae: Triatominae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 16-22.

Trumper, E.V., Gorla, D.E., 1991. Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85, 800-802.

Ushiyama, A., Yamada, S., Ohkubo, C., 2004. Microcirculatory parameters measured in subcutaneous tissue of the mouse using a novel dorsal skinfold chamber. *Microvasc Res* 68, 147-152.

Wheeler, W.C., Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D., 2001. The phylogeny of the insect orders. *Cladistics* 17, 113-169.

Windberger, U., Bartholovitsch, A., Plasenzotti, R., Korak, K.J., Heinze, G., 2003. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 88, 431-440.

Windberger, U., Baskurt, O.K., 2007, Comparative hemorheology, In: Oguz K. Baskurt, M.R.H., Michael W. Rampling and Hebert J. Meiselman (Ed.) *Handbook of hemorheology and hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, pp. 267-288.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 16

Proteases e Inibidores de Proteases de Artrópodes Hematófagos

Aparecida Sadae Tanaka¹
Adriana Seixas²
Bruno de Souza Mayer²
Lucas Tirloni³
Luís Fernando Parizi⁴
Carlos Termignoni⁴

¹Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre.

³National Institutes of Health, Estados Unidos.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Copyright: © 2024 [Aparecida Sadae Tanaka, Adriana Seixas, Bruno de Souza Mayer, Lucas Tirloni, Luís Fernando Parizi, Carlos Termignoni]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Proteases, proteinases ou peptidases são enzimas proteolíticas, isso é, enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Elas estão presentes em todos os organismos vivos, das bactérias aos animais vertebrados. As modificações contínuas que ocorreram ao longo da evolução dos seres vivos resultaram na diversificação das enzimas, que, hoje sabemos, desempenham uma grande variedade de funções em uma série de processos fisiológicos, tais como a coagulação sanguínea, o processamento de hormônios, a fertilização, a regulação celular e muitos outros (Neurath, 1984). Efetivamente, estas enzimas são vitais para os organismos e, portanto, estão sujeitas a um controle muito preciso pela regulação da expressão gênica e a ativação específica de zimogênios. Uma vez ativadas, também são moduladas, principalmente por inibidores específicos, evitando que elas atuem quando suas atividades são desnecessárias ou prejudiciais, prevenindo danos celulares severos (NeurathWalsh, 1976; LaskowskiKato, 1980; Armstrong, 2001).

As enzimas proteolíticas são classificadas em exopeptidases e endopeptidases, de acordo com a posição das ligações peptídicas que são clivadas (Bergmann, 1936). As endopeptidases são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações peptídicas, envolvendo resíduos de aminoácidos internos no substrato peptídico ou proteico. Já as exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, envolvendo resíduos de aminoácidos das extremidades C- ou N terminais das cadeias polipeptídicas (Bergmann, 1936). Nos artrópodes hematófagos, já foram descritas muitas exopeptidases e endopeptidases, que desempenham funções importantes em processos como a digestão de proteínas, a interação com patógenos, a resposta imune, a ovogênese, a embriogênese, entre outros processos (KerlineHughes, 1992; Amino et al., 2001; Sojka et al., 2011; Santiago et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

As endopeptidases são classificadas de acordo com a estrutura primária, o mecanismo de catálise e a estrutura tridimensional nas famílias (enumeradas em ordem decrescente, do número de membros descritos): serino peptidases, cisteíno peptidases, aspartil peptidases e metaloproteases¹. Em artrópodes hematófagos, foi efetivamente demonstrado que as serino peptidases são fundamentais no processo digestório de insetos, como mosquitos (Borovsky, 2003), moscas (Allingham et al., 1998) e flebotomíneos (Telleria et al., 2007). Algumas serino peptidases estão presentes na saliva desses artrópodes, onde elas têm papel crucial na aquisição de sangue (KerlineHughes, 1992; Amino et al.,

¹De acordo com o site https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P

2001; Oliveira et al., 2021). Nos carrapatos e barbeiros, as proteases envolvidas no processo de digestão pertencem às famílias das cisteíno peptidases (Kollien et al., 2004; Sojka et al., 2011; Sojka et al., 2016) e das aspartil peptidases (Garcia et al., 2010).

Assim como as enzimas proteolíticas, os seus inibidores também são agrupados em famílias, inicialmente de acordo com a enzima-alvo e, em seguida, segundo a sua estrutura primária, mecanismo de inibição e estrutura terciária. Os inibidores de serino peptidases, cisteíno peptidases e carboxipeptidases estão distribuídos em mais de 99 famílias (I1 a I99), sendo a maioria deles inibidores de serino peptidases².

Nos artrópodes hematófagos, as famílias de inibidores de serino peptidases que apresentam maior número de membros estudados são dos tipos Kunitz, Kazal, serpinas e, também, inibidores até agora encontrados apenas em invertebrados, as pacifastinas e os TIL (trypsin-like inhibitor). As cistatinas dos tipos 1 e 2 são os inibidores de cisteíno peptidases mais estudados até o momento.

Inibidores de serino peptidases

A maioria dos inibidores de serino peptidases atua como pseudo-substratos, ou seja, mimetizam os substratos (BodeeHuber, 1991) e se ligam ao sítio ativo da enzima, impedindo ou reduzindo a formação do produto. Conforme a anotação proposta por Schechter e Berger, os resíduos de aminoácidos do substrato envolvidos na ligação peptídica que é clivada são denominados de P1 e P1'. Já os aminoácidos adjacentes na direção do N-terminal são denominados P2, P3 e assim por diante, enquanto na direção C-terminal, P'1, P'2, etc. Os subsítios na enzima onde as cadeias laterais desses resíduos de aminoácidos se inserem são denominados de S1, S2, S1' e assim por diante (SchechtereBerger, 1967). Os inibidores de serino peptidases, na sua maioria, formam complexos reversíveis com as enzimas-alvo, embora os inibidores da família das serpinas clivados e inativados permanecem ligados à enzima alvo (Huntington et al., 2000).

Inibidores de serino peptidases do tipo Kunitz

Os artrópodes hematófagos regulam as atividades das serino peptidases do hospedeiro para facilitar o parasitismo, empregando vários inibidores, muitos dos quais pertencem à família do tipo Kunitz. Alguns desses inibidores estão

²De acordo com o site https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=l.

presentes em diversas espécies de artrópodes hematófagos, como os carrapatos e as moscas. Os inibidores do tipo Kunitz são, geralmente, pequenas proteínas de aproximadamente 6-8 kDa, possuindo um ou mais domínios Kunitz de 50 a 60 aminoácidos, cujo mecanismo de inibição canônico mimetiza a estrutura do substrato (Corral-Rodriguez et al., 2009). O domínio Kunitz é constituído por seis resíduos de cisteína, que formam três ligações dissulfeto responsáveis pela estabilização do enovelamento adequado dessa estrutura. Essa estrutura, por sua vez, forma uma protuberância em forma de laço, a qual se insere na fenda do sítio ativo da peptidase, denominado de sítio reativo. Além disso, ela assume uma conformação semelhante ao substrato da serino peptidase que está sendo inibida, formada por pequenos segmentos da cadeia de aminoácidos que se alinham antiparalelas aos resíduos de aminoácidos da peptidase próximos ao sítio ativo (Bodee, Huber, 2000). As posições dos aminoácidos P1 e P1' do sítio reativo estão localizadas no centro da alça, onde P1 é importante para determinar a especificidade do inibidor. Para alguns inibidores, os resíduos P6'-P5' também estão envolvidos em interações com exossítios de serino peptidases (Laskowskie, Kato, 1980; Krowarsch et al., 1999; Ranasinghee, McManus, 2013). A seguir, será apresentada uma breve descrição dos diversos inibidores do tipo Kunitz, encontrados em diferentes artrópodes hematófagos.

Entre os inibidores das serino peptidases dos carrapatos, os do tipo Kunitz perfazem o maior número de moléculas já caracterizadas quanto às suas funções fisiológicas (Parizi et al., 2018). *Haemaphysalis longicornis* é uma espécie de carrapato muito estudada e forneceu informações importantes sobre as peptidases de carrapatos e seus inibidores. Três inibidores do tipo Kunitz foram descritos em glândulas salivares de *H. longicornis* (hemafisalina, hemalina e hemangina), todos contendo dois domínios Kunitz. A hemafisalina atua sobre o sistema plasmático calicreína-cinina e tem como alvo a via intrínseca da coagulação, interferindo na ativação recíproca entre o fator XII e a pré-calicreína (Kato et al., 2005). A hemalina é um inibidor da trombina (Liao et al., 2009) e presente no intestino médio, nas glândulas salivares, nos hemócitos e no corpo gorduroso de fêmeas adultas, assim como em ninfas e larvas. O nível de transcrição mais alto é encontrado nas fases tardias de alimentação das larvas, ninfas e adultos.

O silenciamento por RNA de interferência (RNAi) da hemalina de carrapatos resultou em dificuldades na aquisição do alimento, prolongando o período de alimentação. A hemalina recombinante prolonga o tempo de coagulação do plasma bovino, inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina e a formação de coágulos de fibrina (Liao et al., 2009). O terceiro inibidor

do tipo Kunitz presente nas glândulas salivares de *H. longicornis*, denominado hemangina, inativa potentemente a plasmina, assim como interrompe a angiogênese e a cicatrização tecidual ao inibir a proliferação de células endoteliais vasculares e a apoptose (Islam et al., 2009). A transcrição da hemangina em carrapatos adultos é regulada positivamente durante a alimentação sanguínea. Além disso, experimentos de RNAi mostraram que o ingurgitamento de *H. longicornis* é prejudicado pelo bloqueio da síntese de hemangina (Islam et al., 2009). Em conjunto, os resultados indicam a importância desses inibidores do tipo Kunitz para a aquisição de sangue em *H. longicornis*, pelo controle da hemostasia do hospedeiro.

Outros inibidores do tipo Kunitz de carrapatos que atuam sobre peptidases da cascata de coagulação do sangue já estudados, são o ixolaris e o pentalaris. Essas duas proteínas salivares são expressas em *Ixodes scapularis*, o vetor da doença de Lyme na América do Norte. Ixolaris é um inibidor contendo dois domínios tipo Kunitz, que interfere na ativação do fator X (FX) induzido pelo fator VIIa (FVIIa)/fator tecidual (TF), ao se ligar a um exossítio do FXa (Francischetti et al., 2002). Esse inibidor liga-se ao FX plasmático, diminui a inibição por heparina-antitrombina III e impede a ligação do FXa à heparina plasmática ou imobilizada, afetando, assim, a coagulação (Monteiro et al., 2008). Pentalaris, por sua vez, é um inibidor que contém cinco domínios Kunitz em *tandem* e também tem como alvo a ativação de FX induzida por FVIIa/TF. Esse inibidor se liga firmemente tanto ao zimogênio (FX) quanto à enzima ativa FXa (via exossítio), sem inibir FVIIa. Portanto, o pentalaris pode atuar em combinação com o ixolaris para auxiliar na alimentação de *I. scapularis*, inibindo diferentes peptidases dos hospedeiros (Francischetti et al., 2004). Paralelamente, ixolaris também mostrou diminuir o potencial tumorigênico de células de glioblastoma e melanoma humanas e murinas, sendo associado à redução da vascularização tumoral e expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sugerindo o uso deste inibidor como alvo para terapia anticancerígena (Carneiro-Lobo et al., 2009; Carneiro-Lobo et al., 2012).

Ixodes ricinus, o vetor da doença de Lyme na Europa, produz um inibidor do tipo Kunitz na saliva que bloqueia a coagulação do sangue, denominado inibidor da fase de contato de *I. ricinus* (Ir-CPI). Ir-CPI possui um domínio tipo Kunitz que inibe a via intrínseca da coagulação e, em menor grau, a fibrinólise (Decrem et al., 2009). Ele interfere na ativação recíproca de FXII, pré-caliceína e FXI no plasma humano, ligando-se especificamente a esses três fatores quando estão na forma ativada (Matafonov et al., 2014). A modulação de FXII pela Ir-CPI se mostra interessante para a aplicação farmacológica, visto que camundongos deficitários

de FXII possuem maior proteção contra trombose, sem implicar problemas de coagulação/sangramentos (Renne et al., 2005). Essa possibilidade baseia-se em ensaios *in vivo*, que mostraram que Ir-CPI tem propriedades antitrombóticas e inibe a formação de trombina venosa e arterial, sem perturbar o equilíbrio da coagulação (Decrem et al., 2009).

Rhipicephalus microplus é um ectoparasita que afeta quase exclusivamente bovinos. Supõem-se que essa alta seletividade pelo hospedeiro seja resultado de uma coevolução hospedeiro-parasito, com a qual o carrapato desenvolveu mecanismos de neutralização das defesas do hospedeiro. O carrapato *R. microplus* produz vários inibidores tipo Kunitz, que atuam no controle da hemostasia. Por exemplo, BmTI-A inibe a elastase de neutrófilos, calicreína plasmática (Tanaka et al., 1999), tripsina e plasmina (Soares et al., 2016). Experimentos sobre a formação de vasos *in vitro* sugerem que BmTI-A inibe a angiogênese (Soares et al., 2016). Outros inibidores do tipo Kunitz presentes em *R. microplus* incluem: i) BmTI-6, um inibidor de plasmina contendo três domínios tipo Kunitz, que é expresso no ovário e no corpo gorduroso (Sasaki e Tanaka, 2008); ii) RmKK, um inibidor de dois domínios Kunitz ativo contra tripsina e calicreína tecidual/pancreática (Abreu et al., 2014); e iii) boofilina, um inibidor anticoagulante e antitrombótico de dois domínios Kunitz, expresso no intestino de fêmeas totalmente ingurgitadas que inibe trombina, elastase, calicreína, catepsina G e plasmina (Macedo-Ribeiro et al., 2008; Cereija et al., 2012; Soares et al., 2012; Assumpcao et al., 2016) (Figura 1). Foi sugerido que a boofilina atua conjuntamente com outros inibidores de serino peptidases presentes no intestino, afetando o processo de digestão e, também, a embriogênese (Soares et al., 2012). O conjunto de dados corroboram a ideia de que esses inibidores têm um papel central no bloqueio da hemostasia do hospedeiro e na inibição da coagulação sanguínea, facilitando, assim, a ingestão e a digestão do sangue. O uso de rBmTI-A em modelo de enfisema experimental induzido por elastase, mostraram a redução de lesões parenquimatosas em camundongos, sugerindo ser um alvo com potencial para o tratamento do enfisema (Lourenco et al., 2014).

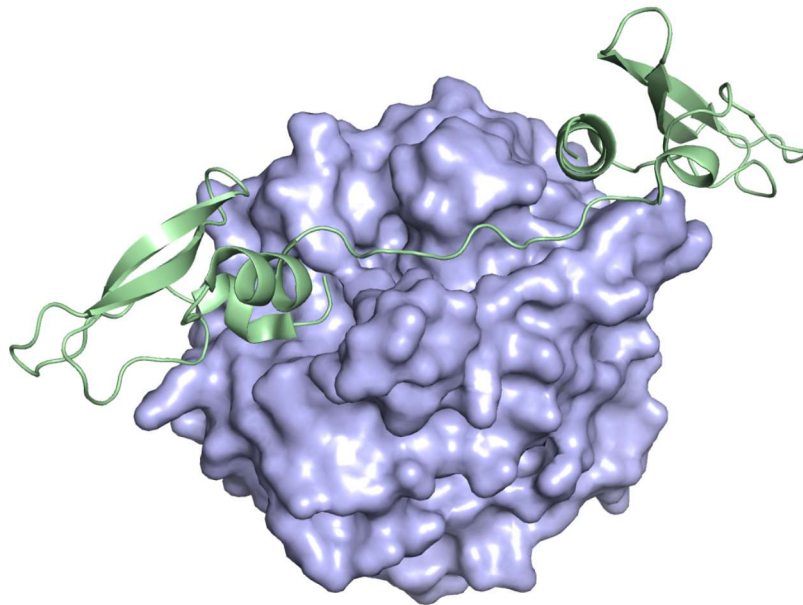


Figura 1: Estrutura tridimensional do complexo formado pela trombina e boofilina, um inibidor do tipo Kunitz do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Protein Data Bank ID: 2ODY) A molécula de boofilina está representada na cor verde, enquanto a trombina está representada na cor lilás. A boofilina interage com a trombina via sítio ativo e exossítio I com os domínios 1 e 2, respectivamente. A interação da boofilina ao exossítio I segue um mecanismo de inibição não canônico.

Fonte: Macedo-Ribeiro et al., 2008

Os inibidores do tipo Kunitz também foram caracterizados em outras espécies de carrapato do gênero *Rhipicephalus*. *Rhipicephalus sanguineus* produz inibidores de tripsina, como RsTIQ2, RsTIQ7 e RsTIS5, que inibem a elastase de neutrófilos, plasmina e de calicreína humanas (Sant'Anna Azzolini et al., 2003). A rhipilina-1 de *Rhipicephalus haemaphysaloides*, que é homólogo ao inibidor da via do fator tecidual (TFPI), prolonga a coagulação do plasma de coelho, tanto em ensaios de recalcificação, quanto em ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Esse inibidor parece ter papel na alimentação do carrapato, uma vez que a rhipilina-1 é transcrita em carrapatos alimentados, mas não em carrapatos não alimentados, e o silenciamento do gene codificador desse inibidor por RNAi leva a uma diminuição da taxa de fixação e ingurgitamento (Gao et al., 2011). Da mesma forma, rhipilina-2, que inibe tripsina e elastase, é homóloga ao TFPI e possui atividade anticoagulante, prolongando a coagulação do plasma de coelho no ensaio de TTPa (Cao et al., 2013).

O carrapato *Amblyomma sculptum* (uma espécie do complexo *Amblyomma cajennense*) secreta amblyomina-X, um inibidor do fator Xa que contém um único domínio tipo Kunitz capaz de inibir a atividade amidolítica do fator Xa, bem como a ativação do fator X pelo complexo tenase extrínseco

(FVIIa/TF) (Batista et al., 2010; Pacheco et al., 2014). A amblyomina-X prolonga os tempos de protrombina (TP) e de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) *in vitro* e foi capaz de promover a redução do tamanho do tumor em um modelo de melanoma, via indução de apoptose e inibição de proteassoma (Pacheco et al., 2014). Devido a essas atividades, a amblyomina-X tem sido investigada para uso como droga antitumoral (Drewes et al., 2015; Morais et al., 2016; Boufleur et al., 2019; Maria et al., 2019). Por sua vez, variegina e amblina, inibidores de trombina de *Amblyomma variegatum* (Koh et al., 2007; Koh et al., 2011) e *Amblyomma hebraeum* (Lai et al., 2004), respectivamente, são estudados como potenciais drogas anti-hemostáticas. Outro inibidor de serino peptidase do tipo Kunitz com propriedade anti-hemostática, o HA11 de *Hyalomma asiaticum* (Zhang et al., 2017), tem sua síntese induzida durante as fases de alimentação sanguínea larval e ninfal. HA11 recombinante prolonga a coagulação normal do plasma no ensaio de TTPa. Recentemente, AsKunitz, um inibidor do tipo Kunitz encontrado em *A. sculptum*, apresentou atividade inibitória para trombina e via clássica do complemento (Carvalho-Costa et al., 2021).

Fatores anti-hemostáticos do tipo Kunitz (também conhecidos como BPTI-Kunitz) foram caracterizados em *Ornithodoros moubata*, *Ornithodoros savignyi* e *Argas monolakensis*. Esses incluem: inibidores de trombina ornithodorina (van de Locht et al., 1996), savignina (Nienaber et al., 1999) e monobina (Mans et al., 2008); inibidores de FXa (Gaspar et al., 1996) e peptídeo anticoagulante de carrapato (TAP) (Waxman et al., 1990) e inibidores da agregação plaquetária savignigrina (Leboulle et al., 2002), disagregrina e monogrinas (Mans et al., 2008). A ornitodorina de *O. moubata* liga-se ao sítio ativo e exossítio da trombina (van de Locht et al., 1996). A savignina de *O. savignyi* inibe a agregação plaquetária induzida por trombina (Nienaber et al., 1999). O TAP (Waxman et al., 1990) liga-se fortemente ao fator Xa em um modo não canônico, exibindo uma alta afinidade para o FXa quando está presente no complexo protrombinase (Krishnaswamy et al., 1994; Betz et al., 1997). A savignigrina e as monogrinas possuem o motivo de reconhecimento de integrina RGD (Ruoslahti, 1996) na alça de ligação do BPTI ao sítio ativo das enzimas (Mans et al., 2008). A monobina atua como um inibidor da coagulação nos testes de tempo de recalcificação e TTPa (Mans et al., 2008). Os carrapatos empregam essas moléculas anti-hemostáticas para o relaxamento muscular do hospedeiro, a vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno para superar a hemostasia do hospedeiro.

Além dos carrapatos, diversas espécies de moscas que evoluíram para a hematofagia apresentam inibidores de proteases na saliva, os quais são fundamentais para a inibição dos processos de defesa dos hospedeiros, como a

inflamação, a coagulação e a resposta imunológica. Entre elas, se encontram a espécie *Haematobia irritans irritans*, um dos ectoparasitas mais importantes na pecuária bovina (Grisi et al., 2014). Um inibidor de serino proteinase (HiTI) da família do tipo BPTI-Kunitz, presente em *H.i. irritans*, inibe a tripsina bovina, a elastase de neutrófilos humanos e uma enzima do tipo tripsina de *H. i. irritans* (Azzolini et al., 2004). Foi sugerido que a HiTI poderia controlar a atividade de enzima endógena, tipo tripsina, da própria mosca *H. i. irritans*.

Inibidores tipo Kunitz também foram descritos em dípteros de importância para a saúde humana e animal, dentre eles os simúlideos. Esses insetos, popularmente conhecidos como borrachudos, são importantes vetores de agentes patogênicos, como a filária *Onchocerca volvulus*, agente etiológico da cegueira-dos-rios. Uma proteína da família tipo BPTI-Kunitz, simucunina, identificada no sialoma de *Simulium vittatum*, inibe a coagulação do plasma, assim como foi capaz de reduzir a atividade enzimática de dez serino peptidases. Algumas dessas enzimas estão envolvidas na coagulação de mamíferos, entre as quais, maior inibição foi detectada para o Fator Xa, elastase e catepsina G, sugerindo uma ação da simucucina no controle da inflamação nos hospedeiros vertebrados (Tsujiimoto et al., 2012).

Inibidores de serino peptidases do tipo Kazal

Entre os inibidores de serino peptidases mais estudados, os da família tipo Kazal, também conhecidos como família I1 de inibidores, competem com os do tipo Kunitz (Rawlings et al., 2018). O nome dessa família faz referência ao trabalho de Kazal e col. (Kazal et al., 1948), que isolaram o primeiro membro desta família, um inibidor de tripsina, posteriormente denominado SPINK1.

Atualmente, a inclusão de uma proteína nessa família tem como base a presença de um ou múltiplos domínios do tipo Kazal (Rimphanitchayakite Tassanakajon , 2010). Esse domínio é composto por 40 a 60 resíduos de aminoácidos, contendo três pontes de dissulfeto, formadas pelos resíduos de cisteína C1 – C5, C2 – C4 e C3 – C6. É importante ressaltar que a estrutura primária do domínio Kazal pode variar drasticamente (Figura 2A); entretanto, as três pontes de dissulfeto conferem a estrutura tridimensional característica desta família (Figura 2B). Essa estrutura pode ser, brevemente, descrita como uma alfa-hélice cercada por três alças denominadas A, B e C. A alça B é chamada de alça reativa, uma vez que ela contém o resíduo P1 (segundo resíduo, após o segundo resíduo de cisteína) responsável pela especificidade do inibidor.

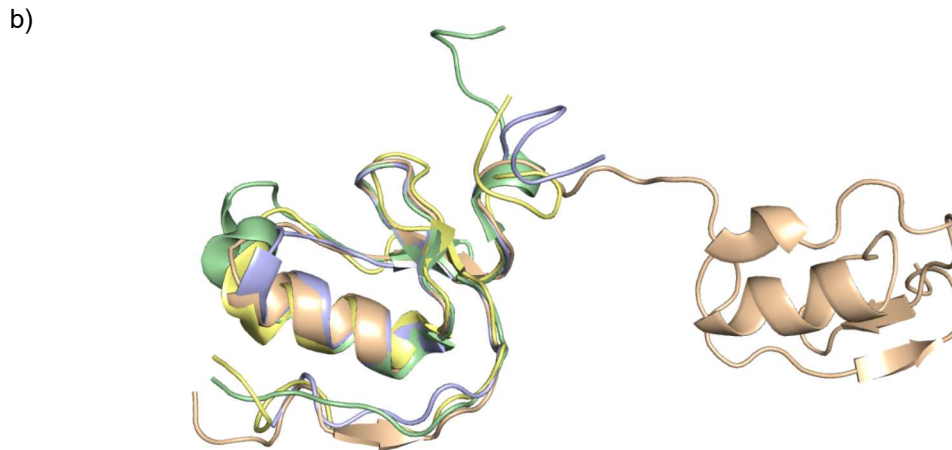
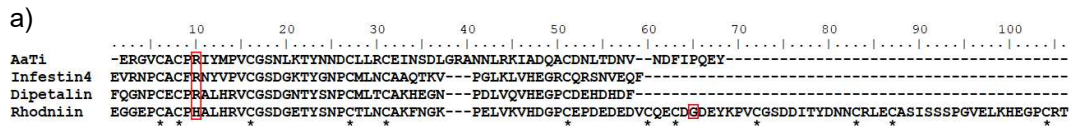


Figura 2: (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes inibidores do tipo Kazal, encontrado em artrópodes hematófagos. Os resíduos de cisteína estão indicados por *, enquanto o resíduo P1 está destacado em vermelho. (B) Sobreposição da estrutura tridimensional de diferentes inibidores do tipo Kazal de artrópodes hematófagos representados em *cartoon*. Rhodniin de *R. prolixus* (PDB:1TBQ) está representada em bege, AaTI de *Ae. aegypti* (PDB: 5DAE), em verde, infestina 4 de *T. infestans* (PDB: 2ERW), em azul e a dipetalina de *D. maximus* (PDB:1KMA), em amarelo.

Fonte: Arquivo pessoal

Historicamente, os primeiros inibidores do tipo Kazal foram isolados de vertebrados. Além disso, o número de resíduos de aminoácidos entre os resíduos de cisteína também era conservado. Entretanto, a descoberta de inibidores do tipo Kazal em invertebrados revelou que esse espaçamento é, na verdade, variável e, portanto, é comumente conhecido como domínio não-canônico ou não-clássico (Fink et al., 1986). Apesar de não ser o foco deste capítulo, vale a pena mencionar que, recentemente, foram encontrados inibidores do tipo Kazal que não apresentam uma das pontes dissulfeto, e são denominados domínios atípicos do tipo Kazal (Nirmala et al., 2001; Zhu et al., 2006).

O mecanismo de inibição dos inibidores do tipo Kazal é conhecido como mecanismo padrão de inibição de serino peptidases (LaskowskieKato, 1980), no qual cada domínio do tipo Kazal atua como um análogo ao substrato da enzima, competindo pelo seu sítio catalítico. Apesar do complexo enzima-inibidor ser estabilizado por interações não-covalentes, o complexo apresenta alta estabilidade e, geralmente, são observadas constantes altas de associação ($10^7 - 10^{13} \text{ M}^{-1}$), resultando em constantes de inibição baixas na ordem de nanomolar (van de Loch et al., 1995; Campos et al., 2002; Takac et al., 2006; Watanabe et al., 2010).

Do ponto de vista funcional, os inibidores do tipo Kazal estão associados a diversos processos fisiológicos e, apesar de alguns membros dessa família serem comumente reportados em transcriptomas e proteomas de artrópodes hematófagos, apenas algumas dessas moléculas foram caracterizadas. As próximas seções apresentam uma breve discussão sobre os diversos inibidores do tipo Kazal encontrados em diferentes artrópodes hematófagos.

Estudos iniciais utilizando extratos de *Rhodnius prolixus* isolaram uma molécula capaz de inibir a trombina de forma específica (Friedrich et al., 1993). Os autores denominaram esse inibidor de rhodniina e demonstraram que a molécula continha dois domínios do tipo Kazal, sugerindo que o primeiro domínio seria responsável pela inibição da trombina. Dois anos após a identificação da rhodniina, sua estrutura tridimensional complexada com a trombina foi caracterizada e foi possível determinar seu mecanismo de inibição (van de Locht et al., 1995). Contrariando o que havia sido inicialmente proposto, demonstrou-se que ambos os domínios interagem com a trombina, mas o domínio amino-terminal se liga no sítio catalítico da trombina de forma similar a um substrato, enquanto que o domínio carboxi-terminal interage com sítio de reconhecimento do fibrinogênio (Figura 3).

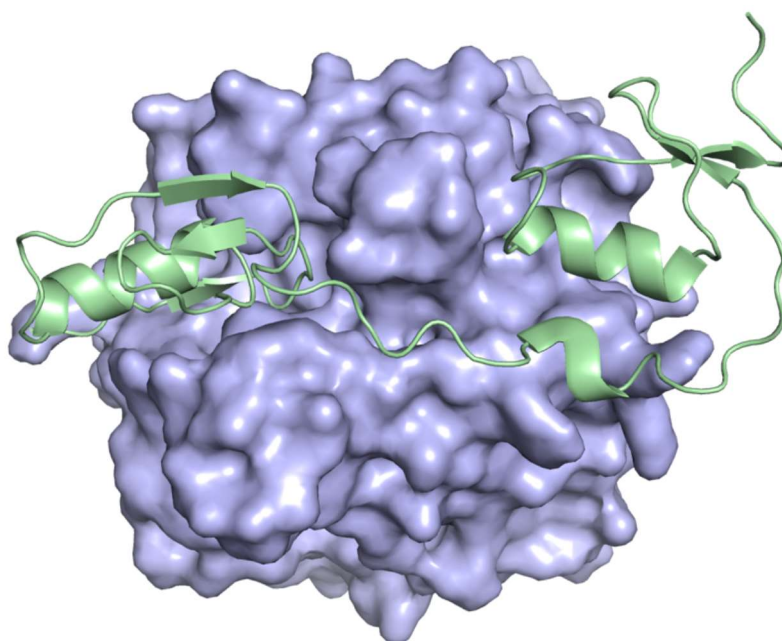


Figura 3: Estrutura tridimensional da rhodniina de *R. prolixus* complexada com a trombina, determinada por cristalografia de raio-X com resolução de 3.10Å (PDB: 1TBQ). A superfície da trombina está representada em lilás enquanto a rhodniina está representada em verde.

Fonte: Arquivo pessoal

Em *Triatoma infestans*, Campos e colaboradores (Campos et al., 2002) isolaram uma sequência de mRNA codificante para uma proteína contendo 4 domínios do tipo Kazal, denominada infestina. Os autores também isolaram a infestina nativa e, como a proteína apresenta dois dos quatro domínios, foi sugerido que ocorra a clivagem pós-tradução por proteases. O mesmo estudo obteve formas recombinantes da proteína e sua atividade inibitória foi caracterizada. A infestina 1-2 (contendo o primeiro e segundo domínios) apresenta alta especificidade para trombina e tripsina, enquanto a infestina 1-4 apresenta atividade inibitória contra o fator XIIa, fator Xa e plasmina. Posteriormente, Campos e col., (Campos et al., 2004) caracterizaram a atividade inibitória das formas recombinantes da infestina 3-4 e da infestina 4, sendo a infestina 3-4 o primeiro inibidor de fator XIIa isolado de um inseto hematófago.

Posteriormente, foi descrito que o mRNA completo da *infestina* contém, na verdade, sete domínios do tipo Kazal, sendo o primeiro domínio, denominado de infestina-1R, isolado a partir de um extrato de intestinos de *T. infestans* (Lovato et al., 2006). Os autores obtiveram a infestina-1R recombinante e demonstraram que este domínio é um potente inibidor de elastase de neutrófilos. De forma geral, os estudos com infestina revelaram a versatilidade dos inibidores do tipo Kazal, uma vez que uma molécula, contendo múltiplos domínios, pode ser processada e resultar em inibidores com diferentes especificidades. Semelhante à infestina, uma molécula contendo sete domínios do tipo Kazal foi identificada em diferentes tecidos de *Panstrongylus megistus* (Meiser et al., 2010). Esse inibidor foi denominado PmStKaz e os domínios 2-3 e 4-5 foram isolados do estômago do triatomíneo.

Em mosquitos *Aedes aegypti*, inibidores do tipo Kazal foram, inicialmente, identificados em transcriptomas de glândulas salivares (Ribeiro et al., 2007), sugerindo um papel desse tipo de inibidor no processo de aquisição do sangue. O AaTI (*Ae. aegypti trypsin inhibitor*) foi o primeiro inibidor do tipo Kazal a ser bioquimicamente caracterizado em mosquitos (Watanabe et al., 2010). Além de apresentar atividade inibitória para tripsina e plasmina, o AaTI também foi capaz de interferir na coagulação do sangue. Curiosamente, o AaTI não apresenta atividade inibitória para as enzimas envolvidas nesse processo, indicando a presença de um mecanismo alternativo. Ensaios de competição utilizando AaTI, anti-trombina III e heparina sugerem que a atividade anticoagulante do AaTI ocorre por interação do inibidor com o exsítio 2 da trombina (Watanabe et al., 2011). Recentemente, Ramesh e colaboradores (Ramesh et al., 2019) exploraram o papel do AaTI em mosquitos infectados com vírus da dengue, sugerindo que tais inibidores podem estar relacionados à capacidade vetorial do mosquito.

Além de triatomíneos e mosquitos, inibidores do tipo Kazal também foram encontrados em outros artrópodes hematófagos. Em *Phlebotomus papatasi*, o flebotomíneo vetor de *Leishmania*, dois inibidores contendo um domínio do tipo Kazal (PpKzl1 e PpKzl2) foram identificados (Sigle e Ramalho-Ortigao, 2013). Nesse estudo, os autores caracterizaram a atividade inibitória de ambas as moléculas, além de analisarem o perfil de transcrição em diferentes estágios (pupa, larva e adultos) e em distintos tempos pós-alimentação, sugerindo que PpKzl1 e PpKzl2 atuam como reguladores do processo digestório. Na mosca *Hybomitra bimaculata*, uma proteína denominada de vasotab foi isolada de um extrato de glândulas salivares e classificada como um inibidor do tipo Kazal, apesar de conter uma inserção de sete resíduos entre o terceiro e o quarto resíduo de cisteína (Takac et al., 2006). O mesmo estudo demonstrou que a vasotab possui uma atividade vasodilatadora, o que favorece a aquisição do sangue.

Finalmente, em carrapatos também foram descritas proteínas contendo domínios do tipo Kazal; entretanto, o conhecimento relativo a esta família em ácaros ainda é esparso. Em *H. longicornis*, um transcrito contendo três domínios, sendo um deles um domínio do tipo Kazal, foi encontrado nos ovários (Zhou et al., 2006), mas a função e a atividade do domínio Kazal presente nessa molécula permanecem desconhecidas. De forma semelhante, no carrapato *Amblyomma americanum*, proteínas contendo domínios do tipo Kazal foram identificadas (Mulenga et al., 2007). Porém, sua função e atividade ainda não foram caracterizadas.

Serpinas

Inibidores da superfamília das serpinas atuam em uma variedade de funções fisiológicas em diferentes organismos, estando presentes em todos os três super reinos (*Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*), bem como em vírus. As serpinas são, tipicamente, compostas por 350-400 aminoácidos e têm um peso molecular médio entre 40-60 kDa (Gettins 2002). Apesar da baixa homologia de sequência, as serpinas compartilham uma estrutura terciária altamente conservada, que, geralmente, consiste em três folhas β (A, B, C), oito a nove α -hélices, e uma alça central reativa (*reactive center loop* - RCL), que é responsável pela interação com o sítio ativo da protease. As serpinas inibem as proteases por meio de um mecanismo “suicida” único, que resulta na inativação não apenas da protease, mas também da serpina (Huntington et al., 2000). Inicialmente, o reconhecimento do resíduo P1 no RCL da serpina pela protease leva à criação de um complexo não covalente do tipo Michaelis-Menten. A protease subsequentemente cliva a

ligação entre os resíduos P1 e P1' do RCL, resultando na formação do componente intermediário acil-protease. Para substratos típicos, o intermediário é resolvido por hidrólise.

No entanto, quando o RCL de uma serpina é hidrolisado, o RCL clivado se insere no centro da folha β A, para formar uma fita extra, e essa mudança conformacional desloca a tríade catalítica. Esse processo impede que a catálise seja concluída, resultando na formação de um complexo covalente entre a serpina e a protease (Figura 4). A maioria das serpinas inibem as serino proteases, mas algumas serpinas são descritas como inibidores de cisteíno proteases. Além disso, algumas delas não possuem função inibitória, estando envolvidas no transporte de hormônios, na regulação da pressão arterial e no armazenamento (Gettins, 2002).

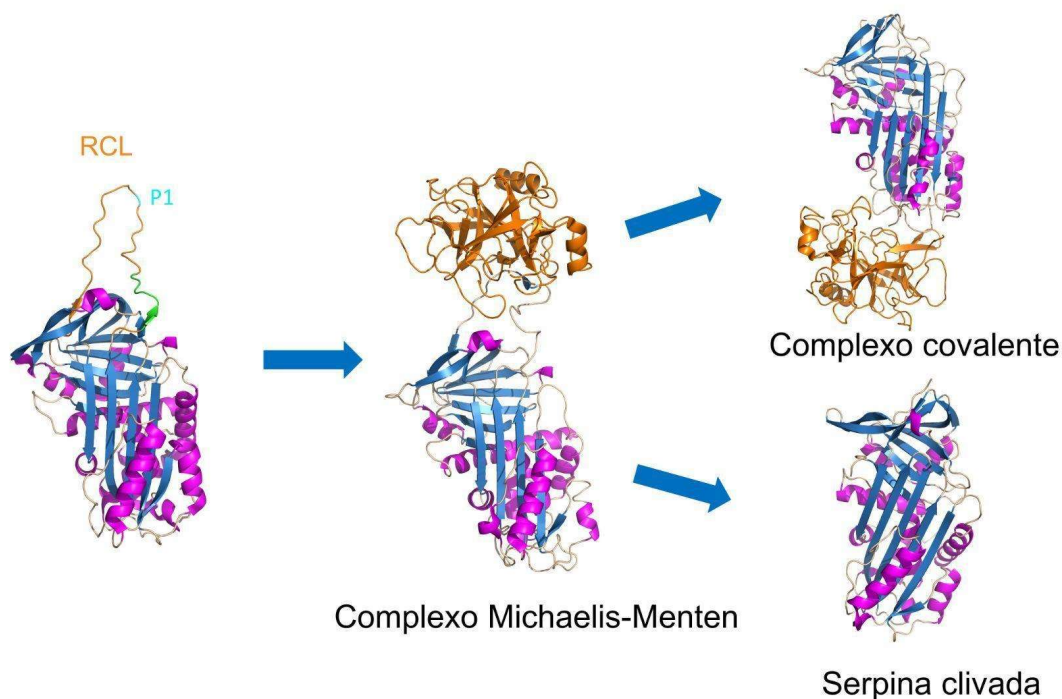


Figura 4: Estrutura das serpinas e seu mecanismo de inibição. O estado nativo de uma serpina é apresentado com destaque para a região do centro reativo (RCL). Após interação com a protease alvo, ocorre a formação do complexo Michaelis-Menten não covalente, que pode terminar com a formação de um complexo covalente ou como um estado inativo clivado. As estruturas usadas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (7PMU, 1K9O, 2D26 e 4CAA) e preparadas no Pymol.

Fonte: Arquivo pessoal

As primeiras serpinas de artrópodes que se conhece foram isoladas da hemolinfa do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Sasaki e Kobayashi 1984), e as primeiras regiões codificadoras foram clonadas a partir do genoma da lagarta da mariposa *Manduca sexta* (Kanost et al., 1989). Sequências de serpinas já foram identificadas em muitos transcriptomas e em genomas de artrópodes (Gulley et al., 2013; Meekins et al., 2017). Desde sua descrição inicial, as serpinas de artrópodes têm sido descritas atuando na regulação de uma grande variedade de funções biológicas, incluindo a reprodução, os processos de desenvolvimento, a hematofagia e a imunidade (Gulley et al., 2013). A maioria das serpinas caracterizadas em artrópodes regulam respostas imunes, incluindo a cascata de coagulação da hemolinfa, a ativação proteolítica da via Toll, e a ativação proteolítica da pró-fenoxidase (proPO), e, como consequência, a melanização. Serpinas também foram descritas e caracterizadas na saliva de artrópodes hematófagos, incluindo carrapatos e mosquitos. Na saliva, as funções moleculares desses inibidores variam desde a inibição da coagulação sanguínea até a interferência da inflamação do hospedeiro, e, possivelmente, são importantes para a alimentação sanguínea e para a transmissão de patógenos.

A primeira serpina descrita em mosquitos foi encontrada nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* e caracterizada como inibidor de fator Xa da coagulação sanguínea, sugerindo que desempenhe um papel anticoagulante, durante o repasto sanguíneo (Starke James, 1995). A alboserpina, ortólogo descrito em *Aedes albopictus*, também inibe o fator Xa. Ambas as serpinas usam um mecanismo inibitório que é divergente do mecanismo clássico de inibição suicida: são ligantes fortes de fator Xa; porém, a formação do complexo serpina-protease é reversível e não covalente, muito provavelmente pelo encurtamento da região RCL presente nessas serpinas (Calvo et al., 2011). Além da função clássica de inibição de fator Xa, a alboserpina interage com heparina e fosfolípídeos de membrana, como a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Embora a ligação à heparina não tenha efeito na atividade inibitória da alboserpina, como é conhecido na interação da heparina com antitrombina III em mamíferos, é sugerido que essa ligação da alboserpina à heparina e fosfolípídeos de membrana atue como uma âncora para localizar e aumentar a concentração efetiva do inibidor nos locais de lesão, de ativação celular ou de inflamação (Calvo et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que, além da atividade anticoagulante, a alboserpina é uma molécula anti-inflamatória potente e essa atividade depende da sinalização pró-inflamatória induzida pela ativação dos receptores PAR (*protease-activated receptors*), pelo fator Xa (Shrivastava et al., 2022). Embora o ortólogo dessa serpina tenha sido descrito em *Culex quinquefasciatus*, não há descrição de um

ortólogo em *Anopheles gambiae* (Gulley et al., 2013), o que sugere que diferentes gêneros de mosquitos desenvolveram estratégias diferentes para modular a homeostasia.

A maioria das serpinas caracterizadas em mosquitos regulam respostas imunes. Em artrópodes, pelo menos quatro tecidos contribuem para as respostas imunes contra patógenos, incluindo: corpo gorduroso, hemócitos, epitélio do intestino médio e epitélio das glândulas salivares. Após o reconhecimento do patógeno, as cascatas de proteases são iniciadas e ativam uma série de reações imunes, entre elas: (i) a via Toll que leva à produção de peptídeos antimicrobianos; (ii) a ativação de proteínas contendo tioéster, como parte da via do complemento; e (iii) a ativação de fenoloxidasas, resultando na produção de melanina. Em *An. gambiae*, a melanização induzida por infecção é fortemente regulada pela via do complemento, especificamente pela proteína TEP1 (*thioester-containing protein 1*), que, após ativação, é depositada na superfície de patógenos (Blandin et al., 2004). A ligação de TEP1 a superfícies microbianas desencadeia, em um mecanismo ainda desconhecido, a ativação de uma complexa cascata de serino proteases. Essas contêm um domínio CLIP (CLIPs) e são constituídas tanto de proteases catalíticas (cSPs) quanto de seus homólogos não catalíticos (cSPHs). Uma protease terminal na cascata, finalmente, cliva e ativa o zimogênio proPO em fenoloxidase ativa (PO).

Embora a composição molecular dessas cascatas de proteases e inibidores sejam bem compreendidas em modelos bem estabelecidos de insetos (Meekins et al., 2017), ainda há muito o que ser estudado em mosquitos e em outras espécies de artrópodes hematófagos. Contudo, nos últimos anos, avanços significativos foram realizados nos estudos dos componentes do sistema da proPO em mosquitos (Gulley et al., 2013; Meekins et al., 2017). No mosquito *Ae. aegypti*, foi demonstrado que existem duas vias distintas de ativação da melanização. Essas vias são controladas por diferentes serino proteases e suas serpinas inibidoras específicas. Proteases de melanização imunes (IMP-1 e IMP-2) e Serpina-1 medeiam a clivagem da pró-fenoloxidase e a resposta imune contra protozoários. A melanização tecidual é controlada pela protease de melanização tecidual (CLIPB8), IMP-1 e Serpina-2. Além disso, as serino proteases CLIPB5 e CLIPB29 estão envolvidas na ativação da via Toll, por infecção fúngica ou de maneira independente de infecção, respectivamente. Já a Serpina-2 está implicada na última ativação da via Toll (Zou et al., 2010). Recentemente, alguns componentes que regulam a melanização em *An. gambiae* foram identificados e caracterizados. Essa via é composta, em parte, pelas serino proteases CLIPB8, CLIPB9 e CLIPB10, que são controladas parcialmente pela SRPN2 (Zhang et al., 2020).

A ativação da transcrição de serpinas em resposta a estímulos microbianos é frequentemente observada em insetos. A expressão de serpinas que respondem ao sistema imunológico pode ser alterada por uma série de desafios imunológicos, incluindo vírus, bactérias, fungos, parasitas protozoários e vespas parasitóides (Gulley et al., 2013; Meekins et al., 2017). Por exemplo, em mosquitos do gênero *Anopheles*, duas serpinas atuam como moléculas de resposta de fase aguda, sendo as serpinas SRPN6 e SRPN10 reguladas positivamente nas células epiteliais do intestino médio após a invasão do protozoário *Plasmodium*. A expressão da SRPN6 também é regulada após a invasão do parasita da malária da glândula salivar de mosquitos (Abraham et al., 2005). Além dos prováveis papéis na regulação negativa da melanização e na sinalização da via Toll, várias serpinas de fase aguda contribuem para a imunidade em insetos de maneiras pouco compreendidas. A identificação dos alvos fisiológicos de tais serpinas fornecerá um melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessas respostas imunes menos caracterizadas.

Assim como outros artrópodes hematófagos, carrapatos e ácaros usam a saliva para contrabalançar as respostas do hospedeiro frente à hematofagia, tais como hemostasia, ativação do sistema complemento e inflamação. Esses mecanismos constituem as primeiras linhas de defesa dos hospedeiros vertebrados frente ao repasto sanguíneo dos parasitas e são, em parte, mediados por serino proteases e controlados por seus inibidores endógenos, muitos deles da superfamília das serpinas (Silverman et al., 2001; Rau et al., 2007). Por esse motivo, foi postulado que carrapatos e outros artrópodes hematófagos codificam e secretam serpinas na saliva para modular as defesas dos hospedeiros (Mulenga et al., 2001). Nos últimos anos, com o desenvolvimento e as aplicações de sequenciamento de RNA em larga escala, os transcriptomas de diferentes tecidos de carrapatos têm confirmado a presença de serpinas em diferentes espécies (Chmelar et al., 2016). Além disso, estudos proteômicos identificaram a presença de serpinas na saliva de carrapatos alimentados em diferentes hospedeiros, sugerindo que a secreção de serpinas é uma estratégia biológica comum, adotada por diferentes espécies de carrapatos para neutralizar as defesas do hospedeiro durante a alimentação (Tirloni et al., 2014b; Kim et al., 2016).

Em carrapatos, as primeiras serpinas clonadas e descritas foram as RAS-1, RAS-2, RAS-3, e RAS-4 de *Rhipicephalus appendiculatus* (Mulenga et al., 2003). Embora ensaios funcionais frente a diferentes serino proteases não tenham sido descritos para esses inibidores, a vacinação de bovinos com um coquetel contendo alguns deles resultou em uma redução na taxa de

ingurgitamento de ninfas e um aumento na taxa de mortalidade de carrapatos adultos (Imamura et al., 2006). A primeira serpina de carrapato a ser caracterizada funcionalmente e com comprovado efeito sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro foi denominada Iris (*Ixodes ricinus immunosuppressor*). Essa serpina inibe a proliferação de células T e esplenócitos e altera os níveis de citocinas derivadas de células mononucleares do sangue periférico (Leboulle et al., 2002). Estudos de cinética enzimática mostraram que a elastase de neutrófilos foi a protease inibida com a maior constante de velocidade ($k_a = 4,3 \times 10^6$), o que é, aproximadamente, 20 vezes mais rápido que para a elastase pancreática ($k_a = 2,1 \times 10^5$). O ativador do plasminogênio tecidual e o fator Xa são inibidos com uma constante semelhante à da elastase pancreática. Esses resultados sugerem fortemente que a elastase de neutrófilos seja o alvo fisiológico dessa serpina, embora a Iris tenha mostrado propriedades anti-hemostáticas *in vitro*, incluindo supressão da coagulação e de fibrinólise *in vitro* (Prevot et al., 2006). Também foi demonstrado que a Iris se liga a monócitos e macrófagos, e suprime a secreção de TNF. Curiosamente, essas atividades não dependem da função inibitória da serpina (Prevot et al., 2009). Embora a Iris não possua um peptídeo sinal, ela foi detectada na saliva de carrapatos. A vacinação de coelhos com Iris recombinante aumenta a mortalidade de carrapatos alimentados nesses animais e reduz o peso após ingurgitamento (Prevot et al., 2007). A Iris se apresenta como uma serpina pleiotrópica, que afeta vários processos simultaneamente por meio de mecanismos independentes.

A IRS-2 (*Ixodes ricinus serpin-2*) foi a segunda serpina a ser caracterizada em *I. ricinus*. Essa serpina apresenta especificidade inibitória contra a quimase de mastócitos e a catepsina G, o que corrobora com o fato de haver um resíduo triptofano na posição P1 do RCL dessa serpina. Além da inibição de duas proteases envolvidas em respostas inflamatórias, a função anti-inflamatória dessa serpina foi evidenciada por experimentos *in vivo*, nos quais a IRS-2 diminuiu significativamente o edema da pata e o recrutamento de neutrófilos em animais tratados com a serpina. A IRS-2 também inibe a agregação plaquetária induzida pela catepsina G, mas não outros indutores, como o colágeno ou os derivados do ácido araquidônico (Chmelar et al., 2011). Além disso, a IRS-2 inibe a produção da citocina pró-inflamatória IL-6, em células dendríticas (DC) e interfere na sinalização JAK/STAT3 dependente de IL-6 em células T auxiliares (Th), inibindo a maturação de linfócitos Th17 pró-inflamatórios (Palenikova et al., 2015).

Até o momento, algumas dezenas de serpinas de diferentes espécies de carrapatos, incluindo *A. americanum*, *H. longicornis*, *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *R. appendiculatus*, *R. haemaphysaloides* e *R. microplus* foram

descritas. Muitas dessas serpinas tiveram as suas funções validadas funcionalmente por ensaios *in vitro*, modelos experimentais *in vivo*, imunização ou por experimentos de RNAi. Algumas dessas serpinas inibem proteases com papel na hemostasia (trombina, fator IXa, fator Xa, fator XIa, fator XIIa, plasmina, ativadores de plasminogênio) e inflamação (elastase de neutrófilos, catepsina G, quimase, calicreína plasmática, matriptase, proteinase-3 de neutrófilos). Outras serpinas possuem alta afinidade para proteases digestivas, como a tripsina e quimiotripsina. Dentre os possíveis papéis fisiológicos desempenhados pelas serpinas salivares em carrapatos destacam-se: a modulação da coagulação sanguínea, a modulação da imunidade inata e a modulação da imunidade adaptativa (Chmelar et al., 2016; Abbas et al., 2022).

Nos últimos anos, estudos genômicos e transcriptômicos vêm demonstrado a presença de serpinas em diferentes espécies de artrópodes hematófagos. Contudo, dados de caracterização funcional para as serpinas dessas espécies são escassos. A identificação dos alvos fisiológicos dessas serpinas ajudarão a fornecer um melhor entendimento sobre os possíveis papéis desempenhados por esses inibidores nesses organismos e os mecanismos moleculares nos quais estão envolvidos.

Inibidores de serino peptidases da família TIL (*trypsin-inhibitor like*) ou *Ascaris*

Os inibidores da família TIL (*trypsin-inhibitor like*) foram inicialmente identificados e caracterizados como inibidores de tripsina pancreática em nematódeos do gênero *Ascaris*. Esses inibidores foram inicialmente denominados como *Ascaris family of serine protease inhibitors* (Green 1957; Goodman et al., 1983). A caracterização da estrutura de um inibidor TIL foi descrita pela primeira vez para um inibidor de quimotripsina e elastase pancreática suína isolado de *Ascaris suum*, o C/E 1 (chymotrypsin/elastase inhibitor-1). Esse inibidor possui 63 resíduos de aminoácidos, dos quais dez são resíduos de cisteína que formam cinco pontes dissulfeto: C5-C54, C15-C29, C18-C38, C22-C33, C40-C60 (BernardePeanasky 1993). A estrutura cristalina do complexo entre o inibidor C/E 1 e a elastase pancreática suína foi resolvida e confirmou que esses inibidores de *Ascaris suum* pertencem a uma nova família de inibidores de serino proteases. A estrutura de um domínio TIL apresenta apenas duas pequenas folhas β e duas hélices. A presença e topografia das cinco pontes dissulfeto sugere que elas desempenham papéis importantes na manutenção da estrutura terciária do inibidor. Além disso, as cadeias laterais de vários resíduos carregados formam

interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, que possivelmente compensam a falta de estruturas secundárias extensas e um núcleo hidrofóbico. A alça do sítio reativo deste inibidor exibe uma conformação que é característica da maioria dos inibidores de serino peptidases. Supõem-se que o inibidor de C/E-1 atua por um mecanismo inibitório semelhante ao proposto para inibidores proteicos canônicos de serino proteases (Figura 5) (Huang et al., 1994).

Membros da família TIL foram caracterizados e descritos em outros invertebrados como nematoides do gênero *Ancylostoma* (BernardePeanasky 1993; Jin et al., 2011) e abelha *Apis mellifera* (Bania et al., 1999), e em animais vertebrados, como o inibidor de tripsina e trombina presente na secreção de pele do sapo *Bombina bombina* (Mignogna et al., 1996). Além dos inibidores de serino proteases, muitas proteínas extracelulares de vertebrados e invertebrados também contêm múltiplos domínios TIL.

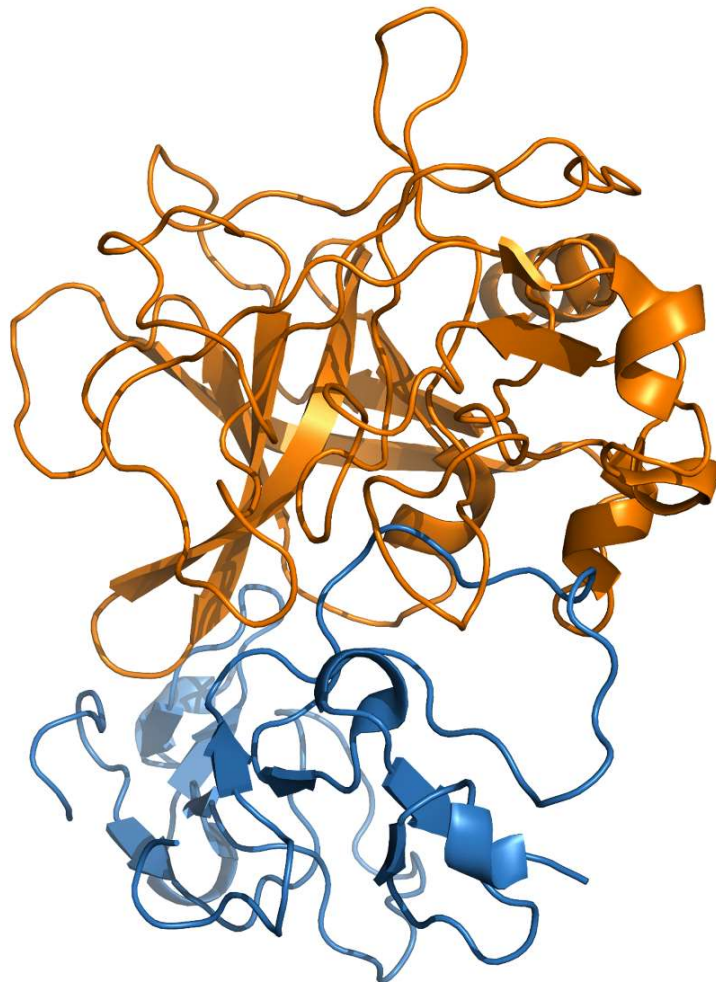


Figura 5: Modelo tridimensional do complexo do inibidor *Ascaris* quimotripsina/elastase com a elastase pancreática porcina (PDB 1EAI). O inibidor *Ascaris* encontra-se na cor azul. A elastase pancreática porcina encontra-se em amarelo.

Fonte: Arquivo pessoal

Os inibidores da família TIL também já foram identificados em artrópodes hematófagos. O primeiro inibidor contendo o domínio TIL identificado em carrapato foi a ixodidina, que apresentou atividade antimicrobiana e foi isolado da hemolinfa do carrapato *R. microplus* (Fogaca et al., 2006). Esse inibidor possui 65 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 7.103 Da. Assim como os demais inibidores da família, a ixodidina possui dez resíduos de cisteína que formam cinco ligações dissulfeto. A ixodidina possui atividade inibitória contra elastase e quimiotripsina com constantes de inibição na faixa de nanomolar. Curiosamente, além de possuir atividade inibitória, a ixodidina também possui atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Esse foi o primeiro relato sobre a caracterização bioquímica de um TIL isolado de um artrópode hematófago, e o primeiro relato de uma molécula de aracnídeo exibindo atividades de inibição do crescimento bacteriano e de proteases (Fogaca et al., 2006). O segundo inibidor contendo o domínio TIL a ser descrito em artrópodes hematófagos foi o BmSI-7, um inibidor de serino peptidases purificado de ovos do carrapato *R. microplus*. O BmSI-7 inibe a elastase de neutrófilos, a subtilisina A, e as proteases Pr1 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, com constantes de inibição na faixa de nanomolar. A proteína madura predita para o BmSI-7 possui 67 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 7.408 Da. A expressão gênica desse inibidor foi identificada no ovário, corpo gorduroso, intestino, glândulas salivares e hemócitos de carrapatos. BmSI-7 é o primeiro inibidor TIL descrito com atividade inibitória sobre subtilisina A e Pr1 proteases de fungos entomopatogênicos (Sasaki et al., 2008).

Além dos estudos bioquímicos, estudos da alteração na expressão gênica durante a infecção do mosquito *Ae. aegypti* pelo vírus da dengue possibilitaram identificar um gene que codifica para um inibidor TIL que é diferencialmente expresso durante a infecção. O silenciamento desse gene (AAEL000379; CRVP379) reduziu significativamente a infecção por dengue em células de *Ae. aegypti*. Também foi demonstrado que o silenciamento da proteína CRVP379 por RNAi ou o seu bloqueio com antissoro específico inibem a infecção do mosquito por vírus Dengue (Londono-Renteria et al., 2015). Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores mostrou que CRVP379 é altamente expresso em estágios de pupa, testículos e ovários de *Ae. aegypti*. A expressão de CRVP379 também está aumentada nos ovários 48 horas após a alimentação com sangue. Usando a edição do genoma por CRISPR-Cas9, foram geradas duas linhagens mutantes de CRVP379 com mutações dentro ou fora do domínio TIL. Mosquitos fêmeas de ambas as linhagens mutantes apresentaram defeitos graves em sua capacidade reprodutiva. Fêmeas mutantes também apresentaram diferenças na

morfologia de suas células foliculares. No entanto, o desempenho reprodutivo masculino da linhagem CRVP379 com mutação fora do domínio TIL não foi afetado, sugerindo que alguns resíduos de CRVP379 podem ter funções sexualmente dimórficas. Em contraste com o estudo anterior, não foi observado uma diferença notável na infecção pelo vírus da dengue entre o tipo selvagem e qualquer uma das linhagens mutantes (Tikhe et al., 2022).

Nos últimos anos, estudos transcriptômicos e genômicos têm demonstrado a presença de inibidores TIL em diferentes espécies de artrópodes hematófagos (Mans 2011). Contudo, dados de caracterização funcional desses inibidores ainda são escassos. A identificação dos alvos fisiológicos e os papéis desempenhados por esses inibidores irão fornecer um melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares nos quais os inibidores do tipo TIL estão envolvidos nesses organismos.

Inibidor de serino peptidases da família Pacifastinas

Uma família de inibidores de serino peptidases com o menor domínio inibitório identificado em animais invertebrados foi denominada de Pacifastina. Em 1997, foram isolados os primeiros membros da família Pacifastina no lagostim do Pacífico, *Pacifastacus leniusculus* (Liang et al., 1997). A proteína isolada de *P. leniusculus* apresentou duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia polipeptídica pesada, com 105 kDa, contendo um domínio relacionado à ferritina e uma cadeia polipeptídica leve, com 45 kDa, com nove domínios inibitórios ricos em resíduos de cisteína (Simonet et al., 2002). O domínio inibitório da Pacifastina (PLD) contém, aproximadamente, 35 resíduos de aminoácidos, sendo seis resíduos de cisteína conservados que formam três pontes dissulfeto [Cys-Xaa(9-12)-Cys-Asn-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa(2-3)-Gly-Xaa(3-4)-Cys-Thr-Xaa(3)-Cys] (Simonet et al., 2002). A estrutura tridimensional do domínio do inibidor Pacifastina, resolvida por RNM, apresenta três fitas que constituem uma folha beta antiparalela dobrada à direita, formando uma cavidade, com o N-terminal orientado perpendicularmente à folha beta, e a cavidade apresenta um núcleo hidrofóbico (Mer et al., 1996). Os inibidores Pacifastina apresentam os aminoácidos P1 e P1' entre os resíduos de cisteínas 5 e 6.

Os inibidores Pacifastina foram descritos em insetos e crustáceos, com funções relacionadas ao controle de serino peptidases em processos como a cascata da pró-fenoloxidase (Simonet et al., 2002; Franssens et al., 2008; Liu et al., 2015; Sangsuriya et al., 2016) e a resposta imune, pela inibição de enzimas de fungos (Franssens et al., 2008; Breugelmans et al., 2009; Qian et al., 2017). Os

inibidores Pacifastina já descritos apresentaram inibição para enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e elastase (Kellenbergere, Roussel 2005; Breugelmans et al., 2009; de Marco et al., 2010).

Em 2009, Breugelmans e colaboradores realizaram um estudo da evolução e distribuição do domínio Pacifastina em Metazoa (Breugelmans et al., 2009). I, no qual Inibidores Pacifastina foram identificados nos três clados de Hemiptera: insetos verdadeiros (Heteroptera), cigarras (Auchenorrhyncha) e pulgões (Sternorrhyncha).

Em 2010, de Marco e colaboradores identificaram e descreveram, pela primeira vez, um inibidor tipo Pacifastina em um artrópode hematófago, o *T. infestans*, que foi denominado de *T. infestans* Pacifastin Inhibitor (TiPI). O TiPI purificado de ovos de *T. infestans* mostrou forte atividade inibitória sobre elastase de neutrófilo humano e quimotripsina bovina, com valores de K_i de 0,2 e 2,0 nM, respectivamente. A sequência de aminoácidos deduzida do fragmento de mRNA obtido do ovário de insetos adultos mostrou a presença de dois domínios Pacifastina, denominados de TiPI1 e TiPI2. O domínio TiPI1 foi produzido em leveduras e apresentou atividades inibitórias similares à proteína nativa e não apresentou atividade antimicrobiana. No entanto, sua expressão gênica foi modulada positivamente em ovário de insetos alimentados com sangue, assim como quando insetos de primeiro instar foram desafiados com a bactéria *E. coli* e injetados com dsRNA de genes não relacionados. Esses dados sugerem que o TiPI tem um papel na resposta imune do barbeiro *T. infestans* (de Marco et al., 2010). O modelo tridimensional da Pacifastina TiPI1 apresenta os fatores estruturais descritos para os demais inibidores desta família, as folhas betas antiparalelas e os resíduos no sítio reativo P1 e P1' na extremidade C-terminal da molécula (Figura 6).

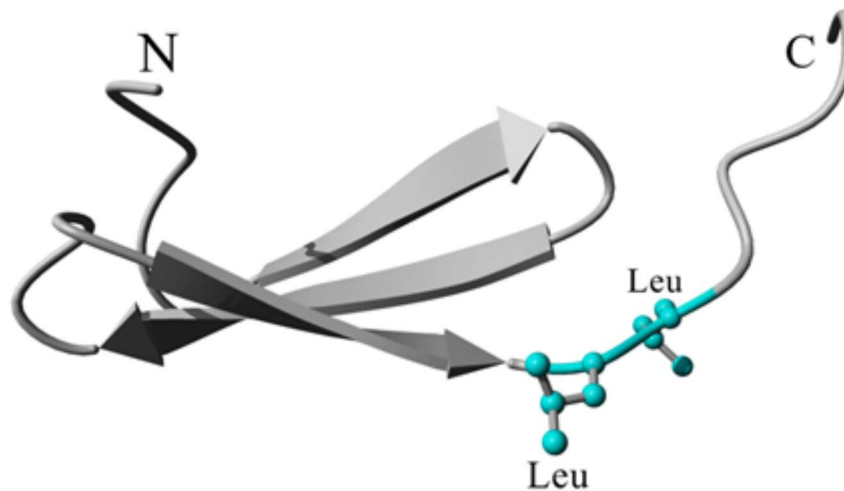


Figura 6: Modelo tridimensional do inibidor Pacifastina TiPI1. As regiões N- e C- terminais da molécula estão marcadas por N e C. As folhas betas antiparalelas e as regiões randômicas do inibidor estão mostradas em cinza. Os resíduos de aminoácidos do sítio reativo P1 e P1', Leu e Leu, respectivamente, estão marcados em ciano. O modelo foi obtido utilizando o programa AlphaFold (Jumper et al. 2021, Varadi et al. 2022). A imagem do modelo foi obtida utilizando o programa YASARA (KriegereVriend 2014).

Fonte: Arquivo pessoal

O Pac2 do mosquito *Ae. aegypti* contém sete domínios Pacifastina e possui apenas um gene codificador (Breugelmans et al., 2009; Soares et al., 2018). O inibidor Pac2 recombinante, contendo os dois primeiros domínios, apresentou atividade inibitória para tripsina bovina e enzimas dos tipos tripsina trombina de larvas de *Ae. aegypti*, com valores de K_i de 4,0 nM, 0,057 nM e 1,5 nM, respectivamente. A expressão do gene de Pac2 ocorre nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas adultas e apresenta modulação positiva 11 dias após infecção pelo vírus da dengue (DENV2). Os resultados sugerem que o inibidor Pac2 pode ser modulado por esse vírus, mas também pode ser uma resposta do mosquito à infecção. Novos estudos poderão confirmar o papel desse inibidor em *Ae. aegypti* (Soares et al., 2018).

Em 2021, Carvalho-Costa e colaboradores, em um estudo de transcriptoma da glândula salivar de *Rhodnius neglectus* infectados com *Trypanosoma cruzi*, identificaram a modulação positiva da expressão gênica de inibidor da família Pacifastina, sugerindo um possível papel no controle da infecção pelo protozoário no triatomíneo (Carvalho-Costa et al., 2021).

Até o momento, pouco se conhece sobre as Pacifastinas, em artrópodes hematófagos, pois apenas dois desses inibidores foram caracterizados bioquimicamente. Muito ainda está por ser desvendado sobre esses, que são os menores inibidores de serino peptidases de animais já descritos.

Inibidores de cisteíno peptidases

As cistatinas são proteínas que inibem especificamente a atividade da papaína e de cisteíno peptidases relacionadas. São inibidores competitivos que, interagindo com o sítio ativo da enzima-alvo, bloqueiam o acesso do substrato. A afinidade de cistatinas com as proteases-alvo é extremamente alta, tornando difícil a reversão da inibição (Barrett, 1987). O primeiro membro da família das cistatinas foi descrito, pela primeira vez, em clara de ovo e, posteriormente, denominado de cistatina de clara de ovo de galinha. Outras cistatinas foram posteriormente encontradas em outras espécies animais, assim como em vegetais e microrganismos (Colella et al., 1989).

As cistatinas possuem homólogos em diferentes organismos pluricelulares, sendo, dessa maneira agrupadas na superfamília das cistatinas (Barrett, 1987). A classificação em famílias é baseada em similaridades de sequência primária, massa molecular, número de pontes dissulfeto e localização subcelular (Abrahamson et al., 2003; Turk 2008; Benchabane et al., 2010). Devido à disponibilidade de informações de inúmeras cistatinas com diferenças nas estruturas primárias, terciárias e do material de origem, as cistatinas foram subdivididas em quatro subfamílias: as estefinas (cistatinas tipo 1), as cistatinas (cistatinas tipo 2), os cininogênios (cistatinas tipo 3) e as fitocistatinas (cistatinas do tipo 4) (Abrahamson et al., 2003; Turk 2008; Benchabane et al., 2010). Estudos cristalográficos desvendaram três motivos conservados característicos de cistatinas, que formam uma estrutura em forma de cunha, bloqueando o sítio ativo das cisteíno peptidases. São eles: um resíduo de glicina (G) localizado na região N-terminal, uma alça inibitória (Q-x-V-x-G) e uma segunda alça na região C-terminal, formada por resíduos de prolina e triptofano (PW) (TurkeBode, 1991). Deve-se notar, no entanto, que em algumas estefinas, o motivo PW pode ser substituído por outros domínios, como PG, PH e PL (Ochieng Chaudhuri, 2010; Wang et al., 2015).

As estefinas possuem uma massa molecular de aproximadamente 11 kDa, com apenas um domínio inibitório e sem pontes dissulfeto, sendo os menores inibidores entre os membros da superfamília das cistatinas. Elas são intracelulares e podem inibir as catepsinas liberadas pelos lisossomos (Abrahamson et al., 2003; Turk 2008; Benchabane et al., 2010).

As cistatinas propriamente ditas também apresentam um domínio inibitório único e sua atuação é, geralmente, extracelular. As cistatinas possuem massa molecular de aproximadamente 15 kDa, com quatro resíduos de cisteína, que podem formar duas pontes dissulfeto. Dessa subfamília, o inibidor mais estudado

é a cistatina C humana, descrita pela primeira vez em 1961 (Turk 2008; Odden et al., 2010). O mecanismo de interação entre as cistatinas (tipo 2) e suas proteases-alvo ocorre, especificamente, pelos domínios altamente conservados: (1) um resíduo de glicina (G) na região amino-terminal; (2) o motivo QxVxG; e (3) um triptofano (W) na região carboxi-terminal, sendo que esses dois últimos motivos estruturais localizam-se no primeiro e no segundo *loops*, entre as folhas- β da estrutura terciária. A interação de cistatinas tipo 2 com a protease-alvo parece seguir o modelo proposto para a cistatina do ovo de galinha (Abe et al., 1988; Bode et al., 1988). Essa interação está esquematizada na Figura 7. Em destaque, encontram-se as regiões envolvidas na inibição: em amarelo, o segmento N-terminal, contendo o resíduo de glicina conservado, interagindo com a peptidase no subsítio S2; em verde a alça central, formada pelo motivo QxVxG interagindo com o subsítio S1'; e em azul o domínio C-terminal, contendo o resíduo conservado de triptofano, interagindo com a peptidase no subsítio S2'.

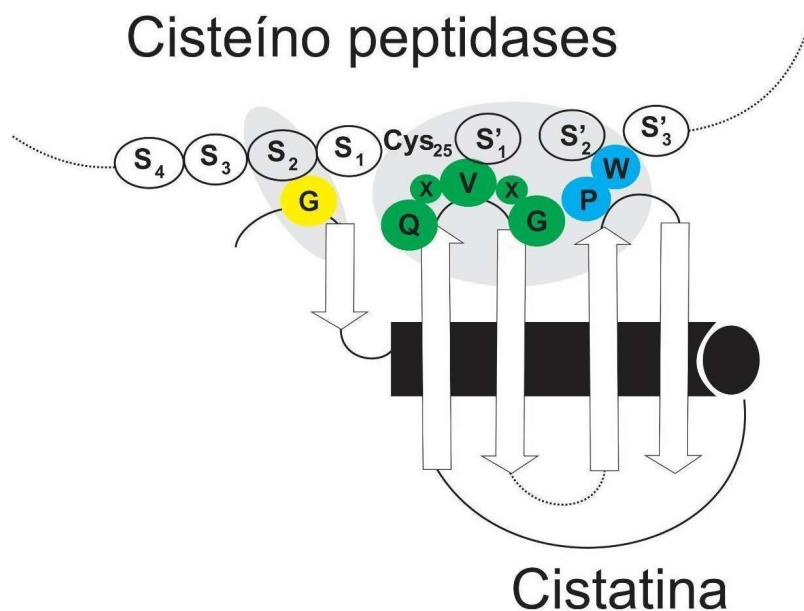


Figura 7: Esquema da interação da cistatina tipo 2 com a cisteína peptidase alvo. Os motivos estruturais presentes no inibidor que interagem com a enzima estão mostrados em: amarelo, verde e azul e sombreados em cinza, respectivamente.

Fonte: Adaptado de (Alvarez-Fernandez et al., 1999)

Os cininogênios (subfamília contendo cistatinas do tipo 3) não foram encontrados em artrópodes hematófagos. Os cininogênios também podem ser denominadas de cistatinas intravasculares visto que seus representantes são encontrados no plasma sanguíneo e em secreções de mamíferos. Essa subfamília apresenta uma organização estrutural mais complexa. Ela possui domínios inibitórios múltiplos, possivelmente resultantes de eventos de duplicação gênica, que originam proteínas de altas massas moleculares entre 60-120 kDa. Os cininogênios atuam como fator de conversão e/ou ativação nos processos de coagulação sanguínea (Abrahamson et al., 2003; Turk 2008; Benchabane et al., 2010).

A subfamília 4 (fitocistatinas) é encontrada em plantas e se caracteriza por apresentar uma sequência conservada Leu-Ala-Arg-Ala-Val (LARFAV). A presença da sequência LARFAV é exclusiva das cistatinas de plantas e é usada para identificar fitocistatinas em particular (ValuevaeMosolov 2004).

Considerando os artrópodes hematófagos, foco desse capítulo, as cistatinas presentes em carrapatos são as mais estudadas. Os carrapatos são bem sucedidos como ectoparasitos por terem se adaptado enormemente aos seus hospedeiros ao longo do tempo. Os carrapatos produzem moléculas, dentre elas as cistatinas, que modulam especificamente os sistemas hemostático e imune dos hospedeiros, capacidade essa adquirida durante a coevolução parasita-hospedeiro. O entendimento sobre as funções e mecanismos de ação dos diferentes tipos de cistatinas em carrapatos tem sido possível, em grande parte, por experimentos de clonagem e expressão heteróloga destes inibidores de cisteína peptidases encontradas em diferentes espécies.

Pesquisas abrangendo diferentes espécies de carrapatos demonstraram a participação de cistatinas em processos fisiológicos cruciais desses parasitas. O papel de cistatinas na alimentação de carrapatos *A. americanum* e *I. scapularis* foi sugerido utilizando silenciamento gênico por RNAi (Karim et al., 2005; Kotsyfakis et al., 2007), visto que os grupos silenciados apresentaram perda de peso e redução da sobrevivência das fêmeas. Os resultados observados são corroborados com a caracterização de outras cistatinas de carrapatos capazes de inibir cisteína peptidases envolvidas na digestão de proteínas do sangue, no desenvolvimento embrionário e na resposta imunológica do hospedeiro (Lima et al., 2006; Kotsyfakis et al., 2007; Yamaji et al., 2010).

Do carrapato *I. scapularis*, duas cistatinas do tipo 1, Sialo-L e Sialo-L2 foram caracterizadas (Kotsyfakis et al., 2007). Essas foram as primeiras cistatinas de carrapatos cujas estruturas tridimensionais foram estudadas (Kotsyfakis et al., 2010). O papel fundamental dessas proteínas na biologia do carrapato foi

evidenciado pelo fato de que a supressão simultânea de ambas as proteínas resultou em comprometimento da alimentação hematofágica. Além disso, a Sialo-L2 facilitou o crescimento de *Borrelia burgdorferi* na pele de camundongos (Kotsyfakis et al., 2007; Kotsyfakis et al., 2010).

Recentemente, uma proteína denominada de mialostatina, pertencente à subfamília de cistatinas do tipo 2 e com um possível papel na regulação das vias proteolíticas relacionadas à digestão sanguínea, foi descrita na mesma espécie de carrapato (Kotal et al., 2021). A mialostatina é um potente inibidor das exopeptidases catepsinas B e C, e das endopeptidases catepsinas L1 e L3 de *I. ricinus* (denominadas IrCB, IrCC, IrCL1 e IrCL3, respectivamente). Tanto a iristatina como a mialostatina foram recentemente cristalizadas e caracterizadas estruturalmente, o que contribuiu para a compreensão de seu modo de ação. A mialostatina é menos seletiva que as cistatinas salivares, sendo uma das mais versáteis nas interações com as catepsinas do tipo papaína, comparado com outras cistatinas de carrapatos (Kotal et al., 2019; Kotal et al., 2021).

Grunclova e colaboradores isolaram duas cistatinas do tipo 2 de *Ornithodoros moubata* nomeadas Om-cystatina 1 e Om-cystatina 2. Foi sugerido que essas proteínas estão envolvidas na regulação de várias proteases no sistema digestório do carrapato e na interação carrapato-hospedeiro, visto que essas proteínas apresentam um padrão de expressão específico em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes tecidos, principalmente no sistema digestório. Outra cistatina do tipo 2 de *O. moubata*, nomeada OmC2 foi capaz de suprimir a resposta imune adaptativa do hospedeiro facilitando o processo de infecção do parasita no hospedeiro. O impacto biológico da OmC2 foi comprovado tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Verificou-se que a OmC2 afetou a função das células dendríticas apresentadoras de antígenos em camundongos, resultando na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α e a interleucina-12, além de inibir a proliferação de células T CD4+ específicas para antígenos. Esses resultados sugerem que essa cistatina é capaz de suprimir a resposta imune adaptativa do hospedeiro (Salat et al., 2010).

Em 2010, surgiram os primeiros relatos de homólogo de cistatina do tipo 1 no intestino e cistatina do tipo 2 em glândulas salivares do carrapato *H. longicornis*, denominadas Hlcyst-1 e HLSC-1, respectivamente (Yamaji et al., 2009; Zhou et al., 2009). A proteína HICPL-A é uma cisteíno peptidase encontrada no intestino médio do carrapato *H. longicornis* que desempenha um papel crucial na degradação da hemoglobina durante a alimentação do carrapato. As cistatinas Hlcyst-1 e Hlcyst-2, por sua vez, são possíveis inibidores dessa enzima (Yamaji et al., 2010).

Cistatinas de carrapatos também parecem ter um papel na embriogênese desses ectoparasitas. A expressão gênica da RHcyst-1, uma cistatina do tipo 1 caracterizada na espécie *R. haemaphysaloides*, é aumentada nos ovos, indicando o provável papel na embriogênese (Wang et al., 2015). Estudos recentes indicam uma possível aplicação de cistatinas como biofármacos para tratamento de doenças humanas como o câncer, visto que a RHcyst-1 foi capaz de inibir a proliferação de algumas linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo* em modelos murinos (Antunes et al., 2018), além do seu papel imunossupressor (Wei et al., 2019).

Em 2020, Parizi e colaboradores caracterizaram a Racys2a, uma cistatina do tipo 2 de *R. appendiculatus*, e demonstraram a sua capacidade de modular as catepsinas do carrapato, facilitando o processo de digestão, bem como do hospedeiro, atuando sobre a resposta do sistema imunológico (Parizi et al., 2020). Oito cistatinas de *R. microplus* foram caracterizadas até o momento: i) Bmcystatina (Lima et al., 2006), ii) BrBmcys2a, iii) BrBmcys2b, iv) BrBmcys2c, v) BrBmcys2d, vi) BrBmcys2e (Parizi et al., 2013), vii) Rmcystatina-4 (Cardoso et al., 2017) e viii) Rmcystatina-1b (Lu et al., 2020). A Bmcystatina foi a primeira cistatina caracterizada nessa espécie e sua expressão gênica foi identificada no corpo gorduroso e no ovário. A Bmcystatina recombinante foi capaz de inibir a *Vitellogenic Digestive Cysteine Endopeptidase* (VTDCE), uma enzima envolvida na degradação de vitelina durante a embriogênese do carrapato, tendo provável papel na reprodução (Lima et al., 2006). Em 2013, foram caracterizadas outras cinco cistatinas da espécie, as BrBmcys2(a - e). A BrBmcys2b foi detectada na saliva e em diferentes tecidos ao longo dos estádios do carrapato, enquanto BrBmcys2c foi detectada, principalmente, no intestino, demonstrando um padrão distinto de expressão. As BrBmcys2 b e c foram caracterizadas juntamente com a Jplocys2a de *Ixodes ovatus*, e foi proposto que desempenhem um papel na digestão do sangue, no desenvolvimento de ovos e larvas e na modulação da resposta imune do hospedeiro. Paralelamente, essas cistatinas mostraram antigenicidade cruzada, sendo potenciais antígenos para o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos (Parizi et al., 2015). A rRmcistatina-4, expressa principalmente no intestino, foi capaz de inibir a atividade da BmCl-1 sobre o substrato hemoglobina bovina (Cardoso et al., 2017).

Nos últimos anos, tem havido uma ampla investigação das cistatinas em carrapatos, abrangendo diversas espécies. Esses estudos têm se dedicado tanto à caracterização estrutural quanto funcional das cistatinas, explorando seu potencial biotecnológico como antígenos para vacinas ou como potenciais fármacos. Considerando os artrópodes hematófagos o maior número de cistatinas, foi descrito em carrapatos (Tabela 1).

Espécie	Cistatina	Família	Referência
<i>Ixodes scapularis</i>	Iscap	Estefinas	(Ribeiro et al., 2006)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Bmcystatina	Estefinas	(Lima et al., 2006)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Om-cystatina 1	Cistatinas	(Grunclova et al., 2006)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Om-cystatina 2	Cistatinas	(Grunclova et al., 2006)
<i>Ixodes scapularis</i>	Sialo-L	Estefinas	(Kotsyfakis et al., 2007)
<i>Ixodes scapularis</i>	Sialo-L2	Estefinas	(Kotsyfakis et al., 2007)
<i>Dermacentor variabilis</i>	DvM602	Estefinas	(Anderson et al., 2008)
<i>Dermacentor variabilis</i>	DvM334	Cistatinas	(Anderson et al., 2008)
<i>Ornithodoros parkeri</i>	Opark	Cistatinas	(Francischetti et al., 2008)
<i>Ornithodoros coriaceus</i>	Ocori 1	Cistatinas	(Francischetti et al., 2008)
<i>Ornithodoros coriaceus</i>	Ocori 2	Cistatinas	(Francischetti et al., 2008)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HISC-1	Cistatinas	(Yamaji et al., 2009)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hlcyst-1	Estefinas	(Zhou et al., 2009)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hlcyst-2	Cistatinas	(Zhou et al., 2009)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hlcyst-3	Cistatinas	(Zhou et al., 2010)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	RsangInt	Estefinas	(Anatriello et al., 2010)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	RsangSec1	Cistatinas	(Anatriello et al., 2010)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	RsangSec2	Cistatinas	(Anatriello et al., 2010)
<i>Ornithodoros moubata</i>	OmC2	Cistatinas	(Salat et al., 2010)
<i>Amblyomma variegatum</i>	Avari	Cistatinas	(Ribeiro et al., 2011)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BrBmcys2a	Cistatinas	(Parizi et al., 2013)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BrBmcys2b	Cistatinas	(Parizi et al., 2013)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BrBmcys2c	Cistatinas	(Parizi et al., 2013)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BrBmcys2d	Cistatinas	(Parizi et al., 2013)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BrBmcys2e	Cistatinas	(Parizi et al., 2013)
<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	RHcyst-1	Estefinas	(Wang et al., 2015)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Rmcystatina-4	Cistatinas	(Cardoso et al., 2017)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Racys2a	Cistatinas	(Parizi et al., 2020)
<i>Ixodes ricinus</i>	Mialostatina	Cistatinas	(Kotal et al., 2021)

Tabela 1: Cistatinas de carrapatos caracterizadas bioquimicamente em ordem cronológica de publicação dos estudos.

Fonte: Arquivo pessoal

Além dos estudos de caracterização bioquímica e funcional das cistatinas, a partir de 2002, estudos de proteomas e transcriptomas também apontam para a presença de proteínas com domínios conservados de cistatinas em diversas espécies de carrapatos (Tabela 2).

Espécie	Referência
<i>Ixodes scapularis</i>	(Valenzuela et al., 2002)
<i>Ixodes pacificus</i>	(Francischetti et al., 2005)
<i>Dermacentor andersoni</i>	(Alarcon-Chaidez et al., 2007)
<i>Amblyomma cajennense</i>	(Batista et al., 2008)
<i>Amblyomma americanum</i>	(Aljamali et al., 2009)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Anatriello et al., 2010)
<i>Amblyomma variegatum</i>	(Ribeiro et al., 2011)
<i>Amblyomma maculatum</i>	(Karim et al., 2011)
<i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	(Francischetti et al., 2011)
<i>Ixodes ricinus</i>	(Schwarz et al., 2013)
<i>Ornithodoros moubata</i>	(Diaz-Martin et al., 2013)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Oliveira et al., 2013)
<i>Amblyomma americanum</i>	(Radulovic et al., 2014)
<i>Ixodes ricinus</i>	(Cotte et al., 2014)
<i>Dermacentor andersoni</i>	(Mudenda et al., 2014)
<i>Amblyomma triste</i>	(Garcia et al., 2014)
<i>Amblyomma parvum</i>	(Garcia et al., 2014)
<i>Amblyomma cajennense</i>	(Garcia et al., 2014)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	(Tirloni et al., 2015)
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	(Tan et al., 2015)
<i>Haemaphysalis flava</i>	(Xu et al., 2015)
<i>Amblyomma sculptum</i>	(Esteves et al., 2017)
<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	(de Castro et al., 2017)
<i>Hyalomma excavatum</i>	(Ribeiro et al., 2017)
<i>Rhipicephalus bursa</i>	(Antunes et al., 2018)
<i>Ixodes holocyclus</i>	(Rodriguez-Valle et al., 2018)
<i>Hyalomma dromedarii</i>	(Bensaoud et al., 2018)
<i>Ornithodoros rostratus</i>	(Araujo et al., 2019)
<i>Haemaphysalis flava</i>	(Liu et al., 2022)

Tabela 2: Estudos de transcriptoma, que demonstram a presença de cistatinas, em espécies de carrapato.

Fonte: Arquivo pessoal

Os estudos de sequenciamento de RNA em larga escala revelaram a grande diversidade de inibidores na superfamília das cistatinas, e é possível que estudos futuros possam surgir com a caracterização de novos membros desta família de inibidores em artrópodes hematófagos.

Bancos de dados de proteínas indicam a presença de cistatinas em outros artrópodes hematófagos, como, por exemplo em algumas espécies de mosquitos, entre eles: *Ae. albopictus*, *An. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *Anopheles darlingi*. Em 2020, foi caracterizada a primeira cistatina do mosquito *Ae. aegypti*, denominada de Aacystatina, e a sua possível enzima-alvo, a cisteíno peptidase AaCatL (Oliveira et al., 2020). Nesse trabalho, foi mostrada uma correlação negativa entre os títulos do DENV2 e os níveis do inibidor Aacystatina e da sua provável cisteíno peptidase-alvo, sugerindo seu envolvimento na interação vírus-mosquito (Oliveira et al., 2020). A expressão gênica de Aacystatina aumentou em células de mosquito Aag2 em apoptose induzida por estaurosporina, e a expressão foi reduzida, quando as células foram tratadas com Aacystatina recombinante, sugerindo um papel de modulador negativo da apoptose, pela inibição da ativação de caspases pela inibição da AaCatL (Oliveira et al., 2020). A figura 8, apresenta o modelo da cistatina Aacystatina obtido, utilizando-se o programa AlphaFold (Jumper et al., 2021).

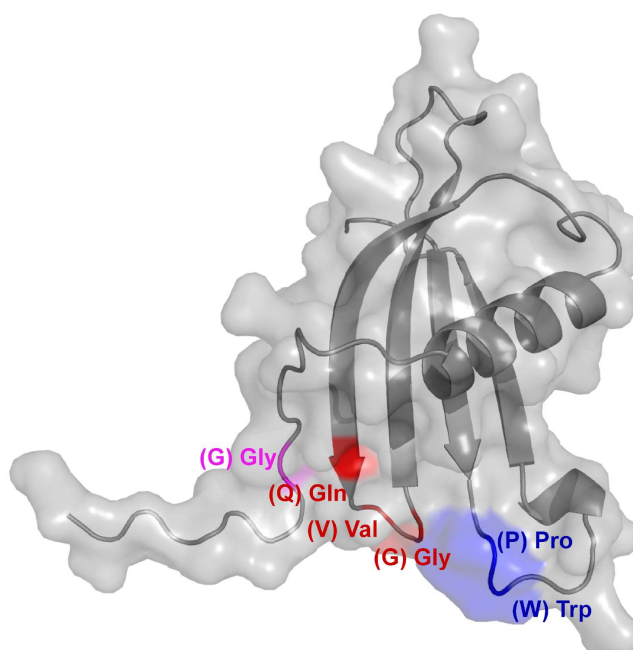


Figura 8: Aacystatina de *Ae. aegypti* (cinza) apresentada em esboço e com a superfície de transparência de 60%. Em vermelho, estão destacados os aminoácidos que formam o domínio conservado QxVxG, em azul o domínio C-Terminal contendo os resíduos conservados de prolina e triptofano. Utilizou-se o programa AlphaFold.

Fonte: Arquivo pessoal

Considerações finais

A análise da literatura científica sobre proteases e, principalmente, dos inibidores de proteases de artrópodes hematófagos, resumida neste capítulo, mostra a importância dessas moléculas para a fisiologia desses animais e para a interação ectoparasita-hospedeiro. Elas desempenham papéis cruciais para o parasito, ao interferirem na resposta imune do hospedeiro, ao inibirem a atividade de enzimas envolvidas na reprodução e na digestão do sangue e, até mesmo, na capacidade vetorial desses ectoparasitas.

Esses inibidores de peptidases estão distribuídos, principalmente, no intestino e nas glândulas salivares, podendo, algumas vezes, ser produzidos em outros órgãos e transportados via hemolinfa para o tecido onde desempenham sua função. Em alguns casos, as peptidases podem permanecer inativas até o momento certo, quando são ativadas, ou quando são liberadas como, por exemplo, as catepsinas presentes em lisossomos. Nessas situações, os inibidores são os principais protagonistas para controlar essas enzimas ativas e manter a equilíbrio do ambiente.

Os inibidores de proteases vêm sendo amplamente estudados em artrópodes hematófagos, com o propósito de estender a compreensão sobre a fisiologia desses animais, assim como sobre o potencial biotecnológico que possuem. Nesse último contexto, diversos estudos têm reportado a possibilidade de usar alguns desses inibidores como antígenos vacinais para controle de artrópodes hematófagos parasitas e vetores de doenças. Devido à presença de proteínas homólogas em diferentes espécies, a antigenicidade cruzada vem sendo explorada, visando o desenvolvimento de vacinas multiantigências ou multiespécies. Além disso, o potencial uso dessas moléculas como novas drogas é uma possibilidade real, considerando a diversidade de atividades observadas além da inibição de proteólise, como, por exemplo, o potencial antitumoral, imunossupressor, antiangiogênico.

Deste modo, conclui-se que os estudos sobre inibidores de proteases e proteases de artrópodes hematófagos, apesar de serem uma área bastante explorada, ainda têm muito a ser explorado. Os estudos em larga escala associados a análises *in silico*, que têm crescido nos últimos, estão permitindo avanços consideráveis na descoberta simultânea de várias moléculas e nas suas possíveis atividades. Em conclusão, apesar de todo o conhecimento gerado na área de inibidores e de proteases de artrópodes hematófagos e do advento das novas tecnologias que permitem gerar dados em larga escala, a caracterização bioquímica e funcional dessas proteínas permanece indispensável para o entendimento do papel fisiológico e da função dessas nos artrópodes.

Referências

- Abbas, M. N., et al., (2022). "Serpins in Tick Physiology and Tick-Host Interaction." *Front Cell Infect Microbiol* 12: 892770.
- Abe, K., et al., (1988). "The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. Expression of oryzacystatin cDNA and its truncated fragments in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 263(16): 7655-7659.
- Abraham, E. G., et al., (2005). "An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45): 16327-16332.
- Abrahamson, M., et al., (2003). "Cystatins." *Biochem Soc Symp*(70): 179-199.
- Abreu, P. A., et al., (2014). "RmKK, a tissue kallikrein inhibitor from *Rhipicephalus microplus* eggs." *Biochem Biophys Res Commun* 449(1): 69-73.
- Alarcon-Chaidez, F. J., et al., (2007). "Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae)." *Insect Biochem Mol Biol* 37(1): 48-71.
- Aljamali, M. N., et al., (2009). "Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae)." *Insect Mol Biol* 18(2): 129-154.
- Allingham, P. G., et al., (1998). "Digestion of host immunoglobulin and activity of midgut proteases in the buffalo fly *Haematobia irritans exigua*." *J Insect Physiol* 44(5-6): 445-450.
- Alvarez-Fernandez, M., et al., (1999). "Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site." *J Biol Chem* 274(27): 19195-19203.
- Amino, R., et al., (2001). "Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)." *Insect Biochem Mol Biol* 31(4-5): 465-472.
- Anatriello, E., et al., (2010). "An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*." *BMC Genomics* 11: 450.
- Anderson, J. M., et al., (2008). "Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)." *BMC Genomics* 9: 552.
- Antunes, S., et al., (2018). "Rhipicephalus bursa Sialotranscriptomic Response to Blood Feeding and *Babesia ovis* Infection: Identification of Candidate Protective Antigens." *Front Cell Infect Microbiol* 8: 116.
- Araujo, R. N., et al., (2019). "RNA-seq analysis of the salivary glands and midgut of the Argasid tick *Ornithodoros rostratus*." *Sci Rep* 9(1): 6764.

- Armstrong, P. B. (2001). "The contribution of proteinase inhibitors to immune defense." *Trends Immunol* 22(1): 47-52.
- Assumpcao, T. C., et al., (2016). "In Vitro Mode of Action and Anti-thrombotic Activity of Boophilin, a Multifunctional Kunitz Protease Inhibitor from the Midgut of a Tick Vector of Babesiosis, *Rhipicephalus microplus*." *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004298.
- Azzolini, S. S., et al., (2004). "Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase inhibitor from the ectoparasite *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae)." *Exp Parasitol* 106(3-4): 103-109.
- Bania, J., et al., (1999). "Primary structure and properties of the cathepsin G/chymotrypsin inhibitor from the larval hemolymph of *Apis mellifera*." *Eur J Biochem* 262(3): 680-687.
- Barrett, A. J. (1987). "The cystatins: a new class of peptidase inhibitors." *Trends in Biochemical Sciences* 12: 193-196.
- Batista, I. F., et al., (2008). "Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)." *Toxicon* 51(5): 823-834.
- Batista, I. F., et al., (2010). "A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition." *Arch Biochem Biophys* 493(2): 151-156.
- Benchabane, M., et al., (2010). "Plant cystatins." *Biochimie* 92(11): 1657-1666.
- Bensaoud, C., et al., (2018). "De novo assembly and annotation of *Hyalomma dromedarii* tick (Acari: Ixodidae) sialotranscriptome with regard to gender differences in gene expression." *Parasit Vectors* 11(1): 314.
- Bergmann, M. R., W.F. (1936). "On Proteolytic enzymes: X. The enzymes of papain and their activation." *Journal of Biological Chemistry* 114(3): 717-726.
- Bernard, V. D.eR. J. Peanasky (1993). "The serine protease inhibitor family from *Ascaris suum*: chemical determination of the five disulfide bridges." *Arch Biochem Biophys* 303(2): 367-376.
- Betz, A., et al., (1997). "Selective inhibition of the prothrombinase complex: factor Va alters macromolecular recognition of a tick anticoagulant peptide mutant by factor Xa." *Biochemistry* 36(1): 181-191.
- Blandin, S., et al., (2004). "Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Cell* 116(5): 661-670.
- Bode, W., et al., (1988). "The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases." *EMBO J* 7(8): 2593-2599.

- Bode, W.eR. Huber (1991). "Proteinase-protein inhibitor interaction." *Biomed Biochim Acta* 50(4-6): 437-446.
- Bode, W.eR. Huber (2000). "Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction." *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 241-252.
- Borovsky, D. (2003). "Biosynthesis and control of mosquito gut proteases." *IUBMB Life* 55(8): 435-441.
- Boufleur, P., et al., (2019). "Biodistribution and Pharmacokinetics of Amblyomin-X, a Novel Antitumour Protein Drug in Healthy Mice." *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 44(1): 111-120.
- Breugelmans, B., et al., (2009). "Identification, distribution and molecular evolution of the pacifastin gene family in Metazoa." *BMC Evol Biol* 9: 97.
- Breugelmans, B., et al., (2009). "A lepidopteran pacifastin member: cloning, gene structure, recombinant production, transcript profiling and in vitro activity." *Insect Biochem Mol Biol* 39(7): 430-439.
- Calvo, E., et al., (2011). "Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity." *J Biol Chem* 286(32): 27998-28010.
- Campos, I. T., et al., (2002). "Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor." *Insect Biochem Mol Biol* 32(9): 991-997.
- Campos, I. T., et al., (2004). "Identification and characterization of a novel factor Xlla inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)." *FEBS Lett* 577(3): 512-516.
- Cao, J., et al., (2013). "Characterization of a new Kunitz-type serine protease inhibitor from the hard tick *Rhipicephalus hemaphysaloides*." *Arch Insect Biochem Physiol* 84(2): 104-113.
- Cardoso, T. H. S., et al., (2017). "Characterization of a novel cystatin type 2 from *Rhipicephalus microplus* midgut." *Biochimie* 140: 117-121.
- Carneiro-Lobo, T. C., et al., (2009). "Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model." *J Thromb Haemost* 7(11): 1855-1864.
- Carneiro-Lobo, T. C., et al., (2012). "The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells." *J Thromb Haemost* 10(9): 1849-1858.
- Carvalho-Costa, T. M., et al., (2021). "Salivary and Intestinal Transcriptomes Reveal Differential Gene Expression in Starving, Fed and *Trypanosoma cruzi*-Infected *Rhodnius neglectus*." *Front Cell Infect Microbiol* 11: 773357.
- Cereija, T. B., et al., (2012). "Crystallization and preliminary crystallographic characterization of the N-terminal Kunitz domain of boophilin." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68(Pt 4): 436-439.

Chmelar, J., et al., (2016). "Sialomes and Mialomes: A Systems-Biology View of Tick Tissues and Tick-Host Interactions." *Trends Parasitol* 32(3): 242-254.

Chmelar, J., et al., (2011). "A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation." *Blood* 117(2): 736-744.

Colella, R., et al., (1989). "Chicken egg white cystatin. Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution." *J Biol Chem* 264(29): 17164-17169.

Corral-Rodriguez, M. A., et al., (2009). "Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors." *Insect Biochem Mol Biol* 39(9): 579-595.

Cotte, V., et al., (2014). "Differential expression of *Ixodes ricinus* salivary gland proteins in the presence of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex." *J Proteomics* 96: 29-43.

de Castro, M. H., et al., (2017). "Sialotranscriptomics of *Rhipicephalus zambeziensis* reveals intricate expression profiles of secretory proteins and suggests tight temporal transcriptional regulation during blood-feeding." *Parasit Vectors* 10(1): 384.

de Marco, R., et al., (2010). "The first pacifastin elastase inhibitor characterized from a blood sucking animal." *Peptides* 31(7): 1280-1286.

Decrem, Y., et al., (2009). "Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis." *J Exp Med* 206(11): 2381-2395.

Diaz-Martin, V., et al., (2013). "An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes." *J Proteomics* 80: 216-235.

Drewes, C. C., et al., (2015). "Post-transcriptional control of Amblyomin-X on secretion of vascular endothelial growth factor and expression of adhesion molecules in endothelial cells." *Toxicon* 101: 1-10.

Esteves, E., et al., (2017). "Analysis of the Salivary Gland Transcriptome of Unfed and Partially Fed *Amblyomma sculptum* Ticks and Descriptive Proteome of the Saliva." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 476.

Fink, E., et al., (1986). "The primary structure of bdellin B-3 from the leech *Hirudo medicinalis*. Bdelellin B-3 is a compact proteinase inhibitor of a "non-classical" Kazal type. It is present in the leech in a high molecular mass form." *Biol Chem Hoppe Seyler* 367(12): 1235-1242.

Fogaca, A. C., et al., (2006). "Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases." *Peptides* 27(4): 667-674.

- Francischetti, I. M., et al., (2011). "An insight into the sialotranscriptome and proteome of the coarse bontlegged tick, *Hyalomma marginatum rufipes*." *J Proteomics* 74(12): 2892-2908.
- Francischetti, I. M., et al., (2008). "An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*." *Insect Biochem Mol Biol* 38(1): 1-21.
- Francischetti, I. M., et al., (2004). "Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*." *Thromb Haemost* 91(5): 886-898.
- Francischetti, I. M., et al., (2005). "The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae)." *Insect Biochem Mol Biol* 35(10): 1142-1161.
- Francischetti, I. M., et al., (2002). "Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex." *Blood* 99(10): 3602-3612.
- Franssens, V., et al., (2008). "The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*." *Peptides* 29(2): 235-241.
- Friedrich, T., et al., (1993). "A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*." *J Biol Chem* 268(22): 16216-16222.
- Gao, X., et al., (2011). "Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick." *J Insect Physiol* 57(2): 339-343.
- Garcia, E. S., et al., (2010). "Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*." *Trends Parasitol* 26(10): 499-505.
- Garcia, G. R., et al., (2014). "The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq." *Parasit Vectors* 7: 430.
- Gaspar, A. R., et al., (1996). "Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae)." *Exp Appl Acarol* 20(10): 583-598.
- Gettins, P. G. (2002). "Serpins: structure, mechanism, and function." *Chem Rev* 102(12): 4751-4804.
- Goodman, R. B., et al., (1983). "Trypsin inhibitors from *Ascaris*: the reactive P1 site of the inhibitors (a correction) and location of the inhibitors and host trypsin in cross-sections of *Ascaris*." *Acta Biochim Pol* 30(2): 233-244.
- Green, N. M. (1957). "Protease inhibitors from *Ascaris lumbricoides*." *Biochem J* 66(3): 416-419.

- Grisi, L., et al., (2014). "Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil." *Rev Bras Parasitol Vet* 23(2): 150-156.
- Grunclova, L., et al., (2006). "Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity." *Biol Chem* 387(12): 1635-1644.
- Gulley, M. M., et al., (2013). "The roles of serpins in mosquito immunology and physiology." *J Insect Physiol* 59(2): 138-147.
- Huang, K., et al., (1994). "The molecular structure of the complex of *Ascaris* chymotrypsin/elastase inhibitor with porcine elastase." *Structure* 2(7): 679-689.
- Huntington, J. A., et al., (2000). "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation." *Nature* 407(6806): 923-926.
- Imamura, S., et al., (2006). "Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks." *Vaccine* 24(13): 2230-2237.
- Islam, M. K., et al., (2009). "The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success." *PLoS Pathog* 5(7): e1000497.
- Jin, X., et al., (2011). "Identification and characterization of a serine protease inhibitor with two trypsin inhibitor-like domains from the human hookworm *Ancylostoma duodenale*." *Parasitol Res* 108(2): 287-295.
- Jumper, J., et al., (2021). "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature* 596(7873): 583-589.
- Kanost, M. R., et al., (1989). "Primary structure of a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors from an insect, *Manduca sexta*." *J Biol Chem* 264(2): 965-972.
- Karim, S., et al., (2005). "RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding." *Biochem Biophys Res Commun* 334(4): 1336-1342.
- Karim, S., et al., (2011). "A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*." *PLoS One* 6(12): e28525.
- Kato, N., et al., (2005). "Contribution of the N-terminal and C-terminal domains of haemaphysalin to inhibition of activation of plasma kallikrein-kinin system." *J Biochem* 138(3): 225-235.
- Kazal, L. A., et al., (1948). "Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas." *J Am Chem Soc* 70(9): 3034-3040.
- Kellenberger, C.eA. Roussel (2005). "Structure-activity relationship within the serine protease inhibitors of the pacifastin family." *Protein Pept Lett* 12(5): 409-414.

- Kerlin, R. L.eS. Hughes (1992). "Enzymes in saliva from four parasitic arthropods." *Med Vet Entomol* 6(2): 121-126.
- Kim, T. K., et al., (2016). "Ixodes scapularis Tick Saliva Proteins Sequentially Secreted Every 24 h during Blood Feeding." *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004323.
- Koh, C. Y., et al., (2007). "Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick." *J Biol Chem* 282(40): 29101-29113.
- Koh, C. Y., et al., (2011). "Crystal structure of thrombin in complex with S-variegin: insights of a novel mechanism of inhibition and design of tunable thrombin inhibitors." *PLoS One* 6(10): e26367.
- Kollien, A. H., et al., (2004). "Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*." *Insect Mol Biol* 13(6): 569-579.
- Kotal, J., et al., (2021). "Mialostatin, a Novel Midgut Cystatin from *Ixodes ricinus* Ticks: Crystal Structure and Regulation of Host Blood Digestion." *Int J Mol Sci* 22(10).
- Kotal, J., et al., (2019). "The structure and function of Iristatin, a novel immunosuppressive tick salivary cystatin." *Cell Mol Life Sci* 76(10): 2003-2013.
- Kotsyfakis, M., et al., (2010). "The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model." *Mol Microbiol* 77(2): 456-470.
- Kotsyfakis, M., et al., (2007). "Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*." *J Biol Chem* 282(40): 29256-29263.
- Krieger, E.eG. Vriend (2014). "YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations." *Bioinformatics* 30(20): 2981-2982.
- Krishnaswamy, S., et al., (1994). "Assembly of the prothrombinase complex enhances the inhibition of bovine factor Xa by tick anticoagulant peptide." *Biochemistry* 33(25): 7897-7907.
- Krowarsch, D., et al., (1999). "Interscaffolding additivity: binding of P1 variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases." *J Mol Biol* 289(1): 175-186.
- Lai, R., et al., (2004). "A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*." *Gene* 342(2): 243-249.
- Laskowski, M., Jr.eI. Kato (1980). "Protein inhibitors of proteinases." *Annu Rev Biochem* 49: 593-626.

- Leboulle, G., et al., (2002). "Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks." *J Biol Chem* 277(12): 10083-10089.
- Leboulle, G., et al., (2002). "Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding." *Am J Trop Med Hyg* 66(3): 225-233.
- Liang, Z., et al., (1997). "Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6682-6687.
- Liao, M., et al., (2009). "Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*." *J Insect Physiol* 55(2): 164-173.
- Lima, C. A., et al., (2006). "Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*." *Biochem Biophys Res Commun* 347(1): 44-50.
- Liu, L., et al., (2022). "Protein profiling of hemolymph in *Haemaphysalis flava* ticks." *Parasit Vectors* 15(1): 179.
- Liu, Y., et al., (2015). "PtPLC, a pacifastin-related inhibitor involved in antibacterial defense and prophenoloxidase cascade of the swimming crab *Portunus trituberculatus*." *Fish Shellfish Immunol* 43(1): 36-42.
- Londono-Renteria, B., et al., (2015). "Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Requires a Putative Cysteine Rich Venom Protein." *PLoS Pathog* 11(10): e1005202.
- Lourenco, J. D., et al., (2014). "A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice." *PLoS One* 9(6): e98216.
- Lovato, D. V., et al., (2006). "The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity." *Biochimie* 88(6): 673-681.
- Lu, S., et al., (2020). "A novel type 1 cystatin involved in the regulation of *Rhipicephalus microplus* midgut cysteine proteases." *Ticks Tick Borne Dis* 11(3): 101374.
- Macedo-Ribeiro, S., et al., (2008). "Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick." *PLoS One* 3(2): e1624.
- Mans, B. J. (2011). "Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods." *J Innate Immun* 3(1): 41-51.
- Mans, B. J., et al., (2008). "Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family." *Insect Biochem Mol Biol* 38(1): 22-41.

- Maria, D. A., et al., (2019). "Preclinical evaluation of Amblyomin-X, a Kunitz-type protease inhibitor with antitumor activity." *Toxicol Rep* 6: 51-63.
- Matafonov, A., et al., (2014). "Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model." *Blood* 123(11): 1739-1746.
- Meekins, D. A., et al., (2017). "Serpins in arthropod biology." *Semin Cell Dev Biol* 62: 105-119.
- Meiser, C. K., et al., (2010). "Kazal-type inhibitors in the stomach of *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Reduviidae)." *Insect Biochem Mol Biol* 40(4): 345-353.
- Mer, G., et al., (1996). "Solution structure of PMP-C: a new fold in the group of small serine proteinase inhibitors." *J Mol Biol* 258(1): 158-171.
- Mignogna, G., et al., (1996). "BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes." *Protein Sci* 5(2): 357-362.
- Monteiro, R. Q., et al., (2008). "Ixolaris binding to factor X reveals a precursor state of factor Xa heparin-binding exosite." *Protein Sci* 17(1): 146-153.
- Morais, K. L., et al., (2016). "Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell." *Mol Cell Biochem* 415(1-2): 119-131.
- Mudenda, L., et al., (2014). "Proteomics informed by transcriptomics identifies novel secreted proteins in *Dermacentor andersoni* saliva." *Int J Parasitol* 44(13): 1029-1037.
- Mulenga, A., et al., (2007). "The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase." *Exp Appl Acarol* 41(4): 267-287.
- Mulenga, A., et al., (2001). "Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development." *J Vet Med Sci* 63(10): 1063-1069.
- Mulenga, A., et al., (2003). "Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization." *Insect Biochem Mol Biol* 33(2): 267-276.
- Neurath, H. (1984). "Evolution of proteolytic enzymes." *Science* 224(4647): 350-357.
- Neurath, H. eK. A. Walsh (1976). "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 3825-3832.
- Nienaber, J., et al., (1999). "Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae)." *Exp Parasitol* 93(2): 82-91.
- Nirmala, X., et al., (2001). "Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor." *Eur J Biochem* 268(7): 2064-2073.

- Ochieng, J.eG. Chaudhuri (2010). "Cystatin superfamily." *J Health Care Poor Underserved* 21(1 Suppl): 51-70.
- Odden, M. C., et al., (2010). "Age and cystatin C in healthy adults: a collaborative study." *Nephrol Dial Transplant* 25(2): 463-469.
- Oliveira, C. J., et al., (2013). "Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine." *Ticks Tick Borne Dis* 4(6): 469-477.
- Oliveira, F. A. A., et al., (2020). "The first characterization of a cystatin and a cathepsin L-like peptidase from *Aedes aegypti* and their possible role in DENV infection by the modulation of apoptosis." *Int J Biol Macromol* 146: 141-149.
- Oliveira, K. A., et al., (2021). "Proteolytic activity of *Triatoma infestans* saliva associated with PAR-2 activation and vasodilation." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 27: e20200098.
- Pacheco, M. T., et al., (2014). "Dynein function and protein clearance changes in tumor cells induced by a Kunitz-type molecule, Amblyomin-X." *PLoS One* 9(12): e111907.
- Palenikova, J., et al., (2015). "Ixodes ricinus salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway." *Infect Immun* 83(5): 1949-1956.
- Parizi, L. F., et al., (2018). "Peptidase inhibitors in tick physiology." *Med Vet Entomol* 32(2): 129-144.
- Parizi, L. F., et al., (2013). "Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Ticks Tick Borne Dis* 4(6): 492-499.
- Parizi, L. F., et al., (2020). "*Rhipicephalus microplus* cystatin as a potential cross-protective tick vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*." *Ticks Tick Borne Dis* 11(3): 101378.
- Parizi, L. F., et al., (2015). "*Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response." *Parasit Vectors* 8: 122.
- Prevot, P. P., et al., (2006). "Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*." *J Biol Chem* 281(36): 26361-26369.
- Prevot, P. P., et al., (2009). "Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*." *FEBS J* 276(12): 3235-3246.
- Prevot, P. P., et al., (2007). "Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin." *Vaccine* 25(17): 3284-3292.
- Qian, C., et al., (2017). "Identification of a small pacifastin protease inhibitor from *Nasonia vitripennis* venom that inhibits humoral immunity of host (*Musca domestica*)." *Toxicon* 131: 54-62.

- Radulovic, Z., et al., (2014). "Comparative bioinformatics, temporal and spatial expression analyses of *Ixodes scapularis* organic anion transporting polypeptides." *Ticks Tick Borne Dis* 5(3): 287-298.
- Ramesh, K., et al., (2019). "Increased Mosquito Midgut Infection by Dengue Virus Recruitment of Plasmin Is Blocked by an Endogenous Kazal-type Inhibitor." *iScience* 21: 564-576.
- Ranasinghe, S.eD. P. McManus (2013). "Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors." *Dev Comp Immunol* 39(3): 219-227.
- Rau, J. C., et al., (2007). "Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis." *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 102-115.
- Rawlings, N. D., et al., (2018). "The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database." *Nucleic Acids Res* 46(D1): D624-D632.
- Renne, T., et al., (2005). "Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII." *J Exp Med* 202(2): 271-281.
- Ribeiro, J. M., et al., (2006). "An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks." *Insect Biochem Mol Biol* 36(2): 111-129.
- Ribeiro, J. M., et al., (2011). "A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*." *BMC Genomics* 12: 136.
- Ribeiro, J. M., et al., (2007). "An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*." *BMC Genomics* 8: 6.
- Ribeiro, J. M., et al., (2017). "An insight into the sialome of *Hyalomma excavatum*." *Ticks Tick Borne Dis* 8(2): 201-207.
- Rimphanitchayakit, V.eA. Tassanakajon (2010). "Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors." *Dev Comp Immunol* 34(4): 377-386.
- Rodriguez-Valle, M., et al., (2018). "Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, *Ixodes holocyclus*." *Int J Parasitol* 48(1): 71-82.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
- Salat, J., et al., (2010). "Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*." *Biochem J* 429(1): 103-112.
- Sangsuriya, P., et al., (2016). "A shrimp pacifastin light chain-like inhibitor: molecular identification and role in the control of the prophenoloxidase system." *Dev Comp Immunol* 54(1): 32-45.
- Sant'Anna Azzolini, S., et al., (2003). "Rhipicephalus sanguineus trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination." *Arch Biochem Biophys* 417(2): 176-182.

Santiago, P. B., et al., (2017). "Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review." *Parasit Vectors* 10(1): 79.

Sasaki, S. D., et al., (2008). "BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*." *Exp Parasitol* 118(2): 214-220.

Sasaki, S. D.eA. S. Tanaka (2008). "rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization." *Vet Parasitol* 155(1-2): 133-141.

Sasaki, T.eK. Kobayashi (1984). "Isolation of two novel proteinase inhibitors from hemolymph of silkworm larva, *Bombyx mori*. Comparison with human serum proteinase inhibitors." *J Biochem* 95(4): 1009-1017.

Schechter, I.eA. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun* 27(2): 157-162.

Schwarz, A., et al., (2013). "De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies." *FASEB J* 27(12): 4745-4756.

Shrivastava, G., et al., (2022). "Alboserpin, the Main Salivary Anticoagulant from the Disease Vector *Aedes albopictus*, Displays Anti-FXa-PAR Signaling In Vitro and In Vivo." *Immunohorizons* 6(6): 373-383.

Sigle, L. T.eM. Ramalho-Ortigao (2013). "Kazal-type serine proteinase inhibitors in the midgut of *Phlebotomus papatasi*." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(6): 671-678.

Silverman, G. A., et al., (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." *J Biol Chem* 276(36): 33293-33296.

Simonet, G., et al., (2002). "Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132(1): 247-255.

Soares, T. S., et al., (2016). "BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation." *Vet Parasitol* 219: 44-52.

Soares, T. S., et al., (2018). "Functional characterization of a serine protease inhibitor modulated in the infection of the *Aedes aegypti* with dengue virus." *Biochimie* 144: 160-168.

Soares, T. S., et al., (2012). "Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut." *Vet Parasitol* 187(3-4): 521-528.

Sojka, D., et al., (2011). "Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites." *Adv Exp Med Biol* 712: 177-191.

- Sojka, D., et al., (2016). "Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks." *Ticks Tick Borne Dis* 7(4): 604-613.
- Stark, K. R.eA. A. James (1995). "A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*." *Exp Parasitol* 81(3): 321-331.
- Takac, P., et al., (2006). "Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands." *J Exp Biol* 209(Pt 2): 343-352.
- Tan, A. W., et al., (2015). "Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*." *J Proteomics* 117: 120-144.
- Tanaka, A. S., et al., (1999). "A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae." *Immunopharmacology* 45(1-3): 171-177.
- Telleria, E. L., et al., (2007). "Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*." *Arch Insect Biochem Physiol* 66(2): 53-63.
- Tikhe, C. V., et al., (2022). "Trypsin-like Inhibitor Domain (TIL)-Harboring Protein Is Essential for *Aedes aegypti* Reproduction." *Int J Mol Sci* 23(14).
- Tirioni, L., et al., (2015). "Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study." *Parasit Vectors* 8: 338.
- Tirioni, L., et al., (2014b). "A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*." *Exp Parasitol* 137: 25-34.
- Tsujimoto, H., et al., (2012). "Simukunin from the salivary glands of the black fly *Simulium vittatum* inhibits enzymes that regulate clotting and inflammatory responses." *PLoS One* 7(2): e29964.
- Turk, V.eW. Bode (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases." *FEBS Lett* 285(2): 213-219.
- Turk, V. T., B. (2008). "Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments." *Acta Chim. Slov.* 55: 727–738.
- Valenzuela, J. G., et al., (2002). "Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*." *J Exp Biol* 205(Pt 18): 2843-2864.
- Valueva, T. A.eV. V. Mosolov (2004). "Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms." *Biochemistry (Mosc)* 69(11): 1305-1309.
- van de Locht, A., et al., (1995). "Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin." *EMBO J* 14(21): 5149-5157.
- van de Locht, A., et al., (1996). "The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?" *EMBO J* 15(22): 6011-6017.

- Wang, Y., et al., (2015). "Functional characterization of a cystatin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*." *Parasit Vectors* 8: 140.
- Watanabe, R. M., et al., (2010). "A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity." *Biochimie* 92(8): 933-939.
- Watanabe, R. M., et al., (2011). "Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity." *Biochimie* 93(3): 618-623.
- Waxman, L., et al., (1990). "Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa." *Science* 248(4955): 593-596.
- Wei, S., et al., (2019). "Functional characterization of Cystatin C in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*." *Dev Comp Immunol* 96: 37-46.
- Xu, X. L., et al., (2015). "De novo sequencing, assembly and analysis of salivary gland transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of sialoprotein genes." *Infect Genet Evol* 32: 135-142.
- Yamaji, K., et al., (2010). "Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*." *J Vet Med Sci* 72(5): 599-604.
- Yamaji, K., et al., (2009). "A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes." *Parasitol Res* 106(1): 61-68.
- Zhang, H., et al., (2017). "Identification and anticoagulant activity of a novel Kunitz-type protein HA11 from the salivary gland of the tick *Hyalomma asiaticum*." *Exp Appl Acarol* 71(1): 71-85.
- Zhang, X., et al., (2020). "CLIPB10 is a Terminal Protease in the Regulatory Network That Controls Melanization in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*." *Front Cell Infect Microbiol* 10: 585986.
- Zhou, J., et al., (2010). "Characterization of Hlcyst-3 as a member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*." *Exp Appl Acarol* 51(4): 327-333.
- Zhou, J., et al., (2006). "Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition." *Gene* 372: 191-198.
- Zhou, J., et al., (2009). "Characterization of an intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*." *Vet Parasitol* 160(1-2): 180-183.
- Zhu, L., et al., (2006). "Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819)." *Fish Shellfish Immunol* 20(3): 320-331.
- Zou, Z., et al., (2010). "Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*." *Immunity* 32(1): 41-53.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 17

Anti-Hemostáticos da Saliva e Intestino de Artrópodes Hematófagos: Estrutura e Função

Anderson Sá-Nunes¹
Stephen Lu²
Leticia Barion Smith²
Aparecida Sadae Tanaka³
Carlos Termignoni⁴

¹Universidade de São Paulo, São Paulo.

²National Institute of Health, Estados Unidos.

³Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Copyright: © 2024 [Anderson Sá-Nunes, Stephen Lu, Leticia Barion Smith, Aparecida Sadae Tanaka e Carlos Termignoni]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Os artrópodes perfazem cerca de 80% de todas as espécies de animais metazoários identificadas, o que corresponde, atualmente, a cerca de um milhão de espécies. Considerando estimativas conservadoras, que apontam para um total de mais de 8 milhões de espécies na natureza, se mantida essa proporção, as espécies de artrópodes podem chegar a mais de 6 milhões. Mais de 19.000 espécies, distribuídas em 500 gêneros, desenvolveram o hábito da hematofagia, isto é, se alimentam de sangue em uma ou mais fases do seu ciclo de vida, e dele dependem para se reproduzir (Ribeiro, 2011). De acordo com a hipótese filogenética atual, a hematofagia evoluiu de maneira independente em torno de 20 vezes em diferentes grupos taxonômicos dentro dos artrópodes. Como exemplos, somente na ordem Diptera, a hematofagia evoluiu cerca de nove vezes em diferentes famílias, enquanto na ordem Ixodida todas as espécies são hematófagas, sugerindo, nesse caso, sua irradiação a partir de um ancestral comum.

Quando o artrópode hematófago alcança a pele do hospedeiro (por meio do voo, escalando seu corpo ou por contato com uma superfície na qual o artrópode se encontre), vários estímulos locais são usados para identificar a posição adequada em que será feito o repasto sanguíneo. Quimiorreceptores localizados na extremidade das peças bucais ou nas antenas inspecionam a pele na busca pelos “sabores e odores” adequados. Mecanorreceptores, por sua vez, presentes nas extremidades das peças bucais, indicam qual a melhor posição para a penetração da pele. Uma vez que a barreira física da epiderme é quebrada e as peças bucais são inseridas, o artrópode hematófago passa a lidar com dois desafios decorrentes da fisiologia do seu hospedeiro: a hemostasia e o sistema imunológico. O sucesso do repasto sanguíneo é uma consequência direta dos mecanismos anti-hemostáticos, anti-inflamatórios e imunomoduladores existentes na saliva e no intestino do artrópode hematófago.

Assim que a penetração das peças bucais ocorre, o artrópode hematófago secreta no sítio de alimentação sua saliva, uma rica mistura de moléculas bioativas. Essa mistura irá modificar localmente, mesmo que de maneira sistêmica, a fisiologia do hospedeiro vertebrado (Reck et al., 2009). Tais alterações favorecem o artrópode hematófago, na medida em que aumentam as chances de aquisição de sangue, pois suas propriedades hemostáticas estão alteradas. Para isto, a saliva de animais artrópodes sugadores de sangue se constitui em um verdadeiro arsenal bioquímico, devido a sua composição diversificada de moléculas com funções anti-hemostáticas. Adicionalmente, a

saliva da maioria desses artrópodes também possui moléculas que interferem no controle da resposta imune e inflamatória do seu hospedeiro (Ribeiro and Francischetti, 2003; Ribeiro, 1987; Francischetti et al., 2009). Dentro desse contexto, o presente capítulo tem como enfoque as moléculas que apresentam atividades anti-hemostáticas, enquanto o Capítulo 18 (Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de artrópodes hematófagos) aborda as moléculas bioativas que atuam no sistema imune do hospedeiro vertebrado.

A aquisição de sangue pelos artrópodes hematófagos pode ocorrer diretamente no vaso sanguíneo (solenofagia) ou de poças/bolsões/piscinas de sangue formadas devido à hemorragia provocada por rompimento de vênulas e arteríolas. Carrapatos, mosquitos-palha (flebotomíneos), mutucas (tabanídeos) e borrachudos (simulídeos), dentre outros, utilizam seus aparelhos bucais para dilacerar capilares, vênulas e arteríolas no local do repasto, alimentando-se da poça de sangue hemorrágica (telmofagia ou *pool feeding*). Outros artrópodes, como os mosquitos verdadeiros (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Anopheles* spp., etc.) e os barbeiros (triatomíneos), utilizam o aparelho bucal para penetrar na pele e localizar pequenos vasos sanguíneos por meio da extremidade de suas maxilas, geralmente flexíveis, que fazem uma espécie de sondagem do tecido (*probing*). Quando o vaso é localizado, a alimentação normalmente ocorre por inserção das peças bucais no seu lúmen (*capillary feeding*), mas, no caso dos mosquitos, pode também ocorrer no hematoma ao seu redor, (quando há laceração do vaso) (James and Rossignol, 1991; Lavoipierre, Dickerson and Gordon, 1959).

Apesar do número crescente de espécies de artrópodes hematófagos estudadas nos últimos anos, essa quantidade ainda é pequena quando considerado o universo total de espécies já conhecidas. Entretanto, esses estudos têm confirmado que todas as espécies já avaliadas, até o momento, apresentam pelo menos um anticoagulante, um vasodilatador e um inibidor de agregação plaquetária. Por questões de espaço, o presente capítulo irá abordar somente as moléculas anti-hemostáticas identificadas e que foram caracterizadas experimentalmente.

Moléculas anti-hemostáticas: uma visão geral

Ao longo do processo evolutivo, os artrópodes hematófagos desenvolveram diferentes mecanismos de controle da hemostasia do hospedeiro, como a inibição da agregação plaquetária, a utilização de vasodilatadores, a inibição da coagulação sanguínea e a ativação do processo fibrinolítico (Ribeiro,

1987; Ribeiro, 1989; Ribeiro, 1995a; Ribeiro, 1995b). De fato, as estratégias anti-hemostáticas utilizadas pelas diferentes espécies de artrópodes hematófagos são muito variadas, o que é uma consequência da evolução independente desse fenótipo em diferentes grupos. Por outro lado, há também uma convergência evolutiva com relação aos alvos dessas estratégias, que interferem em pontos-chave semelhantes da hemostasia. Diversas substâncias com atividade anti-hemostática provenientes de artrópodes hematófagos têm sido descritas, boa parte presentes na saliva, embora algumas também sejam encontradas no intestino. É interessante notar que a saliva dos artrópodes hematófagos possui moléculas que atuam sobre vários alvos no sistema hemostático do hospedeiro e, em algumas espécies, a saliva possui mais de uma substância que inibe uma mesma enzima envolvida desse sistema. Esta redundância faz com que os artrópodes hematófagos sejam extremamente eficientes em regular a hemostasia dos respectivos hospedeiros, além de tornar difícil a busca por métodos de controle desses ectoparasitas que sejam baseados em estratégias de bloqueio das atividades de moléculas anti-hemostáticas individuais. A variedade dessas moléculas nos artrópodes hematófagos é tão grande que, mesmo no caso de espécies que não sejam evolutivamente distantes, como os diferentes gêneros dentro de uma mesma família, há substâncias com estruturas diferentes atuando sobre um mesmo alvo do hospedeiro (Mans et al., 1998; Mans and Neitz, 2004).

Apresentaremos, a seguir, um compilado das moléculas anti-hemostáticas derivadas da saliva e do intestino de artrópodes hematófagos caracterizadas até o momento, comentando seus mecanismos de ação e, em alguns casos, suas relações filogenéticas. O capítulo será dividido em tópicos, de acordo com as atividades que as moléculas apresentam na hemostasia, entre elas: a inibição da coagulação sanguínea, a inibição da agregação plaquetária e a vasodilatação. Para cada um desses tópicos, foi produzida uma tabela contendo as moléculas já caracterizadas nos principais grupos de artrópodes hematófagos e algumas informações a respeito delas. Alguns ativadores da fibrinólise e agentes fibrinolíticos também receberão destaque, bem como os cratagonistas, uma categoria de moléculas capazes de ligar ou “sequestrar” agonistas importantes para a hemostasia dos vertebrados.

Inibidores da coagulação sanguínea

Os artrópodes hematófagos produzem uma gama de moléculas anti-hemostáticas que interferem na coagulação sanguínea. Duas enzimas-chaves da coagulação, as serinoproteases fator Xa e a trombina, participam da via comum

da coagulação sanguínea (Davie, Fujikawa and Kisiel, 1991) e parecem ser os alvos principais. De fato, inibidores de serinoproteases são, frequentemente, utilizados pelos artrópodes hematófagos para interferir com a cascata da coagulação sanguínea, cujas principais etapas são apresentadas na Figura 1. Alguns artrópodes apresentam estratégias distintas, como o carrapato *Ixodes ricinus* que, ao invés de inibir, utiliza uma protease que cliva e inativa fatores da coagulação sanguínea (Hoffmann et al., 1991). Na Tabela 1, estão resumidas algumas moléculas descritas em artrópodes hematófagos que bloqueiam a coagulação e que serão discutidos, a seguir, com base nos seus mecanismos de ação principal.

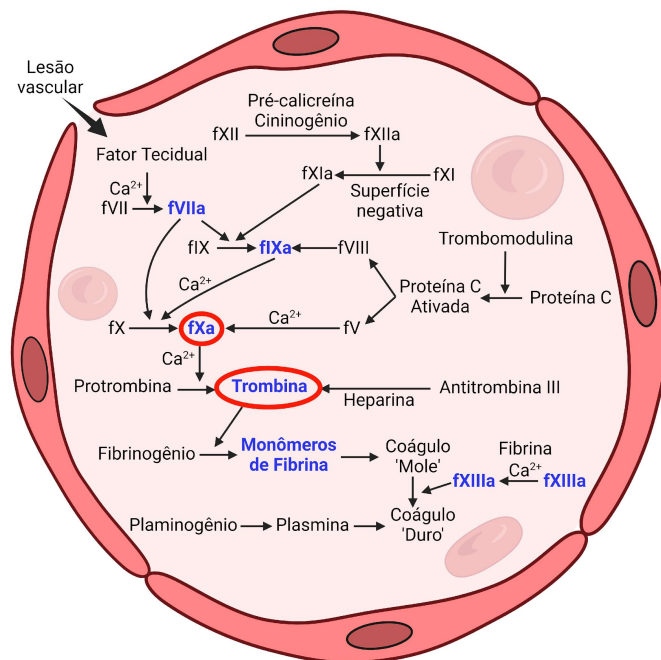


Figura 1: Esquema da cascata da coagulação sanguínea. Geralmente, a coagulação inicia pela ativação do fator VII ao se associar com o fator tecidual. O fator VIIa, uma serino endopeptidase, ativa os fatores IX e X, também zimogênios de serino endopeptidase. A atividade catalítica do fator IXa sobre o fator X depende da associação com o fator VIIIa (um dos componentes não enzimáticos da cascata da coagulação) e com fosfolípidios de membrana. Essa associação com a carga negativa dos fosfolípidios ocorre via intermediação por Ca^{2+} e o complexo formado é denominado de complexo Xase intrínseco. A atividade proteásica do fator Xa sobre a protrombina depende da associação com o fator Va, proteína sem atividade catalítica, bem como com fosfolípidios de membrana por meio de Ca^{2+} , formando o chamado complexo da protrombinase. A trombina age sobre o fibrinogênio liberando fibrina, que se polimeriza, formando o chamado coágulo mole. A trombina também ativa o fator XIII, o qual catalisa a formação de ligações cruzadas entre os polímeros de fibrina, formando, assim, o coágulo duro. A trombina também ativa os fatores V e VIII, retroalimentando a cascata. Alternativamente, a coagulação pode ser iniciada pela associação entre pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular e fator XII. A pequena ativação inicial é reforçada porque tanto caliceína ativa o fator XII como o fator XIIa ativa a pré-caliceína. O fator XIIa ativa o fator XI que, por sua vez, ativa os fatores XI a XIa. A notação "a" indica a forma ativa das proteínas da cascata.

Fonte: Arquivo pessoal

Inibidores do fator Xa

Como dito anteriormente, diversos artrópodes hematófagos fazem uso de inibidores de fator Xa, como anticoagulantes, para sobrepujar a hemostasia dos seus hospedeiros, especialmente carrapatos, mosquitos e borrachudos (Waxman et al., 1990; Söllner et al., 1994; Stark and James, 1995; Cappello et al., 1998). Como a ativação do fator X é um dos eventos comuns da coagulação iniciada tanto pela via intrínseca quanto extrínseca, vários anticoagulantes disponíveis no mercado apresentam esse mecanismo de ação (Bauer, 2011). Assim, não é surpresa que os artrópodes hematófagos tenham desenvolvido substâncias com alta especificidade para o fator Xa. Por exemplo, algumas dessas moléculas, como o TAP (*tick anticoagulant peptide*) do carrapato *Ornithodoros moubata* (Waxman et al., 1990; Vlasuk et al., 1991), a simukina de *Simulium vittatum* (Tsujiimoto et al., 2012) e a amblyomina-X de *Amblyomma sculptum* (Batista et al., 2010), possuem domínios do tipo Kunitz estruturalmente semelhantes ao TFPI (do inglês *tissue factor pathway inhibitor*), o inibidor fisiológico do fator Xa. Outro representante da superfamília de inibidores de protease que também têm o fator Xa como alvo é a serpina 19 de *Amblyomma americanum* (Kim et al., 2015). Diversas outras moléculas capazes de inibir o fator Xa direta ou indiretamente foram descritas, mas ainda carecem de classificação bioquímica (Tabela 1).

Inibidores de trombina

Outra enzima-chave da coagulação sanguínea é a trombina, uma serinoprotease com massa molecular de 38 kDa, constituída de duas cadeias polipeptídicas ligadas por quatro pontes dissulfeto. Além do seu papel no processo de coagulação sanguínea, ela também participa em outros processos fisiológicos não menos importantes, como a inflamação e a proliferação celular (Goldsack et al., 1998). A grande especificidade da trombina aos diferentes substratos se dá pela presença de dois sítios de interação (exosítios), além do seu próprio sítio ativo. Os sítios de interação são denominados sítio de ligação de fibrinogênio e sítio de ligação de heparina (Bode and Huber, 2000). Os artrópodes hematófagos desenvolveram moléculas que inibem a atividade pró-coagulante da trombina por bloquearem os exosítios presentes na superfície da enzima. Por exemplo, a ornitorina, purificada do carrapato *O. moubata* (van de Locht et al., 1996), e a rodinina, presente no barbeiro *Rhodnius prolixus* (Friedrich et al., 1993), inibem especificamente a trombina por meio da ligação ao sítio de fibrinogênio (exosítio 1), bloqueando indiretamente o sítio ativo da enzima (Grütter et al.,

1990). Esse mecanismo de inibição também foi observado para outros inibidores. Por outro lado, a triabina (Noeske-Jungblut et al., 1995) e a microfilina (Ciprandi et al., 2006) inibem a atividade da trombina por interação com o sítio de ligação iônica, não inibindo, portanto, a atividade dessa enzima sobre substratos sintéticos de tamanho pequeno. Recentemente, um inibidor de trombina denominado de AaTI foi descrito no mosquito *Aedes aegypti*. Esse inibidor não interage com o sítio ativo da trombina e os resultados obtidos sugerem que essa molécula atua via exosítio 2 (Watanabe et al., 2011; Watanabe et al., 2010).

Entre os triatomíneos (barbeiros), foram caracterizados os seguintes inibidores de trombina: a rodinina (Friedrich et al., 1993) e a dipetalogastina (Mende et al., 1999). Ambos são inibidores de serino proteases da família denominada tipo Kazal, caracterizada por apresentar domínios com massas moleculares de aproximadamente 6 kDa e 3 pontes dissulfeto. A rodinina tem como característica ser um inibidor *double-headed*, o que lhe confere maior especificidade à trombina, visto que o segundo domínio interage com o sítio de fibrinogênio (exosítio 1) da molécula de trombina (van de Locht et al., 1995). Estudos cinéticos utilizando o primeiro domínio da rodinina recombinante mostraram constantes de inibição (K_i) para a trombina com diferenças de mais de quatro ordens de grandeza quando comparado ao K_i da rodinina contendo os dois domínios.

Dados semelhantes foram obtidos analisando-se os domínios que compõem a dipetalogastina e a infestina 1-2 (ver Tabela 1) (Mende, Lange and Nowak, 2004; Campos et al., 2002). O gene completo da infestina, que codifica uma proteína contendo sete domínios do tipo Kazal, foi clonado e sequenciado. Os três novos domínios foram chamados de 1R, 2R e 3R e se encontram na região a montante do gene em relação ao domínio 1. A infestina 2R-3R apresenta 77% de identidade e 85% de similaridade com a infestina 1-2, indicando que ela pode inibir trombina (Lovato et al., 2006). Os últimos domínios da infestina, a jusante do gene e denominado infestina 3-4, apresenta-se como um potente inibidor para o fator XIIa, sendo o domínio infestina 4 o responsável pela inibição dessa enzima da coagulação (Campos, Tanaka-Azevedo and Tanaka, 2004).

Outros mecanismos de inibição já foram descritos, como o demonstrado para a anofelina de *Anopheles albimanus*, um peptídeo de 6,5 kDa capaz de se ligar tanto ao exosítio 1 aniônico da α -trombina (TABE1, do inglês *α -thrombin anion binding exosite 1*) quanto ao seu sítio catalítico, impedindo a proteólise TABE1-dependente mediada pela tripsina (Valenzuela, Francischetti and Ribeiro, 1999).

Inibidores de outros fatores da coagulação

Além de inibidores do fator Xa e da trombina, os artrópodes hematófagos também expressam inibidores de outros fatores da coagulação. Em carrapatos, *Ixodes scapularis* expressa ixolaris em sua saliva, um inibidor do tipo Kunitz cujo alvo é o fator VIIa/fator tecidual, responsável pela ativação do fator X (Francischetti, Mather and Ribeiro, 2004). A serpina19 de *Amblyomma americanum*, mencionada anteriormente, também inibe o fator XIa, além do fator Xa (Kim et al., 2015). Já em mosquitos, foi descrito um inibidor do fator XIIa/caliceína, chamado hamadarina, em *Anopheles stephensi* (Isawa et al., 2002). O flebótomo *Lutzomyia ayacuchensis* expressa um inibidor do fator XII, conhecido como ayaconina (Kawahori et al., 2022). A nitroforina 2 (NP2) é uma lipocalina de *Rhodnius prolixus* que tem como alvo os fatores IX e IXa (Gudderra, Ribeiro and Andersen, 2005), enquanto a dimiconina é uma lipocalina de *Triatoma dimidiata*, cujo alvo é o fator XII (Ishimaru et al., 2012). Finalmente, a infestina 4 de *Triatoma infestans* é um inibidor do tipo Kazal, cujo alvo é o fator XIIa (Campos, Tanaka-Azevedo and Tanaka, 2004).

Grupo/Espécie	Molécula	MM	Família da molécula	Enzima/fator inibido	Referência
Carrapatos					
<i>Amblyomma americanum</i>	Americanina	~12 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(Zhu et al., 1997)
<i>Amblyomma hebraeum</i>	Amblina	17,4 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(Lai et al., 2004)
<i>Amblyomma sculptum</i>	Amblyomina-X	12,3 kDa	Tipo Kunitz	Fator Xa	(Batista et al., 2010)
<i>Hyalomma truncatum</i>	17 kDa	17 kDa	N/D	Fator Xa	(Joubert et al., 1995)
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	15,7 kDa	Tipo Kunitz	Fator tecidual	(Francischetti et al., 2002a)
<i>Ixodes scapularis</i>	Pentalaris	35 kDa	Tipo Kunitz	Ativação do fator X induzida por fator VIIa/fator tecidual	(Francischetti, Mather and Ribeiro, 2004)
<i>Ixodes scapularis</i>	Salp14	9,8 kDa	TSLPI-Salp14	Fator Xa	(Narasimhan et al., 2002)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornitodorina	~14 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(van de Loch et al., 1996)
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	~7 kDa	Tipo Kunitz	Fator Xa	(Waxman et al., 1990; Vlasuk et al., 1991)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignina	~12 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(Nienaber, Gaspar and Neitz, 1999; Mans, Louw and Neitz, 2002)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>		65 kDa	N/D	Fator Xa	(Limo et al., 1991)
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Madanina	7 kDa	Madanina	Trombina	(Iwanaga et al., 2003)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmAP	60 kDa	N/D	Trombina	(Horn, dos Santos and Termignoni, 2000)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Microfilina	~2 kDa	Peptídeo	Trombina	(Ciprandi et al., 2006)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Boophilina	~14 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(Macedo-Ribeiro et al., 2008)
<i>Hyalomma dromedarii</i>	Dromaserpina	~43 kDa	Serpina	Trombina	(Aounallah et al., 2021)
<i>Haemaphysalis bispinosa</i>	Hematrinas	~6,7 kDa	Madanina	Trombina	(Brahma et al., 2017)
<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	rHDS1	24 kDa	Serpina	Trombina	(Du et al., 2020)
<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	rHDS2	26 kDa	Serpina	Trombina	(Du et al., 2020)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmCL1	Isoformas de 22 e 26 kDa	Cisteinoprotease	Ligação a trombina	(Xavier et al., 2019)
<i>Haemaphysalis flava</i>	Cognato de choque térmico 70 (HSC70)	97,11 kDa	Proteína de choque térmico (HSP)	Trombina	(He, Liu and Cheng, 2019)
<i>Amblyomma americanum</i>	Serpina 19		Serpina	Fator Xa e XIa	(Kim et al., 2015)
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixophilina	~15 kDa	Tipo Kunitz	Trombina	(Narasimhan et al., 2013)

Mosquitos					
<i>Aedes aegypti</i>	AFXa	~36 kDa	N/D	Fator Xa	(Stark and James, 1995)
<i>Aedes aegypti</i>	AaTI	7,0 kDa	Tipo Kazal	Trombina	(Watanabe et al., 2011; Watanabe et al., 2010)
<i>Anopheles albimanus</i>	Anofelina	~6,4 kDa	Inibidor pertencente à família I77	Trombina	(Valenzuela, Francischetti and Ribeiro, 1999; Francischetti, Valenzuela and Ribeiro, 1999)
<i>Anopheles stephensi</i>	Hamadarina	16 kDa	N/D	Fator XIIa/Calicreína	(Isawa et al., 2002)
<i>Aedes albopictus</i>	Proteína tipo Aegyptina (alALP)	~30 kDa	30kDa <i>allergen</i>	Trombina?	(Li et al., 2020)
<i>Anopheles gambiae</i>	cE5	~12 kDa	Aegyptina	Trombina	(Pirone et al., 2017)
Flebótomos					
<i>Lutzomyia ayacuchensis</i>	Ayaconina	5,3 kDa	PpSP15/SL1	Fator XII	(Kawahori et al., 2022)
Borrachudos					
<i>Simulium vittatum</i>	18 kDa	18 kDa	N/D	Fator Xa	(Jacobs et al., 1990)
<i>Simulium vittatum</i>	Simukunina	9,6 kDa	Tipo Kunitz	Fator Xa	(Tsuji moto et al., 2012)
Moscas					
<i>Glossina m. morsitans</i>	TTI	3,5 kDa	Peptídeo	Trombina	(Cappello et al., 1996)
<i>Hematobia irritans</i>	Trombostasina	16,7 kDa	Inibidor pertencente à família I64	Trombina	(Zhang, Cupp and Cupp, 2002)
Barbeiros					
<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitroforina 2 / Prolixina S	~20 kDa	Lipocalina	Fator IX e IXa	(Gudderra, Ribeiro and Andersen, 2005)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Rodinina	11 kDa	Tipo Kazal	Trombina	(Friedrich et al., 1993; van de Loch et al., 1995)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabina	~18 kDa	Lipocalina	Trombina	(Noeske-Jungblut et al., 1995)
<i>Triatoma infestans</i>	Infestina 1-2	~11 kDa	Tipo Kazal	Trombina	(Campos et al., 2002)
<i>Triatoma infestans</i>	Infestina 4	~6,5 kDa	Tipo Kazal	Fator XIIa	(Campos, Tanaka-Azevedo and Tanaka, 2004)
<i>Triatoma dimidiata</i>	Dimiconina	~20 kDa	Lipocalina	Fator XII	(Ishimaru et al., 2012)
Pulgas					
<i>Xenopsylla cheopis</i>	XC-43	~4 kDa	Ligante de exsítio	Trombina	(Lu et al., 2021)

1

Tabela 1: Moléculas anticoagulantes e inibidores de proteases presentes na saliva/glândula salivar e intestino de artrópodes hematófagos com atividade comprovada experimentalmente. MM – Massa molecular; N/D: não determinada; TAP - *tick anticoagulant peptide*; TSLPI – *tick salivary lectin pathway inhibitor*; TTI – *tsetse thrombin inhibitor*; AFXa – *anticoagulant-factor Xa*.

Fonte: Arquivo pessoal

Inibidores da agregação plaquetária

Para garantir o bloqueio das defesas hemostáticas dos hospedeiros, além de inibir a coagulação sanguínea, os artrópodes hematófagos também possuem moléculas capazes de interferir com a agregação plaquetária. As plaquetas ou

trombócitos são fragmentos derivados dos megacariócitos, que se agregam no local da lesão dos vasos sanguíneos para interromper o sangramento. A agregação plaquetária é o primeiro passo na cascata hemostática. Quando as plaquetas na corrente sanguínea são expostas à matriz extracelular subjacente, dois receptores de sua superfície, as glicoproteínas (GP) Ib-IX-V e GPVI, ligam-se ao colágeno diretamente ou através do fator de von Willebrand (vWF) imobilizado ao colágeno, que inicia a adesão e a ativação plaquetária. A ativação plaquetária também pode ser desencadeada pela trombina, formada pela cascata de coagulação, e por tromboxano A_2 (TXA₂) e adenosina difosfato (ADP), que são liberados pelas plaquetas ativadas, um mecanismo de *feedback* positivo. A ativação plaquetária leva à secreção de grânulos contendo ADP, fibrinogênio e vWF, à mudança de forma e à ativação da GP IIb/IIIa. A ativação da GP IIb/IIIa permite que ela se ligue ao fibrinogênio e ao vWF que, auxiliado pela mudança de forma, resulta na agregação plaquetária. A agregação plaquetária leva à formação do *plug* plaquetário, que impede o extravasamento do sangue (Figura 2).

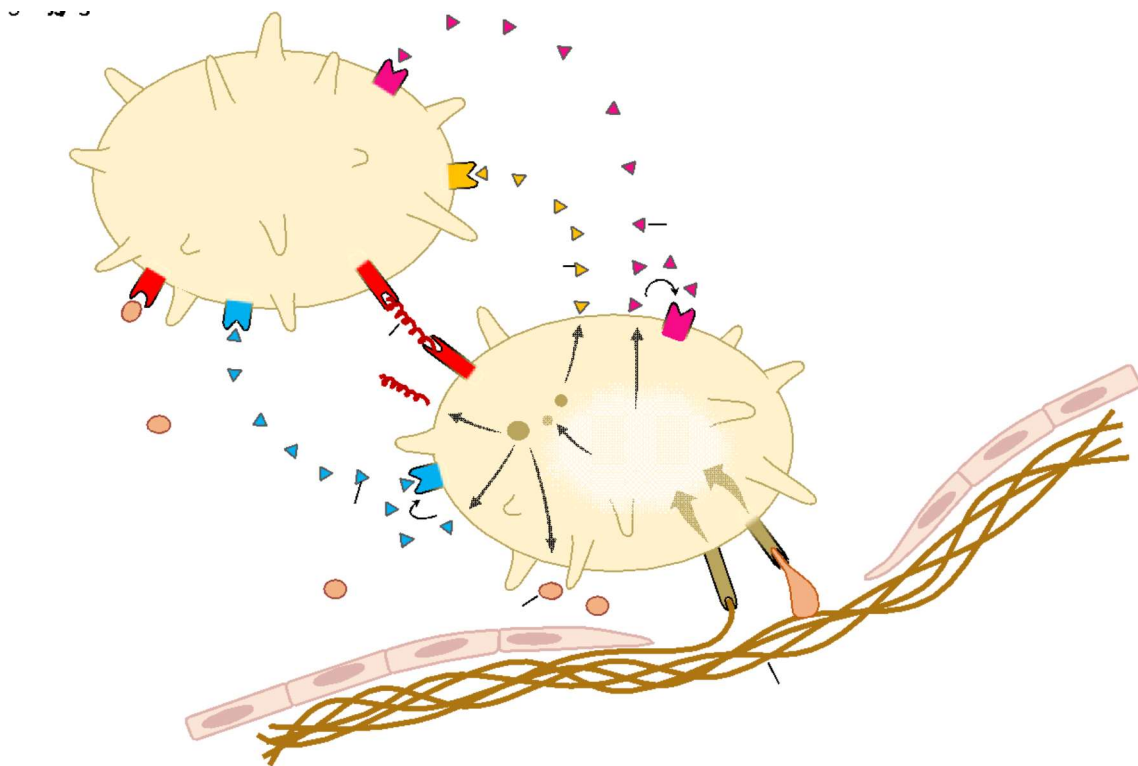


Figura 2: Eventos envolvidos na agregação plaquetária. Quando ocorre a exposição das plaquetas à matriz extracelular, os receptores GP Ib-IX-V e GPVI se ligam ao colágeno diretamente ou através do fator de von Willebrand (vWF), iniciando a adesão e ativação plaquetária. Outros fatores (trombina, TXA₂ e ADP) também levam à ativação das plaquetas, que se ligam ao fibrinogênio e ao vWF, resultando na agregação plaquetária.

Fonte: Arquivo pessoal

Um dos mecanismos utilizados por artrópodes hematófagos para inibir a coagulação sanguínea envolve o uso de enzimas, como as apirases, que hidrolisam tanto adenosina trifosfato (ATP) como ADP, transformando-os em adenosina monofosfato (AMP). A rápida destruição da ADP no local da picada por ação de apirases salivares impede a ativação da agregação plaquetária (Ribeiro and Garcia, 1981; Ribeiro, Endris and Endris, 1991; Champagne et al., 1995; Mans et al., 1998; Valenzuela et al., 2001). Algumas espécies fazem a inativação da ADP por desaminação, através de adenosina desaminases salivares (Charlab, Rowton and Ribeiro, 2000; Ribeiro and Modi, 2001; Valenzuela et al., 2002).

Há, também, substâncias que interferem na interação das plaquetas com o colágeno, bloqueando, assim, a agregação plaquetária induzida pelo contato com esse componente da matriz extracelular (Munro, Jones and Sawyer, 1991). O dano vascular inicial expõe plaquetas ao colágeno subendotelial, iniciando a formação de trombos. No entanto, o complexo receptor de glicoproteínas e o vWF são adicionalmente necessários para a adesão plaquetária firme à parede do vaso sanguíneo. Os artrópodes hematófagos possuem moléculas capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno. Embora o mecanismo permaneça desconhecido para a maioria dessas moléculas, algumas são conhecidas por se ligarem diretamente ao colágeno, como a AAPP de *An. stephensi* (Yoshida et al., 2008; Hayashi et al., 2012), ou por impedirem que o colágeno se ligue ao receptor da glicoproteína VI, como a aegyptina de *Ae. aegypti* (Chagas et al., 2014).

A interação plaquetária com o colágeno leva à liberação do TXA₂, que amplifica a formação de *plug* de plaquetas, recrutando plaquetas circulantes para mudar de forma e agregar com plaquetas já aderidas à superfície subendotelial. As proteínas D7, que são exclusivas dos dípteros, e as lipocalinas, presentes em triatomíneos e carrapatos, são moléculas salivares capazes de se ligar ao TXA₂ e assim, inibir a agregação plaquetária. Algumas proteínas D7 de mosquitos também são capazes de se ligar a aminas biogênicas, como a serotonina e a epinefrina, que, por si só, atuam como agonistas plaquetários fracos. As proteínas D7 e as lipocalinas serão descritas em maiores detalhes mais adiante, no tópico sobre cratagonistas.

Os inibidores salivares da trombina (Tabela 1), além de bloquearem sua ação enzimática sobre as proteínas da cascata da coagulação sanguínea, também atuam sobre seus receptores presentes na superfície das plaquetas, inibindo, assim, a ativação plaquetária trombina-dependente. Alguns hematófagos são capazes de inibir a agregação plaquetária por ligação com a GP IIb-IIIa da superfície de plaquetas (Seymour et al., 1990; Wang et al., 1996), prevenindo, dessa maneira, que o receptor se ligue ao fibrinogênio e ao vWF.

Outra estratégia de inibição da agregação plaquetária utilizada por esses animais é o uso de prostaglandina E₂ (PGE₂) e de prostaciclina, que estimulam a formação de cAMP e cGMP, ambos inibidores da agregação plaquetária (Ribeiro et al., 1985; Ribeiro, 1988). Na Tabela 2, estão mostradas algumas moléculas provenientes de artrópodes hematófagos capazes de interferir na agregação plaquetária de seus hospedeiros.

Grupo/Espécie	Molécula	MM	Família da molécula	Mecanismo	Referência
Carrapatos					
<i>Amblyomma americanum</i>	AamAV422	24 kDa	AV422	Inibição de AP induzida por ADP	(Mulenga, Kim and Ibelli, 2013)
<i>Argas monolakensis</i>	Monogrina	10 kDa	Antagonista do receptor de fibrinogênio	Inibição de AP induzida por ADP, colágeno e PAF	(Mans et al., 2008)
<i>Dermacentor variabilis</i>	Variabilina	4,97 kDa	Adesão RDG	Antagonismo de GPIIb/IIIa	(Wang et al., 1996)
<i>Haemaphysalis marginatum rufipes</i>	Hyalomina-1	6,4 kDa	Madanina?	Inibição de trombina; bloqueio da ativação mediada por trombina do FXI e a ativação do FV pela trombina	(Jablonka et al., 2015)
<i>Hyalomma dromedarii</i>	rDromaserpina	43 kDa	Serpina	Inibição de trombina, calicreína, FXIa e FXIIa	(Aounallah et al., 2021)
<i>Hyalomma dromedarii</i>	TNapirase	25 kDa	5' nucleotidase	Inibição de AP induzida por ADP	(Masoud et al., 2020)
<i>Ixodes dammini</i>	PGE ₂	0,35 kDa	Eicosanoides	Indução de cAMP e cGMP	(Ribeiro et al., 1985; Ribeiro, Makoul and Robinson, 1988)
<i>Ixodes ricinus</i>	IRS-2	41,9 kDa	Serpina	Inibição de AP induzida por trombina e catepsina G	(Chmelar et al., 2011)
<i>Ixodes scapularis</i>	IxscS-1E1	41,7 kDa	Serpina	Inibição de AP induzida por trombina e ADP-	(Ibelli et al., 2014)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	RmS-3 and RmS-17	40-50 kDa	Serpina	Inibição de AP induzida por catepsina G	(Tirioni et al., 2016)
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAI	15 kDa	Inibidor de protease	Inibição de AP induzida por ADP, colágeno, e trombina	(Karczewski et al., 1995)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Desintegrina	6 kDa	Proteínas inibidoras de integrinas	Inibição de AP induzida por colágeno	(Karczewski, Endris and Connolly, 1994)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Apirase	63 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Ribeiro, Endris and Endris, 1991)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Moubatina	17 kDa	Lipocalina	Inibição de AP induzida por colágeno	(Waxman and Connolly, 1993; Keller et al., 1993)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Apirase	67 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Mans et al., 1998)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignina	12,4 kDa	Tipo Kunitz	Inibição de AP induzida por trombina	(Nienaber, Gaspar and Neitz, 1999)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	TSGP3	15,9 kDa	Lipocalina	Inibição de AP eliminando TXA ₂	(Mans and Ribeiro, 2008)
Mosquitos					
<i>Aedes aegypti</i>	Apirase-like	68 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Champagne et al., 1995)
<i>Aedes aegypti</i>	Adenosina desaminase	56,9 kDa	ADGF (CECR1 em vertebrados)	Desaminação de ADP	(Valenzuela et al., 2002)
<i>Aedes aegypti</i>	AeD7L1 e AeD7L2	~37 kDa	OBP	Inibição de AP induzida por colágeno e TXA ₂	(Martin-Martin et al., 2021)
<i>Aedes aegypti</i>	Aegyptina	30 kDa	Aegyptina	Inibição de AP induzida por colágeno prevenindo a ligação com o GPVI,	(Calvo et al., 2007b; Chagas et al., 2014)
<i>Aedes albopictus</i>	AlboD7L1	36,1 kDa	OBP	Inibição de AP induzida por colágeno e TXA ₂	(Martin-Martin et al., 2020b)
<i>Anopheles gambiae</i>	AngaD7L1	35 kDa	OBP	Inibição de AP eliminando TXA ₂	(Smith et al., 2022)
<i>Anopheles stephensi</i>	AAPP	37 kDa	Aegyptina	Inibição de AP induzida por colágeno, interferindo com sua interação com o receptor GPVI	(Yoshida et al., 2008; Hayashi et al., 2012)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Fosfolipase	40-50 kDa	Fosfolipase	Hidrólise de PAF	(Ribeiro and Francischetti, 2001)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	CxD7L1 e CxD7L2	~34 kDa	OBP	Inibição de AP induzida por colágeno e ADP (CxD7L1); Inibição de AP induzida por colágeno e TXA ₂ , liga serotonina e epinefrina (CxD7L2)	(Martin-Martin et al., 2020a)

Flebótomos					
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Adenosina desaminase	52 kDa	ADGF (CECR1 em vertebrados)	Desaminação de ADP	(Charlab, Rowton and Ribeiro, 2000)
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Adenosina e 5'-AMP		0,267 e 0,347 kDa	Deslocamento de ADP	(Ribeiro et al., 1999)
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Apirase	38 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Valenzuela et al., 2001)
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	PduApy 2	35,8 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Fontaine et al., 2011)
Moscas					
<i>Chrysops spp.</i>	Crisoptina	65 kDa	-	Inibição da ligação com fibrinogênio	(Reddy et al., 2000)
<i>Glossina morsitans</i>	Apirase-like	>30 kDa	5'-nucleotidase	Inibição de AP induzida por ADP, colágeno	(Mant and Parker, 1981)
<i>Simulium vittatum</i>	Apirase-like	16 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Cupp et al., 1998)
<i>Simulium nigrimanum</i>	Simplagrina	28,8 kDa	Aegyptina	Inibição de AP induzida por colágeno	(Chagas et al., 2014)
<i>Tabanus yao</i>	Macquarítina 1 e 2	26 kDa	Tabinhibitina	ácido araquidônico, TMVA, stejnluxina, TXA ₂ , e trombina	(Xu et al., 2008)
<i>Tabanus yao</i>	Tab y 1	70 kDa	5'-nucleotidase	Inibição de AP induzida por ADP	(An et al., 2011)
<i>Tabanus yao</i>	Tablysina 2	26,5 kDa	Enzima fibrinogenolítica	Inibição de AP induzida por ADP	(Sheng et al., 2017)
Barbeiros					
<i>Dipetalogaster máxima</i>	DMAV	25,3 kDa	Antígeno-5/CAP	Inibição de AP induzida por colágeno ligando Cu ²⁺	(Assumpção et al., 2013)
<i>Dipetalogaster máxima</i>	Dipetalodipina (DPTL)	18 kDa	Lipocalina	Inibição de AP induzida por colágeno, TXA ₂ , e ácido araquidônico	(Assumpção et al., 2010)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Apirase-like	N/D	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Ribeiro and Garcia, 1981)
<i>Rhodnius prolixus</i>	RPAI-1	19 kDa	Lipocalina	Sequestro de ADP	(Francischetti, Andersen and Ribeiro, 2002)
<i>Rhodnius prolixus</i>	ABP	20,7 kDa	Lipocalina putativa	Sequestro de serotonina e epinefrina	(Andersen et al., 2003)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Lisofosfatidilcolina	N/D	Fosfatidilcolina	Aumento da produção de GMPc na plaqueta	(Golodne et al., 2003)
<i>Rhodnius prolixus</i>	PAF-AH	28 kDa	PAF-acetil-hidrolases	Inibição de AP inativando PAF	(Côrte-Real et al., 2011)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Palidipina	19 kDa	Lipocalina	Inibição de AP induzida por colágeno//Inibição de liberação de ADP	(Haendler et al., 1995; Noeske-Jungblut et al., 1995)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabina	18 kDa	Lipocalina	Inibição de AP induzida por trombina	(Noeske-Jungblut et al., 1995)
<i>Triatoma infestans</i>	Apirase-like	79 kDa	5'-nucleotidase	Hidrólise de ADP	(Faudry et al., 2004)
<i>Triatoma infestans</i>	TIAV	25,6 kDa	Antígeno-5/CAP	Inibição de AP induzida por colágeno	(Assumpção et al., 2013)
<i>Triatoma infestans</i>	Triplatina	~ 18,7 kDa	Lipocalina	Inibição de AP induzida por colágeno, TXA ₂ , e ácido araquidônico	(Ma et al., 2012)

Tabela 2: Moléculas inibidoras de agregação plaquetária presentes na saliva/glândula salivar de artrópodes hematófagos com atividade comprovada experimentalmente.

ADGF: fator de crescimento relacionado a adenosina desaminase (do inglês *adenosine deaminase-related growth factors*); ADP: adenosina difosfato; AP: agregação plaquetária; MM: massa molecular; N/D: não determinada; OBP: proteína ligante de odor (do inglês *odorant binding protein*); PAF: fator de agregação plaquetária; TAI: inibidor de adesão de carrapatos (do inglês *tick adhesion inhibitor*); TXA₂: tromboxano A₂; vWF: fator de von Willebrand.

Fonte: Arquivo pessoal

Vasodilatadores

Como discutido anteriormente, o dano tecidual causado pela picada de um artrópode hematófago desencadeia uma série de respostas defensivas em seu hospedeiro. Um dos mecanismos empregados para evitar a perda de sangue é a

constrição dos vasos e capilares na região da picada, reduzindo o aporte sanguíneo. Além disso, o volume de sangue do hospedeiro vertebrado ocupa cerca de 5% do volume da pele (Ryan, 1976), tornando difícil a localização imediata de vasos sanguíneos pelo hematófago durante a picada. Os estudos das glândulas salivares e da saliva de diferentes hematófagos (carrapatos, mosquitos, triatomíneos e flebotomíneos, dentre outros) mostraram a presença de moléculas capazes de modular a contração dos vasos da microcirculação do hospedeiro vertebrado, facilitando sua localização e o fluxo sanguíneo de tais vasos. Assim, aumentou-se a chance de sobrevivência do artrópode, uma vez que o tempo de interação entre o hospedeiro e o hematófago foi reduzido.

Diversos mecanismos e moléculas capazes de induzir a vasodilatação no hospedeiro vertebrado já foram caracterizados e, apesar do hábito hematofágico ter evoluído de forma independente múltiplas vezes, diferentes artrópodes empregam o óxido nítrico (NO) como principal vasodilatador. O NO é um gás, produto da transformação catalítica da L-arginina em citrulina por enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS), que ocorre na presença de calmodulina e de vários cofatores, como protoporfirina IX heme, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH).

Existem três tipos diferentes de NOS (Nussenzveig, Bentley and Ribeiro, 1995; Liu and Huang, 2008; Rafikov et al., 2011): i) uma NOS neuronal, que é encontrada no cérebro e no sistema nervoso periférico; ii) uma NOS induzida por citocinas e por outros estímulos inflamatórios, que é insensível a cálcio, contém calmodulina fortemente ligada a sua estrutura e que gera NO que atua como agente antimicrobiano ou antitumorigênico; iii) uma NOS endotelial, que é predominantemente encontrada na membrana celular. Uma vez produzida por ação de uma NOS, o NO pode interagir com a musculatura lisa do vaso e promover vasodilatação em função da ativação de uma guanilato ciclase solúvel. A produção de GMP cíclico por tal enzima leva à ativação de uma proteína quinase dependente de nucleotídeo, que fosforila proteínas envolvidas no relaxamento do músculo liso subjacente ao vaso. Outras estratégias utilizadas pelos artrópodes hematófagos são a liberação de vasodilatadores não proteicos, como as prostaglandinas (Ribeiro et al., 1992; Dickinson et al., 1976) e de inibidores da vasoconstrição, como peroxidases salivares (Ribeiro and Nussenzveig, 1993b).

A presença de moléculas, proteicas e não-proteicas, capazes de induzir a vasodilatação no hospedeiro vertebrado é um exemplo da evolução convergente observada nas moléculas salivares dos artrópodes hematófagos. Nessa evolução, diferentes moléculas apresentam a mesma atividade fisiológica

(vasodilatação), através de diferentes mecanismos. Na Tabela 3, é apresentado um sumário de algumas substâncias vasodilatadoras já descritas em artrópodes hematófagos. E, nos próximos subtópicos dessa seção, faremos uma breve descrição dos vasodilatadores já caracterizados, organizados para cada grupo dos diferentes artrópodes hematófagos.

Grupo/Espécie	Molécula	MM	Família da molécula	Mecanismo	Referência
Barbeiros					
<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitroforinas	20 kDa	Lipocalinas	Liberação de NO	(Ribeiro, Marinotti and Gonzales, 1990; Ribeiro and Nussenzveig, 1993a)
<i>Triatoma infestans</i>	Lisofosfatidil-colina <i>Triapsin</i>	0.299 kDa 33 kDa	Lisofosfolípidios Serino proteases	Indução da NOS Ativação de PAR2	(Golodne et al.,2003) (Oliveira et al.,2021)
Mosquitos					
<i>Aedes aegypti</i>	Sialocinina	1.4 kDa	Taquicinas	Indução da NOS via o receptor NK1R	(Champagne and Ribeiro, 1994)
<i>Anopheles albimanus</i>	Peroxidase	50 kDa	Peroxidases	Degradação de catecolaminas e serotonina	(Ribeiro and Nussenzveig, 1993b)
Flebótomos					
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Maxadilan	6.8 kDa	Ligante do receptor de PAC-1	Ativação do receptor PAC1	(Lerner et al.,1991; Lerner and Shoemaker, 1992)
Moscas					
<i>Simulium vittatum</i>	SVEP	15.4 kDa	Lectina tipo RicinaB	Ativação de bomba de K ⁺ ATP-dependente	(Cupp et al.,1998)
Carrapatos					
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	PGE ₂	0.352 kDa	Prostaglandinas	Ativação de NOS endotelial	(Dickinson et al.,1976)
<i>Ixodes dammini</i>	PGE ₂ e PGI ₂	0.352 kDa	Prostaglandinas	Ativação de NOS endotelial	(Ribeiro et al.,1985)
<i>Amblyomma americanum</i>	PGE ₂	0.352 kDa	Prostaglandinas	Ativação de NOS endotelial	(Ribeiro et al.,1992)

Tabela 3: Substâncias vasodilatadoras presentes na saliva/glândula salivar de animais hematófagos. MM – Massa molecular; NOS: óxido nítrico sintase.

Fonte: Arquivo pessoal

Triatomíneos

A primeira evidência de um vasodilatador salivar em uma espécie de barbeiro surgiu no início da década de 1990, quando foi demonstrado que os homogeneizados de glândulas salivares de *R. prolixus* possuíam um vasodilatador com características semelhantes ao NO (Ribeiro, Marinotti and Gonzales, 1990). Posteriormente, se mostrou que, na realidade, o NO se encontra conjugado com um grupo específico de proteínas salivares, que foram denominadas nitroforinas (NP) (Ribeiro et al., 1993; Champagne, Nussenzveig and Ribeiro, 1995). As NP são membros da família das lipocalinas (Montfort,

Weichsel and Andersen, 2000), proteínas de baixo peso molecular, extracelulares e com capacidade de ligação a pequenas moléculas (Flower, 2000). Existem três grupos principais de lipocalinas na saliva de *R. prolixus*. No primeiro estão as já citadas NP – heme proteínas ligadoras de NO e histamina – bem como a proteína ligadora de aminas biogênicas (ABP, do inglês *amine binding proteins*). NP e ABP estão relacionadas através da similaridade das sequências que, apesar de baixas, resultam em estruturas terciárias com alta similaridade. O segundo grupo contém uma proteína ligadora de ADP capaz de inibir a agregação plaquetária, denominada *Rhodnius prolixus Aggregation Inhibitor* (RPAI-1) (Francischetti, Andersen and Ribeiro, 2002). Finalmente, o terceiro grupo é constituído por lipocalinas relacionadas ao inibidor de trombina de *Triatoma pallidipennis*, chamado triabina (Fuentes-Prior et al., 1997). Apesar dessa relação, curiosamente ainda não foi verificada a inibição da atividade da trombina pela saliva de *R. prolixus*.

Estudos funcionais e estruturais sobre NP revelaram detalhes sobre o mecanismo pelo qual tais proteínas transportam NO. De uma forma geral, a estrutura das NP pode ser descrita como: oito folhas antiparalelas, organizadas na forma de um barril β (Figura 3A). Cada NP contém uma molécula de heme na cavidade central do barril- β , que se encontra ancorada à proteína através de um átomo de ferro em coordenação com um resíduo de histidina na segunda fita do barril β , além de realizar interações hidrofóbicas com resíduos próximos (Montfort, Weichsel and Andersen, 2000). A ligação e a liberação de NO podem ser observadas pela mudança do pico de absorção ou pela banda de Soret, em um espectro cujo valor máximo é em torno de 420 nm quando o NO estiver ligado a NP, e em torno de 404 nm na NP livre de NO (Ribeiro and Nussenzveig, 1993a). Tal complexo é mais estável na faixa de pH 5,0 do que no pH fisiológico do sangue, em torno de 7,4. Essa diferença assegura a migração do NO a partir da NP para o vaso durante a injeção da saliva na pele do hospedeiro (Figura 3B), que ocorre com um aumento de cerca de cinco a dez vezes na velocidade de dissociação do NO (Andersen et al., 2000). Um sistema similar de estocagem de NO foi descrito para outro hemíptero, *Cimex lectularius* (Valenzuela, Walker and Ribeiro, 1995; Valenzuela and Ribeiro, 1998).

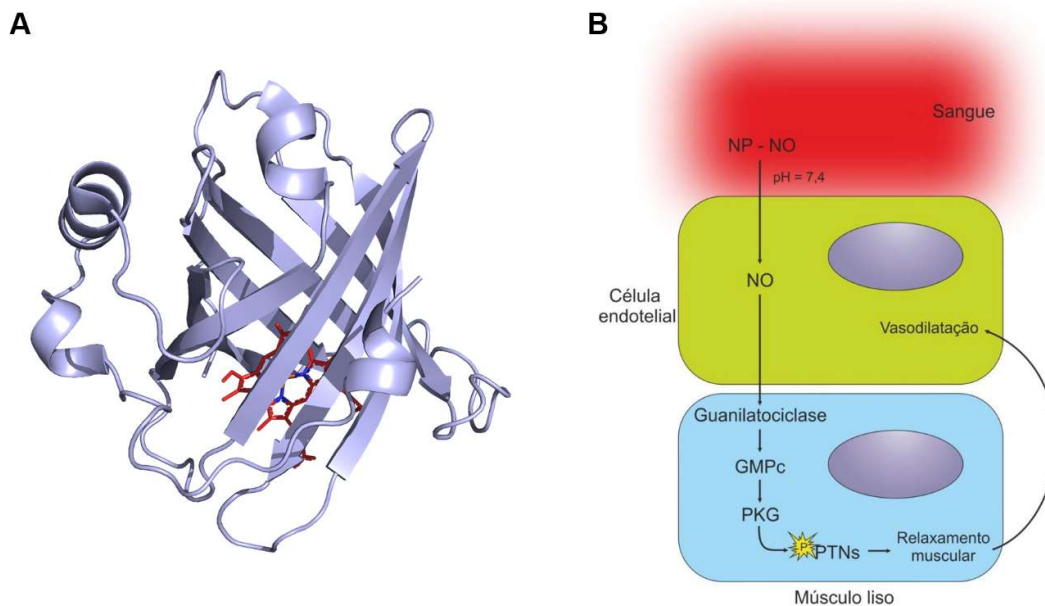


Figura 3: Representação da estrutura tridimensional da nitroforina-2 de *R. prolixus* (PBD: 1EUO) representada na forma de *cartoon* em azul e o grupo prostético heme representado em vermelho (A). Mecanismo de liberação do óxido nítrico (NO) e indução da vasodilatação pelas nitroforinas (NPs) (B).

Fonte: Arquivo pessoal

É importante ressaltar que o NO é uma molécula altamente instável, com uma meia vida de alguns segundos quando em solução (Lancaster, 1994). Por esse motivo, sua produção e estocagem na glândula salivar de *Rhodnius prolixus* são de grande interesse. Foi demonstrado que a produção do NO ocorre no interior das células epiteliais das glândulas salivares de *R. prolixus* através de uma NOS (Ribeiro and Nussenzveig, 1993a). Apesar do mecanismo exato pelo qual o NO atinge as NP no lúmen da glândula salivar ainda ser desconhecido, propôs-se um modelo, sugerindo a difusão do NO através da membrana celular (Nussenzveig, Bentley and Ribeiro, 1995).

Transcriptomas de glândulas salivares de *T. infestans* revelaram a presença de diversas proteínas pertencentes à família das lipocalinas. Porém, não foram identificadas proteínas semelhantes às NP (Assumpcao et al., 2008; Schwarz et al., 2014), sugerindo a presença de um mecanismo alternativo para induzir a vasodilatação. Recentemente, foi demonstrado que a saliva de *T. infestans* é capaz de induzir a liberação de NO em cultura de células HUVEC (do inglês *human umbilical vein endothelial cells*). Ensaio adicional levou a sugerir que a liberação do NO ocorre através da ativação do receptor PAR-2 (do inglês *protease-activated receptor*) pela serino protease denominada triapsina (Amino, Tanaka and Schenkman, 2001).

Além das NP, foi mostrado que a lisofosfatidilcolina (LPC), um lisofosfolípido presente na saliva de *R. prolixus*, é capaz de interferir na agregação plaquetária induzida por colágeno e por trombina. Além disso, usando o modelo de aorta de porco em cultura, foi demonstrado que pode induzir a expressão de uma NOS em células endoteliais, (Golodne et al., 2003). Níveis micromolares de LPC são acumulados no lúmen da glândula salivar durante seu crescimento e, uma vez que a saliva é injetada, esses níveis são suficientes para desempenhar suas atividades.

Mosquitos

Os primeiros estudos, demonstrando a presença da atividade vasodilatadora na saliva de mosquitos também foram realizados na década de 1990. Homogêneos de glândulas salivares de *Ae. aegypti* revelaram a presença de uma proteína de baixo peso molecular (1,4 kDa), pertencente à família das taquicininas, capaz de induzir vasodilatação e, posteriormente, caracterizadas como sendo sialocinina I e II (Champagne and Ribeiro, 1994; Ribeiro, 1992). Ensaio utilizando uma cepa de mosquito *Ae. aegypti* nocautes (KO) para o gene da sialocinina I, revelaram sua importância para o processo de aquisição do sangue, uma vez que esses mosquitos levaram mais tempo para iniciar o repasto sanguíneo. Além disso, estudos iniciais sobre o mecanismo de ação das sialocininas sugerem que a produção de NO ocorre via estimulação de NOS pelo receptor NK1R (Martin-Martin et al., 2022). Apesar de não ser foco desse capítulo, é importante ressaltar que as taquicininas também estão associadas a outras atividades fisiológicas, como a liberação de histamina de mastócitos e a ativação de macrófagos (Repke et al., 1987; Brunelleschi et al., 1990), que serão abordadas em mais detalhes no Capítulo 18. Considerando a importância de *Ae. aegypti* como um vetor de diversas arboviroses e a atividade imunomoduladora que as taquicininas apresentam, alguns pesquisadores avaliaram a contribuição das sialocininas para a sua competência vetorial (Lefteri et al., 2022).

Transcriptomas e proteomas de glândulas salivares de mosquitos do gênero *Anopheles* sugerem que as sialocininas estão ausentes nesses mosquitos, indicando a presença de outros vasodilatadores. Estudos utilizando extratos de glândulas salivares de *Anopheles gambiae* e *An. albimanus* revelaram a presença de oxidases e peroxidases capazes de degradar catecolaminas e serotoninas (Ribeiro and Nussenzveig, 1993b; Ribeiro, Nussenzveig and Tortorella, 1994), moléculas capazes de induzir a vasoconstrição. Esses estudos sugerem que a saliva desses mosquitos inibe a vasoconstrição ao invés de induzir

a vasodilatação. Mosquitos também possuem, na sua saliva, proteínas da família D7, moléculas capazes de interagir com diferentes agonistas relevantes para a homeostasia do hospedeiro, incluindo a vasodilatação. Essa família de proteínas, atualmente, é incluída na categoria de “cratagonistas”, que será discutida mais adiante, de maneira detalhada.

Flebotomíneos

Ainda na década de 1980, foi observado que a picada do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* produz um eritema que persiste por até 48 horas após a picada, indicando a presença de um vasodilatador potente em sua saliva (Ribeiro, Rossignol and Spielman, 1986). Estudos posteriores levaram à identificação dessa substância como uma proteína de 6,8 kDa, denominada maxadilan, um vasodilatador 500 vezes mais potente que o CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) que, até aquele momento, era o vasodilatador mais poderoso conhecido (Lerner et al., 1991).

As propriedades vasodilatadoras da proteína maxadilan foram extensamente estudadas, e logo foi demonstrado que essa molécula é capaz de induzir vasodilatação independente do endotélio. Isso sugere que o peptídeo deve atuar diretamente na musculatura lisa através do aumento dos níveis intracelulares de cAMP (Grevelink et al., 1995). Além de sua atividade em vasos cutâneos, a atividade vasodilatadora da maxadilan foi estudada, também, utilizando outros modelos, como a aorta de coelho e a artéria mesentérica (Grevelink et al., 1995). O receptor da maxadilan foi identificado somente em 1997, tratando-se de um receptor acoplado à proteína G, denominado PAC1 (do inglês *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide - PACAP receptor type I*). Apesar das duas moléculas (PACAP e maxadilan) não compartilharem nenhum tipo de homologia em suas estruturas primárias, ambas são capazes de ativar o receptor com a mesma potência (Moro and Lerner, 1997). Além de sua atividade vasodilatadora, a maxadilan também é capaz de interferir na resposta imune do hospedeiro, modulando a produção de citocinas por macrófagos através dos receptores de PACAP (Soares et al., 1998), o que pode contribuir para a transmissão de *Leishmania*.

Carrapatos

Quando comparados aos demais artrópodes hematófagos, os carrapatos apresentam uma associação única com seu hospedeiro. Enquanto mosquitos,

flebotomíneos e triatomíneos se alimentam em poucos minutos, alguns carrapatos passam dias fixados em seus hospedeiros. Os primeiros relatos da capacidade de carrapatos induzirem vasodilatação foram realizados na década de 1980, na qual um aumento do aporte sanguíneo foi observado na região onde larvas de *Rhipicephalus microplus* se fixaram (Hales et al., 1981). Estudos posteriores revelaram que a saliva de muitas espécies de carrapato contém altos níveis de prostaglandinas (PG), em particular PGE₂ (Ribeiro et al., 1992; Dickinson et al., 1976). As PG apresentam diversas atividades fisiológicas, entre elas a capacidade de induzir vasodilatação (Williams, 1979; Kemp et al., 1983). Outros estudos também demonstraram que os níveis de PGE₂ na saliva de *R. microplus* atingem sua maior concentração momentos antes do ingurgitamento, quando há um aumento no aporte sanguíneo pelo carrapato (Dickinson, 1979). Corroborando esses dados, foi demonstrado que a concentração de PGE₂ na saliva de *A. sculptum* aumenta durante o repasto sanguíneo, atingindo um pico após 7 dias de fixação ao seu hospedeiro (Esteves et al., 2019a).

Apesar do papel das PG salivares de carrapatos como vasodilatadores estar bem estabelecido, nem todas as espécies de carrapatos apresentam altos níveis dessas moléculas. Em *O. moubata* e em *Ornithodoros erraticus*, os níveis de PGE₂ detectados foram menores que 7,8 pg/μL (Astigarraga et al., 1997). Como referência, os níveis de PGE₂ na saliva de *Amblyomma americanum* foram de aproximadamente 469 pg/μL (Ribeiro et al., 1992), de 800 pg/μL na saliva de *A. sculptum* (Esteves et al., 2019b) e de extraordinários 503 ng/μL na saliva de *I. scapularis* (Sá-Nunes et al., 2007). Esses achados sugerem que as PG de *Ornithodoros* spp. não atingem as concentrações necessárias para atuar como vasodilatadores.

Por outro lado, a análise de um transcriptoma da glândula salivar de *Ornithodoros coriaceus* revelou a presença de peptídeos semelhantes a adrenomedulina (Francischetti et al., 2008), até então nunca identificados na glândula salivar de nenhum artrópode hematófago. A adrenomedulina é um peptídeo encontrado em vertebrados que apresenta diversas atividades biológicas, como a redução do estresse oxidativo, a inibição da apoptose em células endoteliais, além de induzir vasodilatação (Kato et al., 2005). Apesar da identificação de peptídeos semelhantes à adrenomedulina em carrapatos, estudos funcionais demonstrando que esses peptídeos de carrapato possuem atividade vasodilatadora ainda não foram realizados.

Ativadores da fibrinólise e agentes fibrinolíticos

O processo de formação do trombo é redundante, isto é, as várias vias que levam à sua formação se interligam em diversos pontos para assegurar a hemostasia. Devido à redundância do sistema hemostático, impedir uma via trombogênica pode não ser suficiente em todas as situações e, ao longo da evolução, algumas espécies de animais hematófagos desenvolveram mecanismos que atuam na destruição do trombo. Para tal, já foi descrito que animais hematófagos, como morcegos e sanguessugas, podem utilizar enzimas que desestabilizam o coágulo, clivando as ligações entre os monômeros de fibrina (Baskova and Nikonov, 1991); enzimas que degradam os polímeros de fibrina e as moléculas de fibrinogênio (Malinconico, Katz and Budzynski, 1984; Swadesh, Huang and Budzynski, 1990; Budzynski, 1991); e enzimas que ativam o plasminogênio (Gardell et al., 1989). No caso específico de artrópodes hematófagos, foi demonstrado que *R. prolixus* possui um ativador de plasminogênio (Hawkins and Hellmann, 1966; Hellmann and Hawkins, 1964).

Cratagonistas

Além das moléculas previamente descritas nesse capítulo, os artrópodes hematófagos apresentam, em sua saliva, proteínas capazes interagir com diferentes agonistas (aminas biogênicas e leucotrienos) relevantes para a hemostasia do hospedeiro. Do ponto de vista prático, esses “cratagonistas” atuam como quelantes ou “sequestradores” de agonistas e, conseqüentemente, interferem em mais de um eixo da hemostasia. Por exemplo, a serotonina é capaz de promover vasoconstrição, além de favorecer a agregação plaquetária. Portanto, um cratagonista capaz de reduzir as concentrações de serotonina, efetivamente inibirá a vasoconstrição e a agregação plaquetária no local da picada (Ribeiro, 2009).

É interessante ressaltar que os cratagonistas geralmente estão entre as proteínas mais abundantes presentes na glândula salivar/saliva dos artrópodes hematófagos e se apresentam como uma família multigênica, cuja origem, provavelmente, é derivada de múltiplos eventos de duplicação gênica (Ribeiro and Arca, 2009). Dessa forma, os cratagonistas servem como um exemplo adicional do processo de evolução convergente observado em proteínas salivares dos artrópodes hematófagos, uma vez que diferentes espécies contêm famílias de proteínas distintas, sem qualquer tipo de homologia entre si, mas apresentam uma função comum (Figura 4). Até o momento, a única exceção observada é a

família das lipocalinas, com membros presentes na saliva de carrapatos e triatomíneos.

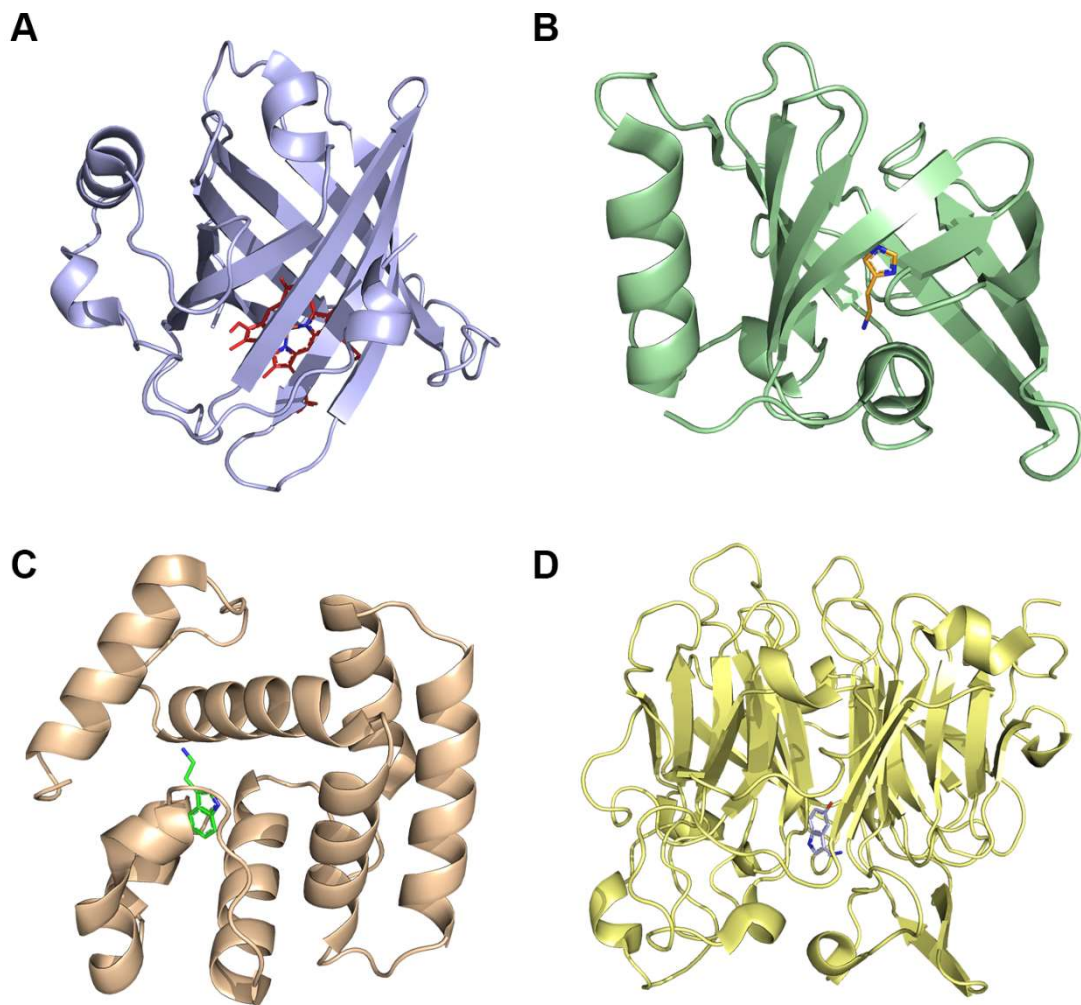


Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional de diferentes cratagonistas caracterizados em artrópodes hematófagos. Nitroforina-2 de *R. prolixus* (PDB: 1EUO) representada na forma de *cartoon* em azul e o grupo prostético heme, representado em vermelho (A). Lipocalina do carrapato *Argas monolakensis* (verde) complexada com histamina (laranja) (PDB: 3BU1) (B). Proteína D7 de *An. gambiae* (bege) complexada com serotonina (verde) (PDB: 2QEH) (C) e proteína amarela (*yellow protein*) de *L. longipalpis* (amarelo) complexada com serotonina (azul) (PDB: 3Q6K) (D).

Fonte: Arquivo pessoal

A seguir, é apresentada uma breve descrição dos principais grupos de cratagonistas. Eles são caracterizados em diferentes artrópodes hematófagos que apresentam atividades na hemostasia.

Lipocalinas

Como apresentado anteriormente, as lipocalinas constituem uma família de proteínas abundantes na glândula salivar e saliva de triatomíneos, também identificadas em carrapatos (Montfort, Weichsel and Andersen, 2000). O papel das lipocalinas do grupo das NP como carregadores de NO já foi abordado. Além de sua atividade vasodilatadora, também foi demonstrado que as NP são capazes de interagir com histamina com alta afinidade, aproximadamente 100 vezes maior do que com NO em pH 7,5 (Weichsel et al., 1998). O dano tecidual e vascular presente no local da picada resulta na ativação de plaquetas e de mastócitos, que liberam grandes quantidades de histamina, amplificando o processo inflamatório.

Além disso, indivíduos previamente expostos à saliva podem se tornar sensibilizados aos seus alérgenos e produzir IgE, que se liga a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos e basófilos. Isso induz sua degranulação após contatos subsequentes, e provoca uma liberação maciça de histamina e de outros mediadores pré-formados (Marshall, Chapman and Saxon, 1986). Portanto, a redução da concentração ativa de histamina no local da picada pelas NP é uma estratégia que contribui para a redução do processo inflamatório, favorecendo a aquisição do sangue pelo hematófago. É importante ressaltar que a ligação de NP com a histamina não é concomitante com a ligação ao NO. A histamina consegue remover o NO ligado ao grupo heme das NP. Esse efeito acontece no sítio de ligação de NO, quando a histamina acelera a liberação de NO em condições fisiológicas. Ou seja, durante a dissociação induzida por pH, o NO é liberado na circulação, ao mesmo tempo que a histamina ocupa o sítio de ligação no grupo heme (Ribeiro and Walker, 1994).

A atividade quelante das lipocalinas não está limitada apenas à histamina. A proteína ABP (*amine binding protein*), identificada na glândula salivar de *R. prolixus*, apresenta alta afinidade para outras aminas biogênicas, incluindo serotonina, epinefrina e norepinefrina (Andersen et al., 2003), moléculas relevantes para a agregação plaquetária e a vasoconstrição. De forma semelhante, a lipocalina RPA11 (*Rhodnius prolixus platelet aggregation inhibitor 1*) é capaz de interagir com ADP e, conseqüentemente, inibir a agregação plaquetária (Francischetti et al., 2000). Lipocalinas com atividades semelhantes foram identificadas em carrapatos. Em *Rhipicephalus appendiculatus*, três proteínas ligadoras de histamina foram caracterizadas (Paesen et al., 1999), enquanto uma lipocalina de *Dermacentor reticulatus* foi capaz de ligar histamina e serotonina (Sangamnatdej et al., 2002).

Algumas lipocalinas também apresentam outras atividades anti-hemostáticas. Por exemplo, a proteína salivar NP2 de *R. prolixus*, originalmente chamada prolixina-S (Hawkins and Hellmann, 1966), possui atividade anticoagulante. Essa proteína é capaz de inibir a formação do complexo Xase intrínseco na superfície aniônica, promovida pelos fosfolipídios de membranas de plaquetas ativadas (Zhang et al., 1998). A NP2/prolixina-S liga-se diretamente ao fator IXa, que possui a atividade proteásica do complexo, mas não parece ser capaz de aboli-la (Isawa et al., 2000). Dessa forma, a NP2/prolixina-S parece interferir mais com a interação do fator IXa com o fator VIIIa, ou mesmo com os fosfolipídios de membrana.

Curiosamente, apesar de possuir uma identidade de cerca de 80% (143 de 180 resíduos) com a NP3, essa última proteína possui uma atividade anticoagulante cerca de 300 vezes menos potente (Champagne, 2005). NP7 é uma outra lipocalina salivar de *R. prolixus*, que possui uma série de trechos positivamente carregados, capazes de interagir com vesículas contendo fosfatidilserina (PS) ou uma mistura de PS com fosfatidilcolina (PC), exceto as que contêm apenas PC. Sua ação anti-hemostática, provavelmente, se dá por associação a fosfolipídios aniônicos da membrana de plaquetas ativadas, onde são formados os complexos Xase e protrombinase, bloqueando a montagem desses complexos enzimáticos e, portanto, o processo de coagulação (Andersen et al., 2004). NP7 também é um provável vasodilatador, já que foi demonstrada a capacidade de seu centro heme de reduzir nitrito na ausência de um segundo substrato, resultando na formação de NO (He and Knipp, 2009).

D7

As proteínas pertencentes à família D7 foram inicialmente descritas em *Ae. aegypti* (James et al., 1991) e, posteriormente, identificadas como uma família relacionada às proteínas ligantes de odor (OBP, do inglês *odorant-binding proteins*) (Hekmat-Scafe, Dorit and Carlson, 2000). Atualmente, as proteínas D7 podem ser subclassificadas como curtas (15 – 20 kDa) ou longas (24 – 30 kDa), contendo um ou dois domínios do tipo OBP, respectivamente. Ambas as formas são comumente observadas em extratos proteicos e transcriptomas de glândula salivar de diferentes espécies de mosquito (Lu et al., 2022; Francischetti et al., 2002b; Ribeiro et al., 2016). Em mosquitos do gênero *Anopheles*, a forma curta geralmente é mais abundante, enquanto em mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*, a forma longa é mais comum (Arca et al., 2007; Calvo et al., 2007a).

O papel das proteínas D7 durante a aquisição do sangue por mosquitos tem despertado bastante interesse, resultando na caracterização de diversos membros dessa família. Estudos iniciais com uma D7 curta de *An. gambiae*, revelaram a capacidade das D7 de se ligarem com alta afinidade a aminas biogênicas (serotonina, epinefrina, norepinefrina e histamina) (Calvo et al., 2006). Além disso, a obtenção de um cristal contendo a D7 complexada com seus diferentes ligantes permitiu a identificação dos resíduos-chaves para estabilização do ligante (Calvo et al., 2006; Mans et al., 2007). Recentemente, a atividade de três D7 longas de *An. gambiae* foi caracterizada (Smith et al., 2022). A proteína denominada AngaD7L1 (*Anopheles gambiae* D7 long 1) é capaz de se ligar ao leucotrieno C4 e ao U-46619 (um análogo do tromboxano A2). AngaD7L2 possui baixa afinidade para os leucotrienos B4 e D4, além de ser capaz de interferir na via intrínseca da cascata de coagulação.

Já a interação da serotonina com uma D7 longa de mosquitos do gênero *Anopheles* foi demonstrada, pela primeira vez, em ensaios com AngaD7L3. Resultados semelhantes foram observados em *An. stephensi*, em que a D7, denominada AnSt-D7L1, apresentou alta afinidade para leucotrienos e tromboxano A2 (Alvarenga et al., 2010). Em mosquitos do gênero *Aedes*, apenas D7 longas foram caracterizadas e foi demonstrado que o domínio N-terminal é capaz de interagir com cisteinil leucotrienos, enquanto aminas biogênicas interagem com o domínio C-terminal (Calvo et al., 2009; Martin-Martin et al., 2020b; Martin-Martin et al., 2021). A função das D7 curtas em *Aedes* e *Culex* permanece desconhecida; porém, especula-se que elas não devem interagir com aminas biogênicas, como demonstrado em *Anopheles*, uma vez que os resíduos-chave para esta interação estão ausentes (Mans et al., 2007). Finalmente, no mosquito *Culex quinquefasciatus*, duas D7 longas foram caracterizadas. CxD7L1 foi capaz de inibir agregação plaquetária induzida por ADP, enquanto a proteína CxD7L2 apresentou alta afinidade para aminas biogênicas e biolipídios, semelhantes às D7 longas de *Aedes* (Martin-Martin et al., 2020a).

Proteínas amarelas (Yellow proteins - YPRs)

Membros da família das proteínas amarelas são encontrados em abundância na saliva de flebotomíneos e apresentam similaridades com um grupo de proteínas de *Drosophila melanogaster* que recebem o mesmo nome (*yellow protein*) (Nash, Kamerow and Merrill, 1983). A atividade cratagonista das YPR foi inicialmente demonstrada em *L. longipalpis*, na qual três proteínas apresentaram alta afinidade para diferentes aminas biogênicas. Além disso, a estrutura

cristalográfica da LJM11 complexada com serotonina permitiu a identificação dos resíduos relevantes para a interação da LJM11, com a amina biogênica (Xu et al., 2011). Recentemente, YPR de *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus orientalis* também foram caracterizadas como cratagonistas de aminas vasoativas, com afinidades variáveis para histamina, serotonina, epinefrina, norepinefrina e octopamina, mas que indicaram um papel conservado das YPR em flebotomíneos do novo e do velho mundo (Sumova et al., 2019; Spitzova et al., 2020). Por fim, vale a pena ressaltar que a comparação da estrutura primária de 31 YPR revelou a presença de uma alta variabilidade entre as sequências, inclusive na região de ligação com a serotonina (Sima et al., 2016), sugerindo que alguns membros das YPR podem apresentar funções alternativas ainda não descritas.

Considerações finais

A complexidade dos sistemas de controle de hemostasia que os artrópodes hematófagos desenvolveram pode ser melhor compreendida pela observação de que a hemostase se desenvolveu há cerca de 400 milhões de anos nos animais vertebrados (Doolittle and Feng, 1987). Desde então, a hematofagia surgiu ao menos 20 vezes de maneira independente na evolução, em um período entre 145 e 65 milhões de anos atrás (Balashov Yus, 1984). Supõe-se que a evolução dos múltiplos mecanismos anti-hemostáticos, incluindo a redundância dos alvos de moléculas completamente diferentes do ponto de vista bioquímico, decorra de uma pressão seletiva contínua (Mans and Neitz, 2004).

Sem dúvida, as moléculas anti-hemostáticas dos hematófagos coevoluíram com as moléculas do sistema hemostático dos vertebrados. Desse modo, é razoável supor que esta seja a principal razão da alta eficiência dos hematófagos em seu modo de vida. Essa alta especificidade para bloquear as defesas do hospedeiro e a redundância dos sistemas dificulta na elaboração e no desenvolvimento de processos para neles interferir, de modo a controlar esses parasitas e vetores.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Wilson Santos Molari, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, pela edição das referências do capítulo; e ao Professor Doutor Mário Alberto C. Silva-Neto (*in memoriam*), do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo Reis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas contribuições à versão anterior desse capítulo.

Referências

Alvarenga, P. H., Francischetti, I. M., Calvo, E., Sa-Nunes, A., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2010) 'The function and three-dimensional structure of a thromboxane A₂/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite', *PLoS Biol*, 8(11), pp. e1000547.

Amino, R., Tanaka, A. S. and Schenkman, S. (2001) 'Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)', *Insect Biochem Mol Biol*, 31(4-5), pp. 465-72.

An, S., Ma, D., Wei, J. F., Yang, X., Yang, H. W., Yang, H., Xu, X., He, S. and Lai, R. (2011) 'A novel allergen Tab y 1 with inhibitory activity of platelet aggregation from salivary glands of horseflies', *Allergy*, 66(11), pp. 1420-7.

Andersen, J. F., Ding, X. D., Balfour, C., Shokhireva, T. K., Champagne, D. E., Walker, F. A. and Montfort, W. R. (2000) 'Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap', *Biochemistry*, 39(33), pp. 10118-31.

Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Schuck, P. and Ribeiro, J. M. (2003) 'Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect', *J Biol Chem*, 278(7), pp. 4611-7.

Andersen, J. F., Gudderra, N. P., Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (2004) 'Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect', *Biochemistry*, 43(22), pp. 6987-94.

Aounallah, H., Fessel, M. R., Goldfeder, M. B., Carvalho, E., Bensaoud, C., Chudzinski-Tavassi, A. M., Bouattour, A., M'ghirbi, Y. and Faria, F. (2021) 'rDromaserpin: A Novel Anti-Hemostatic Serpin, from the Salivary Glands of the Hard Tick', *Toxins (Basel)*, 13(12).

Arca, B., Lombardo, F., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mestres-Simon, M., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2007) 'An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*', *Insect Biochem Mol Biol*, 37(2), pp. 107-27.

Assumpcao, T. C., Francischetti, I. M., Andersen, J. F., Schwarz, A., Santana, J. M. and Ribeiro, J. M. (2008) 'An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease', *Insect Biochem Mol Biol*, 38(2), pp. 213-32.

Assumpção, T. C., Alvarenga, P. H., Ribeiro, J. M., Andersen, J. F. and Francischetti, I. M. (2010) 'Dipetalodipin, a novel multifunctional salivary lipocalin that inhibits platelet aggregation, vasoconstriction, and angiogenesis through unique binding specificity for TXA₂, PGF₂alpha, and 15(S)-HETE', *J Biol Chem*, 285(50), pp. 39001-12.

Assumpção, T. C. F., Ma, D., Schwarz, A., Reiter, K., Santana, J. M., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M. C., Nardone, G., Yu, L. L. and Francischetti, I. M. B. (2013) 'Salivary antigen-5/CAP family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂⁻ and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst', *J Biol Chem*, 288(20), pp. 14341-14361.

Astigarraga, A., Oleaga-Perez, A., Perez-Sanchez, R., Baranda, J. A. and Encinas-Grandes, A. (1997) 'Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine', *Parasite Immunol*, 19(9), pp. 401-10.

Balashov YuS (1984) 'Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential', *Annu Rev Entomol*, 29, pp. 137-56.

Baskova, I. P. and Nikonov, G. I. (1991) 'Destabilase, the novel epsilon-(gamma-Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity', *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2(1), pp. 167-72.

Batista, I. F., Ramos, O. H., Ventura, J. S., Junqueira-de-Azevedo, I. L., Ho, P. L. and Chudzinski-Tavassi, A. M. (2010) 'A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition', *Arch Biochem Biophys*, 493(2), pp. 151-6.

Bauer, K. A. (2011) 'Recent progress in anticoagulant therapy: oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa', *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1, pp. 12-9.

Bode, W. and Huber, R. (2000) 'Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction', *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2), pp. 241-52.

Brahma, R. K., Blanchet, G., Kaur, S., Manjunatha Kini, R. and Doley, R. (2017) 'Expression and characterization of haemathrins, madanin-like thrombin inhibitors, isolated from the salivary gland of tick *Haemaphysalis bispinosa* (Acari: Ixodidae)', *Thromb Res*, 152, pp. 20-29.

Brunelleschi, S., Vanni, L., Ledda, F., Giotti, A., Maggi, C. A. and Fantozzi, R. (1990) 'Tachykinins activate guinea-pig alveolar macrophages: involvement of NK2 and NK1 receptors', *Br J Pharmacol*, 100(3), pp. 417-20.

Budzynski, A. Z. (1991) 'Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin', *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2(1), pp. 149-52.

Calvo, E., Dao, A., Pham, V. M. and Ribeiro, J. M. (2007a) 'An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families', *Insect Biochem Mol Biol*, 37(2), pp. 164-75.

Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2006) 'Function and evolution of a mosquito salivary protein family', *J Biol Chem*, 281(4), pp. 1935-42.

Calvo, E., Mans, B. J., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2009) 'Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), pp. 3728-33.

Calvo, E., Tokumasu, F., Marinotti, O., Villeval, J. L., Ribeiro, J. M. C. and Francischetti, I. M. B. (2007b) 'Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor', *J Biol Chem*, 282(37), pp. 26928-26938.

Campos, I. T., Amino, R., Sampaio, C. A., Auerswald, E. A., Friedrich, T., Lemaire, H. G., Schenkman, S. and Tanaka, A. S. (2002) 'Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor', *Insect Biochem Mol Biol*, 32(9), pp. 991-7.

Campos, I. T., Tanaka-Azevedo, A. M. and Tanaka, A. S. (2004) 'Identification and characterization of a novel factor Xlla inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)', *FEBS Lett*, 577(3), pp. 512-6.

Cappello, M., Bergum, P. W., Vlasuk, G. P., Furnidge, B. A., Pritchard, D. I. and Aksoy, S. (1996) 'Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*', *Am J Trop Med Hyg*, 54(5), pp. 475-80.

Cappello, M., Li, S., Chen, X., Li, C. B., Harrison, L., Narashimhan, S., Beard, C. B. and Aksoy, S. (1998) 'Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), pp. 14290-5.

Chagas, A. C., Ramirez, J. L., Jasinskiene, N., James, A. A., Ribeiro, J. M., Marinotti, O. and Calvo, E. (2014) 'Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(19), pp. 6946-51.

Champagne, D. E. (2005) 'Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods', *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34(4-5), pp. 221-7.

Champagne, D. E., Nussenzveig, R. H. and Ribeiro, J. M. (1995) 'Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*', *J Biol Chem*, 270(15), pp. 8691-5.

Champagne, D. E. and Ribeiro, J. M. (1994) 'Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), pp. 138-42.

Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M. and James, A. A. (1995) 'The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3), pp. 694-8.

Charlab, R., Rowton, E. D. and Ribeiro, J. M. (2000) 'The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*', *Exp Parasitol*, 95(1), pp. 45-53.

Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J. M., Mares, M., Kopecky, J. and Kotsyfakis, M. (2011) 'A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation', *Blood*, 117(2), pp. 736-44.

Ciprandi, A., de Oliveira, S. K., Masuda, A., Horn, F. and Termignoni, C. (2006) 'Boophilus microplus: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor', *Exp Parasitol*, 114(1), pp. 40-6.

Cupp, M. S., Ribeiro, J. M., Champagne, D. E. and Cupp, E. W. (1998) 'Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*', *J Exp Biol*, 201(Pt 10), pp. 1553-61.

Côrte-Real, R., Gomes, R. N., Castro-Faria-Neto, H. C., Azambuja, P. and Garcia, E. S. (2011) 'The activity of platelet activating factor-acetyl hydrolase (PAF-AH) in the salivary glands of *Rhodnius prolixus*', *J Insect Physiol*, 57(6), pp. 825-9.

Davie, E. W., Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991) 'The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation', *Biochemistry*, 30(43), pp. 10363-70.

Dickinson, R. G., Binnington, K.C., Schotz, M. and O'Hagan, J.E. (1979) 'Studies on the significance of smooth muscle contracting substances in the cattle tick *Boophilus microplus*', *J. Aust. ent. Soc.*, 18, pp. 199-210.

Dickinson, R. G., O'Hagan, J. E., Schotz, M., Binnington, K. C. and Hegarty, M. P. (1976) 'Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*', *Aust J Exp Biol Med Sci*, 54(5), pp. 475-86.

Doolittle, R. F. and Feng, D. F. (1987) 'Reconstructing the evolution of vertebrate blood coagulation from a consideration of the amino acid sequences of clotting proteins', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 52, pp. 869-74.

Du, W., Gao, Z., Wang, K., Zhao, Y., Zheng, P., Yu, Z., Liu, J. and Yang, X. (2020) 'Expression and function assessment of two serpin-type serine protease inhibitors from *Haemaphysalis doenitzi*', *Res Vet Sci*, 132, pp. 1-9.

Esteves, E., Bizzarro, B., Costa, F. B., Ramírez-Hernández, A., Peti, A. P. F., Cataneo, A. H. D., Wowk, P. F., Timóteo, R. P., Labruna, M. B., Silva Junior, P. I., Silva, C. L., Faccioli, L. H., Fogaça, A. C., Sorgi, C. A. and Sá-Nunes, A. (2019a) '*Amblyomma sculptum* Salivary PGE2 Modulates the Dendritic Cell-*Rickettsia rickettsii* Interactions in vitro and in vivo', *Front Immunol*, 10, pp. 118.

Esteves, E., Bizzarro, B., Costa, F. B., Ramírez-Hernández, A., Peti, A. P. F., Cataneo, A. H. D., Wowk, P. F., Timóteo, R. P., Labruna, M. B., Silva Junior, P. I., Silva, C. L., Faccioli, L. H., Fogaça, A. C., Sorgi, C. A. and Sá-Nunes, A. (2019b) 'Salivary PGE', *Front Immunol*, 10, pp. 118.

Faudry, E., Lozzi, S. P., Santana, J. M., D'Souza-Ault, M., Kieffer, S., Felix, C. R., Ricart, C. A., Sousa, M. V., Vernet, T. and Teixeira, A. R. (2004) '*Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family', *J Biol Chem*, 279(19), pp. 19607-13.

- Flower, D. R. (2000) 'Experimentally determined lipocalin structures', *Biochim Biophys Acta*, 1482(1-2), pp. 46-56.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier, C. and Almeras, L. (2011) 'Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions', *Parasit Vectors*, 4, pp. 187.
- Francischetti, I. M., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2002) 'Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides', *Biochemistry*, 41(11), pp. 3810-8.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. (2004) 'Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*', *Thromb Haemost*, 91(5), pp. 886-98.
- Francischetti, I. M., Meng, Z., Mans, B. J., Gudderra, N., Hall, M., Veenstra, T. D., Pham, V. M., Kotsyfakis, M. and Ribeiro, J. M. (2008) 'An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*', *J Proteomics*, 71(5), pp. 493-512.
- Francischetti, I. M., Ribeiro, J. M., Champagne, D. and Andersen, J. (2000) 'Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*', *J Biol Chem*, 275(17), pp. 12639-50.
- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M. and Ribeiro, J. M. (2009) 'The role of saliva in tick feeding', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14(6), pp. 2051-88.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. (2002a) 'Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex', *Blood*, 99(10), pp. 3602-12.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Garfield, M. K. and Ribeiro, J. M. (2002b) 'Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*', *J Exp Biol*, 205(Pt 16), pp. 2429-51.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (1999) 'Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition', *Biochemistry*, 38(50), pp. 16678-85.
- Friedrich, T., Kröger, B., Bialojan, S., Lemaire, H. G., Höffken, H. W., Reuschenbach, P., Otte, M. and Dodt, J. (1993) 'A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*', *J Biol Chem*, 268(22), pp. 16216-22.

Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W. D., Huber, R. and Bode, W. (1997) 'Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22), pp. 11845-50.

Gardell, S. J., Duong, L. T., Diehl, R. E., York, J. D., Hare, T. R., Register, R. B., Jacobs, J. W., Dixon, R. A. and Friedman, P. A. (1989) 'Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator', *J Biol Chem*, 264(30), pp. 17947-52.

Goldsack, N. R., Chambers, R. C., Dabbagh, K. and Laurent, G. J. (1998) 'Thrombin', *Int J Biochem Cell Biol*, 30(6), pp. 641-6.

Golodne, D. M., Monteiro, R. Q., Graca-Souza, A. V., Silva-Neto, M. A. and Atella, G. C. (2003) 'Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*', *J Biol Chem*, 278(30), pp. 27766-71.

Grevelink, S. A., Osborne, J., Loscalzo, J. and Lerner, E. A. (1995) 'Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan', *J Pharmacol Exp Ther*, 272(1), pp. 33-7.

Grütter, M. G., Priestle, J. P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J. and Stone, S. R. (1990) 'Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition', *EMBO J*, 9(8), pp. 2361-5.

Gudderra, N. P., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2005) 'Structural determinants of factor IX(a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the intrinsic coagulation pathway', *J Biol Chem*, 280(26), pp. 25022-8.

Haendler, B., Becker, A., Noeske-Jungblut, C., Krätzschmar, J., Donner, P. and Schleuning, W. D. (1995) 'Expression of active recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor, in the periplasm of *Escherichia coli*', *Biochem J*, 307 (Pt 2), pp. 465-70.

Hales, J. R., Schleger, A. V., Kemp, D. H. and Fawcett, A. A. (1981) 'Cutaneous hyperaemia elicited by larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*', *Aust J Biol Sci*, 34(1), pp. 37-46.

Hawkins, R. I. and Hellmann, K. (1966) 'Investigations on a plasminogen activator in two blood-suckers, *Rhodnius prolixus* Stål and *Hirudo medicinalis*', *Br J Haematol*, 12(1), pp. 86-91.

Hayashi, H., Kyushiki, H., Nagano, K., Sudo, T., Matsuoka, H. and Yoshida, S. (2012) 'Anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects in vivo without compromising hemostasis', *Thromb Res*, 129(2), pp. 169-75.

He, C. and Knipp, M. (2009) 'Formation of nitric oxide from nitrite by the ferriheme b protein nitrophorin 7', *J Am Chem Soc*, 131(34), pp. 12042-3.

He, X. M., Liu, L. and Cheng, T. Y. (2019) 'HSC70 from *Haemaphysalis flava* (Acari: Ixodidae) exerts anticoagulation activity in vitro', *Ticks Tick Borne Dis*, 10(1), pp. 170-175.

Hekmat-Scafe, D. S., Dorit, R. L. and Carlson, J. R. (2000) 'Molecular evolution of odorant-binding protein genes OS-E and OS-F in *Drosophila*', *Genetics*, 155(1), pp. 117-27.

HELLMANN, K. and HAWKINS, R. I. (1964) 'ANTICOAGULANT AND FIBRINOLYTIC ACTIVITIES FROM RHODNIUS PROLIXUS STAL', *Nature*, 201, pp. 1008-9.

Hoffmann, A., Walsmann, P., Riesener, G., Paintz, M. and Markwardt, F. (1991) 'Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*', *Pharmazie*, 46(3), pp. 209-12.

Horn, F., dos Santos, P. C. and Termignoni, C. (2000) 'Boophilus microplus anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva', *Arch Biochem Biophys*, 384(1), pp. 68-73.

Ibelli, A. M., Kim, T. K., Hill, C. C., Lewis, L. A., Bakshi, M., Miller, S., Porter, L. and Mulenga, A. (2014) 'A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting', *Int J Parasitol*, 44(6), pp. 369-79.

Isawa, H., Yuda, M., Orito, Y. and Chinzei, Y. (2002) 'A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen', *J Biol Chem*, 277(31), pp. 27651-8.

Isawa, H., Yuda, M., Yoneda, K. and Chinzei, Y. (2000) 'The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway', *J Biol Chem*, 275(9), pp. 6636-41.

Ishimaru, Y., Gomez, E. A., Zhang, F., Martini-Robles, L., Iwata, H., Sakurai, T., Katakura, K., Hashiguchi, Y. and Kato, H. (2012) 'Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease', *J Exp Biol*, 215(Pt 20), pp. 3597-602.

Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M. and Chinzei, Y. (2003) 'Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*', *Eur J Biochem*, 270(9), pp. 1926-34.

Jablonka, W., Kotsyfakis, M., Mizurini, D. M., Monteiro, R. Q., Lukszo, J., Drake, S. K., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2015) 'Identification and Mechanistic Analysis of a Novel Tick-Derived Inhibitor of Thrombin', *PLoS One*, 10(8), pp. e0133991.

Jacobs, J. W., Cupp, E. W., Sardana, M. and Friedman, P. A. (1990) 'Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands', *Thromb Haemost*, 64(2), pp. 235-8.

James, A. A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C. R. and Racioppi, J. V. (1991) 'Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*', *Mol Biochem Parasitol*, 44(2), pp. 245-53.

- James, A. A. and Rossignol, P. A. (1991) 'Mosquito salivary glands: Parasitological and molecular aspects', *Parasitol Today*, 7(10), pp. 267-71.
- Joubert, A. M., Crause, J. C., Gaspar, A. R., Clarke, F. C., Spickett, A. M. and Neitz, A. W. (1995) 'Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*', *Exp Appl Acarol*, 19(2), pp. 79-92.
- Karczewski, J., Endris, R. and Connolly, T. M. (1994) 'Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*', *J Biol Chem*, 269(9), pp. 6702-8.
- Karczewski, J., Waxman, L., Endris, R. G. and Connolly, T. M. (1995) 'An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen', *Biochem Biophys Res Commun*, 208(2), pp. 532-41.
- Kato, J., Tsuruda, T., Kita, T., Kitamura, K. and Eto, T. (2005) 'Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(12), pp. 2480-7.
- Kawahori, S., Seki, C., Mizushima, D., Tabbabi, A., Yamamoto, D. S. and Kato, H. (2022) 'Ayaconin, a novel inhibitor of the plasma contact system from the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis', *Acta Trop*, 234, pp. 106602.
- Keller, P. M., Waxman, L., Arnold, B. A., Schultz, L. D., Condra, C. and Connolly, T. M. (1993) 'Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation', *J Biol Chem*, 268(8), pp. 5450-6.
- Kemp, D. H., Hales, J. R., Schleger, A. V. and Fawcett, A. A. (1983) 'Comparison of cutaneous hyperemia in cattle elicited by larvae of *Boophilus microplus* and by prostaglandins and other mediators', *Experientia*, 39(7), pp. 725-7.
- Kim, T. K., Tirloni, L., Radulovic, Z., Lewis, L., Bakshi, M., Hill, C., da Silva Vaz, I., Logullo, C., Termignoni, C. and Mulenga, A. (2015) 'Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions', *Int J Parasitol*, 45(9-10), pp. 613-27.
- Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H. H. and Turner, P. C. (2004) 'A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*', *Gene*, 342(2), pp. 243-9.
- Lancaster, J. R., Jr. (1994) 'Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(17), pp. 8137-41.
- Lavoipierre, M. M., Dickerson, G. and Gordon, R. M. (1959) 'Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers', *Ann Trop Med Parasitol*, 53, pp. 235-50.

Lefteri, D. A., Bryden, S. R., Pinggen, M., Terry, S., McCafferty, A., Beswick, E. F., Georgiev, G., Van der Laan, M., Mastrullo, V., Campagnolo, P., Waterhouse, R. M., Varjak, M., Merits, A., Fragkoudis, R., Griffin, S., Shams, K., Pondeville, E. and McKimmie, C. S. (2022) 'Mosquito saliva enhances virus infection through sialokinin-dependent vascular leakage', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(24), pp. e2114309119.

Lerner, E. A., Ribeiro, J. M., Nelson, R. J. and Lerner, M. R. (1991) 'Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*', *J Biol Chem*, 266(17), pp. 11234-6.

Lerner, E. A. and Shoemaker, C. B. (1992) 'Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide', *J Biol Chem*, 267(2), pp. 1062-6.

Li, X. P., Lin, D., Zhang, Y., Chen, S. Q., Bai, H. Q., Zhang, S. N., Liu, W. Q. and Liang, S. H. (2020) 'Expression and characterization of anticoagulant activity of salivary protein aALP from Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*', *Trop Biomed*, 37(1), pp. 116-126.

Limo, M. K., Voigt, W. P., Tumbo-Oeri, A. G., Njogu, R. M. and ole-MoiYoi, O. K. (1991) 'Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*', *Exp Parasitol*, 72(4), pp. 418-29.

Liu, V. W. and Huang, P. L. (2008) 'Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice', *Cardiovasc Res*, 77(1), pp. 19-29.

Lovato, D. V., Nicolau de Campos, I. T., Amino, R. and Tanaka, A. S. (2006) 'The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity', *Biochimie*, 88(6), pp. 673-81.

Lu, S., Martin-Martin, I., Ribeiro, J. M. and Calvo, E. (2022) 'A deeper insight into the sialome of male and female *Ochlerotatus triseriatus* mosquitoes', *Insect Biochem Mol Biol*, 147, pp. 103800.

Lu, S., Tirloni, L., Oliveira, M. B., Bosio, C. F., Nardone, G. A., Zhang, Y., Hinnebusch, B. J., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2021) 'Identification of a substrate-like cleavage-resistant thrombin inhibitor from the saliva of the flea *Xenopsylla cheopis*', *J Biol Chem*, 297(5), pp. 101322.

Ma, D., Assumpção, T. C., Li, Y., Andersen, J. F., Ribeiro, J. and Francischetti, I. M. (2012) 'Triplatin, a platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the triatomine vector of Chagas disease, binds to TXA(2) but does not interact with glycoprotein PVI', *Thromb Haemost*, 107(1), pp. 111-23.

Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B. M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P. and Pereira, P. J. (2008) 'Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick', *PLoS One*, 3(2), pp. e1624.

- Malinconico, S. M., Katz, J. B. and Budzynski, A. Z. (1984) 'Hementin: anticoagulant protease from the salivary gland of the leech *Haementeria ghilianii*', *J Lab Clin Med*, 103(1), pp. 44-58.
- Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G. and Ribeiro, J. M. (2008) 'Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family', *Insect Biochem Mol Biol*, 38(1), pp. 22-41.
- Mans, B. J., Calvo, E., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2007) 'The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*', *J Biol Chem*, 282(50), pp. 36626-33.
- Mans, B. J., Gaspar, A. R., Louw, A. I. and Neitz, A. W. (1998) 'Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae)', *Exp Appl Acarol*, 22(6), pp. 353-66.
- Mans, B. J., Louw, A. I. and Neitz, A. W. (2002) 'Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold', *J Biol Chem*, 277(24), pp. 21371-8.
- Mans, B. J. and Neitz, A. W. (2004) 'Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective', *Insect Biochem Mol Biol*, 34(1), pp. 1-17.
- Mans, B. J. and Ribeiro, J. M. (2008) 'Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins', *Insect Biochem Mol Biol*, 38(9), pp. 841-52.
- Mant, M. J. and Parker, K. R. (1981) 'Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation', *Br J Haematol*, 48(4), pp. 601-8.
- Marshall, N. A., Chapman, M. D. and Saxon, A. (1986) 'Species-specific allergens from the salivary glands of Triatominae (Heteroptera:Reduviidae)', *J Allergy Clin Immunol*, 78(3 Pt 1), pp. 430-5.
- Martin-Martin, I., Kern, O., Brooks, S., Smith, L. B., Valenzuela-Leon, P. C., Bonilla, B., Ackerman, H. and Calvo, E. (2021) 'Biochemical characterization of AeD7L2 and its physiological relevance in blood feeding in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*', *FEBS J*, 288(6), pp. 2014-2029.
- Martin-Martin, I., Paige, A., Valenzuela Leon, P. C., Gittis, A. G., Kern, O., Bonilla, B., Chagas, A. C., Ganesan, S., Smith, L. B., Garboczi, D. N. and Calvo, E. (2020a) 'ADP binding by the *Culex quinquefasciatus* mosquito D7 salivary protein enhances blood feeding on mammals', *Nat Commun*, 11(1), pp. 2911.
- Martin-Martin, I., Smith, L. B., Chagas, A. C., Sa-Nunes, A., Shrivastava, G., Valenzuela-Leon, P. C. and Calvo, E. (2020b) '*Aedes albopictus* D7 Salivary Protein Prevents Host Hemostasis and Inflammation', *Biomolecules*, 10(10).

Martin-Martin, I., Valenzuela Leon, P. C., Amo, L., Shrivastava, G., Iniguez, E., Aryan, A., Brooks, S., Kojin, B. B., Williams, A. E., Bolland, S., Ackerman, H., Adelman, Z. N. and Calvo, E. (2022) 'Aedes aegypti sialokinin facilitates mosquito blood feeding and modulates host immunity and vascular biology', *Cell Rep*, 39(2), pp. 110648.

Masoud, H. M. M., Helmy, M. S., Darwish, D. A., Abdel-Monsef, M. M. and Ibrahim, M. A. (2020) 'Apyrase with anti-platelet aggregation activity from the nymph of the camel tick *Hyalomma dromedarii*', *Exp Appl Acarol*, 80(3), pp. 349-361.

Mende, K., Lange, U. and Nowak, G. (2004) 'Three recombinant serine proteinase inhibitors expressed from the coding region of the thrombin inhibitor dipetalogastin', *Insect Biochem Mol Biol*, 34(9), pp. 971-9.

Mende, K., Petoukhova, O., Koulitchkova, V., Schaub, G. A., Lange, U., Kaufmann, R. and Nowak, G. (1999) 'Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. Dipetalogaster maximus cDNA cloning, expression and characterization', *Eur J Biochem*, 266(2), pp. 583-90.

Montfort, W. R., Weichsel, A. and Andersen, J. F. (2000) 'Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods', *Biochim Biophys Acta*, 1482(1-2), pp. 110-8.

Moro, O. and Lerner, E. A. (1997) 'Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist', *J Biol Chem*, 272(2), pp. 966-70.

Mulenga, A., Kim, T. K. and Ibelli, A. M. (2013) 'Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein', *Int J Parasitol*, 43(6), pp. 439-51.

Munro, R., Jones, C. P. and Sawyer, R. T. (1991) 'Calin--a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech', *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2(1), pp. 179-84.

Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M. and Fikrig, E. (2002) 'A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*', *Insect Mol Biol*, 11(6), pp. 641-50.

Narasimhan, S., Perez, O., Mootien, S., DePonte, K., Koski, R. A., Fikrig, E. and Ledizet, M. (2013) 'Characterization of Ixophilin, a thrombin inhibitor from the gut of *Ixodes scapularis*', *PLoS One*, 8(7), pp. e68012.

Nash, W. G., Kamerow, H. N. and Merrill, C. R. (1983) 'Identification of a yellow gene-specific protein in *Drosophila melanogaster* by two-dimensional gel electrophoresis', *Biochem Genet*, 21(11-12), pp. 1135-42.

Nienaber, J., Gaspar, A. R. and Neitz, A. W. (1999) 'Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae)', *Exp Parasitol*, 93(2), pp. 82-91.

Noeske-Jungblut, C., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L. and Schleuning, W. D. (1995) 'Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin', *J Biol Chem*, 270(48), pp. 28629-34.

Nussenzveig, R. H., Bentley, D. L. and Ribeiro, J. M. (1995) 'Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*', *J Exp Biol*, 198(Pt 5), pp. 1093-8.

Oliveira, K. A., Torquato, R. J. S., Lustosa, D., Ribeiro, T., Nascimento, B. W. L., de Oliveira, L. C. G., Juliano, M. A., Paschoalin, T., Lemos, V. S., Araujo, R. N., Pereira, M. H. and Tanaka, A. S. (2021) 'Proteolytic activity of *Triatoma infestans* saliva associated with PAR-2 activation and vasodilation', *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 27, pp. e20200098.

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A. and Stuart, D. I. (1999) 'Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure', *Mol Cell*, 3(5), pp. 661-71.

Pirone, L., Ripoll-Rozada, J., Leone, M., Ronca, R., Lombardo, F., Fiorentino, G., Andersen, J. F., Pereira, P. J. B., Arcà, B. and Pedone, E. (2017) 'Functional analyses yield detailed insight into the mechanism of thrombin inhibition by the antihemostatic salivary protein cE5 from', *J Biol Chem*, 292(30), pp. 12632-12642.

Rafikov, R., Fonseca, F. V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D. and Black, S. M. (2011) 'eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity', *J Endocrinol*, 210(3), pp. 271-84.

Reck, J., Berger, M., Terra, R. M., Marks, F. S., da Silva Vaz, I., Guimarães, J. A. and Termignoni, C. (2009) 'Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation', *Res Vet Sci*, 86(1), pp. 56-62.

Reddy, V. B., Kouniga, K., Mariano, F. and Lerner, E. A. (2000) 'Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly', *J Biol Chem*, 275(21), pp. 15861-7.

Repke, H., Piotrowski, W., Bienert, M. and Foreman, J. C. (1987) 'Histamine release induced by Arg-Pro-Lys-Pro(CH₂)₁₁CH₃ from rat peritoneal mast cells', *J Pharmacol Exp Ther*, 243(1), pp. 317-21.

Ribeiro, J. (2011) *Vector-Borne Diseases: Biology Of Vector Host Relationship: Grantome*. Available at: <https://grantome.com/grant/NIH/ZIA-AI000810-15> (Accessed: September 30th 2022).

Ribeiro, J. M. (1987) 'Role of saliva in blood-feeding by arthropods', *Annu Rev Entomol*, 32, pp. 463-78.

Ribeiro, J. M. (1988) 'The midgut hemolysin of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae)', *J Parasitol*, 74(4), pp. 532-7.

Ribeiro, J. M. (1989) 'Role of saliva in tick/host interactions', *Exp Appl Acarol*, 7(1), pp. 15-20.

- Ribeiro, J. M. (1992) 'Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*', *J Exp Biol*, 165, pp. 61-71.
- Ribeiro, J. M. (1995a) 'Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?', *Infect Agents Dis*, 4(3), pp. 143-52.
- Ribeiro, J. M. (1995b) 'How ticks make a living', *Parasitol Today*, 11(3), pp. 91-3.
- Ribeiro, J. M., Endris, T. M. and Endris, R. (1991) 'Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities', *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 100(1), pp. 109-12.
- Ribeiro, J. M., Evans, P. M., MacSwain, J. L. and Sauer, J. (1992) 'Amblyomma americanum: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry', *Exp Parasitol*, 74(1), pp. 112-6.
- Ribeiro, J. M. and Francischetti, I. M. (2001) 'Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*', *J Exp Biol*, 204(Pt 22), pp. 3887-94.
- Ribeiro, J. M. and Francischetti, I. M. (2003) 'Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives', *Annu Rev Entomol*, 48, pp. 73-88.
- Ribeiro, J. M. and Garcia, E. S. (1981) 'Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*', *Experientia*, 37(4), pp. 384-6.
- Ribeiro, J. M., Hazzard, J. M., Nussenzweig, R. H., Champagne, D. E. and Walker, F. A. (1993) 'Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect', *Science*, 260(5107), pp. 539-41.
- Ribeiro, J. M., Katz, O., Pannell, L. K., Waitumbi, J. and Warburg, A. (1999) 'Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP', *J Exp Biol*, 202(Pt 11), pp. 1551-9.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R. and Spielman, A. (1985) 'Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*', *J Exp Med*, 161(2), pp. 332-44.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T. and Robinson, D. R. (1988) '*Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion', *J Parasitol*, 74(6), pp. 1068-9.
- Ribeiro, J. M., Marinotti, O. and Gonzales, R. (1990) 'A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*', *Br J Pharmacol*, 101(4), pp. 932-6.
- Ribeiro, J. M., Martin-Martin, I., Arca, B. and Calvo, E. (2016) 'A Deep Insight into the Sialome of Male and Female *Aedes aegypti* Mosquitoes', *PLoS One*, 11(3), pp. e0151400.

- Ribeiro, J. M. and Modi, G. (2001) 'The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar', *J Parasitol*, 87(4), pp. 915-7.
- Ribeiro, J. M. and Nussenzveig, R. H. (1993a) 'Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland', *FEBS Lett*, 330(2), pp. 165-8.
- Ribeiro, J. M. and Nussenzveig, R. H. (1993b) 'The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*', *J Exp Biol*, 179, pp. 273-87.
- Ribeiro, J. M., Nussenzveig, R. H. and Tortorella, G. (1994) 'Salivary vasodilators of *Aedes triseriatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)', *J Med Entomol*, 31(5), pp. 747-53.
- Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A. and Spielman, A. (1986) 'Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*', *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 83(4), pp. 683-6.
- Ribeiro, J. M. and Walker, F. A. (1994) 'High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*', *J Exp Med*, 180(6), pp. 2251-7.
- Ribeiro, J. M. a. A. B. (2009) 'From Sialomes to the Sialoverse: An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects', *Advances in Insect Physiology*: ELSEVIER, pp. 59-118.
- Ribeiro, J. M. C. and Arca, B. (2009) 'From Sialomes to the Sialoverse : An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects', in Casas, S.J.S.J. (ed.) *Advances in Insect Biology*: AP, pp. 59-118.
- Ryan, T. J. (1976) 'The blood vessels of the skin', *J Invest Dermatol*, 67(1), pp. 110-8.
- Sangamnatdej, S., Paesen, G. C., Slovak, M. and Nuttall, P. A. (2002) 'A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva', *Insect Mol Biol*, 11(1), pp. 79-86.
- Schwarz, A., Medrano-Mercado, N., Schaub, G. A., Struchiner, C. J., Bargues, M. D., Levy, M. Z. and Ribeiro, J. M. (2014) 'An updated insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations', *PLoS Negl Trop Dis*, 8(12), pp. e3372.
- Seymour, J. L., Henzel, W. J., Nevins, B., Stults, J. T. and Lazarus, R. A. (1990) 'Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*', *J Biol Chem*, 265(17), pp. 10143-7.
- Sheng, X., Gao, L., Lu, X., Wang, Y., Han, Y., Meng, P., Chen, W. and Lu, Q. (2017) 'Expression and characterization of a fibrinogenolytic enzyme from horsefly salivary gland', *Protein Expr Purif*, 129, pp. 135-142.

- Sima, M., Novotny, M., Pravda, L., Sumova, P., Rohousova, I. and Volf, P. (2016) 'The Diversity of Yellow-Related Proteins in Sand Flies (Diptera: Psychodidae)', *PLoS One*, 11(11), pp. e0166191.
- Smith, L. B., Duge, E., Valenzuela-Leon, P. C., Brooks, S., Martin-Martin, I., Ackerman, H. and Calvo, E. (2022) 'Novel salivary antihemostatic activities of long-form D7 proteins from the malaria vector *Anopheles gambiae* facilitate hematophagy', *J Biol Chem*, 298(6), pp. 101971.
- Soares, M. B., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R. and Bozza, M. (1998) 'The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- α and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor', *J Immunol*, 160(4), pp. 1811-6.
- Spitzova, T., Sumova, P., Volfova, V., Polanska, N., Poctova, L. and Volf, P. (2020) 'Interactions between host biogenic amines and sand fly salivary yellow-related proteins', *Parasit Vectors*, 13(1), pp. 237.
- Stark, K. R. and James, A. A. (1995) 'A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*', *Exp Parasitol*, 81(3), pp. 321-31.
- Sumova, P., Sima, M., Kalouskova, B., Polanska, N., Vanek, O., Oliveira, F., Valenzuela, J. G. and Volf, P. (2019) 'Amine-binding properties of salivary yellow-related proteins in phlebotomine sand flies', *Insect Biochem Mol Biol*, 115, pp. 103245.
- Swadesh, J. K., Huang, I. Y. and Budzynski, A. Z. (1990) 'Purification and characterization of hementin, a fibrinogenolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii*', *J Chromatogr*, 502(2), pp. 359-69.
- Sá-Nunes, A., Báfica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. and Francischetti, I. M. (2007) 'Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva', *J Immunol*, 179(3), pp. 1497-505.
- Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H. and Sommerhoff, C. P. (1994) 'Isolation and characterization of hirustasin, an antistasin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*', *Eur J Biochem*, 219(3), pp. 937-43.
- Tirloni, L., Kim, T. K., Coutinho, M. L., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., Mulenga, A. and da Silva Vaz, I. (2016) 'The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship', *Insect Biochem Mol Biol*, 71, pp. 12-28.
- Tsujimoto, H., Kotsyfakis, M., Francischetti, I. M., Eum, J. H., Strand, M. R. and Champagne, D. E. (2012) 'Simukunin from the salivary glands of the black fly *Simulium vittatum* inhibits enzymes that regulate clotting and inflammatory responses', *PLoS One*, 7(2), pp. e29964.

Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E. and Ribeiro, J. M. (2001) 'The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases', *J Exp Biol*, 204(Pt 2), pp. 229-37.

Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M. and Ribeiro, J. M. (1999) 'Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*', *Biochemistry*, 38(34), pp. 11209-15.

Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Garfield, M. K., Francischetti, I. M. and Ribeiro, J. M. (2002) 'Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*', *Insect Biochem Mol Biol*, 32(9), pp. 1101-22.

Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (1998) 'Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipteran *Cimex lectularius*', *J Exp Biol*, 201(Pt 18), pp. 2659-64.

Valenzuela, J. G., Walker, F. A. and Ribeiro, J. M. (1995) 'A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*', *J Exp Biol*, 198(Pt 7), pp. 1519-26.

van de Locht, A., Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Friedrich, T., Kröger, B., Höffken, W. and Bode, W. (1995) 'Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin', *EMBO J*, 14(21), pp. 5149-57.

van de Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W. and Huber, R. (1996) 'The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?', *EMBO J*, 15(22), pp. 6011-7.

Vlasuk, G. P., Ramjit, D., Fujita, T., Dunwiddie, C. T., Nutt, E. M., Smith, D. E. and Shebuski, R. J. (1991) 'Comparison of the in vivo anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis', *Thromb Haemost*, 65(3), pp. 257-62.

Wang, X., Coons, L. B., Taylor, D. B., Stevens, S. E. and Gartner, T. K. (1996) 'Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*', *J Biol Chem*, 271(30), pp. 17785-90.

Watanabe, R. M., Soares, T. S., Morais-Zani, K., Tanaka-Azevedo, A. M., Maciel, C., Capurro, M. L., Torquato, R. J. and Tanaka, A. S. (2010) 'A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity', *Biochimie*, 92(8), pp. 933-9.

Watanabe, R. M., Tanaka-Azevedo, A. M., Araujo, M. S., Juliano, M. A. and Tanaka, A. S. (2011) 'Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity', *Biochimie*, 93(3), pp. 618-23.

Waxman, L. and Connolly, T. M. (1993) 'Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*', *J Biol Chem*, 268(8), pp. 5445-9.

Waxman, L., Smith, D. E., Arcuri, K. E. and Vlasuk, G. P. (1990) 'Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa', *Science*, 248(4955), pp. 593-6.

Weichsel, A., Andersen, J. F., Champagne, D. E., Walker, F. A. and Montfort, W. R. (1998) 'Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect', *Nat Struct Biol*, 5(4), pp. 304-9.

Williams, T. J. (1979) 'Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation', *Br J Pharmacol*, 65(3), pp. 517-24.

Xavier, M. A., Tirloni, L., Torquato, R., Tanaka, A., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., da Silva Vaz, I., Seixas, A. and Termignoni, C. (2019) 'Blood anticlotting activity of a Rhipicephalus microplus cathepsin L-like enzyme', *Biochimie*, 163, pp. 12-20.

Xu, X., Oliveira, F., Chang, B. W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., My Pham, V., Elnaïem, D. E., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G. and Andersen, J. F. (2011) 'Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection', *J Biol Chem*, 286(37), pp. 32383-93.

Xu, X., Yang, H., Ma, D., Wu, J., Wang, Y., Song, Y., Wang, X., Lu, Y., Yang, J. and Lai, R. (2008) 'Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands', *Mol Cell Proteomics*, 7(3), pp. 582-90.

Yoshida, S., Sudo, T., Niimi, M., Tao, L., Sun, B., Kambayashi, J., Watanabe, H., Luo, E. and Matsuoka, H. (2008) 'Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito', *Blood*, 111(4), pp. 2007-14.

Zhang, D., Cupp, M. S. and Cupp, E. W. (2002) 'Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva', *Insect Biochem Mol Biol*, 32(3), pp. 321-30.

Zhang, Y., Ribeiro, J. M., Guimarães, J. A. and Walsh, P. N. (1998) 'Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex', *Biochemistry*, 37(30), pp. 10681-90.

Zhu, K., Bowman, A. S., Brigham, D. L., Essenberg, R. C., Dillwith, J. W. and Sauer, J. R. (1997) 'Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.)', *Exp Parasitol*, 87(1), pp. 30-8.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 18

Moléculas imunomoduladoras presentes na saliva de artrópodes hematófagos

Anderson Sá-Nunes¹
Carlo José Freire Oliveira²

¹Universidade de São Paulo, São Paulo.

²Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

Considerações iniciais

Durante sua alimentação, os artrópodes hematófagos enfrentam as barreiras fisiológicas presentes em seus hospedeiros vertebrados, que representam desafios ao sucesso do repasto sanguíneo. Esses desafios são: i) a homeostasia, representada por mecanismos que previnem a perda de sangue do organismo vertebrado; ii) a inflamação, reação aguda que pode produzir coceira ou dor e, assim, iniciar um comportamento defensivo em seus hospedeiros; e iii) a imunidade adaptativa, consequência de respostas celulares e humorais que se desenvolvem alguns dias após a primeira exposição, gerando memória contra exposições subsequentes.

Para lidar com essas barreiras, os artrópodes hematófagos possuem uma série de moléculas bioativas em sua saliva – particularmente lipídeos e proteínas – com atividades imunofarmacológicas complexas e sofisticadas que garantem o sucesso da alimentação sanguínea. Como alguns desses artrópodes hematófagos podem, também, carregar diferentes microrganismos/parasitas potencialmente patogênicos para o homem e outros animais (bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos), um efeito colateral indesejado das atividades da saliva é a facilitação ou o aumento da infectividade de patógenos nos hospedeiros parasitados. Esse fenômeno é conhecido como transmissão assistida pela saliva (SAT, do inglês *saliva-assisted transmission*) (Nuttall, 2019). Além disso, há evidências consistentes de que as barreiras presentes no hospedeiro representam uma pressão evolutiva para os artrópodes, atuando continuamente para a seleção de moléculas salivares (e também intestinais) capazes de combater, neutralizar ou modular os mediadores responsáveis por esses mecanismos fisiológicos. Por outro lado, as evidências de que a exposição às picadas desses artrópodes representa uma pressão seletiva para o hospedeiro vertebrado ainda são controversas.

Recentemente, nós propusemos alguns exemplos de exuberância fenotípica presentes no sistema imune de vertebrados, que parecem ter como causa direta a interação frequente e contínua com organismos hematófagos ectoparasitas e/ou endoparasitas ao longo de milhões de anos (Sá-Nunes, Oliveira and Ribeiro, 2020). Se confirmados, esses fenótipos extremos representarão evidências consistentes para afirmar, categoricamente, que há uma coevolução em andamento entre artrópodes hematófagos e seus hospedeiros vertebrados, baseada no conceito de “corrida armamentista” (Dawkins and Krebs, 1979).

Durante as décadas de 1980 e 1990, a identificação e caracterização de moléculas bioativas presentes na saliva de artrópodes hematófagos ocorreu por meio de técnicas bioquímicas clássicas, envolvendo etapas de purificação a partir de preparações brutas (saliva ou extrato de glândula salivar), triagem das frações em bioensaios *in vitro* e caracterização da(s) molécula(s) presente(s) nas frações ativas. Embora efetiva, essa abordagem consome um tempo considerável para sua execução e, em geral, necessita de grande quantidade de material bruto para ser realizada. Porém, avanços e otimizações em técnicas de biologia molecular (sequenciamento de última geração), de identificação de moléculas (espectrometria de massas) e o desenvolvimento da bioinformática trouxeram uma revolução nessa área, ao permitir a identificação de potenciais moléculas bioativas em larga escala.

A caracterização de proteomas e de lipidomas salivares, bem como o sequenciamento dos transcriptomas das glândulas salivares e dos genomas das espécies de artrópodes hematófagos são cada vez mais comuns, e anteciparam a descoberta de novas moléculas salivares, cujas atividades biológicas seriam posteriormente caracterizadas. Em alguns casos, a síntese química ou expressão em sistema heterólogo garante a produção de altas quantidades dessas moléculas para estudos prospectivos e de determinação de seus mecanismos de ação. Esses trabalhos aceleraram não somente a elucidação das atividades de moléculas pertencentes a grupos/famílias já conhecidos, mas também a descoberta de novas atividades para moléculas previamente descritas, além da caracterização da função de moléculas bioativas ainda desconhecidas.

Com base nesse conhecimento, o presente capítulo tem como objetivo apresentar um catálogo atualizado das moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de artrópodes hematófagos, e que são importantes para sua manutenção no hospedeiro. Ainda, discutiremos o potencial dessas moléculas quanto a sua relevância clínica e as perspectivas de sua utilização do ponto de vista farmacêutico e biotecnológico. A discussão das atividades dessas moléculas incluirá seu potencial uso no controle e na modulação das reações imunológicas dos hospedeiros vertebrados, permitindo a compreensão de seu papel para um repasto sanguíneo de melhor qualidade e em maior quantidade, e ao mesmo tempo em que favorecem a transmissão de patógenos por esses vetores. Por limitações de espaço, não abordaremos as atividades de preparações totais ou brutas (saliva, extrato ou sonificado de glândulas salivares, etc), que poderão ser consultadas em diversas revisões da literatura (Gillespie, Mbow and Titus, 2000; Schoeler and Wikel, 2001; Peterková *et al.*, 2008; Abdeladhim, Kamhawi and Valenzuela, 2014).

Adicionalmente, há um número considerável de componentes derivados desses artrópodes capazes, também, de atuar na hemostasia. Essas moléculas foram descritas no Capítulo 17 “*Anti-Hemostáticos da Saliva e Intestino de Artrópodes Hematófagos: Estrutura e Função*”. No presente capítulo, nosso foco será inteiramente nas moléculas salivares isoladas, com ações comprovadas no sistema imunológico do hospedeiro vertebrado e restritas aos principais grupos de artrópodes hematófagos de importância médica e veterinária: carrapatos, mosquitos, triatomíneos e flebotomíneos.

Resposta imune do hospedeiro

As respostas imunológicas dos vertebrados mandibulados são, didaticamente, divididas em inatas (ou naturais) e adquiridas (ou adaptativas). As respostas imunes inatas ocorrem imediatamente ou pouco depois do primeiro contato com o agente agressor. Já as respostas imunes adaptativas se estabelecem entre uma e duas semanas após o primeiro contato, e seus mecanismos efetores são mediados por células denominadas linfócitos e seus produtos (por exemplo, os anticorpos). As células e moléculas que participam de ambas as respostas podem atuar diretamente sobre o agente agressor ou atuar amplificando a ação de componentes já presentes no local. As respostas imunes inatas e adquiridas induzidas pela penetração das peças bucais de um artrópode hematófago na pele e a inoculação de sua saliva no hospedeiro são multimedidas.

A espécie hospedeira na qual o repasto está ocorrendo, o fundo genético (*background*) desse hospedeiro e a existência (ou não) de contato prévio com o artrópode determinarão diferentes perfis de resposta imunológica a serem desencadeadas. Da mesma forma, a espécie do artrópode que está se alimentando, a composição de sua saliva e o tempo do repasto são outros aspectos que contribuem com o fenótipo da resposta. Isso porque há uma grande variabilidade das estratégias de hematofagia na natureza, entre elas, a alimentação direta no vaso (solenofagia ou *capillary feeding* no inglês) ou na poça/bolsão/piscina formada pela laceração do vaso (telmofagia ou *pool feeding* no inglês) – ver detalhes no Capítulo 17.

Explicaremos, de forma resumida, a sequência de eventos típicos da resposta imunológica que ocorre em um mamífero em decorrência da alimentação de artrópodes hematófagos na pele, apresentando as células e moléculas envolvidas na reação inflamatória local. Também apresentaremos como essas reações, inicialmente locais, se tornam sistêmicas ao longo do tempo,

e passam a exibir memória imunológica, um fenômeno característico das respostas adaptativas. Algumas variações nas reações imunológicas do hospedeiro, dependendo do tipo de artrópode hematófago que causa a agressão (por exemplo, carrapatos, mosquitos, flebótomos, triatomíneos, etc.), também serão mencionadas.

Embora se acredite que as respostas de outros vertebrados não mamíferos a exposições aos artrópodes hematófagos sejam semelhantes, não é possível extrapolar, o quanto essa exata sequência de eventos, de fato, ocorre. Muito pouco se conhece sobre os elementos e reações cutâneas nesses organismos, tampouco os detalhes da sua interação com os artrópodes hematófagos de uma perspectiva imunológica.

A pele é a interface primária entre o corpo e o ambiente. Ela forma uma barreira ativa que proporciona a primeira linha de defesa imunológica contra infecções e infestações (Nestle et al., 2009). Quando insere suas peças bucais na pele, o artrópode hematófago encontra uma barreira física (as camadas da epiderme e derme, além da firme adesão de suas células estruturais) e, também, barreiras químicas e biológicas presentes nesse tecido: ácidos graxos e secreções sebáceas, a microbiota natural, as enzimas e as moléculas antimicrobianas presentes nas secreções. Quando há uma quebra dessas barreiras, uma série de elementos do sistema imune cutâneo entra em ação. Células residentes do tecido são ativadas pela lesão física gerada pela inserção das peças bucais, por eventuais microrganismos introduzidos durante o repasto (tanto aqueles presentes na microbiota natural do hospedeiro e do vetor quanto os patogênicos transmitidos pelo vetor) e por elementos da saliva inoculada no local. Dentre essas células residentes, estão os mastócitos e os macrófagos.

Os mastócitos são células de alarme, que podem liberar uma gama de mediadores pré-formados de seus grânulos citoplasmáticos, como aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteoglicanos, serinoproteases, sulfatases e citocinas inflamatórias. Esses mediadores causam alterações vasculares, iniciando um processo inflamatório. Após a ativação desencadeada pelo processo de desgranulação, os mastócitos também são capazes de produzir mediadores recém-sintetizados, como fatores de crescimento, quimiocinas e mediadores lipídicos, que ativarão o endotélio e recrutarão células inflamatórias para o local da lesão (Metcalfe, Baram and Mekori, 1997). Já foram descritas dezenas de moléculas salivares dos artrópodes hematófagos capazes de se ligar a esses mediadores e neutralizá-los (por ligação direta ou indiretamente por modulação dos mastócitos) e que serão descritas nas tabelas do presente capítulo, divididas por grupos de artrópodes hematófagos.

Os macrófagos são fagócitos presentes na pele que, ao reconhecerem patógenos ou sinais de lesão, são ativados e iniciam o processo de fagocitose (englobamento de moléculas, partículas ou microrganismos) e a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e lipídeos bioativos, bem como de radicais livres microbicidas (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, dentre outros) (Mantovani et al., 2004). Outras células imunes residentes da pele também possuem um papel importante na resposta inflamatória iniciada durante o repasto sanguíneo, dentre as quais citamos as células linfoides inatas, as células *natural killer*, os linfócitos T $\gamma\delta$ e, até mesmo, as células imunes não clássicas, como os queratinócitos.

Os fatores inflamatórios liberados pelas células residentes descritas causam o aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação na microcirculação local, além de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio desses vasos sanguíneos, favorecendo o recrutamento de células inflamatórias. Essas alterações vasculares levam ao extravasamento plasmático. Além disso, o fluido que chega ao tecido carrega moléculas solúveis presentes no sangue que podem iniciar cascatas de ativação com diversas consequências imunológicas. Dentre essas moléculas, destacam-se os componentes do sistema complemento, cuja ativação pode ser iniciada em resposta à lesão causada pelas peças bucais ou aos microrganismos eventualmente introduzidos no local do repasto.

Alguns componentes do sistema complemento têm como atividade a capacidade de induzir a desgranulação de mastócitos (anafilotoxinas), atrair fagócitos para o local (quimiotaxia), ligar-se a superfícies e a estruturas, aumentando sua fagocitose (opsonização). Ademais, geram poros que podem causar a lise de microrganismos (formação complexo de ataque a membrana) (Dunkelberger and Song, 2010). O resultado é um *feedback* positivo às atividades de mastócitos, macrófagos e outras células residentes, bem como a citotoxicidade direta aos microrganismos. Não por acaso, as ações dessas células e dos componentes do sistema complemento são contrabalanceadas por uma série de moléculas presentes na saliva dos artrópodes vetores, descritas em detalhes mais adiante.

A migração dessas células no tecido é direcionada pela presença de fatores quimiotáticos, tanto daqueles liberados diretamente pelas células quanto dos gerados pela ativação do sistema complemento. Em geral, as primeiras células que migram para o tecido são os neutrófilos, células fagocíticas altamente móveis capazes de fagocitar e degradar os agentes agressores, além de produzir várias citocinas e quimiocinas (Scapini et al., 2000). É importante notar também

que, mesmo considerando as diferenças quantitativas, os neutrófilos estão invariavelmente presentes no infiltrado inflamatório decorrente do repasto de todas as espécies de artrópodes hematófagos já estudadas, independentemente de pré-exposição. Posteriormente, outras células também podem migrar para o local do repasto, como, por exemplo os monócitos inflamatórios, que quando chegam ao tecido, podem se diferenciar em macrófagos e em subpopulações de células dendríticas. Porém, dentre os grupos de artrópodes hematófagos mais relevantes do ponto de vista de transmissão de doenças, apenas os carrapatos duros irão encontrar esses monócitos inflamatórios e suas células derivadas, pois seu repasto sanguíneo dura entre alguns dias e três semanas, dependendo da espécie. No caso dos carrapatos moles, triatomíneos, mosquitos, flebótomos e moscas hematófagas, que fazem repastos bem mais curtos, a chegada dessas células se dá em um momento em que o repasto não está mais acontecendo naquele local. Tem-se como exceção as situações em que o mesmo artrópode faz repastos curtos e sucessivos no mesmo hospedeiro (exemplo dos carrapatos moles e das moscas-do chifre, entre outros) ou em situações de alta exposição, quando o repasto de um novo artrópode pode ocorrer em um sítio de inflamação decorrente da exposição a um artrópode anterior (da mesma espécie ou de outra).

Células dendríticas também são fagócitos residentes presentes em grandes quantidades na epiderme (células de Langerhans) e da derme (células dendríticas dérmicas). Funcionalmente, as células dendríticas são capazes de produzir mediadores inflamatórios e microbicidas semelhantes aos macrófagos. Mas, ao contrário desses, as células dendríticas não permanecem na pele quando são ativadas. Elas passam por um processo de amadurecimento quando encontram agentes agressores e migram para os linfonodos, órgãos linfoides periféricos, onde ocorre a ativação dos linfócitos. Durante esse trajeto, as células dendríticas processam os antígenos que foram endocitados no tecido, e expõem fragmentos dos antígenos proteicos (peptídeos) ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Nos órgãos linfoides secundários, as células dendríticas apresentam aos linfócitos T os peptídeos processados a partir dos antígenos fagocitados na pele (em geral derivados de proteínas salivares dos artrópodes ou dos microrganismos que, eventualmente, estavam presentes no local do repasto).

Essa capacidade de migrar a partir de tecidos periféricos (como a pele) para os linfonodos drenantes e ativar os linfócitos T *naïve*, torna as células dendríticas as principais células apresentadoras de antígeno profissionais dos vertebrados (Sá-Nunes and Oliveira, 2021). É importante ressaltar que a saída de células dendríticas da pele nesse contexto inflamatório e/ou infeccioso, não deixa

a pele desguarnecida dessas sentinelas, já que há uma reposição a partir de células precursoras e monócitos inflamatórios. Esses são recrutados, como descrito anteriormente, e podem se diferenciar em novas células dendríticas. Desse modo, já foi demonstrado que a saliva de algumas espécies de artrópodes hematófagos afeta a biologia de células dendríticas. Porém, entre todos os grupos, os carrapatos duros são aqueles com o maior número de moduladores de células dendríticas já descritos e caracterizados na saliva (Sá-Nunes e Oliveira, 2021).

Os linfócitos T, que reconhecem os antígenos apresentados pelas células dendríticas, são ativados por um processo que depende de vários sinais, alguns concomitantes e outros sequenciais, que não serão detalhados aqui. Porém, o resultado líquido desse processo é que os linfócitos entram numa fase de proliferação (expansão clonal), gerando células-filhas com a mesma especificidade de reconhecimento antigênico, seguido de diferenciação em células efetoras. Após alguns dias, essas células deixarão os linfonodos e migrarão para a pele do local original, onde o repasto sanguíneo aconteceu (no caso de artrópodes hematófagos de alimentação rápida) ou ainda está acontecendo (no caso dos carrapatos duros). Os linfócitos T clássicos são divididos em duas subpopulações caracterizadas pelos correceptores CD4 e CD8, que, quando ativados, se tornam linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos efetores, respectivamente.

Os linfócitos T auxiliares se especializam em produzir citocinas, que orquestrarão diferentes tipos de respostas imunes no tecido, potencializando as respostas já iniciadas em decorrência do repasto sanguíneo. Essas respostas incluem a indução da migração de outras células para a pele, como neutrófilos, eosinófilos e basófilos (estes últimos, especialmente, em infestações por carrapatos), e também a produção de anticorpos, descrita a seguir. É importante ressaltar que uma pequena parcela desses linfócitos T auxiliares pode, também, se diferenciar em células T reguladoras, cuja função de regulação das respostas imunes já está implícita em sua nomenclatura. Já os linfócitos T citotóxicos, como o próprio nome indica, desempenham funções citolíticas, embora não esteja claro como essas células atuam durante o repasto sanguíneo de artrópodes. Já foram descritas diversas moléculas salivares com capacidade de polarizar, inibir ou modular a ativação e as respostas efetoras de células T, bem como de bloquear a ação dos produtos dessas células.

Os linfócitos B também estão presentes nos linfonodos, baço e outros órgãos linfoides secundários. Seu primeiro contato com os componentes salivares dos artrópodes hematófagos possivelmente ocorre quando as

moléculas da saliva chegam nesses órgãos linfoides periféricos, transportadas pela linfa ou pelo sangue. Os linfócitos B antígeno-específicos presentes nesses órgãos são ativados e secretam anticorpos da classe IgM nos primeiros dias após o contato inicial com esses antígenos. Ao mesmo tempo, linfócitos T recém-ativados pelas células dendríticas contribuem com a ativação dos linfócitos B, que, com essa ajuda, deixam de produzir IgM e passam a secretar outras classes de anticorpos, como IgG, IgA e IgE. Os anticorpos secretados caem na circulação e podem alcançar o local do repasto sanguíneo tanto em função das alterações vasculares induzidas durante a inflamação inicial, quanto de maneira direta, se ainda houver a lesão do vaso, causando extravasamento de sangue para o tecido.

No local de uma picada, os anticorpos podem neutralizar as moléculas salivares dos artrópodes hematófagos e ativar a via clássica do complemento, afetando negativamente o repasto sanguíneo. Por outro lado, algumas espécies de artrópodes, particularmente de carrapatos, possuem moléculas salivares capazes de se ligar aos anticorpos e bloquear, pelo menos parcialmente, as funções desses efetores imunes, incluindo a ativação do sistema complemento.

Papel das moléculas salivares bioativas sobre a imunidade do hospedeiro

Nesta seção, apresentaremos um compilado das moléculas salivares originárias dos quatro principais grupos de artrópodes hematófagos (carrapatos, mosquitos, flebotomos e triatomíneos). Além de comentários gerais, proveremos também uma tabela para cada grupo, abordando o nome mais comum das moléculas, sua massa molecular observada ou calculada, a espécie na qual foi descrita e os seus efeitos biológicos.

Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de carrapatos

Os carrapatos (Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Acarina) são ectoparasitas hematófagos obrigatórios capazes de infestar a pele de humanos e de animais domésticos e selvagens, sendo divididos em três famílias. A família Ixodidae é a mais numerosa (aproximadamente 700 espécies), e seus membros são comumente conhecidos como carrapatos “duros” em função da presença de um escudo dorsal queratinizado. A família Argasidae possui menor número de espécies descritas (aproximadamente 200 espécies) e seus membros são conhecidos como carrapatos “moles”, por não apresentarem esse escudo

queratinizado. Já a família Nuttalliellidae tem apenas uma única espécie conhecida, *Nuttalliella namaqua*, cujas informações a respeito são bastante limitadas. Mas, morfologicamente, ela se assemelha a espécies ancestrais dos carrapatos (Nava, Guglielmone and Mangold, 2009).

Em termos práticos, a saliva secretada pelos carrapatos é um fluido claro, rico em proteínas (exemplo: enzimas, inibidores de proteases, lipocalinas, ficolinas, mucinas, tiropinas) e em moléculas não proteicas (exemplo: prostaglandinas, adenosina, endocanabinóides) produzidas nas glândulas salivares, que proporcionam diretamente a fixação e a formação do cone de cemento. Além disso, modulam virtualmente todos os mecanismos imunes de defesa dos seus hospedeiros vertebrados. Da mesma forma, mas do outro lado da balança, a defesa dos vertebrados contra os carrapatos é composta de mecanismos celulares e moleculares, tanto inatos quanto adquiridos, que são centrais para a defesa contra a infestação ou para causar seu desprendimento quando o hospedeiro é infestado.

Entre os mecanismos de defesa mais conhecidos dos hospedeiros, podemos citar os mediadores inflamatórios solúveis e celulares da imunidade inata, incluindo proteínas de fase aguda, o sistema complemento, as citocinas, os macrófagos, os neutrófilos, os mastócitos, as células *natural killer* (NK) e as células dendríticas. Alguns dias depois da fixação e da manutenção do carrapato na pele do hospedeiro, os elementos da imunidade adquirida (adaptativas) são ativados, trazendo novos elementos para o jogo, como células T efectoras produtoras de citocinas, que irão recrutar neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Além disso, anticorpos contra antígenos salivares também alcançam o local do repasto, reconhecendo e respondendo especificamente aos antígenos presentes no local da fixação, aparelho bucal, saliva e intestino do carrapato.

Desde a descrição da presença de PGE₂ na saliva de carrapatos (Higgs et al., 1976), muitas outras moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras foram identificadas e caracterizadas. Durante muito tempo, a descoberta de novas moléculas foi bastante lenta, mas tem se acelerado nos últimos anos com o aprimoramento de técnicas bioquímicas, da biologia molecular e da bioinformática já citados anteriormente. A partir dos anos 2000, a identificação e a caracterização de moléculas salivares se tornaram cada vez mais rápida, especialmente em função das ciências ômicas, capazes de gerar imensas bases de dados que permitem a descoberta de moléculas em larga escala (proteomas, lipidomas, transcriptomas e genomas). Entre todos os artrópodes hematófagos, os carrapatos representam o grupo que possui o maior e mais amplo número de moléculas identificadas e caracterizadas molecularmente e funcionalmente até o momento.

Essas moléculas vêm sendo classificadas em famílias, de acordo com sua estrutura e atividade biológica e, também, segregadas entre moléculas proteicas e não proteicas. Nesse contexto, as moléculas salivares de carrapatos apresentam efeitos diversos, que vão desde a modulação das atividades hemostáticas até a modulação da inflamação e da resposta imunológica dos seus hospedeiros. Nesse último ponto, vale destacar que os efeitos sobre o sistema imunológico envolvem a modulação direta de moléculas efetoras, tais como os anticorpos, o sistema complemento, as citocinas e as quimiocinas. Além disso, possuem relação com a modulação da ativação e a função de células da resposta imune inata e adquirida, o que conseqüentemente afetará seus mecanismos efetores. A Tabela 1 apresenta uma descrição detalhada de todas as moléculas já identificadas na saliva de carrapatos que se ligam a componentes da imunidade do hospedeiro (sistema complemento, quimiocinas, aminas vasoativas, anticorpos, etc), bem como daquelas que modulam as células da resposta imune inata e adquirida (neutrófilos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B).

Molécula	Massa Molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Inibidores do sistema complemento				
AsBasicTail	16,7 kDa	<i>Amblyomma sculptum</i>	Inibição da via clássica e da via alternativa	(Costa et al., 2020)
AsKunitz	8,7 kDa	<i>Amblyomma sculptum</i>	Inibição da via clássica e da via alternativa	(Costa et al., 2020)
As8.9kDa	9,8 kDa	<i>Amblyomma sculptum</i>	Inibição da via clássica e da via alternativa	(Costa et al., 2020)
IRAC I	18,03 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Schroeder et al., 2007)
IRAC II	17,46 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Schroeder et al., 2007)
IxACB1	17,58 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Couvreur et al., 2008)
IxACB2	17,69 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Couvreur et al., 2008)
IxACB3	17,85 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Couvreur et al., 2008)
IxACB4	17,88 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Couvreur et al., 2008)
IxACB5	17,66 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da via alternativa	(Couvreur et al., 2008)
Iripin-8	43 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição do Sistema complemento	(Kotál et al., 2021)
ISAC	18,14 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da via alternativa	(Valenzuela et al., 2000)
Salp14	14 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da via da lectina	(Denisov et al., 2021; Denisov and Dijkgraaf, 2021)
Salp20	48 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da via alternativa	(Tyson et al., 2007; Tyson, Elkins and de Silva, 2008)
TSLPI	8,0 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da via da lectina	(Schuijt et al., 2011; Denisov and Dijkgraaf, 2021)
OmCL	16,77 kDa	<i>Ornithodoros moubata</i>	Inibição da via clássica e da via alternativa	(Nunn et al., 2005)
BSAP1	9,3 kDa	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Inibição da via da lectina	(Denisov and Dijkgraaf, 2021)
TSGP2	17,77 kDa	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Inibição da via clássica	(Mans and Ribeiro, 2008)
TSGP3	17,88 kDa	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Inibição da via clássica	(Mans and Ribeiro, 2008)
RaCI	8 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Inibição da via clássica, via da lectina e da via alternativa	(Jore et al., 2016)
CirpA1	24,4 kDa	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	Inibição da via alternativa	(Braunger et al., 2022)
CirpT1	10 kDa	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	Inibição da via clássica, via da lectina e da via alternativa	(Reichhardt et al., 2020)
Ligantes de histamina				
SHBP	22,0 kDa	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Ligante de histamina	(Sangamnatdej et al., 2002)
Ha24	23,3 kDa	<i>Hyalomma asiaticum</i>	Ligante de histamina	(Wang et al., 2016)
JAA70189	23,5 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Ligante de histamina	(Valdés et al., 2016)
RaHBP1	22,85 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligante de histamina	(Paesen et al., 1999)
RaHBP2	21,37 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligante de histamina	(Paesen et al., 1999)
RaHBP3	21,46 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligante de histamina	(Paesen et al., 1999)
Ligantes de quimiocinas				
Evasinas C6	8,6 – 13,1 kDa	<i>Diversas espécies de carrapatos</i>	Ligação a diferentes quimiocinas das famílias CC e CXC	(Lee et al., 2019)
Evasinas C8	11,0 – 17,6 kDa	<i>Diversas espécies de carrapatos</i>	Ligação a diferentes quimiocinas das famílias CC e CXC	(Singh et al., 2017; Eaton et al., 2018; Hayward, et al., 2017)
Tick MIF	12,60 kDa	<i>Amblyomma americanum</i>	Inibição da migração de macrófagos	(Jaworski et al., 2001)
HIMIF	12,3 kDa	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Inibição da migração de macrófagos e monócitos	(Umehiya et al., 2007)
Evasina1	10,46 kDa	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ligação as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL18	(Frauensschuh et al., 2007)
Evasina2	10,46 kDa	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	?	(Déruaz et al., 2008)
Evasina3	7,0 kDa	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ligação as quimiocinas CXCL1 e CXCL8	(Déruaz et al., 2008)
Evasina4	12,03 kDa	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ligação as quimiocinas CCL5e CCL11	(Déruaz et al., 2008)
Ligantes de anticorpos				
IGBPMA	29 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligação ao anticorpo IgG	(Wang and Nuttall, 1999)
IGBPMB	25 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligação ao anticorpo IgG	(Wang and Nuttall, 1999)
IGBPMC	21 kDa	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Ligação ao anticorpo IgG	(Wang and Nuttall, 1999)
IGBP	19,5 kDa	<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	Ligação ao anticorpo IgG	(Gong et al., 2014)
BmPRM	102 kDa	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ligação ao anticorpo IgG	(Ferreira et al., 2002)

Molécula	Massa Molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Moduladores da ativação e função de células imunes				
PGE ₂	352,4 Da	<i>Diversas espécies de carrapatos</i>	Inibição da maturação e função de células dendríticas; inibição da proliferação de linfócitos T; regulação da migração e produção de citocinas por macrófagos	(Higgs et al., 1976; Oliveira et al., 2011; Ribeiro et al., 1985; Sá-Nunes et al., 2007; Poole et al., 2013)
AAS27	41,0 kDa	<i>Amblyomma americanum</i>	Supressão de processo inflamatório induzido pelo polímero 48/80, carragenina e por formalina e aumento da produção de IL-10 e TGFβ in macrófagos.	(Bakshi et al., 2019)
AAS41	46,0 kDa	<i>Amblyomma americanum</i>	Supressão de processo inflamatório induzido pelo polímero 48/80, carragenina e por formalina e aumento da produção de IL-10 e TGFβ in macrófagos.	(Bakshi et al., 2019; Kim et al., 2020)
N-aciletanolaminas (NAEs: C16:0; C18:0, C18:1)	299,5 Da; 327,5 Da; 325,5 Da	<i>Amblyomma americanum</i>	Atividade analgésica e anti-inflamatória	(Fezza et al., 2003)
Zaraquidonoilglicerol (2AG)	378,3 Da	<i>Amblyomma americanum</i>	Atividade analgésica e anti-inflamatória	(Fezza et al., 2003)
Dopamina	153,2 Da	<i>Amblyomma hebraeum</i>	Modulação da função de células dendríticas e linfócitos T	(Binnington and Stone, 1977; Pacheco et al., 2009)
Dap36	36 kDa	<i>Demacentor andersoni</i>	Inibição da proliferação de linfócitos T	(Bergman et al., 2000)
Iripina-3	42,0 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Redução da sobrevivência de esplenócitos, diminuição da proliferação de linfócitos T CD4+, supressão da resposta Th1, indução da diferenciação de linfócitos T reguladores e inibição de IL-6 em macrófagos.	(Chlastáková et al., 2021)
IRIS	43 kDa	<i>Ixodes ricinus</i>	Inibição da produção de IFNγ por linfócitos T e inibição da produção de IL-6 e TNFα por macrófagos	(Leboulle et al., 2002)
ISL 929, ISL 1373	10 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Diminuição da expressão de integrinas e inibição da produção de O ₂	(Guo et al., 2009)
PGI ₂	352,4 Da	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da degranulação de mastócitos	(Ribeiro et al., 1988)
SALP15	15 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Inibição da ativação de linfócitos T	Anguita et al., 2002; Juncadella et al., 2007; Juncadella e Anguita, 2009)
Sialostatina L	12,5 kDa	<i>Ixodes scapularis</i>	Modulação da migração de neutrófilos, maturação de células dendríticas e função de linfócitos T	(Kotsyfakis et al., 2006; Sá-Nunes et al., 2009)
Adenosina	267,2 Da	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Muitas funções imunomoduladoras sobre neutrófilos, células dendríticas e linfócitos e ações sobre os mecanismos de adesão e migração celular, etc.	(Ribeiro et al., 1999; Ribeiro e Modi, 2001)
BIF	13 kDa	<i>Hyalomma asiaticum asiaticum</i>	Inibição da proliferação de linfócitos B	(Yu et al., 2006)
RH36	24,0 kDa	<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	Supressão da proliferação de esplenócitos e inibição da expressão de várias citocinas incluindo IL-2, IL-12 e TNF-α.	(Wang et al., 2017)
RmS-3	41,5 kDa	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Modulação de mastócitos através da atividade inibidora sobre quimase e inibição da atividade metabólica de linfócitos com consequente inibição da proliferação dessas células.	(Coutinho et al., 2020; Tirloni et al., 2014)
RmS-17	41,5 kDa	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Inibição da atividade metabólica de linfócitos com consequente inibição da proliferação dessas células	(Coutinho et al., 2020; Tirloni et al., 2014)

Tabela 1: Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de carrapatos com atividade caracterizada funcionalmente.

Fonte: Arquivo pessoal

Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de mosquitos

Os mosquitos (Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Culicidae) são representados por aproximadamente 3.500 espécies e considerados os artrópodes vetores mais importantes de doenças humanas. Em termos de saúde pública, três gêneros da família Culicidae estão associados às doenças humanas mais prevalentes: *Anopheles*, vetor da malária; *Culex*, vetor da filariose e da encefalite causada pelo vírus do Nilo Ocidental; e *Aedes*, vetor de diversas arboviroses, como a dengue, a febre amarela (ciclo urbano), a zika e a chikungunya. A importância desses gêneros levou ao sequenciamento dos genomas dos chamados “Três Grandes” (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*), cujos dados, sem dúvida, já estão produzindo descobertas que aumentarão a compreensão de aspectos fundamentais da biologia desses vetores (Severson and Behura, 2012)

Com relação às moléculas salivares derivadas de mosquitos com ação no sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, destacamos as sialocininas. Essas moléculas fazem parte da família das taquicininas (da qual também faz parte a substância P) e foram os primeiros peptídeos vasodilatadores descritos na saliva de *Ae. aegypti* (Champagne and Ribeiro, 1994). Posteriormente, observou-se que essas moléculas são capazes de regular a produção das citocinas produzidas por células de baço de camundongos (Zeidner et al., 1999) e de modular a migração celular no local da picada (Martin-Martin et al., 2022), entre outras funções (Tabela 2). É interessante notar que os genes que codificam as sialocininas não foram encontrados em mosquitos do gênero *Anopheles*, que, coincidentemente, não apresentam capacidade vetorial para a maioria dos vírus causadores de doenças humanas e cuja saliva não induz aumento da permeabilidade vascular tão intenso quanto *Aedes spp.*

As proteínas D7 são membros da família de proteínas ligantes de odores (OBP, do inglês *odorant-binding proteins*), e seus membros são divididos entre D7 curtas (D7S) e D7 longas (D7L), contendo um ou dois domínios do tipo OPB. Essas proteínas constituem o grupo de moléculas salivares mais abundantes da saliva de fêmeas de mosquitos e flebotomos, e também são as proteínas salivares mais bem caracterizadas até o momento. Elas foram descritas em diversas espécies de mosquitos, inicialmente em nível gênico (James et al., 1991; Arcà et al., 2002) e, posteriormente, em nível filogenético (Valenzuela et al., 2002; Calvo et al., 2006), estrutural e funcional (Martin-Martin et al., 2020; Jablonka et al., 2019; Alvarenga et al., 2010; Calvo et al., 2009). Apesar de apresentarem uma

identidade relativamente baixa de sequência com as OBP clássicas, os ensaios funcionais confirmaram a hipótese de que elas seriam também capazes de ligar e sequestrar pequenos compostos hidrofóbicos, como aminas vasoativas e eicosanoides, que atuam em diferentes etapas da inflamação e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado (Tabela 2).

Embora a busca de imunomoduladores salivares ocorra em diversas espécies de mosquitos, a maior parte das demais moléculas descritas na literatura, até o momento, são provenientes de *Ae. aegypti*. As prováveis razões para isso são várias: 1) a facilidade de se estabelecer colônias; 2) a diversidade de arbovírus transmitidos e sua ampla distribuição pelo globo, o que aumenta o interesse dos grupos de pesquisa e disponibilidade de financiamento; 3) a existência de modelos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o papel dessas moléculas em infecções por arbovírus. Possivelmente, outras espécies de mosquitos possuam moléculas homólogas em sua saliva ou mesmo proteínas com funções semelhantes geradas por evolução convergente. Porém, tais moduladores na saliva dessas espécies ainda carecem de caracterização. Por exemplo, muitos ligantes de receptores celulares foram descritos recentemente em preparações salivares de *Ae. aegypti*, mas a maioria ainda necessita de caracterização do efeito biológico nas células. Desses, a única molécula cuja atividade foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* é LTRIN, capaz de interagir com o receptor de linfotóxina β e bloquear sua sinalização (Jin et al., 2018). A Tabela 2 apresenta um apanhado geral destas e de outras moléculas salivares, com atividade imunomoduladora descritas até o momento.

Molécula	Massa molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Inibidores do sistema complemento				
Albicina	13,4 kDa	<i>Anopheles albimanus</i>	Inibição da via alternativa (bloqueio de C3 e fator B no soro; ligação ao complexo C3bBb e inibição de sua atividade C3 convertase)	(Mendes-Sousa et al., 2016)
SG7.AF	13,8 kDa	<i>Anopheles freeborni</i>	Inibição da via alternativa (ligação ao complexo C3bBb e inibição de sua atividade C3 convertase)	(Strayer et al., 2021)
Anofensina	13,4 kDa	<i>Anopheles stephensi</i>	Inibição da via alternativa (ligação ao complexo C3bBb e inibição de sua atividade C3 convertase)	(Strayer et al., 2021)
Ligantes de pequenas moléculas				
D7r1	18,7 kDa	<i>Anopheles gambiae</i>	Ligante de serotonina e histamina	(Calvo et al., 2006)
D7r2	18,5 kDa	<i>Anopheles gambiae</i>	Ligante de epinefrina, norepinefrina e histamina	(Calvo et al., 2006)
D7r3	18,6 kDa	<i>Anopheles gambiae</i>	Ligante de serotonina, histamina, epinefrina e norepinefrina	(Calvo et al., 2006)
D7r4	19,3 kDa	<i>Anopheles gambiae</i>	Ligante de serotonina, histamina, triptamina e norepinefrina	(Calvo et al., 2006; Mans and Ribeiro, 2008)
D7L3	40,9 kDa	<i>Anopheles gambiae</i>	Ligante de serotonina (alta afinidade), histamina e norepinefrina (baixa afinidade)	(Alvarenga et al., 2022)
Hamadarin (D7r1)	16,4 kDa	<i>Anopheles stephensi</i>	Ligante de fator XII e cininogênio de alto peso molecular	(Isawa et al., 2002)
AnSt-D7L2 (formerly AnSt-D7L1)	~34,5 kDa	<i>Anopheles stephensi</i>	Ligante de LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2a} e análogos de TXA ₂	(Alvarenga et al., 2010)
AnAtr-D7L1	36 kDa	<i>Anopheles atroparvus</i>	Ligante de serotonina, histamina, triptamina, LTC ₄ , LTD ₄ e LTE ₄	(Alvarenga et al., 2022)
AnDar-D7L2	29,28 kDa	<i>Anopheles darlingi</i>	Ligante de serotonina, triptamina, dopamina, octopamina, norepinefrina, LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ e U46619	(Alvarenga et al., 2022)
AeD7L1	36,2 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de serotonina, histamina, epinefrina, norepinefrina, LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ e LTE ₄	(Calvo et al., 2006; Calvo et al., 2009)
AeD7L2	35,1 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de serotonina, histamina, norepinefrina, LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ e U46619	(Martin-Martin et al., 2021)
AlboD7L1	36 kDa	<i>Aedes albopictus</i>	Ligante de serotonina, histamina, triptamina, epinefrina, norepinefrina, LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ e U46619	(Martin-Martin et al., 2020)
CxD7L1	34,4 kDa	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Ligante de 5'-ATP, 5'ADP, 5'AMP, adenosina e adenina	(Martin-Martin et al., 2020)
CxD7L2	34,8 kDa	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Ligante de serotonina, histamina, epinefrina, LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , U46619 e ácido araquidônico	(Martin-Martin et al., 2020)
Ligantes de receptores humanos				
AaVA-1	26,7 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD4 e DC-SIGN	(Gavor et al., 2022)
Adenosina desaminase 2 (ADA 2)	55,9 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de TLR4	(Gavor et al., 2022)
AeD7L1	36,2 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD4, CD14	(Gavor et al., 2022)
AeD7L2	35,1 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD86 e DC-SIGN	(Gavor et al., 2022)
Aegyptina	27 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD4, CD14 e CD86	(Gavor et al., 2022)
Apirase	60,2 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD14, CD86, DC-SIGN e TLR4	(Gavor et al., 2022)
Ficolina-3	33,4 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD86 e TLR4	(Gavor et al., 2022)
GAPDH	39,3 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de TLR4	(Gavor et al., 2022)
LTRIN	15 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Interação com receptor da linfotoxinaβ (LTβ) e bloqueio da sua dimerização, ativação e sinalização	(Jin et al., 2018)
Malato desidrogenase	44,3 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de TLR4	(Gavor et al., 2022)
NeSt1	36,2 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ligante de CD4, CD86	(Gavor et al., 2022)

Molécula	Massa molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Moduladores da ativação e função de células imunes				
Sialocinina	1,4 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Modulação das citocinas produzidas por esplenócitos estimulados com concanavalina A (redução de IFN- γ e IL-2; aumento de IL-5 e IL-10); Preparações salivares de mosquitos deficientes de sialocinina induziram aumento de IL-10, IFN- γ e IL-6 e redução de IL-1 β na linhagem de monócitos/macrófagos THP-1; Picadas de mosquitos deficientes de sialocinina induzem migração seletiva de diferentes tipos celulares para a pele, sangue, medula óssea e baço.	(Zeidner et al., 1999) (Martin-Martin et al., 2022)
SAAG-4	20 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Indução da diferenciação de células Th2, reduzindo a expressão de IFN- γ e aumentando da expressão de IL-4 em células T CD4 ⁺	(Spencer Clinton et al., 2023) (Boppana et al., 2009)
34-kDa protein	34 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Diminuição da expressão de RNAm de IFN tipo I, fatores reguladores de IFN (IRFs), e peptídeos antimicrobianos em queratinócitos infectados pelo vírus da dengue	Surasombatpattana et al., 2014
LTRIN	15 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Aumento da infecção pelo vírus da Zika e inibição da expressão de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição induzidos pela infecção com o vírus em diversos tipos celulares	(Jin et al., 2018)
NeSt1	36,2 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Indução de IL-1 β , CXCL2 e CCL2 em neutrófilos; seu bloqueio reduz a expressão de pró-IL-1 β e CXCL2, além de diminuir o recrutamento de macrófagos para o sítio da picada do mosquito; a imunização passiva contra a proteína reduz a replicação do vírus da Zika e a patogênese da infecção	(Hastings et al., 2019)
AaVA-1	26,7 kDa	<i>Aedes aegypti</i>	Ativação de autofagia e aumento da infecção por flavivírus em células da linhagem THP-1, bem como células dendríticas e monócitos humanos	(Sun et al., 2020)
Adenosina desaminase (ADA)	~60 kDa	<i>Aedes albopictus</i>	Secreção de β -hexosaminidase, triptase e IL-6 por mastócitos derivados de medula óssea	(Li et al., 2022)

Tabela 2: Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de mosquitos com atividade caracterizada funcionalmente.

Fonte: Arquivo pessoal

Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de flebotomíneos

Os flebotomíneos (Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Psychodidae), também conhecidos popularmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui, cangalhinha, asa branca, asa dura palhinha, dentre outras denominações, possuem diversos gêneros hematófagos. Os flebotomíneos são capazes de transmitir alguns arbovírus (flebovírus, vesiculovírus e orbivírus, dentre outros) e bactérias (*Bartonella bacilliformis*). Entretanto, são mais conhecidos por serem vetores dos protozoários causadores da leishmaniose. Estão descritas mais de 1.000 espécies de flebotomíneos, sendo aproximadamente 280 encontradas no Brasil (Shimabukuro, de Andrade and Galati, 2017).

Embora apenas 19 espécies sejam reconhecidamente transmissoras de *Leishmania spp.* ao homem, alguns autores consideram que aproximadamente 10% das espécies tenham capacidade vetorial para transmitir alguma espécie de leishmania. Assim, fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* (flebotomos do Novo Mundo) e *Phlebotomus* (flebotomos do Velho Mundo) são as mais bem descritas, embora algumas espécies do gênero *Nyssomyia* também são implicadas como vetores para humanos (Andrade Filho, Galati and Falcão, 2007).

Dentre as proteínas salivares de flebotomíneos com atividades imunomoduladoras, a mais bem estudada é certamente a maxadilan, com quase 100 artigos publicados na literatura. Esse peptídeo foi originalmente isolado das glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* por sua potente atividade vasodilatadora (Lerner et al., 1991), mas posteriormente foi encontrado também em outras espécies de flebotomíneos, tendo diversas propriedades imunomoduladoras da molécula sido descritas (Tabela 3).

Da mesma maneira que em mosquitos, os flebotomíneos também apresentam membros da família D7 em sua saliva. Porém, pelo menos até o momento, apenas as formas longas (D7L) foram descritas em flebotomíneos. Essas moléculas foram capazes de ligar alguns eicosanoides, mas não aminas biogênicas, como a histamina e a serotonina (Jablonka et al., 2019). Por outro lado, dada a importância das aminas vasoativas na resposta hemostática, inflamatória e imunológica dos hospedeiros vertebrados, era de se esperar a presença de ligantes na saliva de flebotomíneos, o que foi confirmado pela caracterização de membros da família relacionados a proteínas amarelas (YRPs, do inglês *yellow-related proteins*). Além disso, a saliva de flebotomos apresenta inibidores do sistema complemento, que atuam por meio de mecanismos diversos, embora apenas uma molécula com essa função tenha sido caracterizada funcionalmente até o momento (Ferreira et al., 2016; Asojo et al., 2017).

Os nucleosídeos adenosina e 5'AMP foram isolados diretamente da saliva de *Phlebotomus papatasi* como as moléculas responsáveis pela modulação da produção de citocinas por células dendríticas murinas estimuladas por LPS, inibindo as citocinas inflamatórias TNF- α e IL-12. Paralelamente, induziu o aumento da produção da citocina anti-inflamatória/reguladora IL-10, da enzima COX-2 e do seu produto PGE₂. Essa modulação seletiva foi explorada terapeuticamente em um modelo de artrite experimental, cujos sinais clínicos foram reduzidos após o tratamento com saliva de *P. papatasi* ou com uma mistura de adenosina e de 5'AMP nas mesmas concentrações encontradas na saliva (Carregaro et al., 2011). Essas e outras moléculas, com atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de flebotomíneos são apresentadas na Tabela 3.

Molécula	Massa molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Inibidores do sistema complemento				
SALO (LJM19)	~11kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Inibição da via clássica (inibição da deposição de C4b)	(Ferreira et al., 2016; Asojo et al., 2017)
Ligantes de pequenas moléculas				
AGE83092 (<i>Phlebotomus papatasi</i> D7L)	27,3 kDa	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Ligante de LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ e U46619	(Jablonka et al., 2019)
ABI15936 (<i>Phlebotomus duboscqi</i> D7L)	26,7 kDa	<i>Phlebotomus duboscqi</i>	Ligante de LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ e U46619	(Jablonka et al., 2019)
LJM11	43 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Ligante de serotonina, epinefrina, norepinefrina, dopamina e octopamina	(Xu et al., 2011)
LJM111	43 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Ligante de serotonina, epinefrina, norepinefrina, dopamina e octopamina	(Xu et al., 2011)
LJM17	45 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Ligante de histamina, serotonina, norepinefrina, dopamina e octopamina	(Xu et al., 2011)
PagSP04	44,92 kDa	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Ligante de histamina e serotonina	Spitzova et al., 2020
rSP03	43,2 kDa	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Ligante de norepinefrina (baixa afinidade para histamina, serotonina, epinefrina, dopamina e octopamina)	Sumova et al., 2019
rSP03B	44,26 kDa	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Ligante de serotonina (baixa afinidade para histamina)	Sumova et al., 2019
rPorASP2	42,96 kDa	<i>Phlebotomus orientalis</i>	Ligante de serotonina, dopamina e octopamina (baixa afinidade para histamina)	Sumova et al., 2019
rPorASP4	43,74 kDa	<i>Phlebotomus orientalis</i>	Ligante de serotonina, epinefrina, norepinefrina, dopamina e octopamina (baixa afinidade para histamina)	Sumova et al., 2019
Moduladores da ativação e função de células imunes				
Maxadilan	6,8 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Inibição da proliferação de células T em diferentes sistemas; inibição de reação de hipersensibilidade tardia <i>in vivo</i> Indução da produção de IL-6, IL-10 e TGF-β e dos níveis de AMPc intracelulares em macrófagos; inibição da produção de TNF-α, IL-12p70, PGE ₂ e NO em macrófagos (alguns fenótipos observados sob estímulo com LPS) Proteção de camundongos contra choque endotóxico induzido por LPS por mecanismo parcialmente dependente de IL-10 Estímulo à hematopoiese <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por um mecanismo dependente de IL-6 Inibição de CD80 e CD86 em células dendríticas murinas (aumento de CD86 na linhagem C3H); redução de TNF-α, IL-12p40 e IFN-γ, aumento de IL-6 e IL-10, e redução da expressão ótima de CCR7 em células dendríticas estimuladas com LPS; redução de TNF-α, IL-12p70 e IFN-γ e aumento de IL-6, IL-10, IL-13 e IL-1β em reação mista de leucócitos (células dendríticas e linfócitos)	(Qureshi et al., 1996) (Soares et al., 1998; Brodie et al., 2007) (Bozza et al., 1998) (Guilpin et al., 2002) (Wheat et al., 2008)
Adenosina	267 Da	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Inibição da expressão de óxido nítrico sintase induzível em macrófagos murinos estimulados com LPS; Inibição da produção de TNF-α e IL-12 e aumento de IL-10, PGE ₂ e da expressão de COX-2 em células dendríticas estimuladas com LPS	(Katz et al., 2000) (Carregaro et al., 2011)
Adenosina monofosfato (5'AMP)	347 Da	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Inibição da produção de TNF-α e IL-12 e aumento de IL-10, PGE ₂ e da expressão de COX-2 em células dendríticas estimuladas com LPS.	(Carregaro et al., 2011)
Lufaxina (LJL143)	32,4 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata induzida por inoculação de fator Xa	(Collin et al., 2012)
LJM111	43 kDa	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Prevenção da migração de neutrófilos e de sensação de dor em modelo de artrite; redução de IL-17, TNF-α e IFN-γ em células de linfonodos reestimulados	(Grespan et al., 2012)

Tabela 3: Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de flebotomos com atividade caracterizada funcionalmente.

Fonte: Arquivo pessoal

Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras da saliva de triatomíneos

Os triatomíneos (Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae), popularmente conhecidos no Brasil como barbeiro, furão, chupão, bicudo ou fincão, são artrópodes hematófagos hemimetábolos (Lent e Wygodzinsky, 1979). Os triatomíneos têm sua importância reconhecida especialmente por serem os vetores do agente causador da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A subfamília Triatominae é dividida em cinco tribos (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini), e organizada em 18 gêneros (Galvão, 2003; Schofield e Galvão, 2009; Frías-Lasserre, 2010; Gurgel-Gonçalves et al., 2012). Já foram descritas 142 espécies de triatomíneos no mundo, sendo que 63% ocorrem no Brasil e 39 são exclusivamente brasileiras.

Diferente de outros artrópodes hematófagos, os triatomíneos obtêm sangue através da canulação direta dos vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado. Nesse processo de alimentação, que dura em média de 20 a 40 minutos, a depender da espécie, esses insetos liberam a saliva, rica em moléculas bioativas, dentro do próprio vaso sanguíneo ou nos tecidos adjacentes a ele (Soares et al., 2006; Soares et al., 2014). Dentre as moléculas com efeitos sobre o sistema imune, a primeira descrição aconteceu em 1994, quando foram identificadas e caracterizadas as nitroforinas, moléculas com capacidade de ligar histamina. Essas moléculas identificadas e caracterizadas na saliva do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, deixam livres um sítio de ligação a histamina quando liberam NO de sua estrutura química (Montfort et al., 2000; Andersen et al., 2005).

No que se refere à descoberta de moléculas na saliva de triatomíneos com atividades sobre a ativação e as funções de células imunes, os achados ainda são bastante limitados. Alguns estudos até indicam que a saliva possui efeitos importantes; no entanto, os estudos ainda carecem de identificação e caracterização em nível molecular. Nesse ponto, apenas duas moléculas foram encontradas até o momento: lisofosfatidilcolina e antígeno-5, moléculas com ações sobre macrófagos e neutrófilos, respectivamente (Tabela 4). No caso da lisofosfatidilcolina, foi demonstrado que essa molécula age como um modulador de diferentes vias de sinalização celular de macrófagos, na qual o mecanismo parece envolver a ativação de alguns receptores concomitantemente ao bloqueio da ativação de MAPK induzidas pela estimulação de receptores do tipo Toll (Mesquita et al., 2008). As proteínas do tipo antígeno-5 são ricas em cisteínas e

estão presentes em várias espécies de artrópodes hematófagos e os achados, até agora, mostram que essas moléculas são capazes de apresentar atividade antioxidante pela remoção de O₂ em neutrófilos (Assumpção et al., 2013).

Molécula	Massa Molecular	Espécie	Efeito biológico	Referências
Inibidores do sistema complemento				
Calreticulina	46,17 kDa	<i>Triatoma infestans</i>	Inibição da via clássica	Weinberger et al., 2017
Proteínas ligantes de histamina				
NP1	20,3 kDa	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ligante de histamina	(Ribeiro and Walker, 1994) Montfort et al., 2000
NP2	19,6 kDa	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ligante de histamina	Weichsel et al., 1998
NP3	19,7 kDa	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ligante de histamina	Weichsel et al., 1998
NP4	20,9 kDa	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ligante de histamina	Weichsel et al., 1998
Modulação da ativação e função celular				
Lisofosfatidilcolina	299,26 Da	<i>Rhodnius prolixus</i>	Aumento da quimiotaxia e diminuição da produção de óxido nítrico em macrófagos	Mesquita et al., 2008; Silva-Neto et al., 2012
Antígeno-5	25,3 kDa	<i>Dipetalogaster máxima</i> <i>Triatoma infestans</i>	Atividade antioxidante pela remoção de O ₂ -em neutrófilos	(Assumpção et al., 2013)

Tabela 4: Moléculas anti-inflamatórias e imunomoduladoras presentes na saliva de triatomíneos com atividade caracterizada funcionalmente.

Fonte: Arquivo pessoal

Considerações finais

No início deste século, as atividades imunomoduladoras da saliva e de moléculas salivares dos artrópodes hematófagos poderiam ser descritas em uma revisão relativamente curta (Gillespie, Mbow and Titus, 2000). Em pouco mais de 20 anos, esse conhecimento se ampliou de tal forma que, para manter o presente capítulo dentro de limites razoáveis, tivemos que limitar as informações apresentadas apenas às moléculas salivares já descritas e caracterizadas funcionalmente nos principais grupos de artrópodes hematófagos: os carrapatos, os mosquitos, os triatomíneos e os flebotomíneos.

A saliva desses artrópodes hematófagos está diretamente envolvida na transmissão e no estabelecimento de patógenos nos hospedeiros vertebrados. Os microrganismos se beneficiam da SAT, que atua por meio da modulação do sistema imunológico do vertebrado desempenhada pelas moléculas salivares descritas no presente capítulo. A compreensão aprofundada dos mecanismos de ação das moléculas bioativas salivares está revelando como essa imunomodulação ocorre no contexto da relação patógeno-hospedeiro. Com isso, alguns grupos vêm trabalhando com a possibilidade de interferir na transmissão desses patógenos, neutralizando as moléculas salivares envolvidas na SAT por meio do uso de vacinas baseadas em saliva (SBV, do inglês *saliva-based vaccines*).

Embora as doenças transmitidas por artrópodes hematófagos causem morbidade e mortalidade significativas em todo o mundo, poucas vacinas estão licenciadas e disponíveis contra os agentes causadores dessas doenças. O racional por trás do conceito de SBV vem de estudos mostrando que as proteínas salivares podem induzir imunidade celular e humoral em hospedeiros naturais dos artrópodes hematófagos, de forma que as respostas contra esses componentes as impediriam de promover a SAT. Assim, o conhecimento acumulado sobre a caracterização das moléculas salivares de artrópodes hematófagos tem revelado diferentes mecanismos de ação desses componentes, alguns redundantes, outros pleiotrópicos, que, em conjunto, estão demonstrando possíveis caminhos para a descoberta de drogas, SBV e SAT.

Assim como a modulação de parâmetros inflamatórios e imunes por moléculas salivares podem favorecer a transmissão de patógenos, essas mesmas propriedades têm sido investigadas quanto a sua capacidade de serem usadas como imunobiológicos para o tratamento de doenças de interesse na medicina veterinária e humana. De fato, um grande desafio para a medicina mundial é o tratamento de doenças inflamatórias ou imunomediadas, uma vez que os medicamentos atualmente disponíveis no mercado apresentam efeitos colaterais importantes, atividade limitada contra a doença ou preços pouco acessíveis para a maior parte da população. Assim, a descoberta e o uso de moléculas bioativas com ação nessas doenças representam uma nova fronteira para seu tratamento e abrem novos caminhos para pesquisas farmacêutica e biotecnológica, especialmente para o Brasil, que apresenta uma das maiores biodiversidades de artrópodes hematófagos do mundo.

Referências

- Abdeladhim, M., Kamhawi, S. and Valenzuela, J. G. (2014) 'What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity', *Infect Genet Evol*, 28, pp. 691-703.
- Alvarenga, P. H., Dias, D. R., Xu, X., Francischetti, I. M. B., Gittis, A. G., Arp, G., Garboczi, D. N., Ribeiro, J. M. C. and Andersen, J. F. (2022) 'Functional aspects of evolution in a cluster of salivary protein genes from mosquitoes', *Insect Biochem Mol Biol*, 146, pp. 103785.
- Alvarenga, P. H., Francischetti, I. M., Calvo, E., Sá-Nunes, A., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2010) 'The function and three-dimensional structure of a thromboxane A₂/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite', *PLoS Biol*, 8(11), pp. e1000547.
- Andrade Filho, J. D., Galati, E. A. and Falcão, A. L. (2007) 'Nyssomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) and Nyssomyia neivai (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(4), pp. 481-7.
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2002) 'Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation', *Immunity*, 16(6):849-59.
- Arcà, B., Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Veneri, M., Louis, C. and Coluzzi, M. (2002) 'A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector Anopheles gambiae', *Insect Mol Biol*, 11(1), pp. 47-55.
- Asojo, O. A., Kelleher, A., Liu, Z., Pollet, J., Hudspeth, E. M., Rezende, W. C., Groen, M. J., Seid, C. A., Abdeladhim, M., Townsend, S., de Castro, W., Mendes-Sousa, A., Bartholomeu, D. C., Fujiwara, R. T., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., Zhan, B., Oliveira, F., Kamhawi, S. and Valenzuela, J. G. (2017) 'Structure of SALO, a leishmaniasis vaccine candidate from the sand fly Lutzomyia longipalpis', *PLoS Negl Trop Dis*, 11(3), pp. e0005374.
- Assumpção, T. C. F., Ma, D., Schwarz, A., Reiter, K., Santana, J. M., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M. C., Nardone, G., Yu, L. L. and Francischetti, I. M. B. (2013) 'Salivary antigen-5/CAP family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂⁻ and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst', *J Biol Chem*, 288(20), pp. 14341-14361.
- Bakshi, M., Kim, T. K., Porter, L., Mwangi, W. and Mulenga, A. (2019) 'Amblyomma americanum ticks utilizes countervailing pro and anti-inflammatory proteins to evade host defense', *PLoS Pathog*, 15(11), pp. e1008128.
- Bergman, D. K., Palmer, M. J., Caimano, M. J., Radolf, J. D. and Wikel, S. K. (2000) 'Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni salivary gland', *J Parasitol*, 86(3), pp. 516-25.

- Binnington, K. C., Stone, B. F. (1977) 'Distribution of catecholamines in the cattle tick *Boophilus microplus*', *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol*, 58(1C):21-8.
- Boppana, V. D., Thangamani, S., Adler, A. J. and Wikel, S. K. (2009) 'SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 T cells to express IL-4', *Parasite Immunol*, 31(6), pp. 287-95.
- Bozza, M., Soares, M. B., Bozza, P. T., Satoskar, A. R., Diacovo, T. G., Brombacher, F., Titus, R. G., Shoemaker, C. B. and David, J. R. (1998) 'The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10', *Eur J Immunol*, 28(10), pp. 3120-7.
- Braunger, K., Ahn, J., Jore, M. M., Johnson, S., Tang, T. T. L., Pedersen, D. V., Andersen, G. R. and Lea, S. M. (2022) 'Structure and function of a family of tick-derived complement inhibitors targeting properdin', *Nat Commun*, 13(1), pp. 317.
- Brodie, T. M., Smith, M. C., Morris, R. V. and Titus, R. G. (2007) 'Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages', *Infect Immun*, 75(5), pp. 2359-65.
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2006) 'Function and evolution of a mosquito salivary protein family', *J Biol Chem*, 281(4), pp. 1935-42.
- Calvo, E., Mans, B. J., Ribeiro, J. M. and Andersen, J. F. (2009) 'Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), pp. 3728-33.
- Carregaro, V., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Souza-Júnior, D. L., Costa, D. L., Oliveira, C. J., Sacramento, L. A., Nascimento, M. S., Milanezi, C. M., Cunha, F. Q. and Silva, J. S. (2015) 'Nucleosides present on phlebotomine saliva induce immunosuppression and promote the infection establishment', *PLoS Negl Trop Dis*, 9(4), pp. e0003600.
- Carregaro, V., Sá-Nunes, A., Cunha, T. M., Grespan, R., Oliveira, C. J., Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Verri, W. A., Milanezi, C. M., Pham, V. M., Brand, D. D., Valenzuela, J. G., Silva, J. S., Ribeiro, J. M. and Cunha, F. Q. (2011) 'Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions', *J Immunol*, 187(8), pp. 4347-59.
- Champagne, D. E. and Ribeiro, J. M. (1994) 'Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), pp. 138-42.
- Chlastáková, A., Kotál, J., Beránková, Z., Kaščáková, B., Martins, L. A., Langhansová, H., Prudnikova, T., Ederová, M., Kutá Smatanová, I., Kotsyfakis, M. and Chmelař, J. (2021) 'Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From', *Front Immunol*, 12, pp. 626200.

Collin, N., Assumpção, T. C., Mizurini, D. M., Gilmore, D. C., Dutra-Oliveira, A., Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Teixeira, C., Ribeiro, J. M., Monteiro, R. Q., Valenzuela, J. G. and Francischetti, I. M. (2012) 'Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(9), pp. 2185-98.

Costa, G. C. A., Ribeiro, I. C. T., Melo-Junior, O., Gontijo, N. F., Sant'Anna, M. R. V., Pereira, M. H., Pessoa, G. C. D., Koerich, L. B., Oliveira, F., Valenzuela, J. G., Giunchetti, R. C., Fujiwara, R. T., Bartholomeu, D. C. and Araujo, R. N. (2020) 'Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines', *Front Immunol*, 11, pp. 611104.

Coutinho, M. L., Bizzarro, B., Tirloni, L., Berger, M., Freire Oliveira, C. J., Sá-Nunes, A. and Silva Vaz, I. (2020) 'Rhipicephalus microplus serpins interfere with host immune responses by specifically modulating mast cells and lymphocytes', *Ticks Tick Borne Dis*, 11(4), pp. 101425.

Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotteaux, B., Decrem, Y., Prévôt, P. P., Brossard, M., Vanhamme, L. and Godfroid, E. (2008) 'Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*', *PLoS One*, 3(1), pp. e1400.

Dawkins, R. and Krebs, J. R. (1979) 'Arms races between and within species', *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 205(1161), pp. 489-511.

Denisov, S. S., Ippel, J. H., Castoldi, E., Mans, B. J., Hackeng, T. M., Dijkgraaf, I. (2021) 'Molecular basis of anticoagulant and anticomplement activity of the tick salivary protein Salp14 and its homologs', *J Biol Chem*, 297(1):100865.

Denisov, S. S. and Dijkgraaf, I. (2021) 'Immunomodulatory Proteins in Tick Saliva From a Structural Perspective', *Front Cell Infect Microbiol*, 11, pp. 769574.

Dunkelberger, J. R. and Song, W. C. (2010) 'Complement and its role in innate and adaptive immune responses', *Cell Res*, 20(1), pp. 34-50.

Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A. L., Dias, J. M., Coelho, F. M., Russo, R. C., Ferreira, B. R., Graham, G. J., Shaw, J. P., Wells, T. N., Teixeira, M. M., Power, C. A. and Proudfoot, A. E. (2008) 'Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity', *J Exp Med*, 205(9), pp. 2019-31.

Eaton, J. R. O., Alenazi, Y., Singh, K., Davies, G., Geis-Asteggiane, L., Kessler, B., Robinson, C. V., Kawamura, A. and Bhattacharya, S. (2018) 'The N-terminal domain of a tick evasin is critical for chemokine binding and neutralization and confers specific binding activity to other evasins', *J Biol Chem*, 293(16), pp. 6134-6146.

Favarin, D. C., Pereira, A. B. M., Francischetti, I. M. B., da Silva, M. V., Rodrigues, V., da Silva, P. R., Valenzuela, J. G., Teixeira, D. N. S., Oliveira, C. J. F. and Rogério, A. P. (2020) 'Agaphelin modulates the activation of human bronchial epithelial cells induced by lipopolysaccharide and IL-4', *Immunobiology*, 225(3), pp. 151937.

Ferreira, C. A., Barbosa, M. C., Silveira, T. C., Valenzuela, J. G., Vaz, I. a. S. and Masuda, A. (2002) 'cDNA cloning, expression and characterization of a Boophilus microplus paramyosin', *Parasitology*, 125(Pt 3), pp. 265-74.

Ferreira, V. P., Fazito Vale, V., Pangburn, M. K., Abdeladhim, M., Mendes-Sousa, A. F., Coutinho-Abreu, I. V., Rasouli, M., Brandt, E. A., Meneses, C., Lima, K. F., Nascimento Araújo, R., Pereira, M. H., Kotsyfakis, M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M., Gontijo, N. F., Collin, N. and Valenzuela, J. G. (2016) 'SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*', *Sci Rep*, 6, pp. 19300.

Fezza, F., Dillwith, J. W., Bisogno, T., Tucker, J. S., Di Marzo, V. and Sauer, J. R. (2003) 'Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick', *Biochim Biophys Acta*, 1633(1), pp. 61-7.

Frauensschuh, A., Power, C. A., Déruaz, M., Ferreira, B. R., Silva, J. S., Teixeira, M. M., Dias, J. M., Martin, T., Wells, T. N. C. and Proudfoot, A. E. I. (2007) 'Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*', *J Biol Chem*, 282(37), pp. 27250-27258.

Gavor, E., Choong, Y. K., Liu, Y., Pompon, J., Ooi, E. E., Mok, Y. K., Liu, H., Kini, R. M. and Sivaraman, J. (2022) 'Identification of *Aedes aegypti* salivary gland proteins interacting with human immune receptor proteins', *PLoS Negl Trop Dis*, 16(9), pp. e0010743.

Gillespie, R. D., Mbow, M. L. and Titus, R. G. (2000) 'The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva', *Parasite Immunol*, 22(7), pp. 319-31.

Gong, H., Qin, S., Wan, X., Zhang, H., Zhou, Y., Cao, J., Xuan, X., Suzuki, H. and Zhou, J. (2014) 'Immunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression, and binding specificity', *Parasitol Res*, 113(12), pp. 4387-95.

Grespan, R., Lemos, H. P., Carregaro, V., Verri, W. A., Souto, F. O., de Oliveira, C. J., Teixeira, C., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G. and Cunha, F. Q. (2012) 'The protein LJM 111 from *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extract (SGE) accounts for the SGE-inhibitory effects upon inflammatory parameters in experimental arthritis model', *Int Immunopharmacol*, 12(4), pp. 603-10.

Guilpin, V. O., Swardson-Oliver, C., Nosbisch, L. and Titus, R. G. (2002) 'Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice', *Parasite Immunol*, 24(8), pp. 437-46.

Guo, X., Booth, C. J., Paley, M. A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S. and Montgomery, R. R. (2009) 'Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins', *Infect Immun*, 77(6), pp. 2320-9.

Hastings, A. K., Uraki, R., Gaitsch, H., Dhaliwal, K., Stanley, S., Sproch, H., Williamson, E., MacNeil, T., Marin-Lopez, A., Hwang, J., Wang, Y., Grover, J. R. and Fikrig, E. (2019) 'NeSt1 Protein Enhances Zika Virus Pathogenesis by Activating Neutrophils', *J Virol*, 93(13).

Hayward, J., Sanchez, J., Perry, A., Huang, C., Rodriguez Valle, M., Canals, M., Payne, R. J., Stone, M. J. (2017) 'Ticks from diverse genera encode chemokine-inhibitory evasin proteins', *J Biol Chem*, 22;292(38):15670-15680.

Isawa, H., Yuda, M., Orito, Y. and Chinzei, Y. (2002) 'A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen', *J Biol Chem*, 277(31), pp. 27651-8.

Jablonka, W., Kim, I. H., Alvarenga, P. H., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M. C. and Andersen, J. F. (2019) 'Functional and structural similarities of D7 proteins in the independently-evolved salivary secretions of sand flies and mosquitoes', *Sci Rep*, 9(1), pp. 5340.

James, A. A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C. R. and Racioppi, J. V. (1991) 'Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*', *Mol Biochem Parasitol*, 44(2), pp. 245-53.

Jaworski, D. C., Jasinskas, A., Metz, C. N., Bucala, R. and Barbour, A. G. (2001) 'Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*', *Insect Mol Biol*, 10(4), pp. 323-31.

Jin, L., Guo, X., Shen, C., Hao, X., Sun, P., Li, P., Xu, T., Hu, C., Rose, O., Zhou, H., Yang, M., Qin, C. F., Guo, J., Peng, H., Zhu, M., Cheng, G., Qi, X. and Lai, R. (2018) 'Salivary factor LTRIN from *Aedes aegypti* facilitates the transmission of Zika virus by interfering with the lymphotoxin- β receptor', *Nat Immunol*, 19(4), pp. 342-353.

Jore, M. M., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N. M., Li, Y. I., Nunn, M. A., Elmlund, H. and Lea, S. M. (2016) 'Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5', *Nat Struct Mol Biol*, 23(5), pp. 378-86.

Juncadella, I. J., Garg, R., Bates, T. C., Olivera, E. R. and Anguita, J. (2008) 'The *Ixodes scapularis* salivary protein, salp15, prevents the association of HIV-1 gp120 and CD4', *Biochem Biophys Res Commun*, 367(1), pp. 41-6.

Katz, O., Waitumbi, J. N., Zer, R. and Warburg, A. (2000) 'Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva', *Am J Trop Med Hyg*, 62(1), pp. 145-50.

Kim, T. K., Tirloni, L., Berger, M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Termignoni, C., da Silva Vaz, I. and Mulenga, A. (2020) '*Amblyomma americanum* serpin 41 (AAS41) inhibits inflammation by targeting chymase and chymotrypsin', *Int J Biol Macromol*, 156, pp. 1007-1021.

Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2006) 'Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*', *J Biol Chem*, 281(36), pp. 26298-307.

Kotál, J., Polderdijk, S. G. I., Langhansová, H., Ederová, M., Martins, L. A., Beránková, Z., Chlastáková, A., Hajdušek, O., Kotsyfakis, M., Huntington, J. A. and Chmelař, J. (2021) 'Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement', *Int J Mol Sci*, 22(17).

Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A. and Godfroid, E. (2002) 'Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks', *J Biol Chem*, 277(12), pp. 10083-9.

Lee, A. W., Deruaz, M., Lynch, C., Davies, G., Singh, K., Alenazi, Y., Eaton, J. R. O., Kawamura, A., Shaw, J., Proudfoot, A. E. I., Dias, J. M. and Bhattacharya, S. (2019) 'A knottin scaffold directs the CXC-chemokine-binding specificity of tick evasins', *J Biol Chem*, 294(29), pp. 11199-11212.

Lerner, E. A., Ribeiro, J. M., Nelson, R. J. and Lerner, M. R. (1991) 'Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*', *J Biol Chem*, 266(17), pp. 11234-6.

Li, Z., Ji, C., Cheng, J., Åbrink, M., Shen, T., Kuang, X., Shang, Z. and Wu, J. (2022) 'salivary proteins adenosine deaminase and 34k2 interact with human mast cell specific proteases tryptase and chymase', *Bioengineered*, 13(5), pp. 13752-13766.

Mans, B. J. and Ribeiro, J. M. (2008) 'Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins', *Insect Biochem Mol Biol*, 38(9), pp. 841-52.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, 25(12), pp. 677-86.

Martin-Martin, I., Kern, O., Brooks, S., Smith, L. B., Valenzuela-Leon, P. C., Bonilla, B., Ackerman, H. and Calvo, E. (2021) 'Biochemical characterization of AeD7L2 and its physiological relevance in blood feeding in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*', *FEBS J*, 288(6), pp. 2014-2029.

Martin-Martin, I., Smith, L. B., Chagas, A. C., Sá-Nunes, A., Shrivastava, G., Valenzuela-Leon, P. C. and Calvo, E. (2020) 'D7 Salivary Protein Prevents Host Hemostasis and Inflammation', *Biomolecules*, 10(10).

Martin-Martin, I., Valenzuela Leon, P. C., Amo, L., Shrivastava, G., Iniguez, E., Aryan, A., Brooks, S., Kojin, B. B., Williams, A. E., Bolland, S., Ackerman, H., Adelman, Z. N. and Calvo, E. (2022) 'Aedes aegypti sialokinin facilitates mosquito blood feeding and modulates host immunity and vascular biology', *Cell Rep*, 39(2), pp. 110648.

Mendes-Sousa, A. F., Queiroz, D. C., Vale, V. F., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Gontijo, N. F. and Andersen, J. F. (2016) 'An Inhibitor of the Alternative Pathway of Complement in Saliva of New World Anopheline Mosquitoes', *J Immunol*, 197(2), pp. 599-610.

Mesquita, R. D., Carneiro, A. B., Báfica, A., Gazos-Lopes, F., Takiya, C. M., Souto-Adorno, T., Vieira, D. P., Ferreira-Pereira, A., Almeida, I. C., Figueiredo, R. T., Porto, B. N., Bozza, M. T., Graca-Souza, A. V., Lopes, A. H., Atella, G. C. and Silva-Neto, M. A. (2008) 'Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine', *Infect Immun*, 76(12), pp. 5543-52.

Metcalf, D. D., Baram, D. and Mekori, Y. A. (1997) 'Mast cells', *Physiol Rev*, 77(4), pp. 1033-79.

Nava, S., Guglielmo, A. A. and Mangold, A. J. (2009) 'An overview of systematics and evolution of ticks', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14(8), pp. 2857-77.

Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z. and Nickoloff, B. J. (2009) 'Skin immune sentinels in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 9(10), pp. 679-91.

Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C. and Nuttall, P. A. (2005) 'Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*', *J Immunol*, 174(4), pp. 2084-91.

Nuttall, P. A. (2019) 'Wonders of tick saliva', *Ticks Tick Borne Dis*, 10(2), pp. 470-481.

Pacheco, R., Prado, C. E., Barrientos, M. J., Bernales, S. (2009) 'Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells', *J Neuroimmunol*, 216(1-2):8-19.

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A. and Stuart, D. I. (1999) 'Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure', *Mol Cell*, 3(5), pp. 661-71.

Peterková, K., Vancová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Simo, L. and Nuttall, P. A. (2008) 'Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks', *Med Vet Entomol*, 22(2), pp. 167-71.

Poole, N. M., Mamidanna, G., Smith, R. A., Coons, L. B., Cole, J. A. (2013) 'Prostaglandin E(2) in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile', *Parasit Vectors*, 11;6(1):261.

Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D. and Lerner, E. A. (1996) 'Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts', *Am J Trop Med Hyg*, 54(6), pp. 665-71.

Reichhardt, M. P., Johnson, S., Tang, T., Morgan, T., Tebeka, N., Popitsch, N., Deme, J. C., Jore, M. M. and Lea, S. M. (2020) 'An inhibitor of complement C5 provides structural insights into activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(1), pp. 362-370.

Ribeiro, J. M. and Walker, F. A. (1994) 'High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*', *J Exp Med*, 180(6), pp. 2251-7.

Sangamnatdej, S., Paesen, G. C., Slovak, M. and Nuttall, P. A. (2002) 'A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva', *Insect Mol Biol*, 11(1), pp. 79-86.

Sankar, S., Ramamurthy, M., Nandagopal, B. and Sridharan, G. (2017) 'In Silico Validation of D7 Salivary Protein-derived B- and T-cell Epitopes of *Aedes aegypti* as Potential Vaccine to Prevent Transmission of Flaviviruses and Togaviruses to Humans', *Bioinformation*, 13(11), pp. 366-375.

Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. and Cassatella, M. A. (2000) 'The neutrophil as a cellular source of chemokines', *Immunol Rev*, 177, pp. 195-203.

Schoeler, G. B. and Wikel, S. K. (2001) 'Modulation of host immunity by haematophagous arthropods', *Ann Trop Med Parasitol*, 95(8), pp. 755-71.

Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renaud, J. C. and Vanderplasschen, A. (2007) 'The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species', *Microbes Infect*, 9(2), pp. 247-50.

Schuijt, T. J., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., Deponte, K., Wouters, D., Brouwer, M., Oei, A., Roelofs, J. J., van Dam, A. P., van der Poll, T., Van't Veer, C., Hovius, J. W. and Fikrig, E. (2011) 'A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the lyme disease agent', *Cell Host Microbe*, 10(2), pp. 136-46.

Severson, D. W. and Behura, S. K. (2012) 'Mosquito genomics: progress and challenges', *Annu Rev Entomol*, 57, pp. 143-66.

Shimabukuro, P. H. F., de Andrade, A. J. and Galati, E. A. B. (2017) 'Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution', *Zookeys*, (660), pp. 67-106.

Singh, K., Davies, G., Alenazi, Y., Eaton, J. R. O., Kawamura, A. and Bhattacharya, S. (2017) 'Yeast surface display identifies a family of evasins from ticks with novel polyvalent CC chemokine-binding activities', *Sci Rep*, 7(1), pp. 4267.

Soares, M. B., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R. and Bozza, M. (1998) 'The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor', *J Immunol*, 160(4), pp. 1811-6.

Spencer Clinton, J. L., Vogt, M. B., Kneubehl, A. R., Hibl, B. M., Paust, S. and Rico-Hesse, R. (2023) 'Sialokinin in mosquito saliva shifts human immune responses towards intracellular pathogens', *PLoS Negl Trop Dis*, 17(2), pp. e0011095.

Spitzova, T., Sumova, P., Volfova, V., Polanska, N., Pochtova, L. and Volf, P. (2020) 'Interactions between host biogenic amines and sand fly salivary yellow-related proteins', *Parasit Vectors*, 13(1), pp. 237.

Strayer, E. C., Lu, S., Ribeiro, J. and Andersen, J. F. (2021) 'Salivary complement inhibitors from mosquitoes: Structure and mechanism of action', *J Biol Chem*, 296, pp. 100083.

Sumova, P., Sima, M., Kalouskova, B., Polanska, N., Vanek, O., Oliveira, F., Valenzuela, J. G. and Volf, P. (2019) 'Amine-binding properties of salivary yellow-related proteins in phlebotomine sand flies', *Insect Biochem Mol Biol*, 115, pp. 103245.

Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., Du, S., Fan, H., Chen, C. H., Zhang, R., Wang, P. and Cheng, G. (2020) 'A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy', *Nat Commun*, 11(1), pp. 260.

Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M., Andersen, J. F., Shi, G. P., Chavakis, T., Ribeiro, J. M. and Kotsyfakis, M. (2009) 'The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity', *J Immunol*, 182(12), pp. 7422-9.

Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. and Francischetti, I. M. (2007) 'Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva', *J Immunol*, 179(3), pp. 1497-505.

Sá-Nunes, A. and Oliveira, C. J. F. (2021) 'Dendritic Cells as a Disputed Fortress on the Tick-Host Battlefield', *Trends Parasitol*, 37(4), pp. 340-354.

Sá-Nunes, A., Oliveira, C. J. F. and Ribeiro, J. M. (2020) 'Mast Cells and Basophils: From Malevolent Design to Coevolutionary Arms Race', *Trends Parasitol*, 36(8), pp. 655-659.

Tirloni, L., Reck, J., Terra, R. M., Martins, J. R., Mulenga, A., Sherman, N. E., Fox, J. W., Yates, J. R., Termignoni, C., Pinto, A. F. and Vaz, I. a. S. (2014) 'Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females', *PLoS One*, 9(4), pp. e94831.

Titus, R. G., Bishop, J. V. and Mejia, J. S. (2006) 'The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission', *Parasite Immunol*, 28(4), pp. 131-41.

Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E. and de Silva, A. (2007) 'Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway', *Insect Mol Biol*, 16(4), pp. 469-79.

Tyson, K. R., Elkins, C. and de Silva, A. M. (2008) 'A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin', *J Immunol*, 180(6), pp. 3964-8.

- Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N. and Fujisaki, K. (2007) 'Haemaphysalis longicornis: molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks', *Exp Parasitol*, 115(2), pp. 135-42.
- Valdés, J. J., Cabezas-Cruz, A., Sima, R., Butterill, P. T., Růžek, D. and Nuttall, P. A. (2016) 'Substrate prediction of Ixodes ricinus salivary lipocalins differentially expressed during Borrelia afzelii infection', *Sci Rep*, 6, pp. 32372.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., de Miranda-Santos, I. K., Marinotti, O., Francischetti, I. M. and Ribeiro, J. M. (2002) 'The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera', *Insect Mol Biol*, 11(2), pp. 149-55.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N. and Ribeiro, J. M. (2000) 'Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, Ixodes scapularis', *J Biol Chem*, 275(25), pp. 18717-23.
- Wang, F., Lu, X., Guo, F., Gong, H., Zhang, H., Zhou, Y., Cao, J. and Zhou, J. (2017) 'The immunomodulatory protein RH36 is relating to blood-feeding success and oviposition in hard ticks', *Vet Parasitol*, 240, pp. 49-59.
- Wang, H. and Nuttall, P. A. (1999) 'Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite', *Cell Mol Life Sci*, 56(3-4), pp. 286-95.
- Wang, Y., Li, Z., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., Gong, H. and Zhou, J. (2016) 'Specific histamine binding activity of a new lipocalin from Hyalomma asiaticum (Ixodidae) and therapeutic effects on allergic asthma in mice', *Parasit Vectors*, 9(1), pp. 506.
- Wheat, W. H., Pauken, K. E., Morris, R. V. and Titus, R. G. (2008) 'Lutzomyia longipalpis salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells', *J Immunol*, 180(12), pp. 8286-98.
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B. W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., My Pham, V., Elnaiem, D. E., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G. and Andersen, J. F. (2011) 'Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly Lutzomyia longipalpis that confers protective immunity against Leishmania major infection', *J Biol Chem*, 286(37), pp. 32383-93.
- Yan, X., Feng, H., Yu, H., Yang, X., Liu, J. and Lai, R. (2008) 'An immunoregulatory peptide from salivary glands of the horsefly, Hybomitra atriperoides', *Dev Comp Immunol*, 32(10), pp. 1242-7.
- Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J. and Lai, R. (2006) 'A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, Hyalomma asiaticum asiaticum', *Biochem Biophys Res Commun*, 343(2), pp. 585-90.

Zeidner, N. S., Higgs, S., Happ, C. M., Beaty, B. J. and Miller, B. R. (1999)
'Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice', *Parasite Immunol*, 21(1), pp. 35-44.

Zhao, R., Yu, X., Yu, H., Han, W., Zhai, L., Han, J. and Liu, J. (2009)
'Immunoregulatory peptides from salivary glands of the horsefly, *Tabanus pleskei*', *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 154(1), pp. 1-5.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

Controle: mecanismos de resistência e novas tecnologias





Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 19

Novos Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos: Avaliando Resistência e Inseticidas

Victor Guimarães Ribeiro¹
Brenda Martins Vasconcellos¹
Luis Felipe Costa Ramos¹
Camila Mattos de Oliveira²
Danielle Maria Perpétua de Oliveira¹
Evelize Folly das Chagas²
Monica Ferreira Moreira¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

² Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Copyright: © 2024 [Victor Guimarães Ribeiro, Brenda Martins Vasconcellos, Luis Felipe Costa Ramos, Camila Mattos de Oliveira, Danielle Maria Perpétua de Oliveira, Evelize Folly das Chagas, Monica Ferreira Moreira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

A demanda crescente por alimentos no mundo em decorrência do aumento populacional nos países em desenvolvimento, da maior longevidade e do incremento da classe média, principalmente no Sudeste Asiático, projeta-se como consequência da necessidade de expansão da produção de alimentos em 35% até 2030 (EMBRAPA, 2020). A expectativa é ainda maior para 2050, quando se estima que a população global alcançará 9,5 bilhões de pessoas (United Nations, 2017) e o Brasil será responsável pela produção de alimentos para abastecer 40% dessa população (FAO-ONU, 2017). Por esses motivos, os interesses econômicos voltados para o agronegócio estão ampliando muito a dimensão do setor agrícola.

Nesse contexto, os insetos tornam-se personagens cada vez mais importantes, por serem responsáveis por grandes perdas econômicas. Isso porque, bilhões de dólares são gastos com prejuízos agrícolas nas colheitas e com produtos armazenados (Ortiz-Urquiza, Luo, Keyhani, 2015). Outro aspecto relevante relacionado aos insetos é a capacidade de transmitir agentes infecciosos que causam doenças em humanos e animais. Todos os anos são notificadas mais de um milhão de mortes provocadas por doenças transmitidas por insetos vetores, como a dengue, a zika, a chikungunya, a filariose, as leishmanioses, a doença de Chagas, entre outras (Ortiz-Urquiza, Luo, Keyhani, 2015). Em geral, para essas doenças não estão disponíveis terapias e vacinas efetivas. Além disso, elas são, em geral, consideradas doenças negligenciadas, pois afetam pessoas que estão em condições de vulnerabilidade econômica e social em países pobres e, em uma segunda classificação mais recente, muitas dessas doenças estão diretamente relacionadas ao saneamento ambiental inadequado (DRSAI).

Assim sendo, o controle de insetos vetores e de pragas se faz necessário para o aumento na produção de alimentos, o controle de doenças e a qualidade de vida. Atualmente, com o alinhamento às políticas para o desenvolvimento limpo e sustentável, existe a necessidade e a mudança de mentalidade mundial para políticas de sustentabilidade. Com mais ações, de acordo com o conceito de ecologicamente correto, vários padrões foram modificados, em especial, o controle de insetos. A busca por inseticidas alternativos e *ecofriendly* (El-Sayed, 2020) para o controle seletivo de insetos e o desenvolvimento de outras metodologias de controle de insetos vetores e de manejo de pragas têm sido um desafio cada vez mais complexo.

O aumento do agronegócio também desencadeia uma enorme quantidade de resíduos, que impactam o ambiente. E, atualmente, o reaproveitamento de

resíduos agrícolas tem sido muito estudado como fonte de energia para ampliar a participação dos biocombustíveis sustentáveis, de modo a implementar outras fontes de energia renováveis na matriz energética. Além disso, almeja-se otimizar o aproveitamento de resíduos agrícolas e o desenvolvimento de novos processos de manejo e de utilização dos dejetos da produção animal (EMBRAPA, 2020).

Estratégias de controle

Práticas para controlar insetos são bastante antigas. Existem registros que datam de mais de 2.000 anos na China (Braga, Valle, 2007). Historicamente, os países desenvolvidos tiveram mais sucesso no controle de pragas de agricultura e insetos vetores, sendo satisfatoriamente controlados e, diversas vezes, quase alcançando a erradicação. Até meados de 1.800, o controle de pragas dependia, na maior parte, da lavagem da praga presente na colheita. Os primeiros químicos utilizados foram enxofre inorgânico, arsênico e, subsequentemente, arsenato de chumbo, criolita e ácido bórico. Subsequentemente, vieram os inseticidas de origem botânica (Casida, Quistad, 1998).

Inicialmente, o controle de pragas foi compreendido como o conjunto de estratégias tomadas com o objetivo de evitar, atenuar ou retardar o impacto de pragas nas lavouras e nos animais domésticos. Em seguida, foi introduzida a ideia de controle integrado de pragas com o trabalho de Hoskins e colaboradores, (1939), sendo definido como controle de pragas que harmoniza e integra os controles biológicos e químicos (Kogan, 1998).

Para que o controle de insetos seja efetivo, é necessário dispor de vários métodos, conhecendo a realidade do local, para que possibilite a sua execução de maneira integrada e seletiva. As práticas de controle devem levar em consideração aspectos fisiológicos do inseto-alvo e seu ciclo de vida, realizando o monitoramento populacional e, a partir disso, traçando o melhor período de intervenção (Moreira et al., 2012). Conhecer os picos populacionais também é um fator relevante para definir as intervenções nos possíveis períodos de infestação e, conseqüentemente, reduzir as perdas econômicas (Aluja, 1994; Braga, Valle, 2007).

As estratégias para o controle de insetos são diversas. Os inseticidas químicos, tais como organofosforados, carbamatos, piretroides e os neonicotinoides, ainda são os produtos mais utilizados, por serem mais baratos, tradicionais e com razoável eficácia no controle, apesar do elevado risco ambiental e de sua toxicidade em mamíferos (Medeiros et al., 2021). Entretanto, há muitos relatos de populações de insetos cada vez mais resistentes aos inseticidas tradicionais (Sparks et al., 2021).

Controle químico

O controle químico é realizado através do uso de inseticidas químicos, os quais, inicialmente, eram divididos em quatro classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (Manjarres-Suarez, Olivero-Verbel, 2013). Esses compostos são amplamente conhecidos pelos seus efeitos negativos ao meio ambiente, bem como pelo desenvolvimento de resistência nos insetos. Devido a isso, diversos inseticidas mais novos foram desenvolvidos, como produtos químicos sintéticos derivados de microrganismos e reguladores do crescimento (Sharma et al., 2020).

Organoclorados

No período da Segunda Guerra Mundial, surgiram os organoclorados, os primeiros inseticidas sintéticos. Eles se diferenciam, principalmente, na estrutura química e nos mecanismos de toxicidade em espécies alvo e não-alvo. Dentre a classe de inseticidas organoclorados, o DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) é o mais conhecido, assim como seus análogos. Os ciclodienos representam um outro grupo relevante de inseticidas organoclorados, em que estão inseridos o clordano, a dieldrina, a aldrina, o heptacloro e a endrina (Costa, 2015). Os compostos orgânicos halogenados são altamente lipofílicos, possuindo um longo período de biotransformação e, assim, apresentam grande tendência a se concentrarem no tecido adiposo. Além disso, em função da presença do anel clorado estável, esses compostos são extremamente persistentes na natureza (Kutz, Wood, Bottimore, 1991). Entre os anos 1935 e 1945, houve o desenvolvimento do DDT e de outros inseticidas organoclorados. Entretanto, o grande valor ao DDT foi dado na Segunda Guerra Mundial, quando uma epidemia de tifo foi rápida e completamente controlada, após o uso do inseticida (Costa, Galli, Murphy, 2013).

O mecanismo de ação dessa classe de inseticidas varia de acordo com a sua subclassificação. Os DDT e seus análogos agem no sistema nervoso periférico, impedindo ou desativando os canais de sódio presentes no axônio após a ativação e a despolarização da membrana do neurônio. Como consequência, ocorre a hiperexcitabilidade do nervo, ocasionando variadas descargas no neurônio de maneira espontânea e/ou a partir de um estímulo único. Já os ciclodienos ou inseticidas alicíclicos clorinados agem promovendo a ligação da picrotoxina no complexo ionóforo de cloreto de ácido gama-aminobutírico (GABA), que inibe o fluxo de íons cloro no nervo, resultando em hiperexcitação (Coats, 1990).

Apesar de muito eficiente no controle de pragas e vetores, os inseticidas organoclorados apresentam demasiado risco para a saúde humana, contaminando o leite materno, principalmente no primeiro mês de lactação (Witczak, Pohoryło, Abdel-Gawad, 2021). Além disso, afeta a fertilidade masculina pois, o hexaclorobenzeno (HCB) correlaciona-se, significativamente, com a morte de espermatozoides (Amir et al., 2021), por exemplo. Além disso, também afeta a fertilidade feminina, promovendo a redução do ciclo menstrual, desregulando a liberação de hormônios esteroides sexuais, e prejudicando a esteroidogênese, a foliculogênese e a ovulação (Sharma et al., 2020).

Adicionalmente, há relação de metabólitos do DDT, como o dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE), no desenvolvimento de câncer de mama (Snedeker, 2001). Esses inseticidas acumulam-se no solo e nos sistemas aquáticos, prejudicando a sobrevivência dos animais e, indiretamente, atingem os humanos através da biomagnificação (Chopra, Sharma, Chamoli, 2011), isto é, por meio do acúmulo dessas substâncias através da teia alimentar.

Organofosforados

Existem diversos compostos organofosforados em uso por todo o mundo. Os organofosforados são derivados de ácido fosfórico, fosfínico e fosfônico. Sua classificação é dada de acordo com a cadeia lateral, bem como com outros elementos ligados aos átomos de fósforo (Gupta, 2011).

Historicamente, inseticidas organofosforados altamente tóxicos foram sintetizados por Schrader e seu grupo, por ordem do Ministério de Defesa Alemão, para atuarem como agentes/gases tóxicos em guerra química antes da Segunda Guerra Mundial. Como resultado, foi desenvolvido o composto diisopropil fosforofluoridato (DFP), que não tinha propriedade tóxica o suficiente para ser usado no sistema nervoso, mas era extremamente tóxico como inseticida (Gupta et al., 2017).

Os organofosforados ligam-se às enzimas acetilcolinesterases, no sítio de ligação para acetilcolina, inibindo a sua atividade de maneira irreversível. Essa inibição tem como resultado o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, quando ocorre a superestimulação e a interrupção da transmissão dos impulsos nervosos no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), causando a paralisia e a morte dos insetos (Bardin et al., 1994). Os organofosforados não têm poder residual, devido ao fato de serem quimicamente instáveis e não de se acumularem em tecidos (Beaty, Marquardt, 1996)

Carbamatos

Os inseticidas carbamatos são derivados de ésteres de ácido carbâmico. Essa classe de inseticida ganhou popularidade devido à baixa toxicidade em mamíferos e pela capacidade de atingir um amplo espectro de insetos (Ware, Whitacre, 2004). O mecanismo de ação desses inseticidas é similar ao dos inseticidas organofosforados, tendo como alvo a enzima acetilcolinesterase. No entanto, ocorre a regeneração espontânea da enzima carbamilada em enzima ativa, em um curto período (Fukuto, 1990). Ainda, os inseticidas carbamatos não conseguem atingir prontamente a barreira hematoencefálica, de modo que a resposta na atividade cerebral da acetilcolinesterase é, notavelmente, menor do que a causada pelos organofosforados (Valle, Lotti, 2015).

Piretroides

As piretrinas são um grupo de seis ésteres com atividade inseticida intimamente relacionados, derivados de extratos de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Entretanto, devido a fácil degradação desses compostos, foram desenvolvidos compostos sintéticos análogos, chamados de piretroides. Esses são divididos em tipo I e tipo II, baseados nos sinais tóxicos que foram observados em ratos (Costa, 2015).

Os inseticidas piretroides agem nos canais de sódio, dependentes de voltagem, causando um efeito prolongado da excitação, com pouco ou nenhum potencial citotóxico direto (Ray, Ray, Forshaw, 2000; Clark, Symington, 2011). A ação desses inseticidas nesses canais demonstra uma forte estereoespecificidade, que acarreta diferentes níveis de toxicidade, de acordo com a forma isomérica (Ray, Ray, Forshaw, 2000).

O uso dos inseticidas piretroides baseia-se, principalmente, na segurança ambiental. Porém, eles apresentam potencial tóxico para os mamíferos, uma vez que o seu mecanismo de ação é o mesmo descrito para os insetos (Matsuo, 2019).

Neonicotinoides e spinosinas

Os neonicotinoides são uma classe de inseticidas sintéticos, largamente utilizados na agricultura, com boa eficácia no controle de pragas que se alimentam de seiva elaborada, como, por exemplo, os afídeos, as moscas brancas, as cigarrinhas e, também, no controle dos insetos que se alimentam dos tecidos vegetais, como larvas de lepidópteros e besouros (Bass, Field, 2018). São

categorizados no grupo quatro dos inseticidas pela IRAC (traduzido do inglês *Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas*): moduladores competitivos do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (Sparks, Nauen, 2015), um importante canal iônico que é peça-chave na sinalização nervosa (Bass, Field, 2018). Neonicotinoides são derivados da nitiiazina, um composto que contém um grupo funcional nitrometileno (Kollmeyer et al., 1999). A presença desse grupo funcional torna esse composto altamente instável à luz do sol (Seifert, 2014). Além disso, a irradiação direta promove a perda da atividade inseticida e a formação de mais de quarenta produtos de degradação (Seifert, 2014).

Devido à atividade inseticida moderada e à pouca estabilidade no ambiente, a nitiiazina não foi comercializada (Ihara, Matsuda, 2018). Para resolver esses problemas, Kagabu e outros colaboradores sintetizaram a imidacloprida, após encontrar o derivado nitroimino, com maior atividade inseticida (Kagabu, 2011). Posteriormente, a empresa japonesa Nippon Soda¹ desenvolveu a acetamiprida, que mostrou bons resultados contra insetos das ordens Hemiptera, Thysanoptera e Lepidoptera (Yamamoto, Casida, 1999). Imidacloprida e acetamiprida possuem o grupamento cloropiridil em sua estrutura, sendo classificados como neonicotinoides de primeira geração (Hartwig, Aran, Mak Commission, 2018). Os neonicotinoides de segunda geração, como o tiametoxam, possuem o grupamento clorotiazolil em substituição ao grupamento cloropiridil, que resultou no aumento da atividade contra insetos mastigadores. Além disso, o tiametoxam também recebeu o grupo metil, aumentando, assim, sua atividade contra insetos sugadores (Maienfisch et al., 2001). O dinotefuran é um exemplo de neocotinoide de terceira geração. Essa molécula foi sintetizada após a remoção do anel heterocíclico cloropiridina ou clorotiazol, seguido da adição de tetrahydro-3-furilmetilo. Os neonicotinóides de terceira geração fazem parte da subclasse dos compostos furanicotinílicos (Wakita et al., 2003).

Todos os inseticidas neonicotinoides são extremamente específicos aos nAChR dos insetos, de modo que a toxicidade para vertebrados é considerada baixa. Além disso, são solúveis em água, podendo ser adicionados em plantas e distribuídos por todos os tecidos vegetais. Tais propriedades sistêmicas permitem a aplicação na semente, antes do plantio. Assim, a colheita estará segura, de maneira que outras pulverizações não serão necessárias (Bass, Field, 2018). Entretanto, há relatos de toxicidade desses inseticidas em abelhas, a qual ocorre, principalmente, por via oral, uma vez que os neonicotinoides possuem baixa hidrofobicidade, diminuindo a toxicidade por contato na cutícula do inseto (Decourtye, Devillers, 2010). A grande preocupação se dá devido às propriedades

¹Nippon Soda Co., Ltd.

sistêmicas dos neonicotinoides, que resulta em exposição via néctar, pólen e fluido de gutação, aumentando, assim, os riscos para abelhas e outros insetos polinizadores (Fairbrother et al., 2014).

A bactéria gram-positiva *Saccharopolyspora spinosa* produz espinosinas, durante sua fermentação, sendo as espinosinas A e D os produtos principais. A junção desses dois produtos resultou na síntese do espinosade, o primeiro inseticida comercial da classe. Esse inseticida é muito utilizado contra pragas de armazenamento, pois é tóxico para muito insetos; porém, é seguro para mamíferos (Bridget et al., 2022). O IRAC classifica as espinosinas no grupo 5: agem como moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Sparks, Nauen, 2015), diferente dos neocotinoides, que atuam como agonistas. As espinosinas modificam a conformação da proteína receptora de acetilcolina, aumentando a atividade, que resulta na ação prolongada. Como resultado, tem-se a transmissão contínua dos impulsos nervosos, que promovem a contração muscular e os tremores contínuos (Salgado, 1998).

Inseticidas de terceira geração

Drogas reguladoras do crescimento de insetos (IGR; do inglês, *insect growth regulators*) são consideradas inseticidas de terceira geração, por atingir apenas o desenvolvimento e o crescimento dos insetos, sem ação sobre organismos vertebrados (Subramanian, Shankarganesh, 2016). Os IGR estão divididos em dois grupos: hormonais e não hormonais.

O grupo dos hormonais são considerados interruptores endócrinos, caracterizados por mimetizar a ação dos IGR naturais, o hormônio da muda ou ecdisona e o hormônio juvenil (Vinson, Plapp, 1974). Assim, retardam ou inibem o crescimento, o desenvolvimento e a capacidade reprodutiva dos insetos (Kamal, Khater, 2010), sendo classificados de acordo com o seu mecanismo de ação (Subramanian, Shankarganesh, 2016).

Os compostos análogos ao hormônio juvenil ligam-se aos receptores desse hormônio e, deste modo, o ciclo de vida é interrompido e os insetos não atingem a fase adulta. Adicionalmente, também afetam a remodelação do intestino médio e a maturação dos ovos (Bear, Monteiro, 2013). Nesta categoria, o fenoxicarbe é composto por uma função carbamato em um dos lados da molécula, e uma fração piretróide do outro lado. A preparação comercial denominada Insegar[®] é eficientemente utilizada contra uma ampla gama de insetos (Sullivan, 2010). Kamimura e Kiuchi (2002) relataram que o tratamento com fenoxicarbe no terceiro e quarto estágio larval no bicho-da-seda *Bombyx mori* desencadeou um

estádio larval extra e um estágio intermediário, entre larva e pupa. O piriproxifen é um agonista do hormônio juvenil do tipo não-terpenoidal aromático, isto é, liga-se aos receptores celulares desse hormônio, mimetizando sua ação, sendo um potente supressor da embriogênese e da última fase do ciclo de vida dos insetos (Dhadialla, Carlson, Le, 1998).

Em *Musca domestica*, larvas de terceiro estágio, tratadas com diferentes concentrações de piriproxifen, foram significativamente afetadas na transição para o estágio de pupa, reduzindo as taxas de pupação. Além disso, a taxa de emergência dos adultos provenientes dessas pupas também foi reduzida, em comparação com o grupo controle (Khan, 2021). O hidroprene é um inseticida doméstico com baixa solubilidade em água (Lewis, 2016). Dependendo da espécie-alvo, o hidroprene é capaz de causar diferentes efeitos tóxicos, uma vez que o hormônio juvenil tem papéis distintos nos insetos (Mohandass et al., 2006). O metoprene é um inseticida sintético terpenoide, com rápida degradação com a luz solar. Também é brevemente metabolizado no solo, em condições aeróbicas e anaeróbicas, sendo o dióxido de carbono o principal produto de degradação (Silberhorn, 2005). Esses dois últimos princípios ativos foram muito utilizados no controle de várias espécies urbanas, como exemplificado no trabalho de Sierras e Schal (2020). Nesse estudo, o tratamento com (S)-hidroprene e (S)-metoprene, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de até 1%, foi capaz de reduzir as taxas de postura e de eclosão de ovos de *Cimex lectularius* L., além de causar alterações na melanização da cutícula e interromper a ecdise. Além disso, os tratamentos com concentrações mais elevadas (10 e 100 µg/ml de sangue) de inseticidas desencadearam altas taxas de mortalidade, sendo mais evidente no grupo de fêmeas tratadas com o metoprene (38 e 84%) do que com hidroprene (0 e 40%).

O hormônio 20-hidroxiecdisona (20E) tem como alvo molecular um heterodímero com dois receptores, o receptor de ecdisteroide (EcR) e o ultraespiráculo (USP) (Dhadialla, Carlson, Le, 1998), tornando-se ativo após a ligação. A 20E faz a ativação de genes em cascata, que são regulados positivamente, dando início ao processo de muda. Após o pico de 20E, ocorre a expressão de diversos genes regulados negativamente, quando o inseto imaturo está no estágio “farato”, ou seja, pronto para o processo de ecdise (Retnakaran et al., 2003). Compostos sintéticos que mimetizam a ação desse hormônio ligam-se aos receptores ecdisteroide, iniciando um processo de muda precoce e incompleta, que é letal para o inseto (Ishaaya, Horowitz, 1998; Retnakaran et al., 2003).

Os IGR não-hormonais atuam sobre a formação do exoesqueleto dos insetos. As principais classes são as benzoilfenilureias (BFU), inibidores da

síntese de quitina. As BFU são substâncias derivadas do composto obtido da fusão do herbicida diclorobenzil e do composto diuron 1-(2,6 difluorobenzoil)-3-(3-4 diclorofenil)-ureia. O composto resultante, denominado DU19111, não apresentou atividade herbicida, mas apresentou propriedades inseticidas contra lagartas (*Pieris Brassicae*), mosquitos (*Aedes aegypti*), moscas (*M. domestica*), gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca gregaria*) e o percevejo praga de algodão (*Dysdercus supersticiosus*).

Em seguida, foram desenvolvidos diferentes análogos do composto DU1911, sendo o diflubenzuron (DFU) o primeiro a se tornar comercial. Hoje, tem-se no mercado BFU até de terceira geração e 15 compostos são comercializados (Balanidou, Grigoraki, Vontas, 2018). Esses compostos são seletivos por interferirem somente com os depósitos de quitina em insetos, sendo seu único mecanismo de ação. Eles apresentam baixa toxicidade e são seguros para organismos não-alvo, como humanos, pássaros e abelhas. Depois do DFU, surgiu o triflumurom, um inseticida de segunda geração que exibe uma ampla atividade ovicida e larvicida, se comparado às BFU de primeira geração. A terceira geração desses inseticidas exibe forte atividade tópica e amplo espectro como larvicida (Sun et al., 2015).

O mecanismo de ação das BFU tem sido investigado, mas ainda não está totalmente elucidado. Foi observado que DFU inibe a incorporação de *N*-acetil na quitina *in vivo*, mas não tem efeito bioquímico sobre o sistema livre de célula (Matsumura, 2010). Inicialmente, Matsumura estabeleceu que o sítio de ação das BFU é o receptor sulfoniluréia (SUR) em *Blatella germanica* e *Periplaneta americana*, através do uso de glibenclamida, um inibidor típico de SUR. Esse inibidor auxilia nos movimentos de exocitose das vesículas, como um membro do grupo de transportador ABC ao qual o SUR pertence. Por outro lado, Meyer et al. (2013) mostraram que o SUR é dispensável para síntese de quitina em embrião de *Drosophila melanogaster*, podendo ter um outro ABC transportador sensível à sulfoniluréia, que não o SUR, durante a formação da cutícula.

Recentemente, foi observado, em larvas de *Lepeophtheirus salmonis*, que o gene da enzima quitina sintase 1 (CHS1), último passo da via de biossíntese de quitina, está envolvido no mecanismo de ação de BFU. O nível de transcritos de CHS1 foi diminuído em larvas tratadas com hexaflumuron e DFB, e todas as BFU afetaram a muda de larvas de náuplio II de *L. salmonis*, mas em diferentes concentrações (Harðardoóttir et al., 2019). A resistência às benzoilfeniluréias é um fenômeno raro e está correlacionada à ação de enzimas monooxigenases envolvidas na eliminação do produto tanto em insetos vetores (Kotze, Sales, Barchia, 1997) quanto em pragas (Ishaaya, 1993). A principal limitação para o uso

das BFU está no início da ação do efeito ser lento, se comparado aos inseticidas químicos, que matam muito rapidamente. As BFU demandam mais tempo para que a redução no número de insetos seja observada, embora a interrupção da alimentação larval, geralmente, ocorra muito mais cedo. Esse mecanismo de ação mais lento exige uma reeducação dos usuários das BFU, como agricultores e fazendeiros, que precisam lembrar que o produto vai eliminar o inseto, mas não imediatamente. Outra limitação é que o grupo da benzoilfenilureias pode sofrer degradações no meio ambiente, como degradação pelos raios ultravioleta (Sun et al., 2015).

Controle biológico

Uma alternativa aos inseticidas químicos tem sido os agentes naturais denominados biocontroladores, que são produtos com organismos vivos para o controle de pragas agrícolas à base de microrganismos, parasitoides e predadores (Zara et al., 2016). Os biocontroladores podem ser manejados ou inseridos no sistema para suprimir as pragas, promovendo a produção de alimentos de forma mais sustentável, bem como a conservação de habitats naturais, ou seja, a preservação do ambiente de forma ecologicamente adequada. Os biocontroladores de qualquer natureza, sejam eles patógenos, predadores, parasitas, herbívoros ou antagonistas, podem atuar sobre as populações de insetos, de suas presas ou de seus hospedeiros, prestando o serviço ecossistêmico de controle biológico (Fontes, Valadares-English, 2020).

Robbs (1992) relata a introdução do parasitoide *Prospaltella berleseii* (Howard) (Hymenoptera: Aphelinidae) para o controle biológico da cochonilha-branca da amoreira e do pessegueiro *Pseudaulacaspis pentagona* (Targ.) (Homoptera: Diaspididae), no estado de São Paulo, afirmando que o programa teve ótimos resultados. Outras introduções foram feitas (Robbs, 1992; Parra, 2014), porém, talvez devido à característica empírica dessas introduções, comum aos Programas de Controle Biológico à época, a maioria desses resultados não esteja publicada (Van Den Bosch, Messenger, Gutierrez, 1982). Apesar da falta de publicações oficiais, o Brasil conta com um bom número de “inimigos naturais”, que foram objetos de uso em Programas de Controle Biológico por importação, com liberações inoculativas e/ou inundativas de predadores, parasitoides e patógenos (Fontes, Valadares-English, 2020). Assim, o controle biológico tem sido importante para conter pragas exóticas, nativas ou naturalizadas no país, envolvendo parasitoides, predadores e patógenos de insetos e ácaros (Robbs, 1992; Van Lenteren, Bueno, 2003; Alves, Lopes, 2008; Li et al., 2010; Parra et al., 2016).

Na classe de biocontroladores, diversos grupos de vírus entomopatogênicos são agentes de controle microbiano (MCA, do inglês *microbial control agents*), particularmente importantes para o controle de pragas da ordem Lepidoptera (Bauer et al., 1998; Eberle et al., 2015). Desses, os mais utilizados são os baculovírus, importantes patógenos de algumas pragas mundialmente relevantes. *Baculoviridae* é uma família de vírus amplamente estudada e reconhecida por sua ação patogênica a insetos, constituindo o maior grupo de vírus conhecido por atacar esse grupo de invertebrados. Seus hospedeiros incluem insetos das ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Harrison et al., 2018). Dentre os vírus que infectam invertebrados, os baculovírus são os que possuem maior quantidade de estudos acerca de sua biologia, patologia e ecologia (Lacey et al., 2015). São considerados agentes de controle seguros, prontamente produzidos em massa, altamente patogênicos e facilmente formulados e aplicados. Entre os entomopatógenos, um dos casos de destaque no Brasil e no mundo foi o programa de controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), com o baculovirus anticarsia (AgNPV) nos anos 1980 e 1990 no estado do Paraná (Fontes, Valadares-Inglish, 2020).

Alguns fungos são entomopatógenos naturais que, frequentemente, causam epizootias em insetos hospedeiros e possuem muitos traços desejáveis, que favorecem seu desenvolvimento, como MCA. Atualmente, os pesticidas microbianos comercializados à base de fungos entomopatogênicos ocupam ampla faixa do mercado agrícola. Recentemente, vários fungos entomopatogênicos no filo Ascomycota foram reclassificados com ferramentas moleculares e tecnológicas, incluindo inúmeras espécies com base na filogenia, bem como anamorfos correspondentes (formas assexuadas) e teleomorfos (formas sexuais) (Newell, Wall, Maruya, 2000; Suh So et al., 2006; Hibbett et al., 2007; Humber, 2008; Rehner, Humber, 2009; Rehner, Buckley, 2011). Apesar do enorme sucesso de fungos entomopatogênicos como MCA em laboratório, nem sempre experiências positivas são observadas no campo (de Vega et al., 2012). Por esta razão, muitas vezes é preciso realizar buscas por novos e melhores isolados de fungo, ao invés de se tentar investigar os fatores subjacentes que afetaram o desempenho no ambiente (Kamal, Khater, 2010).

O uso de nematoides entomopatogênicos (EPN, do inglês *entomopathogenic nematodes*) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* levou a um progresso substancial no controle. O número de pragas-alvo que se mostrou suscetível aos EPN continuou a aumentar na última década. Avanços nesse sentido foram feitos, principalmente, em habitats do solo, onde os EPN são protegidas de extremos ambientais. Mas, progressos também foram obtidos através do uso de nematoides

des em habitats acima do solo, devido ao desenvolvimento de formulações protetoras. Este avanço resultou em melhorias na produção de nematoides, tecnologia usando sistemas *in vivo* e *in vitro*, novos métodos de aplicação e desenvolvimento de novas cepas (Fan et al., 2022).

Um pequeno número de bactérias entomopatogênicas tem sido desenvolvido comercialmente para o controle de insetos, principalmente várias subespécies de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Esses patógenos possuem vantagens em relação aos inseticidas químicos e MCA, como, por exemplo, ação rápida, fácil produção, baixo custo, facilidade para formulação, longa vida útil e a possibilidade de inoculação usando métodos convencionais por equipamentos sistêmicos e de aplicação. Dentre os vários MCA produzidos comercialmente, *B. thuringiensis* tem mais de 50% de participação de mercado.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva presente no solo e que produz cristais parasporais, os quais possuem δ -endotoxinas (inseticidas proteicos) durante a esporulação. Essas toxinas, no ambiente digestivo interno do inseto, podem ser ativadas por proteases digestivas na porção do intestino médio. Nessa região, ligam-se a receptores específicos em células do epitélio intestinal, formando uma espécie de poro, levando à morte do inseto (Talakayala, Katta, Garlandine, 2020; Paul, Das, 2021). Dentre essas δ -endotoxinas, podemos citar as toxinas Cry e Cyt. A primeira é encontrada em todas as linhagens de *B. thuringiensis*, exibindo toxicidade para um amplo grupo de insetos (Palma et al., 2014). A toxina Cyt, menos descrita, é relatada de forma majoritária em linhagens com ação contra insetos da ordem Diptera, principalmente para mosquitos (Soares-da-Silva et al., 2017). *Bacillus thuringiensis* possui outros tipos de proteínas com atividade inseticida. As proteínas inseticidas vegetativas (VIP, do inglês *vegetative insecticidal proteins*), produzidas ao longo do estágio vegetativo do ciclo de crescimento, causam inchaço e ruptura das células epiteliais do intestino médio do inseto por meio de lise osmótica (Lqbal et al., 2021).

A efetividade das toxinas provenientes de *B. thuringiensis* atinge, principalmente, insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Estudos acerca da efetividade das toxinas de *B. thuringiensis* (Bt) em lepidópteros são mais vastos e ainda eficazes na tentativa de mapear quais cepas bacterianas afetam diferentes pragas agrícolas, como *Helicoverpa spp.* (Kranthi et al., 2009; Yang et al., 2021), *A. gemmatalis* (Castro et al., 2019), *Spodoptera spp.* e *Plutella xylostella* (L.) (Park et al., 2022). Com relação a dípteros, foi observada e categorizada a ação de diferentes Bt contra organismos de importância médica e agrônoma (Valtierra-De-Luis et al., 2020), incluindo sua atuação larvicida em insetos vetores (Rao, Goswami, Rawal, 2021). Em relação aos coleópteros, o

conteúdo sobre suas interações com a bactéria é mais limitado quando comparado a outras ordens de insetos; no entanto, é verificada a efetividade de toxinas (Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020).

Na América Latina e em países como Índia, Estados Unidos da América (EUA) e Bangladesh, houve a aprovação e liberação comercial de culturas transgênicas de soja, algodão e berinjela expressando Bt, com resultados satisfatórios no controle de pragas (Talakayala, Katta, Garladinne, 2020). Todavia, é importante ressaltar o surgimento de resistência ao uso de Bt em diferentes insetos, principalmente nas pragas agrícolas. Isso impulsionou o número de estudos para compreender como ocorrem os mecanismos de resposta desses invertebrados às toxinas bacterianas (Pinos et al., 2021), além de estudos específicos de caracterização dos receptores de toxinas Bt (Tanaka et al., 2016; Silva et al., 2019; Dutta et al., 2022) e de moléculas do sistema imune que podem agir contra a infecção bacteriana (Contreras et al., 2015; Li et al., 2018; Ramos et al., 2021). As técnicas utilizadas para observação sistêmica dos insetos em relação a sua resistência contra *B. thuringiensis*, seguem, cada vez mais, a tendência ômica, avaliando o transcriptoma e o proteoma de diferentes tecidos de insetos suscetíveis e resistentes ao *B. thuringiensis* (Shabbir et al., 2019; Pezenti et al., 2021; Lin et al., 2022), além da observação da resposta imediata da infecção (Chimkhan et al., 2022; Jin et al., 2022).

Controle baseado nos semioquímicos

A comunicação química é uma das mais amplas formas de comunicação entre os seres vivos. Os semioquímicos (do grego, *semíon*: sinais) são as substâncias utilizadas como mediadoras nas interações que ocorrem nessa modalidade de comunicação. Essas substâncias podem atuar tanto nas interações intraespecíficas quanto nas interespecíficas. Quando utilizadas nas interações intraespecíficas, são classificadas como feromônios (do grego, *pherein*: carregar; e *horman*: estimular). Já nas interespecíficas, são denominados aleloquímicos. Os seres vivos, desde fungos e bactérias a plantas e animais, interagem entre si e são capazes de se comunicar. Essa comunicação é estabelecida quando um organismo emite um sinal, que é percebido por outro organismo receptor, de modo a alterar o seu padrão de comportamento ou fisiologia. A maioria dos invertebrados usam a olfação para perceber o ambiente. Eles usam semioquímicos para localizar companheiros, hospedeiros ou fonte de alimento, evitar competição, escapar de inimigos naturais e superar os sistemas de defesa natural de seus hospedeiros (Lorenzo, Melo, 2012, Blassioli-Moraes, 2019). Os

semioquímicos têm a vantagem de serem usados para comunicar mensagens a distâncias relativamente grandes (Smart et al., 2014), podendo, também, ser utilizados no monitoramento e controle de pragas.

Essa prática contribui para a sustentabilidade agrícola e se encontra entre os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. Os semioquímicos podem ser usados em associação com outros métodos de controle, inclusive o controle biológico, atuando de forma sinérgica ou auxiliar (El-Shafie, Faleiro, 2019, Parra, Coelho, 2022). Outra estratégia para o controle, a partir de semioquímicos, está no uso de armadilhas como, por exemplo, as armadilhas letais para mosquitos (*autocidal ovitrap gravid*), com isca olfativa de infusão de feno (Mackay, Amador, Barrera, 2013).

Estratégias de controle de vetores também estão voltadas, cada vez mais, para técnicas mais integradas, que utilizam feromônios e outros semioquímicos para executar o controle vetorial através da manipulação comportamental. Tecnologias para atrair e matar os insetos são utilizadas a partir de odores florais e de pistas olfativas associadas a hospedeiros vertebrados. Tais estratégias permitem alcançar o controle de mosquitos adultos e gerar atrativos seletivos de oviposição e fagoestimulantes larvais para melhorar a eficácia de larvicidas bacterianos (Mafrá-Neto, Dekker, 2019).

Estratégias genéticas no controle de insetos pragas e insetos vetores

Devido às falhas dos métodos de controle tradicionais, estudos biológicos avançados forneceram novas opções, incluindo práticas que alteram o material genético dos insetos. Uma estratégia genética muito utilizada é a liberação de insetos estéreis em populações selvagens. Esse método de controle foi concebido nas décadas de 1930 e 1940 e, inicialmente, limitava-se à esterilidade através de cruzamentos híbridos entre espécies distintas ou espécies de diferentes linhagens genéticas (Klassen, Curtis, 2005). Após essas estratégias, foi utilizada a radiação ionizante, que gerava mutações letais dominantes. A prática atual visa à criação de espécies que são expostas à radiação, resultando em danos cromossômicos. Então, esses insetos, preferencialmente de sexo masculino, são liberados em uma área-alvo e, após acasalarem, os ovos não são capazes de eclodir (Alphey, Bonsall, 2018).

A tecnologia CRISPR (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) foi desenvolvida com o objetivo de realizar a edição de genes com precisão. Além disso, possibilita conduzir construções genéticas através de

uma população, incorporando mecanismos de “acionamento gênico” ou *gene drive* (Alphey, Bonsall, 2018). Esse mecanismo natural de eliminação faz parte do sistema imune de bactérias e arqueias, em que as sequências repetidas de DNA atuam juntamente com genes associados a CRISPR(Cas). São descritos três tipos de sistemas CRISPR/Cas, sendo o tipo II o mais elucidado. Ao final desse sistema, o DNA invasor é reconhecido por essa via e é, então, clivado (Savić, Schwank, 2016). Objetivando o controle de insetos, essa abordagem de eliminação gênica foi aplicada para edição dos genes como método de controle. No mosquito *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae), vetor da malária, três genes relacionados à fertilidade feminina foram interrompidos pela inserção de uma construção de acionamento gênico no local de encaixe, por troca de *cassette* mediada por recombinase (RMCE), conferindo fenótipo recessivo de esterilidade (Hammond et al., 2016). Um estudo similar foi feito com a lagarta *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), praga de culturas de milho e algodão, em que a ferramenta CRISPR/Cas9 (associado à proteína-9) mediou o nocaute do gene homeótico abdominal-A, acarretando defeitos morfológicos abdominais, bem como letalidade significativa (Wu et al., 2018).

A estratégia de plantas transgênicas ou geneticamente modificadas (GM) vem sendo explorada há mais de 25 anos, com a introdução do tomate, em 1995, seguido de culturas de milho, soja, algodão, canola, batata, mamão, alfafa, abóbora e beterraba, com características genéticas específicas (Delaney, Goodman, Ladics, 2018). Os métodos mais comuns de transformação genética em plantas se dividem em transformação genética mediada por *Agrobacterium* e transformação genética direta (Krenek, 2015). Atualmente, a metodologia mais empregada é referente à transformação direta mediada por proteínas com potencial inseticida, como as proteínas *Cry* presentes na bactéria Bt, já mencionadas anteriormente, lectinas de plantas e proteínas fusionadas (Talakayala, Katta, Garlandine, 2020; Paul, Das, 2021).

As lectinas são glicoproteínas com grande abundância nos tecidos vegetais, contendo ao menos um domínio não-catalítico, o qual pode ligar-se a carboidratos. Sugere-se que essas proteínas tenham função de armazenamento. Entretanto, também atuam como moléculas de defesa contra patógenos e insetos fitófagos, provocando efeitos severos na fecundidade, no crescimento, no desenvolvimento e no comportamento, em função da interação com glicoproteínas e glicanos, que são abundantes nesses organismos (Michiels, Van Damme, Smaghe, 2010). O estudo de Miao et al. (2011) mostra um ensaio com trigo transgênico expressando *aglutinina galanthus nivalis* (GNA), uma lectina comumente conhecida como *snowdrop*, contra três espécies de pulgões de trigo

(Homoptera: Aphididae). Em duas das três espécies estudadas neste trabalho, *Sitobion avenae* (F.) e *Schizaphis graminum* (Rondani), houve alterações significativas na alimentação, com períodos iniciais de sondagem mais curtos e período total de não-sondagem mais longo. Além disso, a fecundidade foi reduzida, em conjunto com a taxa intrínseca de crescimento natural na primeira e segunda geração. Estudos anteriores utilizaram uma metodologia similar em plantas de arroz transgênicas contra *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae), a cigarrinha marrom do arroz (Rao et al., 1998) e *Sogatella furcifera* (Horváth) (Homoptera: Delphacidae), a cigarrinha do dorso-branco (Nagadhara et al., 2004). Ambos os estudos exibiram declínio na sobrevivência e na fecundidade, além de atraso no desenvolvimento.

Proteínas fusionadas podem ser descritas como proteínas que são traduzidas juntas (geralmente duas), sob o domínio de um único promotor. A maior parte resume-se às δ - endotoxinas de Bt e/ou outras proteínas, que atuam no sistema de defesa de plantas (Paul, Das, 2021), como lectinas de plantas específicas para manose (Tajne et al., 2014). Essa estratégia apresenta resultados interessantes, com atividade inseticida aumentada em comparação com a administração de uma única proteína inseticida (Tajne et al., 2014).

Uma estratégia mais recente, que vem ganhando notório destaque no manejo de insetos pragas de agricultura e vetores de doenças, é a tecnologia do RNA de interferência (RNAi) (Kim et al., 2015). Trata-se de um mecanismo regulatório pós-transcricional, descrito em diversos organismos eucariotos (Baulcombe, 2002). Resumidamente, o gatilho para ativação desta via antiviral natural se dá pela presença de uma molécula de dupla-fita de RNA (dsRNA), que é fornecida de maneira exógena ou endógena. Essa molécula dsRNA é, inicialmente, reconhecida pela enzima *Dicer* (RNASE III), a qual cliva a dupla fita de RNA, e os fragmentos se associam às enzimas da maquinaria RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). E, finalmente, a fita antissenso liga-se, por complementaridade, ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, resultando na sua clivagem ou na inibição da tradução, gerando a diminuição da expressão da sequência proteica alvo (Agrawal et al., 2003; Montgomery, 2004; Meister, Tuschl, 2004; Campbell, Choy, 2005).

O uso de plantas GM expressando dsRNAs foi muito estudado e explorado nas últimas décadas, devido à vantagem de diversos genes letais de insetos serem considerados alvos no controle, como o milho transgênico, expressando sequências de dsRNA para o gene ATPase vacuolar da lagarta da raiz do milho ocidental, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) (Baum et al., 2007; Yan et al., 2020).

Produtos inseticidas ou repelentes baseados em resíduos vegetais

A produção diária de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais forma-se em toneladas, o que acarreta um grande problema quanto à destinação adequada desse material. O aproveitamento desses resíduos torna-se, então, uma importante alternativa para redução dos impactos ambientais. Esses resíduos são fontes valiosas de biomassas lignocelulósicas, que podem servir de matéria-prima em processos termoquímicos, gerando produtos com uma composição química de alto valor agregado. A pirólise é um exemplo de processo termoquímico, que tem demonstrado inúmeros benefícios, tanto no aproveitamento de resíduos, quanto na formação de produtos químicos, com grande potencial biotecnológico para diferentes finalidades (Hossain et al., 2015).

O processo de pirólise é realizado em um reator, onde ocorre a conversão termoquímica de uma biomassa lignocelulósica sob elevadas temperaturas (300 a 1000°C) na ausência de oxigênio, formando um biocarvão sólido e, como subprodutos, um líquido de pirólise e gases não condensáveis (Bridgwater et al., 2001; Czernik, Bridgwater, 2004; Mohan et al., 2006; Hagner et al., 2020). Existem três classificações diferentes para o processo de pirólise, que variam de acordo com a temperatura, taxa de aquecimento e tempo de residência: pirólise convencional (ou lenta), pirólise rápida e pirólise *flash* (Mohan et al., 2006; Balat et al., 2009; Hagner et al., 2020) (Bridgwater, 2003; Czernik, Bridgwater, 2003). A escolha do processo de pirólise deve ser avaliada, dependendo da finalidade que os produtos serão utilizados.

Os líquidos de pirólise (também conhecidos como bio-óleo, ácido pirolenhoso, vinagre de madeira, entre outros) consistem em uma microemulsão complexa, com uma composição química diversa, que pode variar significativamente de acordo com a matéria-prima e com as condições de processamento (especialmente temperatura) (Mohan et al., 2006; Kraiem et al., 2017). A composição química das biomassas vegetais (lignina, celulose e hemicelulose) contém compostos orgânicos, como, por exemplo, derivados fenólicos, hidroxialdeídos, hidroxicetonas, açúcares e ácidos carboxílicos, com destaque para o ácido acético (Mohan et al., 2006; Lu et al., 2009; Fagernas et al., 2012; Bridgwater, 2012; Kim et al., 2020).

Na busca por alternativas aos inseticidas convencionais, os líquidos de pirólise obtidos de diferentes biomassas foram usados como pesticidas, há muito tempo, em alguns países asiáticos (Tiilikkala, Fagernäs, Tiilikkala, 2010). Entretanto, apenas nos últimos 20 anos, grupos de pesquisa vêm desenvolvendo

estudos revelando o seu potencial como inseticida (Mattos et al., 2019). Por exemplo, os produtos líquidos de pirólise têm demonstrado ótimo desempenho na prevenção ao ataque de cupins, auxiliando na conservação da madeira. Cupins subterrâneos do gênero *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) foram suscetíveis aos produtos líquidos de pirólise obtidos da madeira de *Vitex pubescens*, serragem de *Toona sinensis*, madeira de *Dyera costulata*, resíduo de abacaxi, casca de noz de macadâmia e coqueiro do dendê. Um estudo recente, realizado por Kadir et al. (2021), revelou que o vinagre de madeira de *D. costulata* (na concentração de 10%), pirolisado a 500 °C, preveniu o ataque de *Coptotermes curvignathus* Holmgren. Os autores também mostram dados de inibição alimentar e repelência; entretanto, a redução na perda de peso pode ter ocorrido em função da mortalidade precoce dos insetos. Similarmente, os bio-óleos de biomassa de lignocelulose da madeira de *V. pubescens*, obtidos a 400 e 450 °C, também demonstraram efeito termiticida (100%) para *C. curvignathus*. Um efeito protetor, com baixo consumo das madeiras (5,65 - 10,89%) tratadas com 5% dos bio-óleos, foi observado (Oramahi et al., 2014; Sayed et al., 2014; Yahayu et al., 2017).

Ao comparar o efeito biológico de produtos líquidos de pirólise de uma mesma biomassa submetida a diferentes temperaturas, observa-se, com frequência, que os produtos obtidos em temperaturas mais altas possuem melhor eficácia, como foi o caso do vinagre de madeira de *D. costulata* e dos bio-óleos de biomassa de lignocelulose da madeira de *V. pubescens* (Oramahi et al., 2013, Oramahi et al., 2014; Kadir et al., 2021). Entretanto, o vinagre de madeira do coqueiro de dendê, obtido na menor temperatura avaliada (350°C), ocasionou uma menor diminuição do peso do papel filtro tratado (11,75 %), mostrando que a relação entre a atividade biológica e a temperatura do processo de pirólise é variável. Quanto ao efeito termiticida, todos os vinagres de madeira do coqueiro de dendê (obtidos a 350, 400 e 450 °C) causaram 100% de mortalidade de *C. formosanus*, na concentração de 10% (Oramahi et al., 2018).

A análise da composição química dos produtos líquidos de pirólise descritos com atividade termiticida mostra que todos têm ácido acético e derivados fenólicos, esses últimos sempre presentes, porém, normalmente em baixa concentração (Yatagai et al., 2002; Oramahi et al., 2014; Adfa et al., 2017; Oramahi et al., 2018; Boer et al., 2021; Kadir et al., 2021). Outros compostos menos comuns, mas que já foram majoritários em alguns líquidos de pirólise com atividade termiticida, são a vanilina e o catecol, como majoritários do vinagre de madeira de *D. costulata*, e o metanol, sendo o mais abundante no bio-óleo de biomassa de lignocelulose da madeira de *V. pubescens* (Oramahi et al., 2014; Kadir et al., 2021).

Dentre as pragas agrícolas, *L. decemlineata* foi suscetível aos produtos líquidos de pirólise obtidos de folhas de tabaco, grãos de café, palhas de canola e mostarda, resíduos de tomate, lignina, celulose e hemicelulose (Booker et al., 2010; Bedmutha et al., 2011; Hossain et al., 2013; Suqi et al., 2014; Cáceres et al., 2015; Hossain et al., 2015). O líquido de pirólise do tabaco também foi estudado por Prabowo et al. (2016) quanto ao seu efeito inseticida em *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Entretanto, os autores utilizaram o caule ao invés das folhas do tabaco. Os líquidos de pirólise da casca de coco foram avaliados em uma variedade de espécies de insetos pragas agrícolas de diferentes grupos filogenéticos, incluindo as ordens Isoptera, Hemiptera, Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (Wititsiri, 2011; Wagiman, Ardiansyah, Witjaksono, 2014; Diptaningsari et al., 2022), apresentando resultados animadores quanto à potência da atividade inseticida, com letalidade de até 85%, como demonstrado no trabalho de Wititsiri (2011).

Os estudos avaliando o efeito inseticida de produtos líquidos de pirólise em insetos pragas de produtos armazenados tiveram início muito recentemente e existem poucos trabalhos na literatura. A resistência aos fumigantes e inseticidas convencionais têm demonstrado a necessidade de encontrar novos produtos para garantir a proteção dos alimentos durante o armazenamento. Os insetos pragas de produtos armazenados englobam espécies das famílias Coleoptera e Lepidoptera, responsáveis por grandes perdas qualitativas e quantitativas em grãos e produtos armazenados, com uma estimativa de um prejuízo anual de milhões de dólares (Morrison III et al., 2019). As vias de aplicação e uso dos produtos líquidos de pirólise são diversas e específicas para determinadas espécies. Mattos et al. (2021) observaram que as frações aquosas de pirólise da casca do licuri, obtidas a 400 °C, apresentaram efeito inseticida como fumigante ao besouro vermelho da farinha *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Bruce et al. (2022), por outro lado, avaliaram o efeito de areias pulverizadas com o bio-óleo obtido de dois tipos diferentes de reatores e catalisadores (biomassa não informada) no desenvolvimento de larvas e adultos de *T. castaneum*, *Tribolium confusum* J. du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). O bio-óleo obtido em leito fixo com catalisador de platina sobre óxido de titânio (PtTiO₂), após fracionamento de destilação a 230-250 °C, afetou em mais de 95% da emergência larval de *T. castaneum* e *T. confusum* na concentração de 140 e 200 mg/mL, respectivamente (Bruce et al., 2022). O vinagre de madeira de resíduos de poda de *Ficus benjamina* (a 350 °C) não demonstrou atividade inseticida em *S. oryzae*.

O vinagre de madeira (na concentração de 5%) só exibiu eficácia quando associado com a concentração subletal (CL₂₀) de deltametrina, atingindo aproximadamente 90% de mortalidade de adultos *S. oryzae* no bioensaio por contato (Aly, Wahba, Hassan, 2022).

As mariposas *Ephestia kuehniella* (Zeller) e *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) também foram alvo de estudos com produtos líquidos de pirólise. Homayoonzadeh et al. (2022) alimentaram as larvas de ambas as espécies com uma dieta contendo vinagre de madeira de casca de árvores de *Citrus medica*, e realizaram análises bioquímicas. Os autores observaram um aumento da atividade de enzimas antioxidantes e uma redução da atividade de enzimas digestivas e de detoxificação. Além disso, houve uma redução das reservas energéticas e os adultos apresentaram menor longevidade, fecundidade e período de oviposição em comparação com o grupo controle (Homayoonzadeh et al., 2022).

A fração aquosa de pirólise do licuri mais ativa, por outro lado, revelou uma grande quantidade de ácido acético (76,3%), e os resultados do estudo indicam que o efeito fumigante exibiu correlação positiva com a concentração de ácido acético (Mattos et al., 2021). Os autores acreditam que o ácido acético desempenha um papel importante no efeito inseticida, uma vez que foi capaz de ser efetivo contra o besouro vermelho da farinha *T. castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), mas que existem, também, outras moléculas atuando sinergicamente.

O bio-óleo de cascas de sementes de girassol também apresentou o ácido acético (43%) como o principal composto em sua composição química. Entretanto, o bio-óleo não exibiu eficácia no controle dos insetos pragas. Esse só foi ativo quando as cascas foram pré-tratadas com ácido, dando origem a um bio-óleo com 97,4% de furfural (Urrutia et al., 2021). Kiarie-Makara et al. (2010) mostraram que o vinagre de madeira comercial, obtido a partir da pirólise de *Quercus serrata mongólica*, na concentração de 20 % e 40%, causou uma repelência de 90,3% e 100% aos mosquitos *Culex pipiens pallens* (Coquillett). O vinagre de madeira de *Q. serrata mongólica*, na concentração de 20% e 80%, repeliu 71,7 e 96,1%, respectivamente, os mosquitos *Aedes togoi* Theobald (Diptera: Culicidae). Os autores também observaram que o vinagre de madeira forneceu uma proteção repelente parcial por até 7 horas (Kiarie-Makara, Yoon, Lee, 2010).

De acordo com Cordella et al. (2012), processos de pirólise realizados em altas temperaturas tendem a gerar mais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Eles são conhecidos por serem mutagênicos, carcinogênicos e,

consequentemente, tóxicos ao meio ambiente e à saúde humana (Guo et al., 2011). Entretanto, sabe-se que a fumaça líquida, produto de pirólise comercial utilizado há décadas para defumar alimentos, passa por uma filtração para remoção dos HAP (Pszczola, 1995). Portanto, a presença desses compostos não inviabiliza o seu uso, desde que os produtos líquidos de pirólise sejam previamente processados. Apesar da fumaça líquida ser um produto líquido de pirólise utilizado em alimentos, estudos de ecotoxicidade e toxicidade em humanos devem ser realizados, a fim de oferecer um produto seguro.

As questões relacionadas ao tempo de prateleira também devem ser avaliadas. Foi observado por Hossain et al. (2015) que o bio-óleo de lote mais antigo teve a eficácia reduzida. Isso ocorre em função da instabilidade do produto, que tem sua composição química alterada com o tempo, devido a reações que ocorrem entre as moléculas e, além disso, o bio-óleo torna-se mais viscoso (Czernik, Johnson, Black, 1994). Assim, é importante avaliar o uso de formulações com os líquidos de pirólises a fim de estabilizar o produto e permitir seu uso por um tempo mais prolongado.

Resistência a inseticidas e seus mecanismos

A resistência a inseticidas é um fenômeno evolutivo, classificado em mono ou poligênico, podendo ocorrer tanto em populações de insetos mantidas em laboratório como em populações de campo (Ffrench-Constant, 2013). É um grande obstáculo que impacta o controle de insetos pragas de agricultura e vetores de doenças.

O primeiro caso registrado de ocorrência de resistência em insetos data de 1914 (Melander, 1914). Com o uso exacerbado do inseticida DDT durante a primeira Guerra Mundial, houve o surgimento de populações resistentes de mosca (*M. domestica*), mosquitos (*Culex pipiens* L. e *Aedes sollicitans* Walker (Diptera: Culicidae)), percevejo (*Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae)) e piolho (*Pediculus humanus humanus* L. (Anoplura: Pediculidae)) (Metcalf, 1989), causando grande preocupação, uma vez que essas espécies são transmissoras de agentes infecciosos que causam doenças que afetam humanos (Naqqash et al., 2016). Desde então, há um grande esforço por parte da comunidade científica de investigar fatores que conferem resistência a esses organismos, bem como os mecanismos envolvidos.

Segundo Torres et al. (2018), os mecanismos de resistência a inseticidas podem ser classificados em quatro grupos: (1) mutações pontuais em genes-alvo de inseticidas; (2) superexpressão ou mutação na região codificadora de genes

que codificam enzimas de destoxificação (resistência metabólica); (3) superexpressão ou mutação em genes que participam na formação da cutícula; e (4) alterações no comportamento (Li et al., 2007; Whalon et al., 2008; Bass, Field, 2011; Ffrench-Constant, 2013; Liu, 2015; Torres et al., 2018)

Mutações pontuais em genes-alvo de inseticidas

A administração frequente de inseticidas em populações de insetos gera uma pressão seletiva e pode favorecer alguns insetos que apresentam alterações genéticas, as quais podem ocorrer na forma de mutações em genes estruturais na forma de modificações no seu número de cópias ou em sua atividade. Esses genes que favorecem à resistência aos inseticidas são ditos resistentes. Alterações como deleções, adições e substituições de nucleotídeos nas moléculas de DNA podem resultar em modificações na sequência de aminoácidos de uma proteína e, essas mutações pontuais, quando ocorrem nos locais-alvo de inseticidas, são conhecidas por conferir resistência (Feyereisen, 1995). No inseto modelo *D. melanogaster*, foi relatada uma substituição do aminoácido alanina 302 por um resíduo de serina no receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), o qual é codificado pelo gene *Rdl* (resistente ao dieldrin) (Ffrench-Constant et al., 2013, 2016). A subunidade Rdl codificada é um importante alvo para os inseticidas ciclodienos, e a substituição do aminoácido alanina 302, além de afetar diretamente a ligação do inseticida, também induz a desestabilização alostérica da conformação preferida da droga no receptor (Ffrench-Constant, 2000), causando ineficácia do inseticida.

Busvine (1951) descreveu o mecanismo de resistência a pesticidas chamado *Kdr* (do inglês, *knockdown resistance*) em *M. domestica*, causado por um fator recessivo localizado no cromossomo 3. O fenótipo *Kdr* se dá em decorrência de mutações nos canais de sódio sensíveis à voltagem (VSSC) ou nos canais de sódio dependente de voltagem (VGSC), que são codificados pelo gene *Vssc* (Auteri et al., 2018). Tal fenótipo ocorre devido à substituição de leucina por fenilalanina na posição 1014 ou pela substituição de metionina por treonina na posição 118 (Soderlund, 2008), conferindo resistência aos piretroides e ao DTT. Quando ocorrem as duas substituições, o fenótipo é conhecido como fenótipo super-*Kdr* e confere resistência a altos níveis de piretroides (Soderlund, Kinipple, 2003).

Também em *Drosophila*, o gene *para* é responsável por codificar uma subunidade dos canais de sódio ativados por voltagem, local alvo de ação de DDTs e piretroides. Assim, mutações nestes genes conferem resistência a estas

classes de inseticidas (Pittendrigh; Reenan, Ganetzky, 1997). Além disso, alguns estudos indicam que essas mutações são altamente conservadas entre diferentes espécies de insetos (Ffrench-Constant, 1999), incluindo mosquitos do gênero *Aedes* (Auteri et al., 2018).

Resistência metabólica

A resistência metabólica é definida como a resistência xenobiótica, em que substâncias exógenas sofrem alterações bioquímicas que resultam na diminuição da capacidade de interagir com o alvo molecular ou a alteração na própria molécula do inseticida, que leva ao aumento de sua solubilidade ou à destruição de sua estrutura, como consequência da diminuição de sua eficácia. Quando ocorre o aumento da biodegradação dos inseticidas administrados, geralmente ele é atribuído à superexpressão dos genes que codificam as enzimas carboxi/cholinesterases, monooxigenases do citocromo P450 (P450s) e glutationa-transferases (GSTs) (Li, Schuler, Berenbaum, 2007; David et al., 2013).

As enzimas citocromo P450 estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como a biossíntese, a ativação e o catabolismo de ecdisteróides. Essas enzimas são amplamente conhecidas como enzimas de destoxificação em insetos, devido ao importante papel no metabolismo xenobiótico (Feyereisen, 2012). Em cepas resistentes de muitas espécies de insetos foi observada a superexpressão de múltiplos genes P450. A interação entre esses múltiplos genes pode ser responsável pelo desenvolvimento de resistência à inseticidas (LIU et al., 2015). Recentemente, o estudo de Yang et al. (2021) mostrou a relação entre o silenciamento de genes P450 (*CYP4C52v1* e *CYP6AA7*), mediado por RNAi, com o aumento da suscetibilidade ao inseticida piretroide permetrina no mosquito *Cx. quinquefasciatus*.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) apresentam um papel crucial na regulação positiva dos genes P450 em insetos, sendo primeiramente descrito em mosquitos (Li et al., 2015). Entretanto, a superexpressão de diversos genes GPCRs também foi relatada nas espécies *Lymantria dispar* e *M. doméstica* (Liu et al., 2021). Além disso, o trabalho de Li e Liu (2019) mostrou que a expressão de efetores intracelulares de GPCRs, adenilato ciclase (AC), subunidade alfa da proteína G (Gas) e proteína quinase A (PKA) em linhagens celulares de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), induziu um aumento significativo da expressão do gene P450 (*CYP9A32*). Nesse mesmo trabalho, as linhagens celulares (Sf9) foram tratadas com inibidores de monofosfato de adenosina cíclico - cAMP (bupivacaína HCl) e de PKA (H89 2HCl). Ambos os tratamentos

mostraram efeitos sinérgicos com a permetrina em testes com cepas resistentes de *Cx quinquefasciatus* (MAMCq^{G6} e HAMCq^{G8}), demonstrando que esses inibidores foram capazes de reduzir as taxas de resistência à permetrina nessas populações.

As glutationas transferases (GST) são uma grande família de isoenzimas multifuncionais, encontradas na maioria dos organismos eucariotos aeróbicos e em alguns procariotos (Salinas, Wong, 1999). São descritos dois grupos de GST, classificados de acordo com a localização no compartimento celular: microsomal e citosólico (Enayati, Ranson, Hemingway, 2005). Um terceiro grupo, chamado GST de classe Kappa, é encontrado em mamíferos, sendo a enzima humana localizada em mitocôndrias e em peroxissomos, e ausente no citoplasma (Morel et al., 2004). Essas enzimas fazem parte do grupo que metaboliza compostos endógenos e xenobióticos, quando as células são protegidas através da inibição de compostos citotóxicos e genotóxicos, os quais, geralmente, possuem natureza hidrofóbica. Isso ocorre por meio de uma catálise da conjugação S da porção hidrofílica da glutationa reduzida (GSH), um mecanismo conhecido como adição nucleofílica (Salinas, Wong, 1999), aumentando a solubilidade em água e, conseqüentemente, facilitando a excreção pela célula (Mannervik, 1985).

Inicialmente, as classes de inseticidas metabolizadas por GST foram os organoclorados e organofosforados. Posteriormente, a resistência à inseticidas piretroides atribuída às GST também foi relatada (Ketteeman; Saisawang, Wongsantichon, 2011). A destoxificação por meio de GST pode ocorrer de duas maneiras: direta (fase I) ou através do metabolismo de subprodutos secundários que são gerados a partir da catálise de outras enzimas de desintoxicação (fase II) (Pavliidi, Vontas, Van Leeuwen, 2018). As GST também podem desempenhar um papel relevante nos processos antioxidantes sob condições adversas de estresse, como foi mostrado por Liu (2016), em que a exposição a temperaturas extremas e a diferentes tipos de inseticidas resultaram em um aumento dos níveis de expressão da GSTT1 na espécie *Apis cerana cerana*.

As enzimas esterases fazem parte da superfamília das hidrolases, que engloba um vasto grupo de enzimas (Bhatt et al., 2021). Essas realizam a degradação de inseticidas carbamatos, organofosforados e piretroides, assim como o hormônio juvenil e seus análogos (Terriere, 1984). O mecanismo de ação das esterases é baseado na catálise de ésteres carboxílicos, através da adição de moléculas de água (Yan; Cui, Qiao, 2009). Há relatos na literatura da presença dessas enzimas em diferentes grupos de organismos, tais como, bactérias, fungos e diferentes células animais, incluindo leucócitos e outras células sanguíneas (Pittendrigh et al., 1997). Uma vez que constituem parte do sistema de

defesa xenobiótico dos insetos, as esterases são, frequentemente, associadas à resistência a inseticidas pelas suas alterações quantitativas e/ou qualitativas (Yan, Cui, Qiao, 2009).

Superexpressão ou mutação em genes que participam na formação da cutícula

A resistência a inseticidas conferida por modificações na cutícula são fenômenos que reduzem a sua penetração, dificultando a chegada dos produtos aos seus respectivos alvos. Para monitorar a taxa de internalização do inseticida, é feita a exposição do inseto ao produto por um determinado tempo, seguido da extração do inseticida remanescente na cutícula do inseto, comparado ao inseticida internalizado presente no homogeneizado do inseto (Balabanidou, Grigoraki, Vontas, 2018). Na cepa 91-R de *D. melanogaster*, ocorreu 30% de redução na taxa de internalização de DDT radioativo (Strycharz et al., 2013). A cepa resistente de *Helicoverpa armigera* precisou de 6 horas para penetração de 50% do inseticida deltametrina radioativo, comparada à 1 hora para penetração na cepa sensível (Ahmad, Denholm, Bromilow, 2006). Modificações na cutícula afetam o organismo do inseto como um todo, alteram sua fisiologia e a sua adaptação, com possíveis implicações no aparecimento de resistência.

As modificações na cutícula se caracterizam por dois principais fenótipos: o aumento da espessura da cutícula por depósito de componentes estruturais, como os lipídios epicuticulares e/ou as proteínas cuticulares estruturais, e a alteração da composição cuticular (Vannini, Reed, Willis, 2014; Balabanidou, Kampourakib, Macleanc, 2015; Balabanidou et al., 2016).

Foram identificados alguns poucos genes envolvidos com a composição da cutícula ou com a síntese de componentes cuticulares que são regulados positivamente como fenômeno de resistência. Em geral, o aumento da espessura da cutícula é mais comumente associado à resistência. No espessamento, foram observados diferentes padrões. Um ensaio de microscopia eletrônica de transmissão revelou que *An. gambiae* super-resistente a várias classes de inseticidas possui a perna com cutícula espessa, devido ao enriquecimento no depósito de hidrocarbonetos na epicutícula, pela superexpressão dos genes citocromo P450s (*cyp4g16* e *cyp4g17*) (Balabanidou, Grikoraki, Vontas, 2018). Em uma outra cepa de *An. gambiae* resistente a piretroides e a DDT, originada do oeste da África, foi observado um espessamento da cutícula alternativo pelo engrossamento de todas as camadas quitinosas (exo-cutícula, meso-cutícula e endo-cutícula), em função da superexpressão de proteínas específicas

cuticulares (CP), como as CPLGG3, CPR124 e CPR127 e CPR129. Todas essas proteínas apresentam domínios ligadores de quitina, o que justifica o reforço em todas as camadas da cutícula (Yahouédo et al., 2017).

As proteínas CPLGG3 e CPLGG4 são altamente expressas no mosquito *An. gambiae* comparado ao mosquito sensível (Makki, Cinnamon, Gould (2014), Neve, Ingelman-Sundberg (2008), condizente com o aumento da resistência na endo-cutícula. Um terceiro padrão multirresistente foi observado em *An. gambiae* da Tanzânia, que apresenta elevados níveis de CPR 131, CPLGG4 e CPLGG5 (Abdalla et al., 2014).

A resistência associada ao espessamento cuticular foi relacionada também com pestes agrícolas, como no caso da resistência de *P. xylostella* à penetração do piretroide fenvalerato (Noppun, Saito, Miyata, 1989) e a resistência de *Cimex hemipterus* ao organofosforado fenitrotona e ao neonicotinoide imidacloprida, (Soh, Veera Singham, 2021).

Existem alguns trabalhos que correlacionam a composição da cutícula com a diminuição da penetração de xenobióticos. Para esse fenômeno, dois mecanismos de ação têm sido propostos: um mediado pela superexpressão da enzima lacase 2, responsável pelo escurecimento e endurecimento da cutícula, e o segundo mediado por superexpressão de transportadores ABC. A coloração da cutícula é um processo extracelular que envolve duas etapas: a de esclerotização e a de pigmentação, que contribuem para o endurecimento e a coloração da cutícula, respectivamente. Destacam-se duas enzimas do tipo fenoxidase, as enzimas lacase e a tirosinase. O gene de lacase 2 de *Cx. pipiens pallens* foi superexpresso em populações resistentes do mosquito ao piretroide fenvalerato, quando comparado a cepas suscetíveis (Pan, Zhou, Mo, 2009). A lacase 2 também é responsável pela esclerotização do córion de ovos de mosquitos vetores de patógenos (Amenya et al., 2010).

Os transportadores ABC agem como bombas de efluxo em células eucarióticas e sua expressão na epiderme pode facilitar a exportação dos componentes cuticulares em direção à cutícula. Os transportadores ABC da subfamília G são envolvidos com o transporte de lipídios na epiderme (Pignatelli et al., 2018). A superexpressão dos transportadores ABC dessa subfamília em pernas do mosquito *An. gambiae* foi observada em cepas resistentes a diferentes inseticidas, possivelmente pelo depósito de hidrocarbonetos e o consequente aumento da resistência à penetração (Balabanidou et al., 2016). Corroborando essa hipótese, cepas sensíveis a inseticidas superexpressam a glicoproteína-P, principalmente na cutícula, quando comparadas a cepas resistentes (Lanning et al., 1996). Como os transportadores ABC são responsáveis pelo transporte de

hidrocarbonetos e inseticidas, o exato papel desses transportadores na resistência a inseticidas ainda não está muito claro (Dermauw, Van Leeuwen, 2014).

Os transportadores ABC estão envolvidos na resistência contra todas as famílias de inseticidas químicos, incluindo os organofosforados, os carbamatos, os piretroides e os neonicotinoides. Um nível aumentado de transcritos codificando para esse sistema transportador foi observado em muitas espécies de insetos resistentes. Nos mosquitos, ABCB4 é superexpresso em *Ae. aegypti* resistente a piretroides (Bariami et al., 2012), ABCG4 e ABCB1 em *An. arabiensis* resistente ao DDT (Jones et al., 2012) e ABCA1, ABCB4 e ABCA4 em *An. gambiae* resistente a piretroides e ao DDT (Fossgotene et al., 2013).

No entanto, sabe-se, ainda, que a associação do inseticida temefós com o silenciamento gênico da glicoproteína-P no mosquito *Ae. aegypti* diminuiu significativamente a dose necessária do inseticida para matar as larvas do inseto (Figueira-Mansur et al., 2013). Assim, a associação de drogas inibidoras de transportadores ABC ou de RNAi específicos para silenciar genes de transportadores ABC aos inseticidas podem reduzir a dose necessária para matar o inseto, conseqüentemente diminuindo os riscos ambientais.

Alterações no comportamento

A resistência a inseticida pode ser definida como comportamentos evolutivos que diminuem a exposição de um inseto a um determinado composto tóxico ou que concede sobrevivência a esse inseto, em um determinado ambiente, que, de outra forma, o produto seria tóxico e letal (Sparks et al., 1989). É necessário diferenciar, porém, se a resistência ocorreu em nível de pré-seleção do comportamento, isto é, um tipo de comportamento protetor que ocorre naturalmente, ou se foi, de fato, uma resistência adquirida e desenvolvida em nível de pós-seleção aprimorada (Muirhead-Thomson, 1960; Georghiou, 1972).

Dessa forma, são descritas duas categorias de resistência comportamental: a dependente e a independente de estímulo. No primeiro caso, ocorre a resistência na expressão do estímulo sensorial do comportamento, pois, quando o inseto evita o estímulo, a irritabilidade e a repelência são exemplos de comportamento comuns. O aumento da aptidão para detectar uma substância nociva presume uma propriedade de irritação ou de repelência do composto, que, após ser evitado, acarreta uma resposta evasiva (Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984). Esse comportamento foi observado em espécies de *An. gambiae* e *An. funestus*, em que houve um aumento da proporção das taxas de evasão em residências con-

tendo mosquiteiros impregnados com inseticida piretroide, reduzindo consequentemente o sucesso da alimentação com sangue (Mathenge et al., 2001). Em um trabalho mais recente, foi observado um perfil significativo de evasão da espécie *Sitophilus zeamais*, praga do milho, em arenas tratadas com indoxacarbe (Haddi et al., 2015), um inseticida organoclorado e éster metílico (NCBI, 2022). Uma vez que os insetos conseguem sobreviver à exposição, o contato é interrompido antes que uma dose letal seja assimilada (Georghiou, 1972).

Grande parte do comportamento em insetos se deve à capacidade olfativa desses organismos, que permite perceber o ambiente em que estão inseridos, bem como a necessidade de reagir a estímulos e o modo como devem reagir. Insetos, em geral, possuem um sistema de olfação altamente sofisticado e, através da detecção de odores, são desencadeados comportamentos inatos e outros que são desenvolvidos através de experiências anteriores, como resultados de processos de aprendizado (Lorenzo, Melo, 2012).

A percepção de odores em insetos inicia-se com o recebimento do sinal químico pelas antenas e palpos maxilares, uma vez que possuem, em seus segmentos, estruturas quitinosas denominadas sensilas. Estas estruturas abrigam os dendritos dos neurônios sensoriais olfativos. Posteriormente, as moléculas de odor ligam-se às proteínas ligadoras de odor, que atuam solubilizando e transportando essas moléculas através da linfa sensilar e, finalmente, ocorre a ativação dos receptores olfativos, que reconhecem e desencadeiam os sinais elétricos recebidos (Sachse, Krieger, 2011; Lorenzo, Melo, 2012; Leal, 2013).

A resistência comportamental independente de estímulo se trata de um esquivamento natural de um determinado ambiente ou de um hospedeiro por uma parte da população de insetos sem o estímulo sensorial, como, por exemplo, a zoofilia e a exofilia (Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984). Foi relatado que parte da população que sobrevivia aos tratamentos com DDT completavam seu ciclo gonotrófico através da exofilia e aumentavam as tendências esofágicas e zoofílicas (Hamon, 1963). Um caso bem sólido desse tipo de resistência foi documentado em Suazilândia e Rodésia do Sul, onde o mosquito *An. gambiae* deixou de ser encontrado nas casas, mesmo as não-tratadas com inseticidas, e passou a se alimentar quase que exclusivamente de sangue de gado (Hamon, 1963).

Considerações finais

Considerando os temas abordados nesse capítulo, a enorme adaptação dos insetos em diversos nichos no planeta, a capacidade de voo e a alta taxa de reprodução, devem ser desenvolvidas, de forma urgente, várias estratégias para o seu controle. É importante que elas sejam, de preferência, sustentáveis e integradas para o controle ecológico e adequado de pragas de agrícolas, vetores de doenças e pragas de estoque. Além disso, é relevante que visem à segurança alimentar do mundo, à redução dos impactos ambientais e ao controle de doenças transmitidas por vetores.

Referências

- ABDALLA, H., WILDING, C. S., NARDINI, L., PIGNATELLI, P., KOEKEMOER, L. L., RANSON, H., & COETZEE, M. (2014). Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* in Sudan: temporal trends and underlying mechanisms. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-9.
- ADFA, M., KUSNANDA, A. J., SAPUTRA, W. D., BANON, C., EFDI, M., & KOKETSU, M. (2017). Termiticidal activity of *Toona sinensis* wood vinegar against *Coptotermes curvignathus* Holmgren. *Rasayan Journal of Chemistry*, 10(4), 1088-1093.
- AGRAWAL, N., DASARADHI, P.V.N., MOHMMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R.K., & MUKHERJEE, S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 657-685.
- AHMAD, M., DENHOLM, I., & BROMILOW, R. H. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(9), 805-810.
- ALPHEY, N., & BONSALE, M. B. (2018). Genetics-based methods for agricultural insect pest management. *Agricultural and forest entomology*, 20(2), 131-140.
- ALUJA, M. (1994). Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual review of entomology*, 39(1), 155-178.
- ALVES, S. B., & LOPES, R. B. (2008). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: Fealq. 414 p. (Biblioteca de Ciências Agrária Luiz de Queiroz, 14).
- ALY, H. M., WAHBA, T. F., HASSAN, N. A. (2022). Pyroligneous Acid Derived from *ficus benjamina* Wastes Synergize Deltamethrin against *Sitophilus oryzae*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control*, 14(1), 47-54.
- AMENYA, D. A., CHOU, W., LI, J., YAN, G., GERSHON, P. D., JAMES, A. A., & MARINOTTI, O. (2010). Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. *Journal of Insect Physiology*, 56(10), 1414-1419.
- AMIR, S., TZATZARAKIS, M., MAMOULAKIS, C., BELLO, J. H., EQANI, S. A. M. A. S., VAKONAKI, E., & TSATSAKIS, A. (2021). Impact of organochlorine pollutants on semen parameters of infertile men in Pakistan. *Environmental Research*, 195, 110832.
- AUTERI, M., LA RUSSA, F., BLANDA, V., & TORINA, A. (2018). Insecticide resistance associated with kdr mutations in *Aedes albopictus*: an update on worldwide evidences. *BioMed research international*, 2018.

BALABANIDOU, V., GRIGORAKI, L., & VONTAS, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current opinion in insect science*, 27, 68-74.

BALABANIDOU, V., KAMPOURAKI, A., MACLEAN, M., BLOMQUIST, G. J., TITTIGER, C., JUÁREZ, M. P., MIJAILOVSKY, S. J., CHALEPAKIS, G., ANTHOUSI, A., LYND, A., ANTOINE, S., HEMINGWAY, J., RANSON, H., LYCETT, G. J., & VONTAS, J. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), 9268-9273.

BALAT, M., BALAT, M., KIRTAY, E., & BALAT, H. (2009). Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. *Energy conversion and Management*, 50(12), 3147-3157.

BARDIN, P. G., VAN EEDEN, S. F., MOOLMAN, J. A., FODEN, A. P., & JOUBERT, J. R. (1994). Organophosphate and carbamate poisoning. *Archives of internal medicine*, 154(13), 1433-1441.

BARIAMI, V., JONES, C. M., POUPARDIN, R., VONTAS, J., & RANSON, H. (2012). Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(6), e1692.

BASS, C., & FIELD, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest management science*, 67(8), 886-890.

BASS, C., & FIELD, L. M. (2018). Neonicotinoids. *Current Biology*, 28(14), R772-R773.

BAUER, L. S., MILLER, D. L., MADDOX, J. V., & MCMANUS, M. L. (1998). Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(2), 147-153.

BAULCOMBE, D. (2002). RNA silencing. *Current biology*, 12(3), R82-R84.

BAUM, J. A., BOGAERT, T., CLINTON, W., HECK, G. R., FELDMANN, P., ILAGAN, O., JOHNSON S, PLAETINCK G, MUNYIKWA T, PLEAU M & ROBERTS, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*, 25(11), 1322-1326.

BEAR, A., & MONTEIRO, A. (2013). Both cell-autonomous mechanisms and hormones contribute to sexual development in vertebrates and insects. *Bioessays*, 35(8), 725-732.

BEATY, J., & MARQUARDT, C. (1996). *The Biology of Disease Vectors*. Elsevier. University Press of Colorado. Nowit, Colorado.

BEDMUTHA, R., BOOKER, C. J., FERRANTE, L., BRIENS, C., BERRUTI, F., YEUNG, K. K. C., SCOTT, I., CONN, K. (2011). Insecticidal and bactericidal characteristics of the bio-oil from the fast pyrolysis of coffee grounds. *Journal of Analytical and Applied pyrolysis*, 90(2), 224-231.

- BHATT, P., ZHOU, X., HUANG, Y., ZHANG, W., & CHEN, S. (2021). Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. *Journal of hazardous materials*, 411, 125026.
- BISCHOFF, J. F., REHNER, S. A., & HUMBER, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- BLASSIOLI-MORAES, M. C., LAUMANN, R. A., MICHEREFF, M. F., & BORGES, M. (2019). Semiochemicals for integrated pest management. *Sustainable Agrochemistry: A Compendium of Technologies*, 85-112.
- BOER, F. D., VALETTE, J., COMMANDRÉ, J. M., FOURNIER, M., & THÉVENON, M. F. (2021). Slow pyrolysis of sugarcane bagasse for the production of char and the potential of its by-product for wood protection. *Journal of Renewable Materials*, 9(1), 97.
- BOOKER, C. J., BEDMUTHA, R., SCOTT, I. M., CONN, K., BERRUTI, F., BRIENS, C., & YEUNG, K. K. C. (2010). Bioenergy II: characterization of the pesticide properties of tobacco bio-oil. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 8(1).
- BRAGA, I. A., & VALLE, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 16(2), 113-118.
- BRIDGET, A. F., NGUYEN, C. T., MAGAR, R. T., & SOHNG, J. K. (2022). Increasing production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by metabolic engineering. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
- BRIDGWATER, A. V. (2003). Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass. *Chemical engineering journal*, 91(2-3), 87-102.
- BRIDGWATER, A. V. (2012). Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and bioenergy*, 38, 68-94.
- BRIDGWATER, A. V., CZERNIK, S., & PISKORZ, J. (2001). An overview of fast pyrolysis. *Progress in Thermochemical Biomass Conversion*. Oxford: Blackwell Science, 977-997.
- BRUCE, A., WILSON, A. N., RANABHAT, S., MONTGOMERY, J., NICHOLSON, S., HARRIS, K., & MORRISON III, W. R. (2022). A Biomass Pyrolysis Oil as a Novel Insect Growth Regulator Mimic for a Variety of Stored Product Beetles. *Journal of Economic Entomology*, 115(3), 877-887.
- BUSVINE, J.R. (1951). Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature*:193-5.
- CÁCERES, L. A., MCGARVEY, B. D., BRIENS, C., BERRUTI, F., YEUNG, K. K. C., & SCOTT, I. M. (2015). Insecticidal properties of pyrolysis bio-oil from greenhouse tomato residue biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 112, 333-340.

CAMPBELL, T. N., & CHOY, F. Y. (2005). RNA interference: past, present and future. *Current issues in molecular biology*, 7(1), 1-6.

CASIDA, J. E., & QUISTAD, G. B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology*, 43, 1.

CASTRO, B. M. D. C. E., MARTINEZ, L. C., BARBOSA, S. G., SERRÃO, J. E., WILCKEN, C. F., SOARES, M. A., DA SILVA, A. A., DE CARVALHO, A.G., & ZANUNCIO, J. C. (2019). Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific reports*, 9(1), 6667.

CHIMKHAN, N., THAMMASITTIRONG, S. N. R., ROYTRAKUL, S., KROBTHONG, S., & THAMMASITTIRONG, A. (2022). Proteomic response of *Aedes aegypti* larvae to Silver/Silver Chloride Nanoparticles synthesized using *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis metabolites. *Insects*, 13(7), 641.

CHOPRA, A. K., SHARMA, M. K., & CHAMOLI, S. (2011). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 173(1), 905-916.

CLARK, J. M., & SYMINGTON, S. B. (2011). Advances in the mode of action of pyrethroids. *Pyrethroids*, 49-72.

COATS, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 255–262.

CONTRERAS, E., BENITO-JARDON, M., LÓPEZ-GALIANO, M. J., REAL, M. D., & RAUSELL, C. (2015). *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. *Developmental & Comparative Immunology*, 50(2), 139-145.

CORDELLA, M., TORRI, C., ADAMIANO, A., FABBRI, D., BARONTINI, F., & COZZANI, V. (2012). Bio-oils from biomass slow pyrolysis: a chemical and toxicological screening. *Journal of hazardous materials*, 231, 26-35.

COSTA, L. G. (2015). The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handbook of clinical neurology*, 131, 135-148.

COSTA, L. G., GALLI, C. L., & MURPHY, S. D. (Eds.). (2013). *Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives (Vol. 13)*. Springer Science & Business Media.

Czernik, S., Bridgwater, A. V. (2004). Overview of applications of biomass fast pyrolysis oil. *Energy & fuels*, 18(2), 590-598.

CZERNIK, S., JOHNSON, D. K., & BLACK, S. (1994). Stability of wood fast pyrolysis oil. *Biomass and Bioenergy*, 7(1-6), 187-192.

DA SILVA G., COSTA RAMOS L.F., DOS SANTOS SECKLER H., MENDONÇA GOMES F., REIS CORTINES J., RAMOS I., DINIS ANOBOM C., DE ALCANTARA MACHADO E., PERPÉtua DE OLIVEIRA D.M. (2019). Biochemical characterization of digestive membrane-associated alkaline phosphatase from the velvet bean caterpillar *A. gemmatalis*. Archives of insect biochemistry and physiology, 102(1), e21591.

DAVID, J. P., ISMAIL, H. M., CHANDOR-PROUST, A., & PAINE, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1612), 20120429.

DE VEGA, C., GUZMAN, B., LACHANCE, M. A., STEENHUISEN, S. L., JOHNSON, S. D., & HERRERA, C. M. (2012). *Metschnikowia proteae* sp. nov., a nectarivorous insect-associated yeast species from Africa. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62(Pt_10), 2538-2545.

DECOURTYE, A., & DEVILLERS, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. Insect nicotinic acetylcholine receptors, 85-95.

DELANEY, B., GOODMAN, R. E., & LADICS, G. S. (2018). Food and feed safety of genetically engineered food crops. Toxicological sciences, 162(2), 361-371.

DERMAUW, W., & VAN LEEUWEN, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. Insect biochemistry and molecular biology, 45, 89-110.

DHADIALLA, T.S., CARLSON, G.R., & LE, D.P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annual review of entomology, 43, 545-69.

DIPTANINGSARI, D., MEITHASARI, D., KARYATI, H., & WARDANI, N. (2022). Potential Use of Coconut Shell Liquid Smoke as an Insecticide on Soybean and the Impact on Agronomic Performance. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 985, No. 1, p. 012058). IOP Publishing.

DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, M., VILLANUEVA, M., ESCRICHE, B., ANCÍN-AZPILICUETA, C., & CABALLERO, P. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. Toxins, 12(7), 430.

DUTTA, T.K., VEERESH, A., PHANI, V., KUNDU, A., SANTHOSHKUMAR, K., MATHUR, C., SAGAR, D. & SREEVATHSA, R. (2022). Molecular characterization and functional analysis of Cry toxin receptor-like genes from the model insect *Galleria mellonella*. Insect Molecular Biology, 31 (4), 434– 446.

EBERLE, A. L., DICKERSON, B. H., REINHALL, P. G., & DANIEL, T. L. (2015). A new twist on gyroscopic sensing: body rotations lead to torsion in flapping, flexing insect wings. Journal of the Royal Society Interface, 12(104), 20141088.

EL-SAYED, A. A., AMR, A., KAMEL, O. M., EL-SAIDI, M. M., & ABDELHAMID, A. E. (2020). Eco-friendly fabric modification based on AgNPs@ Moringa for mosquito repellent applications. Cellulose, 27(14), 8429-8442.

EL-SHAFIE, H. A. F., & FALEIRO, J. R. (2017). Semiochemicals and their potential use in pest management. *Biological control of pest and vector insects*, 10-5772.

ENAYATI, A.A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect molecular biology*, 14(1), 3-8.

FAGERNÄS, L., KUOPPALA, E., TIILIKKALA, K., & OASMAA, A. (2012). Chemical composition of birch wood slow pyrolysis products. *Energy and Fuels*, 26 (2), 1275-1283.

FAIRBROTHER, A., PURDY, J., ANDERSON, T., & FELL, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 719-731.

FAN, Y., BAO, J., FU, X., WU, P., CHEN, J., HUANG, Y., WEI J, PAN G, LI C & ZHOU, Z. (2022). The NPC Families Mediate BmNPV Entry. *Microbiology Spectrum*, e00917-22.

FAO-ONU (2021). Conferencia de la FAO, en su 42.º período de sesiones, el 18 de junio de 2021. Marco estratégico de la FAO para 2022-2031. Disponible em: <<https://www.fao.org/3/ne577es/ne577es.pdf>>.

FEYEREISEN, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology letters*, 82, 83-90.

FEYEREISEN, R. (2012). Insect CYP genes and P450 enzymes. In *Insect molecular biology and biochemistry* (pp. 236-316). Academic Press.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. (1999). Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(5), 397-403.

FFRENCH-CONSTANT, R. H., 2013. The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*, 194(4), 807-815.

FFRENCH-CONSTANT, R. H., WILLIAMSON, M. S., DAVIES, T. E., & BASS, C. (2016). Ion channels as insecticide targets. *Journal of neurogenetics*, 30(3-4), 163-177.

FIGUEIRA-MANSUR, J., FERREIRA-PEREIRA, A., MANSUR, J.F., FRANCO, T.A., ALVARENGA, E.S., SORGINE, M.H., NEVES, B.C., MELO, A.C., LEAL, W.S., MASUDA, H., MOREIRA, M.F. (2013). Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Molecular Biology*, 22(6), 648-658.

FONTES, E. M. G. & VALADARES-INGLIS, M. C. (eds). (2020). Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF, Brasil. EMBRAPA.

FOSSOG TENE, B., POUPARDIN, R., COSTANTINI, C., AWONO-AMBENE, P., WONDJI, C. S., RANSON, H., & ANTONIO-NKONDJIO, C. (2013). Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PloS one*, 8(4), e61408.

FREDERIC, C. (1992). Subsídios ao histórico do controle biológico de artrópodes fitófagos no Brasil. Ciclo de palestras sobre controle biológico de pragas, Campinas, SP. Serie técnicocientífica, (178), 21-29.

FUKUTO, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives*, 87, 245-254.

GEORGHIOU, G. P. (1972). The evolution of resistance to pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3(1), 133-168.

GUO, Y., WU, K., HUO, X., XU, X. (2011). Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Health*, 73(9), 22-25.

GUPTA, R. C. (Ed.). (2011). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Academic Press.

GUPTA, R. C., MUKHERJEE, I. R. M., DOSS, R. B., MALIK, J. K., & MILATOVIC, D. (2017). Organophosphates and carbamates. In *Reproductive and developmental toxicology* (pp. 609-631). Academic Press.

HADDI, K., MENDONÇA, L. P., DOS SANTOS, M. F., GUEDES, R. N. C., & OLIVEIRA, E. E. (2015). Metabolic and behavioral mechanisms of indoxacarb resistance in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 362-369.

HAGNER, M., TIILIKKALA, K., LINDQVIST, I., NIEMELÄ, K., WIKBERG, H., KÄLLI, A., & RASA, K. (2020). Performance of liquids from slow pyrolysis and hydrothermal carbonization in plant protection. *Waste and Biomass valorization*, 11(3), 1005-1016.

HAMMOND, A., GALIZI, R., KYROU, K., SIMONI, A., SINISCALCHI, C., KATSANOS, D., GRIBBLE M., BAKER D., MAROIS E., RUSSELL S., BURT A., WINDBICHLER N., CRISANTI A. & NOLAN, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology*, 34(1), 78-83.

HAMON, J. (1963). L'importance des changements de comportement chez les insectes. *Bulletin of the World Health Organization*, 29(Suppl), 115.

HARDARDÓTTIR, H. M., MALE, R., NILSEN, F., & DALVIN, S. (2019). Effects of chitin synthesis inhibitor treatment on *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, Caligidae) larvae. *PloS one*, 14(9), e0222520.

HARRISON, R. L., HERNIOU, E. A., JEHLE, J. A., THEILMANN, D. A., BURAND, J. P., BECNEL, J. J., KRELL P.J., VAN OERS M.M., MOWERY J.D., BAUCHAN G.R. & ICTV REPORT CONSORTIUM. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. *Journal of General Virology*, 99(9), 1185-1186.

HARTWIG, A., ARAND, M., & MAK COMMISSION. (2018). Neonicotinoids with a 6-chloropyridinyl group (eg imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, nitenpyram, boscalid)-Determination of 6-chloronicotinic acid in urine by GC-MS [Biomonitoring Methods, 2018]. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1687-1704.

HIBBETT, D.S, BINDER, M., BISCHOFF, J.F., BLACKWELL, M., CANNON, P.F., ERIKSSON, O.E., HUHNENDORF, S., JAMES, T., KIRK, P.M., LÜCKING, R., THORSTEN, LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P.B., MCLAUGHLIN, D.J., POWEL, L.M.J., REDHEAD, S., SCHOCH, C.L., SPATAFORA, J.W., STALPERS, J.A., VILGALYS, R., AIME, M.C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G.L., CASTLEBURY, L.A., CROUS, P.W., DAI, Y.C., GAMS, W., GEISER, D.M., GRIFFITH, G.W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D.L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R.A., HYDE, K.D., IRONSIDE, J.E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C.P., LARSSON, K.H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J.D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J.P., SCHÜSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R.G., TIBELL, L., UNTEREINER, W.A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M.M., WINKA, K., YAO, Y.J., ZHANG, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.

HOMAYOONZADEH, M., TALEBI, K., TORABI, E., ALLAHYARI, H., NOZARI, J., & SCULLY, E. D. (2022). Effects of pyroligneous acid on life history and physiology of two pyralid pests of stored products. *Journal of Stored Products Research*, 97, 101971.

HOSKINS, W. M., BORDEN, A. D., & MICHELbacher, A. E. (1939, July). Recommendations for a more discriminating use of insecticides. In *Proceedings of the 6th Pacific Science Congress (Vol. 5, pp. 119-123)*.

HOSSAIN, M. M., SCOTT, I. M., MCGARVEY, B. D., CONN, K., FERRANTE, L., BERRUTI, F., & BRIENS, C. (2013). Toxicity of lignin, cellulose and hemicellulose-pyrolyzed bio-oil combinations: Estimating pesticide resources. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 99, 211-216.

HOSSAIN, M. M., SCOTT, I. M., MCGARVEY, B. D., CONN, K., FERRANTE, L., BERRUTI, F., & BRIENS, C. (2015). Insecticidal and anti-microbial activity of bio-oil derived from fast pyrolysis of lignin, cellulose, and hemicellulose. *Journal of Pest Science*, 88(1), 171-179.

HUMBER, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 262-266.

IHARA, M., & MATSUDA, K. (2018). Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. *Current Opinion in Insect Science*, 30, 86-92.

IQBAL, A., KHAN, R. S., KHAN, M. A., GUL, K., JALIL, F., SHAH, D. A., RAHMAN H & AHMED, T. (2021). Genetic engineering approaches for enhanced insect pest resistance in sugarcane. *Molecular Biotechnology*, 63(7), 557-568.

ISHAAYA, I. (1993). Insect detoxifying enzymes: their importance in pesticide synergism and resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22(1-2), 263-276.

JIN, M.; SHAN, Y.; PENG, Y.; WANG, P.; LI, Q.; YU, S.; ZHANG, L.; XIAO, Y. (2022). An integrative analysis of transcriptomics and proteomics reveals novel insights into the response in the midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae to Vip3Aa. *Toxins*, 14(1), 55.

KADIR, R., SARIF MOHD ALI, M., KARTAL, S. N., ELHAM, P., MOHD ALI, N. A., & AWANG, A. F. (2022). Chemical characterization of pyrolysis liquids from *Dyera costulata* and evaluation of their bio-efficiency against subterranean termites, *Coptotermes curvignathus*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 80(1), 45-56.

KAGABU, S. (2011). Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2887-2896.

KAMAL, H. A., & KHATER, E. I. (2010). The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. *J Egypt Soc Parasitol*, 40(3), 565-574.

KAMIMURA, M., & KIUCHI, M. (2002). Applying fenoxycarb at the penultimate instar triggers an additional ecdysteroid surge and induces perfect extra larval molting in the silkworm. *General and comparative endocrinology*, 128(3), 231-237.

KARTAL, S. N., TERZI, E., KOSE, C., HOFMEYR, J., & IMAMURA, Y. (2011). Efficacy of tar oil recovered during slow pyrolysis of macadamia nut shells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 369-373.

KETTERMAN, A. J., SAISAWANG, C., & WONGSANTICHON, J. (2011). Insect glutathione transferases. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 253-265.

KHAN, H. A. A. (2021). Pyriproxyfen induces lethal and sublethal effects on biological traits and demographic growth parameters in *Musca domestica*. *Ecotoxicology*, 30(4), 610-621.

KIARIE=MAKARA, M. W., YOON, H. S., LEE, D. K. (2010). Repellent efficacy of wood vinegar against *Culex pipiens pallens* and *Aedes togoi* (Diptera: Culicidae) under laboratory and semi-field conditions. *Entomological Research*, 40(2), 97-103.

KIM, S., LEE, Y., LIN, K.Y.A., HONG, E., KWON, E.E., LEE, J. (2020). The valorization of food waste via pyrolysis: a review. *Journal of Cleaner Production*. 120816.

- KIM, Y. H., ISSA, M. S., COOPER, A. M., & ZHU, K. Y. (2015). RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120, 109-117.
- KLASSEN, W., CURTIS, C. F., & HENDRICH, J. (2021). History of the sterile insect technique. In *Sterile insect technique* (pp. 1-44). CRC Press.
- KOGAN, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual review of entomology*, 43(1), 243-270.
- KOLLMAYER, W. D., FLATTUM, R. F., FOSTER, J. P., POWELL, J. E., SCHROEDER, M. E., & SOLOWAY, S. B. (1999). Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor, 71-89.
- KOTZE, A. C., SALES, N., & BARCHIA, I. M. (1997). Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology*, 90(1), 15-20.
- KRAIEM, T., HASSEN, A. B., BELAYOUNI, H., & JEGUIRIM, M. (2017). Production and characterization of bio-oil from the pyrolysis of waste frying oil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 9951-9961.
- KRANTHI, S. DHAWAD, C.S., NAIDU, S., BHAROSE, A., CHAUDHARY, A., SANGODE, V., NEHARE, S.K., BAJAJ, S.R., KRANTHI, K.R. (2009). Susceptibility of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner)(Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab before and after the introduction of Bollgard-II. *Crop Protection*, 28(5), 371-375.
- KRENEK, P., SAMAJOVA, O., LUPTOVCIK, I., DOSKOCILOVA, A., KOMIS, G., & SAMAJ, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024-1042.
- KUTZ, F. W., WOOD, P. H., & BOTTIMORE, D. P. (1991). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 1-82.
- LACEY, L. A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN, D. I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M., & GOETTEL, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 132, 1-41.
- LANNING, C. L., FINE, R. L., CORCORAN, J. J., AYAD, H. M., ROSE, R. L., & ABOU-DONIA, M. B. (1996). Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1291(2), 155-162.
- LEAL, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol*, 58(1), 373-391.

LEWIS, K.A., TZILIVAKIS, J., WARNER, D. AND GREEN, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064.

LI, S., XU, X., SHAKEEL, M., XU, J., ZHENG, Z., ZHENG, J., YU, X., ZHAO, Q., JIN, F. (2018) *Bacillus thuringiensis* suppresses the humoral immune system to overcome defense mechanism of *Plutella xylostella*. *Frontiers in Physiology*, 9, 1478.

LI, T., & LIU, N. (2019). Role of the G-protein-coupled receptor signaling pathway in insecticide resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4300.

LI, T., CAO, C., YANG, T., ZHANG, L., HE, L., XI, Z., BIAN G. & LIU, N. (2015). A G-protein-coupled receptor regulation pathway in cytochrome P450-mediated permethrin-resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific reports*, 5(1), 1-13.

LI, X., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 231-253.

LI, Z.; ALVES, S. S.; ROBERTS, D.; FAN, M.; DELALIVERA, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20(2), 117-136.

LIN, Y., GAO, Q., WANG, Y., WANG, Z., HE, K., SHANG, S., & ZHANG, T. (2022). Comparative transcriptome analysis of bt resistant and susceptible strains in *Ostrinia furnacalis* (guenée)(Lepidoptera: Crambidae). *Agriculture*, 12(2), 298.

LIU, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 537–559.

LIU, N., LI, T., WANG, Y., & LIU, S. (2021). G-protein coupled receptors (GPCRs) in insects—A potential target for new insecticide development. *Molecules*, 26(10), 2993.

LIU, S., LIU, F., JIA, H., YAN, Y., WANG, H., GUO, X., & XU, B. (2016). A glutathione S-transferase gene associated with antioxidant properties isolated from *Apis cerana cerana*. *The Science of Nature*, 103, 1-12.

LOCKWOOD, J. A., SPARKS, T. C., & STORY, R. N. (1984). Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Esa*, 30(4), 41-51.

Lorenzo, M. G., & Melo, A. D. A. Olfacção e comportamento. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular* (2012), 1, 1-20.

LU, Q., LI, W. Z., & ZHU, X. F. (2009). Overview of fuel properties of biomass fast pyrolysis oils. *Energy conversion and management*, 50(5), 1376-1383.

- MACKAY, A.J., AMADOR, M. & BARRERA, R. (2013). An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors*, 6(1), 1-13.
- MAFRA-NETO, A., & DEKKER, T. (2019). Novel odor-based strategies for integrated management of vectors of disease. *Current opinion in insect science*, 34, 105-111.
- MAIENFISCH, P., ANGST, M., BRANDL, F., FISCHER, W., HOFER, D., KAYSER, H., KOBEL W., RINDLISBACHER A., SENN R., STEINEMANN A. & WIDMER, H. (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest management science*, 57(10), 906-913.
- MAKKI R, CINNAMON E, GOULD AP (2014) The development and functions of oenocytes. *Annu Rev Entomol.* 59, 405–425.
- MANJARRES-SUAREZ A, OLIVERO-VERBEL J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Rev. Costarr Salud Pública*, 22(1):68-75.
- MANNERVIK, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 57, 357-417.
- MATHENGE, E. M., GIMNIG, J. E., KOLCZAK, M., OMBOK, M., IRUNGU, L. W., & HAWLEY, W. A. (2001). Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *Journal of medical entomology*, 38(4), 531-536.
- MATSUMURA, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97(2), 133-139.
- MATSUO, N. (2019). Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(7), 378-400.
- MATTOS, C., ANDRADE, J., OLIVEIRA, P. C., VELOSO, M. C., ROMEIRO, G. A., & DAS CHAGAS, E. F. (2021). Fumigant activity of pyrolysis fractions derived from waste licuri's pericarp (*Syagrus coronata*-Arecaceae) in the control the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Challenges*, 5, 100294.
- MATTOS, C., VELOSO, M. C. C., ROMEIRO, G. A., & FOLLY, E. (2019). Biocidal applications trends of bio-oils from pyrolysis: Characterization of several conditions and biomass, a review. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 139, 1-12.
- MEDEIROS, J. F. D., ACAYABA, R. D. A., & MONTAGNER, C. C. (2021). A química na avaliação do impacto à saúde humana diante da exposição aos pesticidas. *Química Nova*, 44, 584-598.

MEISTER, G., & TUSCHL, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349.

MELANDER, A. L. (1914). Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology*, 7(2), 167-173.

METCALF, R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide science*, 26(4), 333-358.

MEYER, F., FLÖTENMEYER, M., & MOUSSIAN, B. (2013). The sulfonylurea receptor Sur is dispensable for chitin synthesis in *Drosophila melanogaster* embryos. *Pest management science*, 69(10), 1136-1140.

MIAO, J., WU, Y., XU, W., HU, L., YU, Z., & XU, Q. (2011). The impact of transgenic wheat expressing GNA (snowdrop lectin) on the aphids *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum*, and *Rhopalosiphum padi*. *Environmental entomology*, 40(3), 743-748.

MICHIELS, K., VAN DAMME, E. J., & SMAGGHE, G. (2010). Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 73(4), 193-212.

MOHAN, D., PITTMAN JR, C. U., & STEELE, P. H. (2006). Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & fuels*, 20(3), 848-889.

MOHANDASS, S. M., ARTHUR, F. H., ZHU, K. Y., & THRONE, J. E. (2006). Hydroprene: mode of action, current status in stored-product pest management, insect resistance, and future prospects. *Crop Protection*, 25(9), 902-909.

MONTGOMERY, M. K. (2004). RNA interference : historical overview and significance. *RNA Interference, Editing, and Modification*, 3-21.

MOREIRA, M.F., MANSUR, J.F., FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Capítulo 15. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM)*. 2012.

MOREL, F., RAUCH, C., PETIT, E., PITON, A., THERET, N., COLES, B., & GUILLOUZO, A. (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *Journal of biological chemistry*, 279(16), 16246-16253.

MORRISON III, W. R., BRUCE, A., WILKINS, R. V., ALBIN, C. E., & ARTHUR, F. H. (2019). Sanitation improves stored product insect pest management. *Insects*, 10(3), 77.

MUIRHEAD-THOMSON, R. C. (1960). The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization*, 22(6), 721.

- NAGADHARA, D., RAMESH, S., PASALU, I. C., RAO, Y. K., SARMA, N. P., REDDY, V. D., & RAO, K. V. (2004). Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(7), 1399-1405.
- NAQQASH, M. N., GÖKÇE, A., BAKHSH, A., & SALIM, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology research*, 115(4), 1363-1373.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). PubChem Compound Summary for CID 107720, Indoxacarb. Acessado em 02/08/2022: Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indoxacarb>>.
- NEVE EPA, INGELMAN-SUNDBERG M. (2008). Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem* 392(6), 1075–1084.
- NEWELL, S. Y., WALL, V. D., & MARUYA, K. A. (2000). Fungal biomass in saltmarsh grass blades at two contaminated sites. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 38, 268-273.
- NICOLETTI, R., & BECCHIMANZI, A. (2022). *Talaromyces*–insect relationships. *Microorganisms*, 10(1), 45.
- NOPPUN, V., SAITO, T., & MIYATA, T. (1989). Cuticular penetration of S-fenvalerate in fenvalerate-resistant and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 33(1), 83-87.
- ORAMAHI, H. A., & YOSHIMURA, T. (2013). Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. *Journal of wood science*, 59(4), 344-350.
- ORAMAHI, H. A., DIBA, F., NURHAIDA (2014). New bio preservatives from lignocelluloses biomass bio-oil for anti termites *Coptotermes curvignathus* holmgren. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 778-784.
- ORAMAHI, H. A., YOSHIMURA, T., DIBA, F., & SETYAWATI, D. (2018). Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from oil palm trunk. *Journal of Wood Science*, 64(3), 311-317.
- ORTIZ-URQUIZA, A., LUO, Z., & KEYHANI, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 1057-1068.
- PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., & CABALLERO, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325.

PAN, C., ZHOU, Y., & MO, J. (2009). The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(3), 105-111.

PARK, M.G., CHOI, J.Y., KIM, J.H., PARK, D.H., WANG, M., KIM, H.J., KIM, S.H., LEE, H.Y. AND JE, Y.H. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* toxic to lepidopteran pests *Spodoptera* spp. and *Plutella xylostella*. *Pest management science*, 78(7), 2976-2984.

PARRA, J. R. P., & COELHO JR, A. (2022). Insect rearing techniques for biological control programs, a component of sustainable agriculture in Brazil. *Insects*, 13(1), 105.

PARRA, J. R. P., ALVES, G. R., DINIZ, A. J. F., & VIEIRA, J. M. (2016). *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) × *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): mass rearing and potential use of the parasitoid in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, 7(1).

PAUL, S., & DAS, S. (2021). Natural insecticidal proteins, the promising bio-control compounds for future crop protection. *The Nucleus*, 64(1), 7-20.

PAVLIDI, N., VONTAS, J., & VAN LEEUWEN, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current opinion in insect science*, 27, 97-102.

PEZENTI L.F., SOSA-GÓMEZ D.R., DE SOUZA R.F., VILAS-BOAS L.A., GONÇALVES K.B., DA SILVA C.R.M., VILAS-BÔAS G.T., BARANOSKI A., MANTOVANI M.S., DA ROSA R. (2021). Transcriptional profiling analysis of susceptible and resistant strains of *Anticarsia gemmatalis* and their response to *Bacillus thuringiensis*. *Genomics*, 113(4), 2264-2275.

PIGNATELLI, P., INGHAM, V. A., BALABANIDOU, V., VONTAS, J., LYCETT, G., & RANSON, H. (2018). The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect molecular biology*, 27(1), 110-122.

PINOS, D., ANDRÉS-GARRIDO, A., FERRÉ, J., & HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. (2021). Response mechanisms of invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), e00007-20.

PITTENDRIGH, B., ARONSTEIN, K., ZINKOVSKY, E., ANDREEV, O., CAMPBELL, B., DALY, J., TROWELL S, & FFRENCH-CONSTANT, R. H. (1997). Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid-susceptible and-resistant strain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(6), 507-512.

PRABOWO, H., MARTONO, E., & WITJAKSONO, W. (2016). Activity of liquid smoke of tobacco stem waste as an insecticide on *Spodoptera litura* Fabricius Larvae. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 20(1), 22-27.

PSZCZOLA, D. E. (1995). Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food technology (Chicago)*, 49(1), 70-74.

- RAMOS, L.F.C., RANGEL, J.H.O., ANDRADE, G.C., LIXA, C., CASTILHO, L.V.A., NOGUEIRA, F.C.S., PINHEIRO, A.S., GOMES, F.M., ANOBOM, C.D., ALMEIDA, R.V., OLIVEIRA, D.M.P. (2021). Identification and recombinant expression of an antimicrobial peptide (cecropin B-like) from soybean pest *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27.
- RAO, K. V., RATHORE, K. S., HODGES, T. K., FU, X., STOGER, E., SUDHAKAR, D., WILLIAMS S., CHRISTOU P., BHARATHI M., BOWN D.P., POWELL K.S., SPENCE J., GATEHOUSE A.M. & GATEHOUSE, J. A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 15(4), 469-477.
- RAO, P., GOSWAMI, D. & RAWAL, R. (2021). Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*: a glimpse into the Pandora's box for the strategic control of vector borne diseases. *Environmental Sustainability* 4(1), 23-37.
- RAY, D. E., RAY, D., & FORSHAW, P. J. (2000). Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38(2), 95-101.
- REHNER, S. A. & BUCKLEY, E. A. (2011). *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences:evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- RETNAKARAN, A., KRELL, P., FENG, Q., & ARIF, B. (2003). Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(4), 187-199.
- SACHSE, S.& KRIEGER, J. (2011). Olfaction in insects. *e-Neuroforum*, 17(3), 49-60.
- SALGADO, V. L. (1998). Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(2), 91-102.
- SALINAS, A. E., & WONG, M. G. (1999). Glutathione S-transferases-a review. *Current medicinal chemistry*, 6(4), 279-310.
- SAVIĆ, N., & SCHWANK, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15-21.
- SAYED, A. M., BEHLE, R. W., TIILIKKALA, K., & VAUGHN, S. F. (2018). Insecticidal activity of bio-oils and biochar as pyrolysis products and their combination with microbial agents against *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticidi i fitomedicina*, 33(1), 39-52.
- SEIFERT, J. (2014). Nithiazine. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. 517-518.
- SHABBIR, M. Z., ZHANG, T., WANG, Z., & HE, K. (2019). Transcriptome and proteome alternation with resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ah toxin in *Ostrinia furnacalis*. *Frontiers in Physiology*, 10, 27.

SHARMA, R. K., SINGH, P., SETIA, A., & SHARMA, A. K. (2020). Insecticides and ovarian functions. *Environmental and molecular mutagenesis*, 61(3), 369-392.

SIERRAS A & SCHAL C. (2020). Lethal and Sublethal Effects of Ingested Hydroprene and Methoprene on Development and Fecundity of the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(4), 1199-1206.

SILBERHORN, E. M. (2005). Methoprene. *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*. 59-61.

SMART, L. E., ARADOTTIR, G. I., & BRUCE, T. J. A. (2014). Role of semiochemicals in integrated pest management. In *Integrated pest management* (pp. 93-109). Academic Press.

SNEDEKER, S. M. (2001). Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 35-47.

SOARES-DA-SILVA J, QUEIRÓS SG, DE AGUIAR JS, VIANA JL, NETA MDRAY, DA SILVA MC, PINHEIRO VCS, POLANCZYK RA, CARVALHO-ZILSE GA, TADEI WP. (2017). Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. *Acta tropica*, 176, 197-205.

SODERLUND, D. M., & KNIPPLE, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(6), 563-577.

SOH, L.S., VEERA SINGHAM, G., (2021). Cuticle thickening associated with fenitrothion and imidacloprid resistance and influence of voltage-gated sodium channel mutations on pyrethroid resistance in the tropical bed bug, *Cimex hemipterus*. *Pest Management Science*, 77(11), 5202-5212.

SPARKS, T. C., & NAUEN, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 122-128.

SPARKS, T. C., LOCKWOOD, J. A., BYFORD, R. L., GRAVES, J. B., & LEONARD, B. R. (1989). The role of behavior in insecticide resistance. *Pesticide Science*, 26(4), 383-399.

SPARKS, T. C., STORER, N., PORTER, A., SLATER, R., & NAUEN, R. (2021). Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. *Pest Management Science*, 77(6), 2609-2619.

STRYCHARZ, J. P., LAO, A., LI, H., QIU, X., LEE, S. H., SUN, W., YOON, K.S, DOHERTY, J.J, PITTENDRIGH, B.R & CLARK, J. M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(2), 207-217.

SUBRAMANIAN, S., & SHANKARGANESH, K. (2016). Insect hormones (as pesticides). In *Ecofriendly pest management for food security* (pp. 613-650). Academic Press.

SUH SO., BLACKWELL, M., KURTZMAN, C.P., LACHANCE, M.A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6):1006-17.

SULLIVAN, J. J. (2010). Chemistry and environmental fate of fenoxycarb. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 155-184.

SUN, R., LIU, C., ZHANG, H., & WANG, Q. (2015). Benzoylurea chitin synthesis inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(31), 6847-6865.

SUQI, L., CACERES, L., SCHIECK, K., BOOKER, C. J., MCGARVEY, B. M., YEUNG, K. K. C., PARIENTE, S.; BRIENS, C.; BERRUTI, F.; SCOTT, I. M. (2014). Insecticidal activity of bio-oil from the pyrolysis of straw from *Brassica* spp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(16), 3610-3618.

TAJNE, S., BODDUPALLY, D., SADUMPATI, V., VUDEM, D. R., & KHAREEDU, V. R. (2014). Synthetic fusion-protein containing domains of Bt Cry1Ac and *Allium sativum* lectin (ASAL) conferred enhanced insecticidal activity against major lepidopteran pests. *Journal of Biotechnology*, 171, 71-75.

TALAKAYALA, A., KATTA, S., & GARLADINNE, M. (2020). Genetic engineering of crops for insect resistance: An overview. *Journal of biosciences*, 45(1), 1-12.

TANAKA, S., ENDO, H., ADEGAWA, S., KIKUTA, S. & SATO, R. (2016). Functional characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors explains resistance in insects. *The FEBS journal*, 283(24), 4474-4490.

TERRIERE, L. C. (1984). Induction of detoxication enzymes in insects. *Annual review of Entomology*, 29(1), 71-88.

TIILIKKALA, K., FAGERNÄS, L., & TIILIKKALA, J. (2010). History and use of wood pyrolysis liquids as biocide and plant protection product.

TORRES, A. Q., VALLE, D., MESQUITA, R. D., & SCHAMA, R. (2018). Gene Family Evolution and the Problem of a Functional Classification of Insect Carboxylesterases. *Reference Module in Life Sciences*.

UNITED NATIONS. *World Population Prospects: The 2017 Revision*. 21 June 2017. Disponível em <<https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html>>.

URRUTIA, R. I., YEGUERMAN, C., JESSER, E., GUTIERREZ, V. S., VOLPE, M. A., & GONZÁLEZ, J. O. W. (2021). Sunflower seed hulls waste as a novel source of insecticidal product: Pyrolysis bio-oil bioactivity on insect pests of stored grains and products. *Journal of Cleaner Production*, 287, 125000.

VALE, A., & LOTTI, M. (2015). Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. *Handbook of clinical neurology*, 131, 149-168.

- VALTIERRA-DE-LUIS, D., VILLANUEVA, M., BERRY, C., CABALLERO, P. (2020). Potential for *Bacillus thuringiensis* and other bacterial toxins as biological control agents to combat dipteran pests of medical and agronomic importance. *Toxins*, 12(12), 773.
- VAN LENTEREN, J. C., & BUENO, V. H. (2003). Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl*, 48(2), 123-139.
- VANNINI, L., REED, T.W., WILLIS, J.H., (2014). Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-11.
- VINSON, S. B., & PLAPP, F. W. (1974). Third generation pesticides. Potential for the development of resistance by insects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 22(3), 356-360.
- WAGIMAN, F. X., ARDIANSYAH, A., WITJAKSONO (2014). Activity of coconut-shell liquid-smoke as an insecticide on the rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Journal of Agricultural and Biological Science*, 9(9), 293-296.
- WAKITA, T., KINOSHITA, K., YAMADA, E., YASUI, N., KAWAHARA, N., NAOI, A., NAKAYA M., EBHARA K., MATSUNO H. & KODAKA, K. (2003). The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 59(9), 1016-1022.
- WARE, G. W., & WHITACRE, D. M. (2004). An introduction to insecticides. The pesticide book, 6.
- WHALON, M. E., MOTA-SANCHEZ, D., & HOLLINGWORTH, R. M. (Eds.). (2008). Global pesticide resistance in arthropods.
- WITCZAK, A., POHORYŁO, A., & ABDEL-GAWAD, H. (2021). Endocrine-disrupting organochlorine pesticides in human breast milk: Changes during lactation. *Nutrients*, 13(1), 229.
- WITITSIRI, S. (2011). Production of wood vinegars from coconut shells and additional materials for control of termite workers, *Odontotermes* sp. and striped mealy bugs, *Ferrisia virgata*. *Songklanakarinn*. *Journal of Science & Technology*, 33(3).
- WU, K., SHIRK, P. D., TAYLOR, C. E., FURLONG, R. B., SHIRK, B. D., PINHEIRO, D. H., & SIEGFRIED, B. D. (2018). CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in fall armyworm moth (*Spodoptera frugiperda*). *PloS one*, 13(12), e0208647.
- YAHAYU, M., MAHMUD, K. N., MAHAMAD, M. N., NGADIRAN, S., LIPEH, S., UJANG, S., & ZAKARIA, Z. A. (2017). Efficacy of pyroligneous acid from pineapple waste biomass as wood preserving agent. *Jurnal Teknologi*, 79(4).

- YAHOUÉDO, GA, CHANDRE, F., ROSSIGNOL, M., GINIBRE, C., BALABANIDOU, V., MENDEZ, N.G.A., PIGEON, O., VONTAS, J. & CORNELIE, S. (2017) Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Scientific reports*, 7(1), 11091.
- YAMAMOTO, I., & CASIDA, J. E. (1999). Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor.
- YAN, S., CUI, F., & QIAO, C. (2009). Structure, function and applications of carboxylesterases from insects for insecticide resistance. *Protein and Peptide Letters*, 16(10), 1181-1188..
- YAN, S., REN, B., ZENG, B., & SHEN, J. (2020). Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. *Biotechniques*, 68(5), 283-290.
- YANG, F., KERNS, D.L., LITTLE, N.S., SANTIAGO GONZÁLEZ, J.C., TABASHNIK, B.E. Early warning of resistance to Bt toxin Vip3Aa in *Helicoverpa zea*. *Toxins*, 13(9), 618.
- YANG, T., LI, T., FENG, X., LI, M., LIU, S., & LIU, N. (2021). Multiple cytochrome P450 genes: Conferring high levels of permethrin resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10.
- YATAGAI, M., NISHIMOTO, M., HORI, K., OHIRA, T., & SHIBATA, A. (2002). Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. *Journal of Wood Science*, 48(4), 338-342.
- ZARA, A. L. D. S. A., SANTOS, S. M. D., FERNANDES-OLIVEIRA, E. S., CARVALHO, R. G., & COELHO, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 20

Enterobactérias entomopatogênicas simbiotes de nematoides

Danilo R. Ferraz¹
Carlos E. Winter¹

¹ Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nematoides Entomopatogênicos

O termo entomopatogênico tem sido associado aos nematoides, desde o início da década de 80 e, quando em conjunto, descrevem uma guilda altamente especializada de nematoides parasitas de insetos. Para que um nematoide seja considerado, de fato, um nematoide entomopatogênico (NEP; Box 1) é necessário que dois critérios sejam atingidos: (i) ele deve apresentar uma associação mutualista com bactérias (Box 2), que desencadeia ou amplifica sua patogênese nos insetos hospedeiros e (ii) a morte do hospedeiro deve ocorrer em um intervalo menor do que 120 horas, o que evidencia um mecanismo, altamente eficiente, de transmissão da bactéria pelo nematoide vetor (Dillman et al., 2012).

Box 1 - Famílias de nematoides rhabditídeos classificadas como NEP

A família Steinernematidae é, atualmente, composta por dois gêneros, *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neos-teinerinema* Nguyen & Smart, 1994. O primeiro, com 95 espécies descritas, é um patógeno de diversas ordens de insetos, assim como de outros artrópodes, e abriga uma enterobactéria *Xenorhabdus* ssp. como parceiro simbiote (Hunt e Nguyen, 2016). O segundo, por sua vez, é um gênero

monoespecífico, parasita exclusivamente de cupins e que não apresenta uma descrição formal de sua bactéria simbiote (Nguyen e Smart, 1994)

Já a família monotípica Heterorhabditidae, apresenta, atualmente, 18 espécies descritas de *Heterorhabditis* Poinar, 1976, que estão distribuídas por todos os continentes, a exceção da Antártida (Machado et al., 2021a). Cabe destacar que, embora a esma-

gadora maioria das linhagens de *Heterorhabditis* sejam patógenos de ordens de insetos, algumas delas são capazes de infectar outros artrópodes e, até mesmo, alguns moluscos (Dolinski et al., 2017). Em todos os casos, as bactérias simbiotes responsáveis pela patogenia são enterobactérias do gênero *Photorhabdus* (Hunt e Nguyen, 2016).

Box 2 - Bactérias simbiotes de NEP

Gênero *Xenorhabdus*

Em 1965, Thomas e Poinar descreveram *Achromobacter nematophilus*, uma espécie de bactéria associada à linhagem DD-136 do nematoide *Neoplectana carpocapsae* (atualmente *Steinernema carpocapsae*) (Poinar e Thomas, 1965), demonstrando, no ano seguinte, a importância da associação entre ambos para a reprodução e o desenvolvimento do nematoide (Poinar e Thomas, 1966). Posteriormente, o gênero *Achromobacter* foi considerado não válido e o gênero *Xenorhabdus* foi proposto por Thomas e Poinar em 1979, englobando as espécies *X. nematophilus* e *X. luminescens* (Thomas e Poinar, 1979).

Atualmente, o gênero *Xenorhabdus* conta com 27 espécies válidas, associadas a nematoides do gênero *Steinernema* e distribuídas por todos os continentes, a exceção da Antártida (Koppenhöfer, 2007; Sajnaga e Kazimierczak, 2020; Castaneda-Alvarez et al., 2021).

O gênero *Xenorhabdus* é caracterizado por bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, com dimensões entre 0,3-2,0 µm de largura por 2,0-10,0 µm de comprimento e capazes de produzir filamentos de até 50 µm de extensão. O movimento celular ocorre devido à flagelação peritríquea das bactérias, que podem, também, realizar *swar-*

ming em concentrações de até 1,2% de ágar. Ao final da fase exponencial, produzem esferoblastos com aproximadamente 2,6 µm de diâmetro e, durante a fase estacionária, apresentam inclusões cristalinas proteicas (Thomas e Poinar, 1979; Boemare e Akhurst, 2006; Koppenhöfer, 2007).

O metabolismo é anaeróbio facultativo, com capacidade de realizar tanto respiração quanto fermentação, embora a eficiência fermentativa de carboidratos outros que não glicose, seja limitada. A temperatura ótima de crescimento é de 28 °C, podendo algumas linhagens crescer até à 42 °C. São catalase-negativas, proteases e DNases-positivas e não redutores de nitrato (Thomas e Poinar, 1979; Boemare e Akhurst, 2006; Koppenhöfer, 2007).

Gênero *Photorhabdus*

Quatorze anos após a descrição de *Xenorhabdus luminescens*, o gênero *Photorhabdus* foi formalmente descrito, tendo *Photorhabdus luminescens* como espécie tipo (Boemare et al., 1993). Desde então, 21 espécies de *Photorhabdus* foram descritas (Fischer-Le Saux et al., 1999; Ferreira et al., 2014; Machado et al., 2018; Machado et al., 2021a, b).

O gênero é caracterizado por bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, móveis, com flagelação peritríquea e ligeiramente maiores

que as demais enterobactérias, apresentando dimensões de 0,5-2,0 µm de largura por 1,0-10,0 µm de comprimento. Durante a fase estacionária de crescimento, apresentam inclusões cristalinas proteicas e podem assumir conformação de esferoblastos pela desintegração parcial da parede celular (Thomas e Poinar Jr, 1979; Boemare et al., 1993).

Seu metabolismo é anaeróbio facultativo com capacidade respiratória e fermentativa, podendo utilizar fumarato, succinato, glucosamina, ácido-L-glutâmico, L-malato, L-prolina e L-tirosina como única fonte energética ou de carbono. Em geral, produzem ácidos pelo metabolismo de carboidratos, mas sem a produção de gases no processo. São, também, catalase-positivos, oxidase-negativos e não-redutores de nitrato. A temperatura ótima de crescimento celular é de 28°C, com algumas linhagens capazes de crescer à 37°C (Boemare et al., 1993).

Muitas linhagens produzem, quando em meio rico, colônias pigmentadas com coloração amarelada, alaranjada ou avermelhada, devido à produção de antraquinonas. Por fim, outra importante característica é a capacidade de produção de bioluminescência, quando em fase estacionária, sendo a única bactéria de ambientes terrestres capaz de emitir luz (Boemare et al., 1993).

Metabolismo Secundário e Bioprodutos dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*

Metabólitos secundários são compostos orgânicos de ocorrência natural e baixo peso molecular, produzidos por seres vivos como produto de seu metabolismo secundário. Em bactérias, eles são sintetizados ao final da fase exponencial de crescimento ou durante a fase estacionária, e não estão envolvidos diretamente com o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução dos microrganismos. Ao contrário dos metabólitos primários, a ausência de metabólitos secundários não resulta na morte imediata do organismo (Abdel-Aziz et al., 2017). A importância desses compostos ainda não foi completamente compreendida, mas se especula que apresentem papel na interação ecológica entre microrganismos e o ecossistema, impactando positivamente sua sobrevivência (Clarke, 2017).

Dentre os inúmeros produtos do metabolismo secundário, encontram-se componentes do biofilme, biopigmentos, biopolímeros, compostos antimicrobianos, imunomoduladores. Esses são apenas alguns poucos exemplos da enorme diversidade de compostos já conhecida (Abdel-Aziz et al., 2017; Clarke, 2017).

Sabe-se, atualmente, que mais de 6,5% de todo o genoma das bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* codifica componentes de vias envolvidas na produção de metabólitos secundários (Shi, Bode, 2018). Essa grande abundância de genes associados ao metabolismo secundário ficou ainda mais evidente, após o ano de 2003, com o sequenciamento do genoma de *Photorhabdus laumondi*¹ (Duchaud et al., 2003). Nesses dois gêneros de bactérias, as funções associadas aos metabólitos secundários são divididas em quatro categorias principais: (i) fuga ou combate ao sistema imune dos hospedeiros (Crawford et al., 2012; Brachmann et al., 2013); (ii) proteção do cadáver do hospedeiro contra espécies competidoras (Akhurst, 1982, Hu et al., 1999, Zhou et al., 2002,); (iii) facilitação do desenvolvimento e da reprodução do nematoide simbiote (Ciche et al., 2001; Joyce et al., 2008); e (iv) comunicação celular (Shi, Bode, 2018).

Insetos apresentam respostas imunológicas celulares, que englobam a fagocitose e o encapsulamento de organismos invasores. Além disso, apresentam uma resposta imune humoral, que envolve a produção de peptídeos

¹À época do sequenciamento de *P. laumondi*, esta ainda era considerada uma subespécie de *P. luminescens*. Contudo, Machado, no ano de 2018, realizou uma extensa revisão do gênero elevando as 17 subespécies de *Photorhabdus* descritas até então, ao nível de espécie.

antimicrobianos e cascatas proteolíticas, como, por exemplo, aquela envolvida na ativação da pró-fenoloxidase (PO) (Schmidt et al., 2008).

Escapar desses mecanismos é um aspecto crucial para a sobrevivência dos patógenos. Um metabólito com esta função essencial, presente tanto em *Photorhabdus* quanto em *Xenorhabdus*, é a rabduscina (Figura 1A). A rabduscina é um isocianeto ou, mais exatamente, o 4-acetamido-4-6-didesoxi- β -L-galactopiranosídeo de p-[(E)-2-isocianovinil]fenol. Esse composto, derivado do aminoácido tirosina, apresenta um grupo funcional isocianeto com potente atividade de inibição da PO. A rabduscina é depositada na parede celular, formando um perímetro defensivo contra a PO, impedindo a melanização das bactérias invasoras na hemolinfa dos hospedeiros (Crawford et al., 2012).

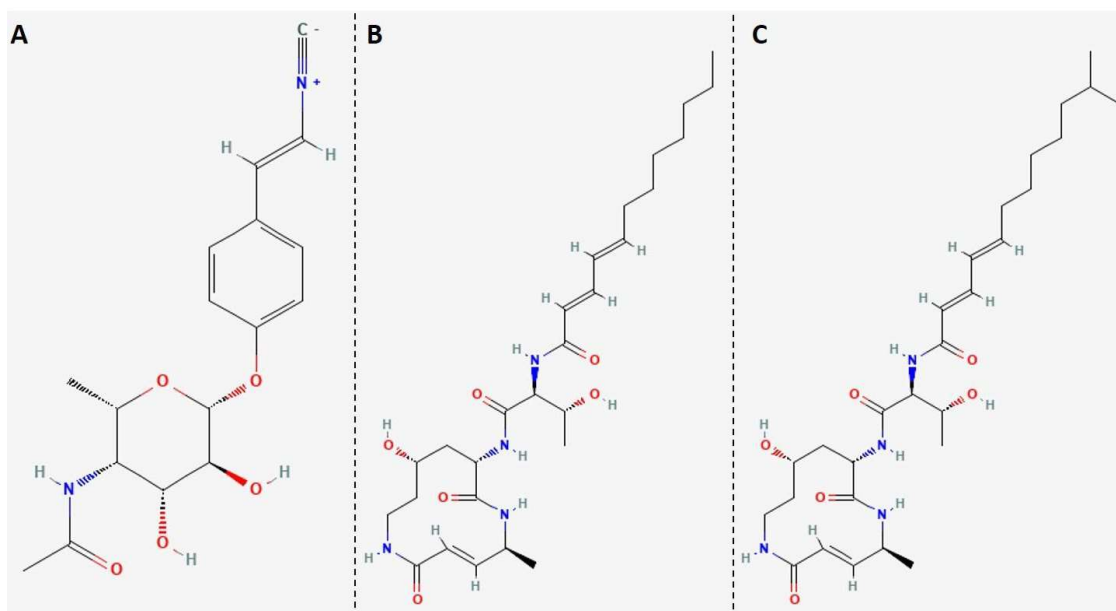


Figura 1: Fuga do sistema imune **A:** Rabduscina (MW = 332,4) PubChem CID 102453304; **B:** Glidobactina A (MW= 520,7) PubChem CID 6505332; **C:** Cepafungina I (MW = 534,7) PubChem CID 9915081.

Fonte: Arquivo pessoal

Outros compostos com importante atividade de inibição do sistema imune dos insetos são a glidobactina (Figura 1B) e a cepafungina (Figura 1C) (presentes em *Photorhabdus*) e a xenorabdina (Figura 2A) (presente em *Xenorhabdus*), que atuam como inibidores do proteassomo de células eucarióticas, consequentemente impedindo a degradação dos repressores das cascatas imunológicas nos insetos. (Groll et al., 2008; Kisselev, 2008; Tobias et al., 2018).

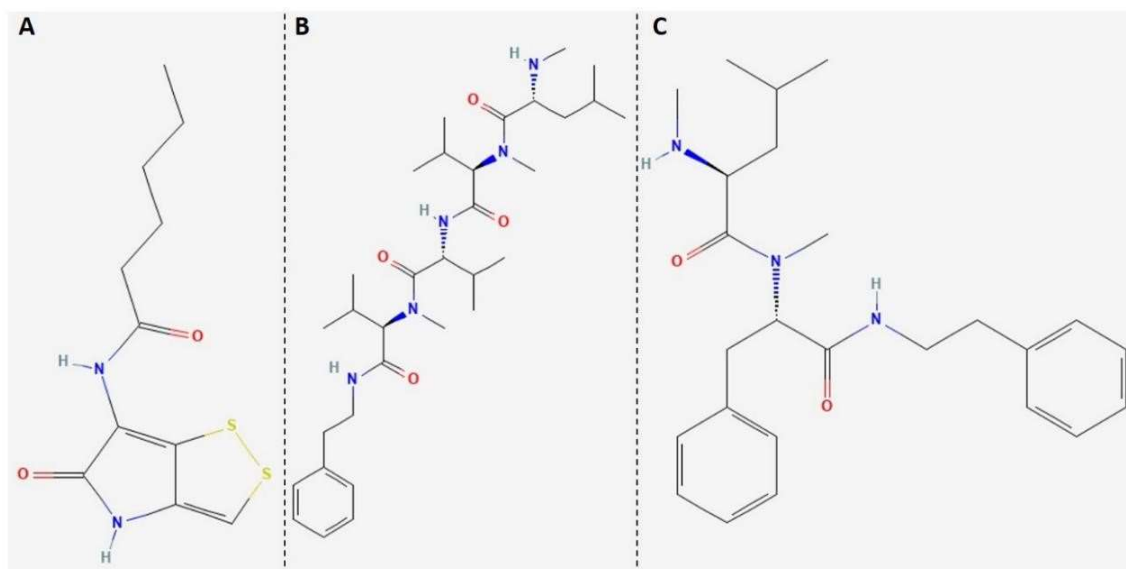


Figura 2: A: Xenorabdina I (MW = 270,4) PubChem CID 185193; B: Rabdopeptídeo I (MW = 573,8) PubChem CID 73332068 (573,8); C: Xenortídeo (MW = 409,6) PubChem CID 24900168.

Fonte: Arquivo pessoal

Além da rabduscina, xenorabdina, cepafungina e glidobactina, há também os rabdopeptídeos (Figura 2B) e os xenortídeos (Figura 2C), uma classe especial de oligopeptídeos (dois a oito aminoácidos) lineares, com um grupo amino C-terminal. Esses peptídeos apresentam atividade contra hemócitos de insetos, danificando a estrutura do citoesqueleto, além de atuarem como inibidores de serina-proteases. São, portanto, inibidores da cascata proteolítica de ativação da PO (Reimer et al., 2013; Shi, Bode, 2018).

Nem todos os compostos isolados de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* apresentam sua função completamente desvendada, como é o caso da antraquinona (Figura 3A). A literatura descreve mais de 700 compostos, com estrutura relacionada a ela, a maior parte oriunda de plantas, líquens e fungos, com inúmeras atividades, inclusive participando do metabolismo primário de plantas (Diaz-Muñoz et al., 2018). Em *Photorhabdus*, esse pigmento é o responsável pela coloração vermelho-alaranjada das culturas, e é capaz de remover radicais livres; portanto, é esperado que proteja as bactérias das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são parte da resposta imune dos insetos. Além disso, também se especula que a antraquinona atue como fator de dissuasão da predação por pássaros e formigas (Li et al., 1995; Bozhüyük et al., 2017; Shi, Bode, 2018).



Figura 3: A: Antraquinona (MW = 208,21) PubChem CID 6780; B: Xenocumacina I (MW = 456,5) PubChem CID 163752; C: Fabclavina Ia (MW = 1356,8) PubChem 145720647.

Fonte: Arquivo pessoal

Proteção contra competidores

Após a morte do inseto hospedeiro, seus restos são bioconvertidos em uma fonte extremamente rica de nutrientes, estando prontamente disponíveis para utilização de inúmeros organismos presentes no solo. Dessa forma, não é surpreendente que tanto *Photorhabdus* quanto *Xenorhabdus* produzam um extenso arsenal de compostos capazes de proteger o cadáver do inseto da colonização por fungos, protozoários, bactérias e outros organismos saprófitos (Shi, Bode, 2018).

Um desses antibióticos, identificado em *Xenorhabdus nematophila*, foi a xenocumacina (Figura 3B). Pela similaridade desse composto à amicumacina, especula-se que a xenocumacina atue como inibidor da síntese proteica bacteriana, inibindo a fase de alongamento durante a biossíntese de proteínas nos polirribossomos a partir do códon de iniciação (McInerney et al., 1991; Polikanov et al., 2014).

Outro metabólito com função de proteção do cadáver do inseto isolado de *Xenorhabdus* é a fabclavina (Figura 3C), uma poliamina de amplo espectro de atividade. As poliaminas apresentam atividade contra bactérias e eucariotos, incluindo fungos, oomicetos, plantas e nematoides. É possível que a fabclavina atue como a zeamina, produzida por *Dickeya zaeae*, causando danos à bicamada lipídica das membranas celulares e aumentando sua permeabilidade (Fuchs et al., 2014; Masschelein et al., 2015).

Vale ressaltar que as funções dos metabólitos secundários não necessariamente possuem um único propósito, como, por exemplo, a glidobactina, presente em *Photorhabdus*. Sendo um potente inibidor do

proteassomo, além de atuar como inibidor das cascatas imunológicas dos insetos, também atua contra fungos e outros organismos saprófitos, protegendo, assim, a carcaça do inseto da colonização por organismos invasores (Bozhüyük et al., 2017).

Desenvolvimento do parceiro simbiote

Talvez, o mais importante metabólito secundário, produzido pelas bactérias simbiotes de nematoides, seja o multipotente antibiótico 3-5-dihidroxi-4-isopropil-trans-estibeno (Figura 4A).

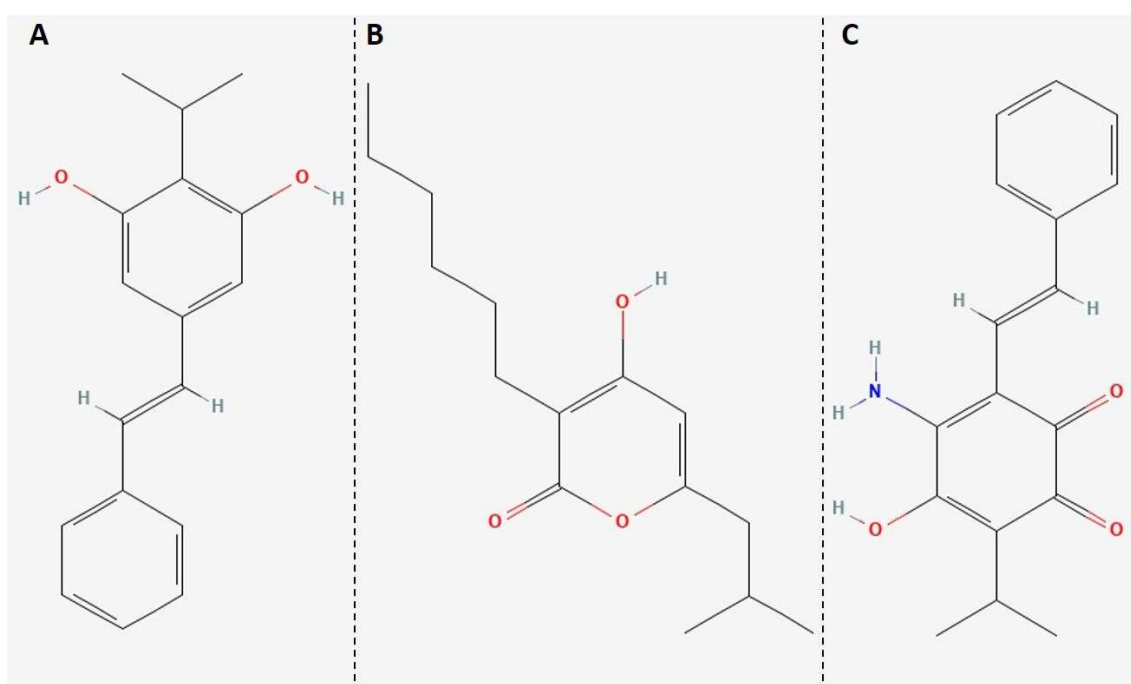


Figura 4: A: Estilbeno (MW = 254,32) PubChem CID 6439522; B: Fotopirona A (MW = 252,35) PubChem CID 71576814; C: Lumiquinona A [dialquilresorcinol] (MW = 283,32) PubChem CID 122179408.

Fonte: Arquivo pessoal

Além de apresentar função como inibidor do sistema imune de insetos e, também, de atuar como um antibacteriano, nematicida e antifúngico, o estilbeno opera como um sinalizador inter-reino. Por esses motivos, é indispensável para o crescimento e desenvolvimento do nematoide simbiote (Challinor, Bode, 2015; Shi, Bode, 2018).

Segundo Joyce et al. (2008), o processo de recuperação de *Heterorhabditis* fica amplamente comprometido, na ausência de estilbeno, diminuindo a taxa de recuperação dos nematoides, em cerca de 90%.

Comunicação celular

Quorum sensing é uma forma de comunicação entre células bacterianas, através de mensagens químicas que levam à expressão de genes associados à formação de biofilme e a fatores de virulência, por exemplo. Em bactérias gram-negativas, as homo-serino-lactonas são os compostos mais conhecidos associados ao *quorum sensing* (Papenfort, Bassler, 2016).

Em *Photorhabdus*, entretanto, as homo-serino-lactonas não parecem ser os responsáveis por essas respostas celulares. Nessas bactérias, foram identificados dois sinalizadores moleculares, chamados fotopironas (Figura 4B) e dialquilresorcinois (Figura 4C). Quando as fotopironas são percebidas pelas bactérias, elas ativam a expressão do operon *pcfABCDEF*, responsável pelo fator de aglomeração celular, que ocasiona um aumento da virulência contra insetos. (Brachmann et al., 2013; Brameyer et al., 2015).

Em *Xenorhabdus*, entretanto, estão associadas ao *quorum sensing*, as feniletilamidas (Figura 5A) e triptamidas (Figura 5B) (Bode et al., 2017).

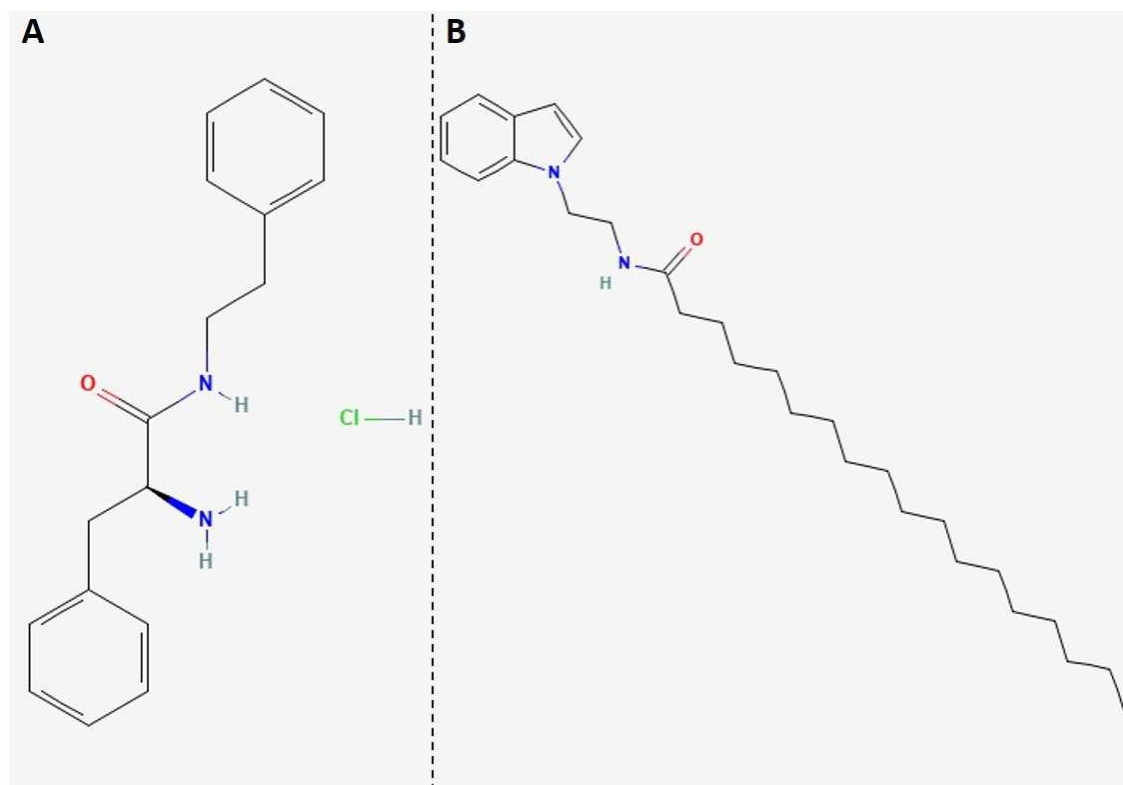


Figura 5: A: L-Phe-Feniletilamida (MW = 304,8) PubChem CID 21308260; B: Triptamida do ácido octadecanoico (MW = 426,7) PubChem CID 99780034.

Fonte: Arquivo pessoal

Toxinas proteicas

A fim de infectar seus hospedeiros e levá-los à morte com tamanha eficiência e rapidez, é natural que as enterobactérias simbiotes de nematoides produzam uma ampla variedade de compostos orgânicos, metabólitos, proteínas e toxinas, que impactem diretamente em sua virulência (Ffrench-Constant, 2017).

Em *Photorhabdus*, essas toxinas são classificadas em quatro grupos principais: (i) Complexos de toxinas (Tc); (ii) as proteínas de *Photorhabdus* relacionadas a proteínas de insetos (Pir); (iii) as toxinas que tornam lagartas flácidas (MCF); e (iv) os Cassetes de Virulência de *Photorhabdus* (PVC) (Rodou et al., 2010).

Complexos de toxinas

Tanto *Photorhabdus* quanto *Xenorhabdus* produzem proteínas de alto peso molecular (maior que 1,4 MDa), organizadas em um complexo oligomérico tripartido com atividade tóxica contra insetos chamados Tc (Xpt em *Xenorhabdus*). Essas toxinas são, tipicamente, compostas pelas subunidades TcA, TcB e TcC², com atividade entomotóxicas (Sheets e Aktories, 2017) (Figura 6).

As subunidades TcA se ligam à bicamada lipídica das células, formando uma estrutura em forma de sino composta por cinco subunidades de TcA, originando um poro na membrana. A inserção da porção em α -hélice do complexo pentamérico de TcA na membrana das células estabelece a formação de um mecanismo semelhante a uma seringa, que pode ser utilizado para injeção de proteínas nas células-alvo. Embora a subunidade TcA apresente, sozinha, atividade inseticida, como demonstrado por Liu et al. (2003), é em conjunto com TcB e TcC que todo seu potencial entomotóxico é observado (Gatsogiannis et al., 2013; Gatsogiannis et al., 2016).

TcB, por sua vez, não apresenta qualquer atividade inseticida quando expressa sozinha. Contudo, acredita-se que atue como uma chaperonina de TcC, impedindo que ela se dobre, formando um complexo insolúvel incapaz de se ligar ao restante da proteína. Também foi observado que o complexo TcB-TcC, quando ligado à TcA, amplia a dimensão do poro formado pelo complexo pentamérico de TcA (Yang e Waterfield, 2013; Meusch et al., 2014).

²TcA, B e C representam uma simplificação da atual nomenclatura e dizem respeito às subunidades funcionais das Tc. Para uma visão mais abrangente da estrutura e nomenclatura das subunidades, ver Sheets e Aktories, 2017 e Roderer e Raunser, 2019.

Já TcC é formada por uma proteína com dois domínios distintos, que são clivados pela própria TcC. Um destes domínios é formado por uma região hipervariável que define a atividade tóxica do complexo e é transferido para a célula-alvo através do poro formado por TcA. Uma vez no citoplasma celular, TcC atua como uma ADP-ribosiltransferase, favorecendo a polimerização da actina ao mesmo tempo que inibe sua fragmentação, resultando em alteração da morfologia e, conseqüentemente, na destruição celular. Um dos alvos destas toxinas são os hemócitos de insetos, cuja atividade fagocitária fica amplamente deficiente devido ao desajuste do citoesqueleto (Lang et al., 2010; Lang et al., 2016).

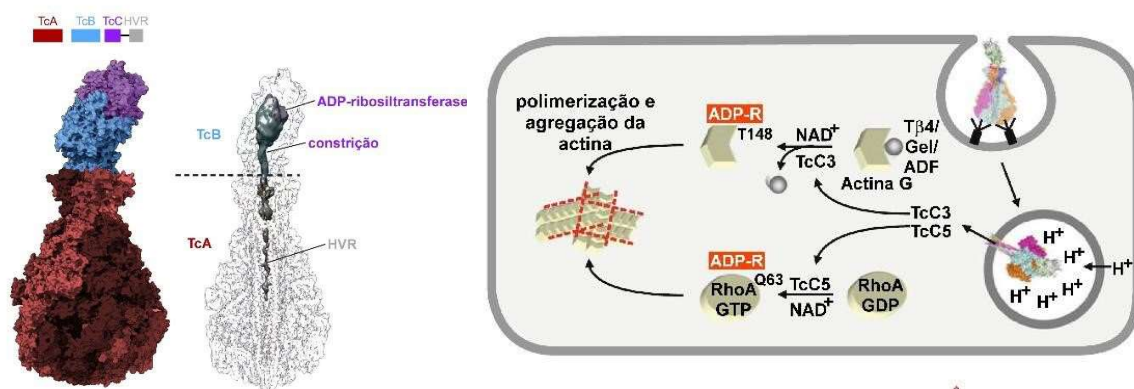


Figura 6: Tc de *Photorhabdus*. (A) Estrutura do Tc composto de 3 subunidades, TcA, TcB e TcC (ver <https://www.rcsb.org/3d-sequence/6H6E?assemblyId=1>). O esquema à direita mostra a toxina ativada, inserindo a região HVR de TcC, já processada, através da membrana. (B) Esquema do mecanismo de ação do Tc em uma célula eucariótica. São mostradas duas diferentes proteínas TcC (TcC3 e TcC5) agindo no citoesqueleto de um enterócito de inseto. TcC3 ADP-ribosila a actina na Thr 148, o que inibe sua interação com proteínas como a timosina β -4 (T β -4), gelsolina (Gel) ou ADF (*actin depolymerization factors* ou destrinas). A TcC5 ADP-ribosila as GTPases Rho na glutamina 63, resultando em sua ativação persistente, o que leva à polimerização da actina. Essas modificações levam à agregação das subunidades de actina, desestabilizando o citoesqueleto e levando a célula a apoptose.

Fonte: (A) modificado de Roderer, Raunser, 2019; (B) modificado de Sheets, Aktories, 2017.

Toxinas Pir

As proteínas de *Photorhabdus* relacionadas a proteínas de insetos, ou toxinas Pir, são proteínas binárias codificadas por dois pares de genes. Os produtos desses dois pares de genes são chamados PirA e PirB (Ffrench-Constant et al., 2007).

Essas toxinas apresentam toxicidade contra lepidópteros e culicíneos devido a similaridades entre as toxinas Pir, a lepitinotarsina e a δ -endotoxina de *Bacillus turingensis*. Todas essas proteínas apresentam similaridade com uma

região formadora de poros na membrana, o que sugere que esse pode ser um dos mecanismos de ação das toxinas Pir (Ffrench-Constant et al., 2007).

Outro mecanismo observado foi o dano causado às células do intestino médio e posterior dos insetos quando a toxina foi ofertada oralmente ao lepidóptero *Plutella xylostela*. As células do intestino médio ficam inchadas e se destacando da membrana basal. Embora desencadeie grandes danos a *Plutella*, o mesmo mecanismo não foi observado em outros lepidópteros (Blackburn et al., 2006).

Toxinas MCF

Utilizando-se de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, foi identificado um gene de *Photorhabdus* com 8.8 kbs. Quando bactérias que expressavam esse gene eram injetadas em *Manduca sexta*, não apenas permitiam sua permanência na hemolinfa das lagartas, como as levava à morte. O produto desse gene são as toxinas Mcf1 (*Makes Caterpillars Floppy*) que, em uma tradução literal, quer dizer “tornam as lagartas flácidas”, nome dado justamente por desencadear esse fenótipo nas lagartas (Daborn et al., 2002).

Essas toxinas apresentam uma potente ação quando injetadas em lagartas, resultando em uma rápida destruição das células do intestino dos insetos. Como o intestino é um órgão importante na osmorregulação dos insetos, sua destruição leva à perda de turgor das lagartas e, conseqüentemente, ao fenótipo “flácido”. Outra ação dessa toxina leva à apoptose dos hemócitos (Daborn et al., 2002; Ullah et al., 2014).

Além da Mcf1, outro gene homólogo, também presente em *Photorhabdus*, é responsável pela expressão de Mcf2, capaz de causar o mesmo fenótipo de flacidez e matar lagartas (Ffrench-Constant, 2007).

Toxinas PVC

A última das quatro ilhas de patogenicidade de *Photorhabdus* apresenta um conjunto de 16 genes, arranjados como um operon. Eles expressam as toxinas PVC (*Photorhabdus Virulence Cassettes*), além dos genes efetores *pnf*, cujo produto está fisicamente associado ao *needle complex* dessas toxinas. Análises genômicas identificaram entre cinco e seis cópias desse operon em diferentes linhagens de *Photorhabdus* (Yang et al., 2016).

Essa toxina é homóloga aos genes *anti-feeding* de *Serratia entomophila*, apresentando atividade quando injetados na hemolinfa de lagartas. Embora sua

estrutura seja semelhante a bacteriocinas, ela não apresenta atividade antibacteriana e, sim, atividade contra células eucarióticas, através do rearranjo e da condensação das fibras de actina do citoesqueleto, o que leva a apoptose dos hemócitos (Ffrench-Constant, 2007).

A toxina age nas células-alvo por um sistema semelhante ao observado nos fagos T4 e, também, nos sistemas de secreção tipo IV. Porém, não necessitam de que *Photorhabdus* esteja ancorado à célula alvo para que a toxina seja injetada (Vlisidou et al., 2019). Essas toxinas fazem parte da extensa família de toxinas eCISs (*extracellular contractile injection systems*), aparentemente derivadas de genes modificados de bacteriófagos ancestrais (Nagakubo, 2022). A estrutura de uma das PVC de *Photorhabdus asymbiotica* foi analisada em detalhes por crio electromicroscopia, fornecendo dados para melhor entender a montagem e a disponibilização dessa enorme toxina (Jiang et al., 2019).

Potencial de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* para a Saúde Pública

Como mencionado, cerca de 6,5% do genoma de *Photorhabdus* e de *Xenorhabdus* são destinados a síntese de metabólitos secundários e, embora todos esses componentes contribuam para o fitness das bactérias, eles também podem apresentar enorme utilidade ao ser humano, com especial destaque à área da saúde (Shi, Bode, 2018).

Doenças infecciosas são problemas endêmicos em diversas partes do planeta. Segundo Ashley (2018), por exemplo, cerca de 200 milhões de pessoas são infectadas por *Plasmodium* sp. (protozoário causador da malária) todos os anos, e cerca de meio milhão morre em decorrência da doença. Tornando o cenário ainda mais preocupante, novas linhagens de patógenos resistentes aos fármacos que conhecemos surgem, fazendo com que o arsenal de combate a diversas doenças infecciosas seja cada vez mais escasso. A enorme diversidade de compostos produzidos por *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, entretanto, podem ser uma grande aposta para o futuro. Entre os metabólitos descritos até o momento, há compostos com atividade antiparasitária, antifúngica e antimicrobiana (Parihar et al., 2022).

Em pesquisas atuais, a evibactina, um composto isolado de *Photorhabdus noenieputensis* que é um inibidor de DNA girasse, se mostrou um promissor antibiótico para o tratamento de infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Imai et al., 2022), cuja resistência a outros antibióticos é um sério problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil. Uma varredura de sobrenadantes de cultura de diferentes linhagens de *Xenorhabdus* e

Photorhabdus revelou a presença de metabólitos secundários que apresentam atividade contra os protozoários causadores de doenças importantes em seres humanos, como: *Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania tropica* e *Trypanosoma cruzi* (Gulsen et al., 2022). Esses dois exemplos mostram claramente o potencial das bactérias entomopatogênicas para o desenvolvimento de novas drogas antibióticas e antiparasitárias.

Considerações finais

Fica claro que o estudo da interação entre as bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* e seus hospedeiros nematoides permitirá o desenvolvimento de novas abordagens para o controle de infecções por bactérias e parasitas eucariotos. O metabolismo secundário bastante desenvolvido nessas bactérias será, com certeza, uma fonte importante de novos antibióticos.

Recentemente proteínas do sistema PVC de *Photorhabdus* foram modificadas para construir um sistema de injeção de proteínas em células eucarióticas (Jiang et al., 2022), inclusive de cas9 (Kreitz et al., 2023), mostrando a importância de se melhor entender a relação patógeno-hospedeiro, dessa classe de bactérias.

Referências

- ABDEL-AZIZ SM, ABO ELSOUD MM, ANISE AAH. Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products. In: GRUMEZESCU AM, HOLBAN AM, Handbook of food bioengineering volume 1: Food Biosynthesis. AP Academic Press: London, UK. 2017; p. 25-54.
- AKHURST RJ. Antibiotic Activity of *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated with Insect Pathogenic Nematodes of the Families Heterorhabditidae and Steinernematidae. J. Gen. Microbiol., v. 128, p. 3061–3065, 1982.
- ASHLEY EA, PHYO AP, WOODROW CJ. Malaria. Lancet v. 391, p. 1608–1621, 2018.
- BLACKBURN MB, FARRAR RR, NOVAK NG, LAWRENCE SD. Remarkable susceptibility of the diamondback moth (*Plutella xylostella*) to ingestion of Pir toxins from *Photorhabdus luminescens*. Entomol. Exp. Appl. v. 121, p. 31–37, 2006.
- BODE E, HE Y, VO TD, SCHULTZ R, KAISER M, BODE HB. Biosynthesis and function of simple amides in *Xenorhabdus doucetiae*. Environ. Microbiol. v. 19, n. 11, p. 4564-4575, 2017.
- BOEMARE N, AKHURST R. The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Eds. Dworkin, M. 3rd ed.; Springer-Verlag: New York, USA, 2006; pp.451-494.
- BOEMARE NE, AKHURST RJ, MOURANT RG. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. v. 43, n. 2, p. 249-255, 1993.
- BOZHÜYÜK KAJ, ZHOU Q, ENGEL Y, HEINRICH A, PÉREZ A, BODE HB. Natural Products from *Photorhabdus* and Other Entomopathogenic Bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology. v. 402, p. 55-80, 2017
- BRACHMANN AO, BRAMEYER S, KRESOVIC D, HITKOVA I, KOPP Y, MANSKE C, SCHUBERT K, BODE HB, HEERMANN R. Pyrones as bacterial signaling molecules. Nat. Chem. Biol., v. 9, p. 573–578, 2013.
- BRAMEYER S, KRESOVIC D, BODE HB, HEERMANN R. Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 112, p. 572-577, 2015.
- CASTANEDA-ALVAREZ C, PRODAN S, ZAMORANO A, SAN-BLAS E, ABALLAY E. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. Int. J. Syst. Evol. v. 71, n. 12, p. 005151, 2021.
- CHALLINOR VL, BODE HB. Bioactive natural products from novel microbial sources. Ann N.Y Acad Sci. v. 1354, p. 82-97, 2015.

- CICHE TA, BINTRIM SB, HORSWILL AR, ENSIGN JC. A Phosphopantetheinyl Transferase Homolog Is Essential for *Photorhabdus luminescens* To Support Growth and Reproduction of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 3117–3126, 2001.
- CLARK DJ. The Regulation of Secondary Metabolism in *Photorhabdus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. v. 402, p. 81-102, 2017.
- CRAWFORD JM, PORTMANN C, ZHANG X, ROEFFAERS MJB, CLARDY J. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci. USA*, p. 1-6. 2012
- DABORN PJ, WATERFIELD N, SILVA CP, AU CPY, SHARMA S, FFRHECH-CONSTANT RH. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS*. v.99, n. 16, p. 10742–10747, 2002.
- DIAZ-MUÑOZ G, MIRANDA IL, SARTORI SK, DE REZENDE DC, DIAZ MAN. Anthraquinones: an overview. *Studies in Natural Products Chemistry*. v. 58, p. 313-338, 2018
- DILLMAN AR, CHASTON JM, ADAMS BJ, CICHE TA, GOODRICH-BLAIR H, STOCK OS, STERNBERG PW. An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathog*. v. 8, p. 1-4, 2012.
- DOLINSKI C, MONTEIRO C, ANDALÓ V, LEITE LG. Studies n entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. *Nematoda*. v. 4. 2017.
- DUCHAUD E, RUSNIOK C, FRANGEUL L, BUCHRIESER C, GIVAUDAN A, TAOURIT S, BOCS S, BOURSAX-EUDE C, CHANDLER M, CHARLES JF, DASSA E, DEROSE R, DERZELLE S, FREYSSINET G, GAUDRIAULT S, MÉDIGUE C, LANOIS A, POWELL K, SIGUIER P, VINCENT R, WINGATE V, ZOUINE M, GLASER P, BOEMARE N, DANCHIN A, KUNST F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol*. v. 21, n. 11, p.1307-1313. 2003.
- FERREIRA T, REENEN CAV, ENDO A, TAILLIEZ P, PAGÈS S, SPRÖES C, MALAN AP. *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 64, p. 1540-1545, 2014.
- fFRENCH-CONSTANT RH. The molecular biology of *Photorhabdus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. v. 402, Springer: Cham, Switzerland. 2017. p. 213.
- fFRENCH-CONSTANT RH, DOWLING A, WATERFIELD NR. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*. v. 49, p. 436–451, 2007.

FISHER LE-SAUX M, VIALARD V, BRUNEL B, NORMAND P, BOEMARE NE. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *Akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. v. 49, p. 1645-1656, 1999.

FUCHS SW, GRUNDMANN F, KURZ M, KAISER M, BODE HB. Fabclavines: Bioactive Peptide–Polyketide–Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. ChemBioChem v. 15, p. 512–516, 2014.

GATSOGIANNIS C, LANG AE, MEUSCH D, PFAUMANN V, HOFNAGEL O, BENZ R, AKTORIES K, RAUNSER S. A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins. Nature. v. 495, p. 520–523, 2003.

GATSOGIANNIS C, MERINO F, PRUMBAUM D, RODERER D, LEIDREITER F, MEUSCH D, RAUNSER S. Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail. Nat Struct Mol Biol. v. 23, p. 884-890. 2016.

GROLL M, SCHELLENBERG B, BACHMANN AS, ARCHER CR, HUBER R, POWELL TK, LINDOW S, KAISER M, DUDLER R. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. Nature v. 452, p. 755-758. 2008.

GULSEN SH, TILEKLIOGLU E, BODE E, CIMEN H, ERTABAKLAR H, ULUG D, ERTUG S, WENSKI SL, TOURAY M, HAZIR C, BILECENOGLU DK, YILDIZ I, BODE HB, HAZIR S. Antiprotozoal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacterial secondary metabolites and identification of bioactive compounds using the easyPACId approach. Sci Rep. v. 12(1):10779, 2022.

HU K, LI J, WEBSTER JM. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. Nematology. v.1, n. 5, p.457-469, 1999.

HUNT DJ, NGUYEN KB. Nematology Monographs and Perspectives volume 12: Advances in Entomopathogenic Nematode Taxonomy and Phylogeny. Brill: Leiden/Boston, Netherlands/USA. 2016; p 438.

IMAI Y, HAUK G, QUIGLEY J, LIANG L, SON S, GHIGLIERI M, GATES MF, MORRISSETTE M, SHAHSAVARI N, NILES S, BALDISSERI D, HONRAO C, MA X, GUO JJ, BERGER JM, LEWIS K. Evybactin is a DNA gyrase inhibitor that selectively kills *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Chem Biol. Epub ahead of print. PMID: 35996001, 2022.

JIANG F, LI N, WANG X, CHENG J, HUANG Y, YANG Y, YANG J, CAI B, WANG YP, JIN Q, GAO N. Cryo-EM Structure and Assembly of an Extracellular Contractile Injection System. Cell v. 177, p.370-383, 2019.

JIANG F, SHEN J, CHENG J, WANG X, YANG J, LI N, GAO N, JIN Q. N-terminal signal peptides facilitate the engineering of PVC complex as a potent protein delivery system. Sci. Adv. 8, eabm2343, 2022.

JOYCE AS, BRACHMANN AO, GLAZER I, LANGO L, SCHWÄR G, CLARKE DJ, BODE HB. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angew chem int ed.* v. 47, p. 1942-1945. 2008.

KISSELEV AF. Joining the Army of Proteasome Inhibitors. *Chem. Biol.*, v. 15, p. 419-421, 2008.

KOPPENHÖFER HS. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. In: NGUYEN KB, HUNT DJ, *Nematology Monographs and Perspectives volume 5: Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Brill: Leiden/Boston, Netherlands/USA. 2007; p. 735-808.

KREITZ, J, FRIEDRICH MJ, GURU A, LASH B, SAITO M, MACRAE RK, ZHANG F. Programmable protein delivery with a bacterial contractile injection system. *Nature* v. 616, p. 357-364, 2023.

LANG AE, QU Z, SCHWAN C, SILVAN U, UNGER A, SCHOENENBERGER CA, AKTORIES K, MANNHERZ HG. Actin ADP-ribosylation at Threonine148 by *Photorhabdus luminescens* toxin TccC3 induces aggregation of intracellular F-actin. *Cell Microbiol.* v. 19, n. 1, p. e12636. 2017.

LANG AE, SCHMIDT G, SCHLOSSER A, HEY TD, LARRINUA IM, SHEETS JJ, MANNHERZ HG, AKTORIES K. *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science.* v. 327, p. 1139–1142, 2010.

LI J, CHEN G, WU H, WEBSTER JM. Identification of Two Pigments and a Hydroxystilbene Antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 61, n. 12, p. 4329–4333, 1995.

LIU D, BURTON S, GLANCY T, LI ZS, HAMPTON R, MEADE T, MERLO DJ. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* v. 21, n. 10, p. 1222–1228, 2003.

MACHADO R, BHAT AH, ABOLAFLA J, MULLER A, BRUNO P, FALLET P, ARCE CCM, TURLINGS TCJ, BERNAL JS, KAJUGA J, WAWERU B, TOEPFER S. Multi-locus phylogenetic analyses uncover species boundaries and reveal the occurrence of two new entomopathogenic nematode species, *Heterorhabditis ruandica* n. sp. and *Heterorhabditis zacatecana* n. sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 53, p. 1-42, 2021.

MACHADO R, MULLER A, GHAZAL S, THANWISAI A, PAGES S, BODE H, HUSSEIN M, KHALIL K, TISA L. *Photorhabdus heterorhabditis* subsp. *aluminescens* subsp. nov., *Photorhabdus heterorhabditis* subsp. *Heterorhabditis* subsp. nov., *Photorhabdus australis* subsp. *thailandensis* subsp. nov., *Photorhabdus australis* subsp. *australis* subsp. nov., and *Photorhabdus aegyptia* sp. nov. isolated from *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *J. Nematol., Microbiology Society*, v. 71, p. 1-9, 2021. (b).

MACHADO RAR, WÜTHRICH D, KUHNERT P, ARCE CCM, THÖNEN L, RUIZ C, ZHANG X, ROBERTS CAM, KARIMI J, KAMALI S, MA J, BRUGGMANN R, ERB M. Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus* phylogeny: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp. nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. *clarkei* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* v. 68, p. 2664-2681. 2018.

MASSCHELEIN J, CLAUWERS C, STALMANS K, NUYTS K, DE BORGGRAEVE W, BRIERS Y, AERTSEN A, MICHIELS CW, LAVIGNE R. The Zeamine Antibiotics Affect the Integrity of Bacterial Membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 81, n. 3, p. 1139–1146, 2014.

McINERNEY BV, TAYLOR WC, LACEY MJ, AKHURST RJ, GREGSON R. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* ssp., part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* v. 54, n. 3, p. 785–795, 1991.

MEUSCH D, GATSOGIANNIS C, EFREMOV RG, LANG AE, HOFNAGEL O, VETTER IR, AKTORIES K, RAUNSER S. Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature.* v. 508 p. 61–65, 2014.

NAGAKUBO T. Biological Functions and Applications of Virus-Related Bacterial Nanoparticles: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* v. 23, 2595, 2022

NGUYEN KB, SMART GC. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a Parasite of the Termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Nematol.* v. 26, p. 162-174, 1994.

PAPENFORT K, BASSLER BL. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* v. 14, n. 9, p. 576-588, 2016.

PARIHAR RD, DHIMAN U, BHUSHAN A, GUPTA PK, GUPTA P. *Heterorhabditis* and *Photorhabdus* Symbiosis: A Natural Mine of Bioactive Compounds. *Front. Microbiol.* v. 13, p. 790339, 2022.

POINAR GO Jr, THOMAS GM. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp.nov. (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) associated with a nematode. *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.* v.15, p. 249-252, 1965.

POINAR GO Jr, THOMAS GM. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology.* v.56, p. 385-390, 1966.

POLIKANOV YS, OSTERMAN IA, SZAL T, TASHLITSKY VN, SEREBRYAKOVA MV, KUSOCHEK P, BULKLEY D, MALANICHEVA IA, EFIMENKO TA, EFREMENKOVA OF, KONEVEGA AL, SHAW KJ, BOGDANOV AA, RODNINA MV, DONTSOVA OA, MANKIN AS, STEITZ TA, SERGIEV PV. Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. *Mol. Cell.* v. 56, n. 4, p. 531–540, 2014.

REIMER D, COWLES KN, PROSCHAK A, NOLLMANN FI, DOWLING AJ, KAISER M, FRENCH-CONSTANT R, GOODRICH-BLAIR H, BODE HB. Rhabdopeptides as Insect-Specific Virulence Factors from Entomopathogenic Bacteria. *ChemBioChem* v. 14, p. 1991–1997, 2013.

RODERER D, RAUNSER S. Tc Toxin Complexes: Assembly, Membrane Permeation, and Protein Translocation. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 73, p. 247 – 265, 2019.

RODOU A, ANKRAK DO, STATHOPOULOS C. Toxins and Secretion Systems of *Photorhabdus luminescens*. *Toxins*. v. 2, p. 1250-1264, 2010.

SAJNAGA E, KAZIMIERCZAK W. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. *Symbiosis*. v. 80, p. 1-13, 2020.

SCHMIDT O, THEOPOLD U, BECKAGE NE. Insect and vertebrate immunity: Key similarities versus differences. In: BEKAGE NE. *Insect Immunology*. AP Academic Press: San Diego, USA. 2008, 1-23.

SHEETS J, AKTORIES K. Insecticidal Toxin Complexes from *Photorhabdus luminescens*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. v. 402, p. 3-24, 2017.

SHI TM, BODE HB. Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria–nematode–insect interactions. *Nat Prod Rep*. v. 13, p. 309-335, 2018.

THOMAS GM, POINAR GO Jr. *Xenorhabdus* gen.nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 29, n. 4, p. 352-360, 1979.

TOBIAS NJ, SHI YM, BODE HB. Refining the Natural Product Repertoire in Entomopathogenic Bacteria. *Trends Microbiol* v. 26 n. 10, p. 833–840, 2018.

ULLAH I, JANG EK, KIM MS, SHIN JH, PARK GS, KHAN AR, HONG SJ, JUNG BK, CHOI JB, PARK YJ, KWAK Y, SHIN JH. Identification and Characterization of the Insecticidal Toxin “Makes Caterpillars Floppy” in *Photorhabdus temperata* M1021 Using a Cosmid Library. *Toxins*. v.6, p. 2024-2040, 2014.

VLISIDOU I, HAPESHI A, HEALEY JRJ, SMART K, YANG G, WATERFIELD NR. The *Photorhabdus asymbiotica* virulence cassettes deliver protein effectors directly into target eukaryotic cells. *eLife*. v.8, e46259, 2019.

YANG G, DOWLING AJ, GERIKE U, FRENCH-CONSTANT RH, WATERFIELD NR. *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J. Bacteriol.* v.188, p. 2254–2261, 2006.

YANG G, WATERFIELD NR. The role of TcdB and TccC subunits in secretion of the *Photorhabdus* Tcd toxin complex. *PLoS Pathog.* v. 9, n. 10, p. e1003644, 2013.

ZHOU X, KAYA HK, HEUNGENS K, GOODRICH-BLAIR H. Response of Ants to a Deterrent Factor(s) Produced by the Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, p. 6202–6209, 2002.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 21

Uso de *Wolbachia* no controle biológico

José Márcio Gomes Fernandes¹
Álvaro Gil Araújo Ferreira¹
Luciano Andrade Moreira¹

¹ Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz - Minas Gerais, Belo Horizonte.

Copyright: © 2024 [José Márcio Gomes Fernandes, Álvaro Gil Araújo Ferreira, Luciano Andrade Moreira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Mosquitos podem transmitir patógenos, que causam uma gama de doenças, conhecidas pelo ser humano, como a malária, a filariose linfática e as arboviroses, incluindo a dengue, a febre amarela, a zika e a chikungunya (Caragata et al., 2021). Dentre todo esse destaque médico e sanitário, a dengue se enquadra como uma das doenças mais importantes que, atualmente, assolam a humanidade, tendo sido considerada uma das 10 maiores ameaças à saúde humana, em 2019, segundo a OMS (WHO, 2019). Aproximadamente, 40% da população mundial está presente em áreas de risco de transmissão da doença, com uma estimativa de 400 milhões de infecções por ano (Stanaway et al., 2016; Cattarino et al., 2020).

Para combater e controlar a transmissão desses patógenos, o uso de inseticidas ainda é o método mais comum, com objetivo de suprimir os estágios imaturo e/ou adulto dos mosquitos. Porém, indivíduos resistentes vêm sendo selecionados, causando um decaimento na efetividade de tal controle (Lopes et al., 2019; Pinto et al., 2021). Assim, novas formas de combate vêm surgindo no decorrer dos últimos anos, com destaque à transfecção de mosquitos *Aedes aegypti* com *Wolbachia*, a qual reduz o potencial de transmissão de arbovírus, além de garantir uma vantagem reprodutiva ao induzir a incompatibilidade citoplasmática (IC) (Nazni et al., 2019).

Wolbachia é uma bactéria gram-negativa e obrigatoriamente intracelular, pertencente à família Anaplasmataceae, com *Wolbachia pipientis* como única representante do gênero. É comumente encontrada no reino animal, ocorrendo em artrópodes e nematódeos de todo o globo, sendo comum sua presença em dois terços de todas as espécies conhecidas de insetos (Beckmann et al., 2017). Com uma grande variedade de adaptações mutualísticas e parasitárias, seu sucesso reprodutivo se dá pela transmissão vertical, através dos ovos das fêmeas, garantindo que a espécie se espalhe e se estabeleça entre as populações dos insetos (Austin et al., 2022).

Estudos conduzidos na Indonésia e no Brasil demonstraram que a introdução de mosquitos infectados por *Wolbachia*, além de provar um método eficiente para uso, em grandes áreas urbanas, reduziu a incidência de dengue sintomática nas áreas estudadas. Além disso, levou à diminuição das hospitalizações daqueles que se infectaram (Pinto et al., 2021; Utarini et al., 2021).

Assim, o presente capítulo tem como objetivo abordar os conceitos teóricos e práticos relacionados ao uso da *Wolbachia*, com ênfase nos estudos mais recentes que contribuíram para o atual conhecimento da biologia fundamental.

Isso será associado à interação com os insetos, na tentativa de demonstrar a eficácia do uso deste endossimbionte no combate à transmissão de arboviroses.

Fenótipos de *Wolbachia* em artrópodes

Fenótipos reprodutivos

Uma das principais características evolutivas da *Wolbachia* é a sua capacidade de infectar e manipular diversos processos celulares e reprodutivos em invertebrados, como insetos e nematódeos. Das estratégias que garantem seu sucesso reprodutivo e que serão discutidas a seguir, a mais conhecida delas é a incompatibilidade citoplasmática (IC). Porém, outros métodos são empregados na manipulação dos hospedeiros, como a partenogênese, a feminização e a morte de machos (Figura 1).

Incompatibilidade citoplasmática

O fenótipo reprodutivo da *Wolbachia*, em artrópodes mais comuns e prevalentes, ocorre pela IC unidirecional e bidirecional (Shropshire et al., 2020). A IC unidirecional resulta na morte do embrião, no cruzamento entre machos infectados e fêmeas não infectadas, enquanto a IC bidirecional resulta na morte do embrião entre machos e fêmeas, que possuem diferentes e incompatíveis linhagens da *Wolbachia* (Kaur et al., 2021). De um modo simplificado, a IC implica uma segregação defeituosa dos cromossomos paternos, na primeira divisão mitótica, ocasionando a má formação e, conseqüentemente, a não geração de prole (Harumoto, Fukatsu, 2022).

Apesar de ser considerado o fenótipo reprodutivo mais comum e estudado, os genes bacterianos, que atuam na IC, ainda são pouco conhecidos. Porém, no decorrer dos últimos anos, algumas hipóteses vêm sendo levantadas e estudadas. Uma delas leva em consideração o prófago-WO, que é um bacteriófago que infecta *Wolbachia*, e os fragmentos de seus genes estão presentes em mais de 80% de cepas da bactéria (Miao et al., 2020).

Em um estudo importante, LePage et al. (2017) demonstram que os genes *cifA* e *cifB*, co-derivados e diferentemente transcritos de prófago-WO, recapitulam e aumentam a IC em *Wolbachia*, com cada gene aumentando a letalidade embrionária em cruzamentos entre machos infectados e fêmeas não infectadas. Assim, através da IC, a *Wolbachia* consegue se espalhar em uma determinada população, mesmo que essa infecção cause um custo no *fitness* do inseto (Caragata et al., 2021).



Figura 1. Diferentes fenótipos reprodutivos induzidos pela *Wolbachia* em artrópodes.

Fonte: Adaptado de Werren et al., 2008

Partenogênese

A partenogênese induzida por *Wolbachia* ocorre quando fêmeas infectadas pela bactéria e que não foram fecundadas, passam a produzir toda prole a partir de seus ovos infertilizados (Kaur et al., 2021). Assim, basicamente, a partenogênese se refere à reprodução de prole de fêmeas sem a contribuição genética de machos. Ela pode ocorrer em algumas espécies de vespas (himenópteros) e ácaros (Ma, Schwander, 2017).

Feminização

Outra estratégia utilizada por *Wolbachia* ao infectar seu hospedeiro é chamada de feminização. Ela ocorre, principalmente, em espécimes de tatus de jardim (*Armadillidium vulgare*), nos quais a feminização pode levar a uma rápida evolução no sistema de determinação de sexo (Werren, 1997). Esse processo ocorre através da proliferação da bactéria dentro do organismo, que inibe a secreção do hormônio andrógeno (o hormônio responsável pela diferenciação de machos), forçando indivíduos machos geneticamente a se transformarem em fêmeas ativamente reprodutivas (Kaur et al., 2021). Porém, infelizmente, o processo ainda não é muito bem conhecido, havendo necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema.

Morte de machos

Outro processo que garante o sucesso reprodutivo de indivíduos infectados por *Wolbachia* é a morte de machos. Esse processo foi, primeiramente, descrito por Hurst et al. (1999), em uma espécie de joaninha e em outra de borboleta (*Adalia bipunctata* e *Acraea encedon*, respectivamente). Nesse processo, *Wolbachia* tem como alvo o desenvolvimento dos machos, interferindo no sistema de compensação e dosagem, que regula a expressão do cromossomo ligado ao sexo masculino, matando os machos infectados em desenvolvimento e gerando uma grande proporção de fêmeas (Kaur et al., 2021).

Indução de resistência a patógenos

A disseminação de *Wolbachia* dentro de populações de insetos ajuda a protegê-los do ataque de vírus nocivos, dando uma vantagem em relação àqueles indivíduos que não possuem esse endossimbionte. Tal fato foi observado, quando populações de *Drosophila melanogaster*, que estavam infectadas por uma cepa de *Wolbachia*, se mostraram protegidas do vírus C de *Drosophila* e do vírus Nora, sendo uma das primeiras evidências de um benefício direto da bactéria a artrópodes (Lindsey et al., 2018). Tais estudos iniciais demonstraram que *Wolbachia* pode reduzir a carga viral em insetos infectados de várias espécies.

Esse fenótipo foi, inicialmente, descoberto na linhagem wMel de *Wolbachia* em *D. melanogaster* (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Usando a linhagem wMel, Moreira e coautores mostraram que, quando transfectada em mosquitos da espécie *Ae. aegypti*, essa cepa pode, também, conferir resistência a

arbovírus (Moreira et al., 2009). Nesse estudo, mosquitos infectados e não-infectados com *Wolbachia* foram expostos aos vírus Dengue e Chikungunya. Os resultados mostraram que a presença da bactéria no mosquito causou uma drástica redução tanto na presença como no desenvolvimento dos três diferentes patógenos, abrindo um novo campo de possibilidade de controle dessas doenças (Moreira et al., 2009).

Porém, os mecanismos responsáveis pela habilidade da bactéria de aumentar a resistência contra patógenos são ainda pouco conhecidos. Embora os genes imuno-efetores tenham a expressão aumentada em mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *wMelPop-CLA*, os principais componentes das vias de sinalização (Toll, IMD E Jak-STAT) não parecem ser transcricionalmente modulados por *Wolbachia* (Moreira et al., 2009; Kambris et al., 2010). Estudos anteriores também revelaram que alguns genes das vias IMD e JAK-STAT envolvidos no controle da infecção por vírus de RNA em insetos (Huszar & Imler, 2008) são regulados diferencialmente em *Ae. aegypti* infectados com dengue (XI et al., 2008).

A capacidade da cepa *wMelPop-CLA* proporcionar proteção contra o vírus da dengue pode, também, ser dependente da competição celular de componentes essenciais do hospedeiro, como foi observado em infecções com DENV-2 em células de mosquitos infectados com *wMelPop-CLA* (Moreira et al., 2009). Além disso, em *D. melanogaster* existem evidências de que cepas de *Wolbachia* obtêm grande parte da sua energia através do metabolismo dos aminoácidos (Wu et al., 2004), incluindo a treonina – um aminoácido requerido na ativação da expressão da vitelogenina (Vg) em *Ae. aegypti* (Attardo et al., 2006). Ainda, foi levantada a hipótese da existência de uma competição entre a *wMelPop* e *Ae. aegypti* para a obtenção de treonina necessária para expressão da Vg, que poderia, conseqüentemente, inibir o desenvolvimento dos ovos (Mcmeniman et al., 2014).

Alternativamente, sabe-se que os insetos também precisam obter colesterol e outros ácidos graxos através da dieta (Blitzer et al., 2005) e, como a própria *Wolbachia* e outras bactérias não realizam a biossíntese de colesterol, devem obtê-lo do inseto hospedeiro (Lin & Rikihisa, 2003; Wu et al., 2004). O colesterol é conhecido por ser um ácido graxo-chave necessário para o sucesso da replicação de Flavivírus e que deve ser obtido a partir da célula hospedeira (Lu et al., 1999; Mackenzie et al., 2007).

Por outro lado, as cepas de *Wolbachia* que naturalmente residem em mosquitos têm capacidade muito limitada para proteção contra os vírus. Mosquitos *Aedes albopictus*, infectados com as cepas de *Wolbachia* não virulentas *wAlbA* e *wAlbB* (Sinkins et al., 1995), ainda são capazes de transmitir o

vírus da dengue (Kyle & Harris, 2008). Da mesma forma, os mosquitos *Armigeres subalbatus* Coquillett infectados com outra cepa de *Wolbachia*, não apresentaram nenhuma evidência de interferência com o vírus da encefalite japonesa (Tsai et al., 2006). Já em mosquitos *Aedes fluviatilis* Lutz, naturalmente infectados com a cepa wFlu, apesar de serem vetores competentes de *Plasmodium gallinaceum* em laboratório, não apresentam, aparentemente, nenhum efeito de interferência no desenvolvimento do protozoário no mosquito (Baton et al., 2013). Isso pode ser explicado pelo fato da cepa wFlu ter um tropismo tecidual muito restrito no mosquito hospedeiro (Moreira et al., 2009).

Recentemente, a cepa de *Wolbachia* wPip nativa de *Culex quinquefasciatus* Say mostrou ter algum efeito protetor contra o vírus do Nilo Ocidental (Glaser & Meola, 2010). No entanto, esse efeito foi muito menos pronunciado quando comparado com os efeitos sobre o vírus da dengue para *Ae. aegypti* transfectados (Moreira et al., 2009). De uma maneira geral, parece que a capacidade de *Wolbachia* para gerar interferências em patógenos é, provavelmente, restrita a cepas que crescem em altas densidades e têm um alto tropismo tecidual no inseto hospedeiro (Dobson et al., 1999; McGraw et al., 2001).

Interessantemente, foi também demonstrado que a introdução da linhagem wMel de *Wolbachia* nos mosquitos *Ae. aegypti* pode limitar a replicação de vírus em vários tecidos somáticos. Entre eles, é possível citar o intestino médio e as glândulas salivares. Como consequências, esses mosquitos se tornam menos capazes de transmitir infecção para humanos (Moreira et al., 2009; Ogunlade et al., 2021).

Na última década, estudos alcançaram descobertas importantes em relação aos mecanismos biológicos envolvidos na indução de resistência antiviral. Por exemplo, em *Drosophila*, foi demonstrado que densidades mais altas de *Wolbachia* são frequentemente importantes para uma resposta antiviral eficaz (Chrostek et al., 2013), com algumas exceções (Cattel et al., 2016; Kaur et al., 2020). Aos níveis celular e molecular, *Wolbachia* pode bloquear a ligação do vírus à célula, impedindo sua consequente propagação (Schultz et al., 2018; Lu et al., 2020). Tal bloqueio reduz a produção de vírus nessas mesmas células infectadas com *Wolbachia* e, conseqüentemente, limita a disseminação e transmissão do vírus (Bhattacharya et al., 2020).

Ainda, alguns fatores relacionados aos hospedeiros podem, também, influenciar na interação *Wolbachia*-vírus. Zhang et al. (2013) demonstraram que a bactéria suprime, de forma significativa, a expressão do gene metil-transferase (*AaDnmt2*) em mosquitos infectados, através de um pequeno RNA expresso em *Wolbachia*. Isso leva a uma diminuição da expressão de *AaDnmt2*, assim como

contribui para a inibição do vírus da dengue em *Ae. aegypti*, já que o patógeno se utiliza desse gene para se replicar. Além disso, *Wolbachia* pode estimular a expressão de genes do sistema imune que inibem a replicação de patógenos dentro dos hospedeiros (Kambris et al., 2010). De um modo geral, além de prover nutrientes e metabólitos aos seus hospedeiros, *Wolbachia* pode modular drasticamente a competência vetorial desses indivíduos, reduzindo sua capacidade de transmitir diversos patógenos de interesse humano, como os arbovírus (Dengue, Zika e Chikungunya) (Caragata et al., 2021).

Wolbachia também pode conferir resistência contra bactérias, nematoides e *Plasmodium* (Moreira et al., 2009, Bortzis et al., 2014), proporcionando, assim, uma ampla gama de proteção contra patógenos. Ainda foi demonstrado que a bactéria (wMelPop-CLA) também fornece proteção contra nematoides que causam filariose (Kambris et al., 2009), sugerindo que algumas cepas de *Wolbachia* possam inibir uma ampla gama de patógenos humanos.

Uso da *Wolbachia* para conter doenças transmitidas por insetos

Uma vez demonstrado que, em condições laboratoriais, *Wolbachia* pode conferir resistência antiviral num dos principais vetores de arboviroses, *Ae. aegypti*, foram, então, desenvolvidas estratégias para usar esse endossimbionte para combater a transmissão de arbovírus. Duas estratégias diferentes foram desenvolvidas e aplicadas no campo em vários países (Figura 2): a) a substituição das populações e b) a supressão populacional.

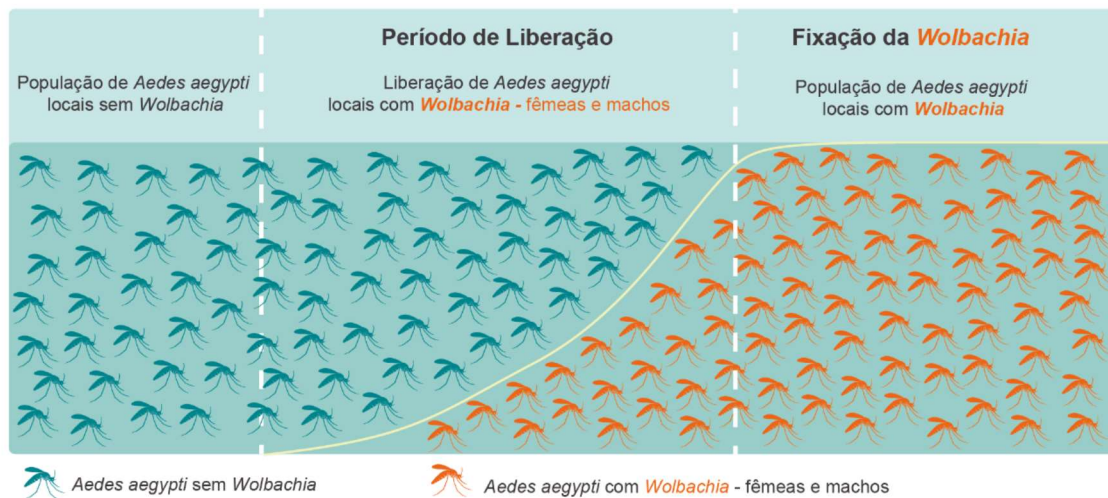
Substituição das populações

Esta estratégia se baseia na substituição das populações locais de *Ae. aegypti* pouco resistentes à infecção e, portanto, eficazes em transmitir arbovírus, por mosquitos com o mesmo fundo genético. Desse modo, é possível obter uma população de campo que apresente uma elevada resistência à infecção por arbovírus, bem como uma reduzida competência em transmitir esses patógenos.

Para tal, são liberados mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas e machos com *Wolbachia*, com o objetivo de substituir as populações locais, recorrendo ao IC (induzido pela própria *Wolbachia*) para ajudar a fixar a bactéria nas populações locais (Hoffmann et al., 2011). Nesse caso, quando fêmeas são também liberadas, elas contribuem para a produção de progênie com *Wolbachia*, o que dá vantagem reprodutiva para fêmeas com a bactéria. Isso porque, se fêmeas não infectadas cruzarem com machos infectados, elas se tornarão estéreis.

Um estudo realizado por Lau et al. (2021), na Austrália, confirmou que as populações de *Ae. aegypti* infectadas pela cepa *wMel* permanecem com seus genomas estáveis, mesmo após um intervalo de dez anos da soltura das primeiras populações infectadas com *Wolbachia*. Logo, uma das principais vantagens da estratégia de substituição de populações é o fato de que, assim que a *Wolbachia* é estabelecida em campo, não será necessário realizar mais liberação de mosquitos, pois esse endossimbionte tem a capacidade de se manter estável nas populações.

A) Substituição da população de mosquitos



B) Redução da população de mosquitos

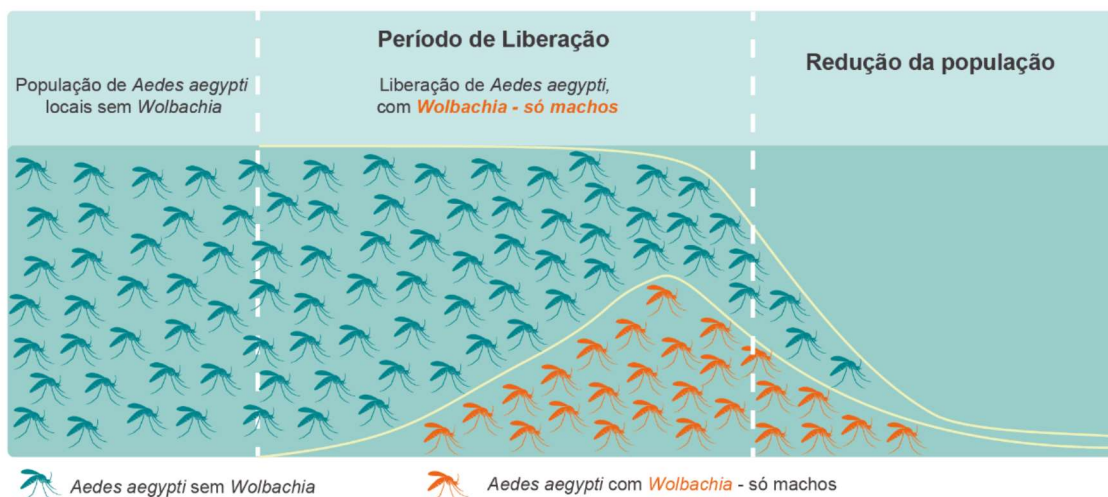


Figura 2: Aplicações de *Wolbachia* para controle de transmissão de arbovírus.

Fonte: Adaptado de James et al., 2018

Supressão populacional

A supressão populacional é outra estratégia com uma abordagem bastante diferente, que tem como objetivo reduzir o tamanho das populações de *Ae. aegypti* para níveis tão baixos, que torne impossível os arbovírus persistirem nessas regiões. Essa estratégia se baseia na liberação de apenas mosquitos machos infectados com *Wolbachia* ou mosquitos estéreis, com o intuito de que cruzem com as fêmeas de campo, sem *Wolbachia*, levando a não geração de prole.

Carvalho et al. (2015) confirmaram a eficácia desse método pois, ao introduzirem de forma massiva populações de *Ae. aegypti* transgênicas (OX513A) numa área de subúrbio de Juazeiro, Bahia, durante um ano, houve uma redução drástica de 95% das populações do mosquito baseadas em armadilhas para adultos, e de 81% de redução baseadas em ovitrampas, em relação às áreas de controle. Esses resultados corroboraram outro estudo, realizado por Harris et al. (2012), em que populações de mosquitos *Ae. aegypti* tiveram redução drástica após a soltura de machos estéreis nas ilhas Cayman.

Assim, a prole desses cruzamentos vai ser inviável, o que originará uma redução populacional. A diferença desse método é que exige um esforço constante de liberações, pois a população original de mosquitos pode retornar, com a eclosão do banco de ovos de mosquitos sem *Wolbachia* que porventura se encontrem na área.

Considerações finais

Embora a infecção de mosquitos com *Wolbachia* tenha se mostrado um método promissor para o combate à transmissão de arboviroses diversas, uma das maiores dificuldades encontradas pelos pesquisadores para aplicação prática do método foi o fato de que as regiões endêmicas para transmissão desses patógenos são tropicais e, portanto, com altas temperaturas. Isso impactou, negativamente, na densidade de *Wolbachia* nos mosquitos, dificultando o estabelecimento da bactéria nas populações de campo (Caragata et al., 2021). Porém, recentemente, ficou comprovado que a infecção por *Wolbachia* em mosquitos pode reduzir a incidência das doenças, em situações de campo, pela introdução progressiva de mosquitos infectados por um longo período de tempo, alinhado a um alto engajamento da comunidade envolvida (Pinto et al., 2021; Utarini et al., 2021).

Nazni et al. (2019) demonstraram o estabelecimento de populações de mosquitos *Ae. aegypti* infectados pela cepa *wAlbB*, em Kuala Lumpur, na Malásia, com uma taxa de estabilidade de mais de 90%, nas áreas estudadas após um ano da soltura. Além disso, houve uma redução de 40% nos casos de dengue nas seis regiões em que houve a soltura dos mosquitos infectados.

Já Pinto et al. (2021), após introduzirem mosquitos adultos de *Ae. aegypti* infectados por outra cepa de *Wolbachia*, a *wMel*, em Niterói, Brasil, entre os anos de 2017 e 2019, observaram que as populações contendo a bactéria se estabeleceram, em uma taxa superior a 80%, na área em que primeiro houve a soltura, seguida de 40 a 70%, nas demais áreas. Além disso, foi observada a redução de 69% da incidência dos casos de dengue, seguida de 56% de redução nos casos de chikungunya e 36% de redução na incidência de zika, nas zonas estudadas, em relação às áreas controle.

Ainda, Utarini et al., 2021, após introduzirem com sucesso populações de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* infectados também pela cepa *wMel* em Yogyakarta, Indonésia, observaram uma redução de 77,1% nos casos dos quatro sorotipos do vírus Dengue, em relação às áreas controle. Nas áreas de estudo, houve, também, redução de hospitalizações daquelas pessoas que foram confirmadas como casos positivos do vírus.

Os estudos anteriormente citados mostram quatro importantes resultados: 1) houve a estabilização de populações dos mosquitos infectados em grandes áreas; 2) foi possível a utilização de mais de uma cepa de *Wolbachia*; 3) o método foi aplicado em diferentes partes do globo; e, principalmente 4) o método de introdução da bactéria em mosquitos *Ae. aegypti* reduziu a incidência dos casos de dengue, em todas as cidades e regiões, em que foram aplicadas. Assim, as expectativas em relação a esses resultados apontam para uma possível redução massiva dos casos das arboviroses, ao redor do mundo, principalmente se alinhadas a outros métodos de combate, como a utilização de inseticidas.

É importante lembrar que o método *Wolbachia* é complementar e deve ser utilizado com a rotina de controle vetorial pelo poder público. Além disso, a população precisa continuar as ações de redução de criadouros, em suas casas, e em seus bairros.

Referências

- ATTARDO G M, HANSEN I A, SHIAO SH, RAIKHEL A S. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. *Journal of Experimental Biology*. Aug, 2006. DOI: 10.1242/jeb.02349.
- AUSTIN J M, DUTRA H L C, JONES M J, PERERA R, MCGRAW E A. Cross-tissue and generation predictability of relative *Wolbachia* densities in the mosquito *Aedes aegypti*. *Parasite & Vectors*. 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05231-9.
- BATON L A, PACIDÔNIO E C, GONÇALVES D D S, MOREIRA L A. wFlu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PLoS ONE* 2013 8: e59619. DOI: 10.1371/journal.pone.0059619.
- BHATTACHARYA T, NEWTON I L G, HARDY R W. Viral RNA is a target for *Wolbachia*-mediated pathogen blocking. *PLoS Pathogen*. June, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008513.
- BECKMANN J F, RONAU J A, HOCHSTRASSER M. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nature Microbiology*. 2017. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.7.
- BLITZER E J, VYAZUNOVA I, LAN Q. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. May, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2005.00560.x.
- CATTARINO L, RODRIGUEZ-BARRAQUER, IMAI N et al. Mapping global variation in dengue transmission intensity. *Sci Transl Med*. 2020. DOI: 10.1126/scitransmed.aax4144.
- CARAGATA E P, DUTRA H L C, SUCUPIRA P H F, FERREIRA A G A, MOREIRA L A. *Wolbachia* as translational Science: controlling mosquito-borne pathogens. *Trends in Parasitology*. Elsevier, March. 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2021.06.007.
- CARVALHO D O, MCKEMEY A R, GARZIERA L et al. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003864.
- CATTEL J, MARTINEZ J, JIGGINS F, MOUTON L, GIBERT P. *Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest *Drosophila suzukii*. *Insect Molecular Biology*. May, 2016. DOI: 10.1111/imb.12245.
- CHEN H, ZHANG M, HOCHSTRASSER M. The Biochemistry of Cytoplasmic Incompatibility Caused by Endosymbiotic Bacteria. *Genes*. 2020. DOI: 10.3390/genes11080852.

CHROSTEK E, MARIALVA M S P, ESTEVES S S et al. *Wolbachia* Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. PLoS Genetics. Dec, 2013. DOI: 10.1371/journal.pgen.103896.

DOBSON S L, BOURTZIS K, BRAIG H R, et al. *Wolbachia* Infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. Insect Biochemistry and Molecular Biology. Feb, 1999. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00119-2.

GLASER R L, MEOLA M A. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. PLoS One. August, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0011977.

HARRIS A F, MCKEMEY A R, NIMMO D et al. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. Nat Biotech. 2012. DOI: 10.1038/nbt.2350.

HARUMOTO T, FUKATSU T. Perplexing dynamics of *Wolbachia* proteins for cytoplasmic incompatibility. PLoS Biology. 2022. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001644.

HEDGES L M, BROWNLIE J C, O'NEILL S L, JOHNSON K N. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. Science. Vol 322, 2008. DOI: 10.1126/science.1162418.

HOFFMANN AA, MONTGOMERY BL, POPOVICI J et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature. DOI: 10.1038/nature10356.

HURST G D D, JIGGINS F M, von der SCHULENBURG H G. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. Proc. R. Soc. Lond. 1999.

HUSZAR T, IMLER J L. Chapter 6 *Drosophila* Viruses and the Study of Antiviral Host-Defense. Advances In Viruses Research. Vol 72. 2008. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)00406-5.

JAMES S, COLLINS F H, WELKHOFF P A, et al. Pathway to Deployment of Gene Drive Mosquitoes as a Potential Biocontrol Tool For Elimination of Malaria in Sub-Saharan Africa: Recommendations of a Scientific Working Group. Am J Trop Med Hyg. Jun, 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0083.

KAMBRIS Z, BLAGBOROUGH A M, PINTO S B et al. *Wolbachia* Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits *Plasmodium* Development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathogens. 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001143.

KAUR R, SHROPSHIRE J D, CROSS K L et al. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. Cell Host and Microbes. Elsevier, 2021. DOI: 10.1016/j.chom.2021.03.006.

KYLE J L, HARRIS E. Global Spread and Persistence of Dengue. Annual Rev. Microbiol. 2008. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.163005.

LAU MJ, SCHMIDT T L, YANG Q, CHUNG J, et al. Genetic stability of *Aedes aegypti* populations following invasion by wMel *Wolbachia*. BMC Genomics. 2021. DOI: 10.1186/s12864-021-08200-1.

LEPAGE D P, METCALF J A, BORDENSTEIN S R et al. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Nature. 2017. DOI: 10.1038/nature21391.

LIN M, IKIHISA Y. *Erlhnia chafeensis* and *Anaplasma phagoytophilum* Lack Genes or Lipid A Biosynthesis and Incorporate Cholesterol for Their Survival. Infection and Immunity. Vol 71. September, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.9.5324-5331.2003.

LINDSEY A R I, BHATTACHARYA T, NEWTON I L G, HARDY R W. Conflict in the Intracellular Lives of Endosymbionts and Viruses: A Mechanistic Look at *Wolbachia*-Mediated Pathogen blocking. Viruses. 2018. DOI: 10.3390/v10040141.

LOPES R P, LIMA J B P, MARTINS A J. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: a review. Parasite Vectors. 12: 591. 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3850-8.

LU Y E, CASSESE T, KIELIAN M. The Cholesterol Requirement for Sindbis Virus Entry and Exit and Characterization of a Spike Protein Region Involved in Cholesterol Dependence. Journal of Virology. Vol 73. May, 1999. DOI: 10.1128/JVI.73.5.4272-4278.1999.

MA W J, SCHWANDER T. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiotic-induced parthenogenesis. J. Evol. Biol. 2017. DOI: 10.1111/jeb.13069.

MACKENZIE J M, KHROMYKH A A, PARTON R G. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. Cell Host & Microbe. Vol 2. October, 2007. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.003.

MCGRAW E A, MERRITT D J, DROLLER J N, O'NEILL S L. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. The Royal Society Publishing. Dec, 2001. DOI: 10.1098/rspb.2001.1839.

MCMENIMAN C J, HUGHES G L, O'NEILL S L. A *Wolbachia* in *Aedes aegypti* Disrupts Mosquito Egg Development to a Greater Extent When Mosquitoes Feed on Nonhuman Versus Human Blood. Journal of Medical Entomology. Nov, 2014. DOI: 10.1603/ME09188.

MOREIRA L A, ITURBE-OMAETXE I, JEFFERY J A et al. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. CellPress. Elsevier. Vol 139. December, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.042.

MIAO YUN-HENG, XIAO JIN-HUA, HUANG DA-QEL. Distribution and Evolution of the Bacteriophage WO and Its Antagonism With *Wolbachia*. Frontiers in Microbiology. 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.595629.

NAZNI W A, HOFFMAN A A, NOORAZFIZAH A et al. Establishment of *Wolbachia* Strain *wAlbB* in Malaysian Populations of *Aedes aegypti* for Dengue Control. *Current Biology*. December, 2019. DOI: 10.1016/j.cub.2019.11.007.

OGULANDE S T, MEEHAN M T, ADEKUNLE A I et al. A Review: *Aedes*-Borne Arboviral Infections, Controls and *Wolbachia*-Based Strategies. *Vaccines*. 2021. DOI: 10.3390/vaccines9010032.

PINTO S B, RIBACK T I S, SYLVESTRE G et al. Effectiveness of *Wolbachia*-Infected mosquito deployments in reducing the incidence of Dengue and other *Aedes*-borne diseases in Niterói – Brazil: A *quasi* experimental study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009556.

SINKINS S P, BRAIG H R, O'NEILL S L. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. The Royal Society Publishing. September, 1995. DOI: 10.1098/rspb.1995.0154.

SHROPSHIRE J D, LEIGH B, BORDENSTEIN S R. Symbiont-mediated cytoplasmic incompatibility: What have we learned in 50 years? *eLife*. 2020. DOI: 10.7554/eLife.61989.

STANAWAY JD, SHEPARD D S, UNDURRAGA E A et al. The global burden of dengue: na alaysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*. 2016. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00026-8.

TEIXEIRA L, FERREIRA A, ASHBURNER M. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*. December, 2008. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000002.

TSAI KH, HUANG CG, WU WJ et al. Parallel Infection of Japanese Encephalitis Virus and *Wolbachia* within Cells of Mosquito Salivary Glands. *Journal of Medical Entomology*. Vol 43. July, 2006. DOI: 10.1093/jmedent/43.4.752.

UTARINI A, INDRIANI C, AHMAD R A et al. Efficacy of *Wolbachia*-Infected Mosquito Deployments for the control of Dengue. *The New England Journal of Medicine*. June, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2030243.

WERREN J H. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*. 1997.

WERREN J H, BALDO L, CLARK M E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. October, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ten threats to global health in 2019. 2019. www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019.

WU M, SUN L V, VAMATHEVAN J et al. Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia pipientis wMel*: A Streamlined Genome Overrun by Mobile Genetic Elements. *PLoS Biology*. March, 2004. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020069.

XI Z, RAMIREZ J L, DIMOPOULOS G. The *Aedes aegypti* Toll Pathways Controls Dengue Virus Infection. PLoS Pathogens. July, 2008. DOI: 10.1371/journal.ppat1000098.

ZHANG G, HUSSAIN M, O'NEILL S L, ASGARI S. *Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. PNAS. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1303603110



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 22

Aplicação de proteínas olfativas de insetos no desenvolvimento de biossensores

Nathália F. Brito^{1§}
Ana Claudia A. Melo¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

[§] Endereço atual: Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

Considerações iniciais

Ao longo da última década, uma maior compreensão do mecanismo subjacente ao reconhecimento de odores, em sistemas biológicos, chamou a atenção para o potencial uso de proteínas olfativas, como elementos sensoriais, em dispositivos de detecção. A simulação do processo olfativo, com elementos de ocorrência natural, tem maior potencial para alcançar os parâmetros observados, em organismos vivos, como a alta especificidade, a sensibilidade, a repetibilidade e o tempo de resposta curto, do que os sensores que utilizam componentes inorgânicos, como óxidos metálicos (Brito et al., 2020). Graças aos avanços recentes, atualmente é possível utilizar materiais biológicos para a fabricação de biossensores (Wasilewski, Gębicki, Kamysz, 2018; Cave, Wickiser, Mitropoulos, 2019).

De forma simplificada, biossensores são dispositivos compostos por três componentes básicos (Figura 1): (i) um elemento sensorial biológico; (ii) um transdutor (ótico, gravimétrico, eletroquímico, dentre outros), que converte variações físico-químicas associadas ao evento de bioreconhecimento em sinais mensuráveis; e (iii) uma unidade de processamento do sinal (Wasilewski et al., 2022). Pesquisas direcionadas para a manipulação de componentes biológicos de sistemas quimiossensoriais de ocorrência natural e que possam ser utilizados como elemento de detecção em biossensores tornam-se cada vez mais relevantes. Isso porque, apresentam bom custo-benefício, são compactos e portáteis, fornecem resultados rápidos e precisos, e podem ser utilizados em campo por indivíduos com treinamento mínimo.

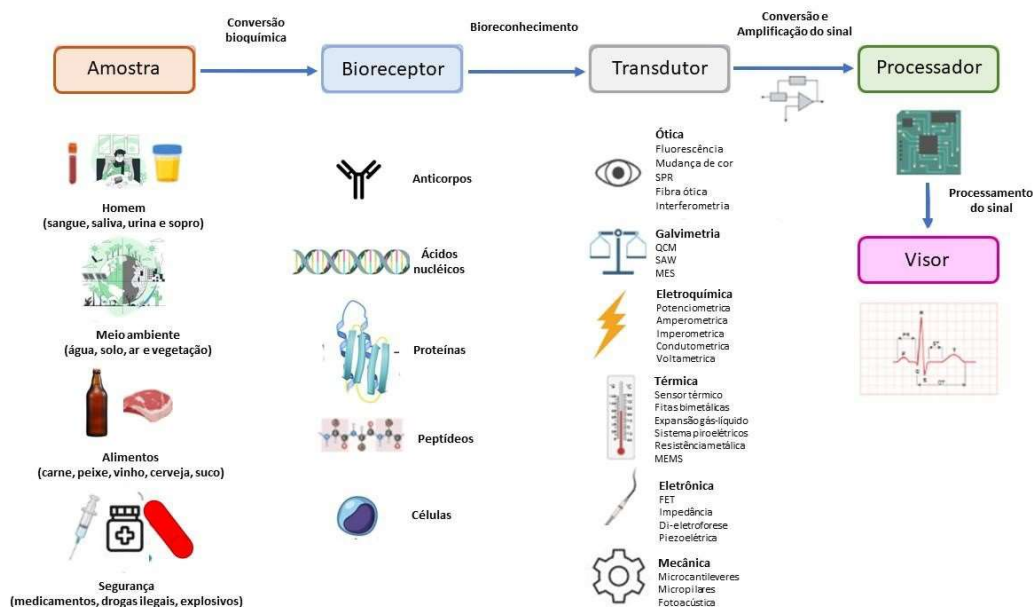


Figura 1: Esquema representativo de um biossensor. O dispositivo é constituído por três componentes básicos: (i) o receptor biológico (bioreceptor), (ii) um transdutor que converte variações físico-químicas associadas ao evento de bioreconhecimento em sinais mensuráveis, e (iii) uma unidade de processamento do sinal. Uma ampla gama de transdutores pode ser utilizada, de acordo com a finalidade da detecção. Biossensores podem ser utilizados em diferentes campos como controle de qualidade, diagnósticos e monitoramento ambiental. SPR: ressonância plasmônica de superfície; QCM: microbalança de cristal de quartzo; SAW: onda acústica de superfície; MEMS: sistemas microeletromecânicos; FET: transistor de efeito de campo.

Fonte: Arquivo pessoal

O sistema olfativo de insetos é bastante sofisticado. A detecção de semioquímicos no ambiente evoca respostas comportamentais essenciais para a sobrevivência, como a localização de fontes de alimento, os sítios de oviposição, os parceiros para o acasalamento, os hospedeiros e a identificação de predadores (Bruyne and Baker, 2008; Vinauger, Buratti, Lazzari, 2011; Choo et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Liu et al., 2022). A olfação é a modalidade sensorial responsável pelo processamento desta informação, que ocorre, basicamente, nas antenas. Diversas proteínas participam desse processo, entre as quais se destacam duas classes: i) as proteínas ligadoras de odor (OBP), responsáveis pelo transporte de odores até os receptores olfativos (OR) localizados na membrana dos neurônios sensoriais olfativos (NSO); e ii) os próprios OR, capazes de discriminar entre milhares de voláteis, detectando uma gama de compostos com grande sensibilidade. A ligação do odor ao OR resulta na despolarização da membrana do NSO e em um sinal neuronal, que é decodificado pelo cérebro do inseto, evocando uma resposta comportamental associada.

Biossensores baseados em receptores olfativos

OR estão localizados na membrana de dendritos ciliados de NSO. Acredita-se que eles reconheçam diferentes odores com alta especificidade e sensibilidade (Leal, 2013; Guo, Kunwar and Smith, 2017), o que os torna candidatos interessantes como elementos de reconhecimento na tecnologia de biossensores. Os OR são tipicamente parte de um complexo heteromérico, que compreende duas unidades: um OR específico ao ligante e um correceptor altamente conservado (ORCO), os quais formam canais iônicos fechados e que não parecem ser funcionais sem a expressão do ORCO (Franco et al., 2016).

A incorporação de proteínas transmembranas, como OR, a transdutores de estado sólido é uma tarefa bastante desafiadora. Além da considerável diferença de suas propriedades físicas e mecânicas, a estabilidade estrutural e a funcionalidade dessas proteínas dependem de um ambiente de bicamada lipídica que não pode ser adaptado para superfícies sólidas de forma adequada. Biossensores que usam OR fora de seu ambiente de membrana apropriado geralmente não são capazes de atingir parâmetros semelhantes aos observados em sistemas biológicos, uma vez que OR isolados não conseguem simular completamente o processo olfativo (Wasilewski et al., 2022). Diferentes estratégias foram criadas para que OR possam ser implementados em biossensores, como a utilização de células e tecidos, nanovesículas, nanodiscos e bicamadas lipídicas artificiais.

O uso de células e tecidos que expressam OR como elementos sensoriais baseia-se em uma cascata de sinal associada ao transporte de íons de fora para dentro da célula, que resulta da ligação OR-odor (Bohbot, Vernick, 2020). As vantagens desse tipo de abordagem estão diretamente associadas à melhor transdução do sinal olfativo complexo, já que os OR estariam em seu ambiente natural, onde as conexões estruturais e os elementos celulares a jusante que facilitam o olfato são preservadas. Uma abordagem conhecida é o uso de células vivas de ovócitos de *Xenopus laevis* injetados com RNA para expressar o receptor de interesse. Em um trabalho conduzido por Misawa e colaboradores (2010), as respostas eletrofisiológicas foram medidas na faixa nanomolar, e o sistema foi capaz de distinguir entre compostos semelhantes. A principal desvantagem dos biossensores com OR em células é que eles dependem da capacidade de criar e manter células vivas, bem como sua integração em plataformas eletrônicas (Ahn et al., 2015). Além disso, os sinais de resposta à ligação do odor podem variar, de acordo com o ciclo celular e a expressão do OR.

Uma alternativa interessante é a manipulação das membranas celulares contendo o OR em nanovesículas, estruturas de bicamada fosfolipídica em nanoescala que mantêm o ambiente natural dos receptores. Nanodiscos são estruturas de bicamada sintética de fosfolídeos solúveis e automontáveis, que também fornecem um ambiente estável para OR (Cave, Wickiser and Mitropoulos, 2019; Bohbot, Vernick, 2020). As vantagens do uso de nanodiscos geralmente estão relacionadas à capacidade de controlar seu tamanho e uniformidade. No entanto, os nanodiscos ainda separam o OR de proteínas a jusante, que facilitam o processo de olfação.

Um estudo com *Drosophila melanogaster* também forneceu evidências de que OR de insetos podem ser integrados em nanodiscos lipídicos e usados como elementos sensoriais primários (Murugathas et al., 2019). Quatro receptores diferentes foram associados a um sistema de transistor de efeito de campo, baseado em nanotubos de carbono (CNT-FET). Os CNT-FET são uma das tendências no *design* de biossensores em relação à transdução de sinal de OR como biorreceptores. Eles oferecem muitas vantagens, como baixo consumo de energia, pequenas dimensões, amplificação de sinal embutida e leitura direta (Zhang, Lieber, 2016). O princípio fundamental de funcionamento dos biossensores baseados em CNT-FET consiste na imobilização dos receptores nas paredes do CNT para a transdução de alterações elétricas induzidas pela ligação ao odor. Os autores demonstraram que cada OR produzia uma resposta elétrica seletiva e sensível aos seus respectivos ligantes (salicilato de metila, hexanoato de metila, trans-2-hexen-1-al e 4-etilguaiacol) com limites de detecção na faixa femtomolar.

Bicamadas artificiais também são alternativas capazes de mimetizar a membrana celular, frequentemente encontradas na literatura em estudos de canais iônicos (Malik, Ghosh, 2022; Su, Leitch, Lipkowski, 2022). Uma vez que OR funcionam, basicamente, como canais iônicos controlados por ligantes, o interesse de cientistas da área de biossensores foi logo despertado. As bicamadas lipídicas artificiais são capazes de sustentar proteínas de membrana como OR, mantendo-as totalmente funcionais. Um trabalho mais recente demonstrou o uso de OR de mosquito sensíveis a 1-octen-3-ol integrados em membrana de bicamada lipídica colocadas em um chip (Misawa et al., 2019). Alterações na corrente iônica causadas por respostas OR-específicas ao octenol, um componente do suor humano, foram obtidas quando o sensor foi exposto a concentrações de 0,01-0,2 ppm.

Para explorar ainda mais as possibilidades de aplicação, um estudo de prova de conceito combinou a unidade biossensor a um pequeno robô móvel, que

pode ser acionado por estímulos de octenol. Já o trabalho conduzido por Khadka e colaboradores (2019) demonstrou que OR de insetos reconstituídos em lipossomos artificiais podem ser imobilizados em uma superfície de ouro e detectar odores de forma seletiva. O estudo utilizou três OR de *D. melanogaster* e mostrou, por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), que cada um deles foi capaz de detectar seu ligante específico em concentrações femtomolares. De todos os métodos analíticos, o EIS é um dos mais complexos e oferece várias vantagens, como o baixo limite de detecção e a operação sem uso de indicadores. Esse método é baseado na resistência elétrica de um sistema, e é sensível a fenômenos de superfície, como o reconhecimento de ligantes (Bertok et al., 2019).

Embora seja interessante utilizar OR como elementos de reconhecimento em biossensores, ainda existem dificuldades técnicas, que são inerentes à natureza de proteínas transmembranas, tornando-os mais difíceis de estabilizar e manipular, fora do ambiente celular.

Biossensores baseados em proteínas ligadoras de odor

OBP são pequenas proteínas solúveis, responsáveis pela ligação entre o ambiente externo e os OSN, capazes de interagir com uma ampla gama de compostos. São bastante estáveis à desnaturação térmica e por solvente, assim como à degradação proteolítica. OBP são facilmente produzidas via expressão heteróloga, em bactéria ou levedura, e a purificação da proteína recombinante é realizada em poucas etapas cromatográficas (Brito, Moreira e Melo, 2016; Szunerits, Boukherroub e Vasilescu, 2020). Uma característica bastante interessante das OBP é que suas propriedades de ligação podem ser modificadas, por mutação sítio-dirigida, de modo que é possível adaptá-las para ligar compostos não-nativos, com maior especificidade e sensibilidade (Zhu et al., 2020). Para aplicação em biossensores, a utilização de OBP de insetos é mais interessante que as de mamíferos, devido à possibilidade de detecção de uma variedade maior de compostos. Os genomas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* codificam 109 e 111 OBP (Manoharan et al., 2013), respectivamente, enquanto apenas cinco genes OBP são conhecidos em ratos, por exemplo (Shiao et al., 2012; Cave, Wickiser and Mitropoulos, 2019).

Sankaran e colaboradores (2011) buscaram mimetizar o sítio de ligação da OBP LUSH, de *D. melanogaster*, para a detecção de compostos orgânicos voláteis (VOC) indicadores de contaminação por *Salmonella*, como 3-metil-1-butanol, em carne bovina. O grupo desenvolveu um sensor, utilizando

microbalança de cristal de quartzo (QCM) como transdutor em conjunto com um peptídeo sintético derivado da OBP LUSH. O biossensor conseguiu detectar 3-metil-1-butanol em uma concentração de femtomolares. Também distinguiu, seletivamente, a molécula de odor alvo de outros compostos com estruturas semelhantes sem um processo de pré-tratamento complexo.

Foi realizado, ainda na área de segurança alimentar, um estudo preliminar com o objetivo de investigar a aplicabilidade da OBP LUSH de *D. melanogaster* como elemento sensorial para a detecção de moléculas amargas, normalmente associadas a um sinal de toxicidade (Chen et al., 2020). Os autores usaram EIS para determinar a concentração de denatônio, quinina e barberina na faixa de 10^{-9} a 10^{-6} mg mL⁻¹.

Visando monitorar a qualidade da água de abastecimento, Dimitratos e colaboradores (2019) descreveram um novo biossensor empregando AgamOBP1 de *Anopheles gambiae* como elemento de biorreconhecimento. AgamOBP1 é capaz de se ligar, de forma específica, a compostos associados a bactérias coliformes, como o indol, um importante metabólito da *Escherichia coli*. Os autores demonstraram a montagem de um biossensor de fluxo lateral portátil e barato, muito semelhante aos testes de gravidez disponíveis comercialmente, para detecção rápida de indol, em soluções aquosas, usando AgamOBP1. O método de detecção do biossensor OBP foi baseado em um mecanismo repórter, envolvendo ligação competitiva com um indicador.

A pesquisa em biossensores também se concentra em estudos destinados a explorar o processo de reconhecimento molecular, para que um melhor entendimento do sistema de comunicação química seja alcançado. É o caso do trabalho em que um biossensor EIS foi construído utilizando Acer-ASP2 de *Apis mellifera*, para a avaliação das propriedades de ligação da proteína aos seus ligantes (Lu et al., 2014). A ligação de odores florais específicos e de feromônios produziu variação linear de impedância, de acordo com diferentes concentrações, com limite de detecção na faixa de milimolar. Os autores foram, então, capazes de melhorar esse dispositivo, usando *nanocup arrays* (nanoCA), para que pequenos eventos de ligação pudessem ser monitorados por ressonância plasmônica de superfície (SPR) (Zhang et al., 2015). Os resultados mostraram um limite de detecção na ordem de picomolar.

Estudos concentrados em estimar a afinidade entre proteínas e ligantes, muitas vezes, visam ao desenvolvimento de biossensores para tal finalidade como alternativa ao ensaio de fluorescência, atualmente utilizado. Kotlowski e colaboradores (2018) reportaram à fabricação e à avaliação de desempenho de um biossensor projetado para o monitoramento *in situ* e em tempo real de um

amplo espectro de moléculas odoríferas, conhecidas por serem atrativas para abelhas, como o ácido homovanílico (também um biomarcador para neuroblastoma), citral, metil eugenol e geraniol. Para isso, a OBP14 de *A. mellifera*, tanto nativa quanto mutantes, foi utilizada como elemento de bioreconhecimento para a construção de biossensores FET baseados em grafeno reduzido (rGO-FET). Os ligantes testados foram detectados na faixa de picomolar, o que realmente poderia levar ao desenvolvimento de um método para medir afinidades de ligação a pequenas moléculas usando biossensores.

A possibilidade de adaptar as propriedades de ligação de OBP por meio de mutagênese sítio-dirigida foi explorada em um estudo envolvendo a proteína AgamOBP1. Os autores analisaram a cavidade de ligação da proteína *in silico*, a fim de investigar a possibilidade de criação de mutantes capazes de detectar drogas de abuso em fase de vapor (Cali and Persaud, 2020). Os resultados demonstraram que substituições de aminoácidos únicos no sítio de ligação, inicialmente modeladas *in silico* e, posteriormente, testadas em proteínas expressas, causam mudanças dramáticas na afinidade de ligação. O mutante AgamOBP1-S82P mostrou ter alta afinidade por canabidiol, 3,4-metilenodioximetanfetamina e cloridrato de cocaína. Após imobilização em QCM, o vapor saturado de cloridrato de cocaína foi detectado, algo que seria impossível usando a AgamOBP1 selvagem, uma vez que o composto não é capaz de acessar sua cavidade de ligação da mesma forma que consegue no mutante projetado. Os autores produziram uma mutação eficaz, que altera as características de ligação da AgamOBP1, mantendo a estabilidade estrutural da proteína. Esse é um exemplo perfeito de como as técnicas de modelagem e *docking* molecular podem ser úteis ao projetar mutações pontuais com a intenção de modificar a afinidade ao ligante. É possível estimar a estabilidade conformacional e estrutural do mutante, o que facilita a produção de uma proteína realmente estável, com boa repetibilidade. Além disso, a avaliação computacional da afinidade de ligação reduz o número de candidatos para expressão e purificação, conferindo foco experimental apenas aos mutantes promissores, acelerando o processo de identificação de voláteis oriundos de drogas de abuso.

Considerações finais

O desenvolvimento de dispositivos bioeletrônicos ainda apresenta muitos desafios, como sua vida útil, que está, intrinsecamente, limitada pelo uso de proteínas. O elemento de bioreconhecimento tem grande contribuição na especificidade e na sensibilidade de um biossensor, por isso, manter a

estabilidade na conexão com componentes eletrônicos é um gargalo para sua implementação. Além disso, seu uso pode ser caro e limitado a condições fisiológicas. Nesse contexto, materiais biomiméticos, que buscam imitar as propriedades desejadas de receptores biológicos, têm recebido atenção nos últimos anos. A imobilização de peptídeos sintéticos, baseados em OR e OBP, ao invés de proteínas inteiras, é explorada para melhorar a estabilidade e repetibilidade, uma vez que não requerem estrutura terciária ou membrana lipídica (Son et al., 2016; Mascini et al., 2017; Wasilewski, Gębicki, Kamysz, 2018). Receptores artificiais, como polímeros molecularmente impressos (MIP), também oferecem uma alternativa para superar as limitações do material biológico, pois proporcionam alta robustez e estabilidade em condições extremas (Gui et al., 2018; Crapnell et al., 2019).

O uso de unidades de reconhecimento biológico melhora, significativamente, a seletividade e a sensibilidade de um biossensor a ligantes específicos. Sua capacidade de interagir com uma variedade de compostos faz com que OBP e OR, assim como peptídeos derivados sejam alvos adequados para pesquisa aplicada, em diversos segmentos industriais, incluindo têxtil, cosmético, pesticida e farmacêutico, bem como para aplicações militares, ambientais, de saúde e segurança (Bianchi et al., 2013; Gonçalves et al., 2019; Full et al., 2021; Rebelo et al., 2021; Wasilewski, Gębicki, 2021). Apesar das barreiras que ainda precisam ser superadas, resultados consideráveis também já foram obtidos. Grande progresso foi feito na identificação de diferentes tipos de componentes biológicos olfativos e sistemas de detecção que, quando associados, podem alcançar parâmetros de sensibilidade, seletividade e velocidade comparáveis aos encontrados em sistemas naturais.

Referências

- Ahn, J. H. et al. (2015) 'Screening of target-specific olfactory receptor and development of olfactory biosensor for the assessment of fungal contamination in grain', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 210, pp. 9–16. doi: 10.1016/j.snb.2014.12.060.
- Bertok, T. et al. (2019) 'Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Biosensors: Mechanistic Principles, Analytical Examples and Challenges towards Commercialization for Assays of Protein Cancer Biomarkers', *ChemElectroChem*, 6(4), pp. 989–1003. doi: 10.1002/celec.201800848.
- Bianchi, Federica et al. (2013) 'An innovative bovine odorant binding protein-based filtering cartridge for the removal of triazine herbicides from water', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2–3), pp. 1067–1075. doi: 10.1007/s00216-012-6499-0.
- Bohbot, J. D. and Vernick, S. (2020) 'The emergence of insect odorant receptor-based biosensors', *Biosensors*, 10(3), pp. 1–22. doi: 10.3390/bios10030026.
- Brito, N. F. et al. (2020) 'Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, pp. 8631–8648. doi: 10.1007/s00253-020-10860-0.
- Brito, N. F., Moreira, M. F. and Melo, A. C. A. (2016) 'A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception', *Journal of Insect Physiology*, 95, pp. 51–65. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.008.
- de Bruyne, M. and Baker, T. C. (2008) 'Odor detection in insects: volatile codes.', *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), pp. 882–897. doi: 10.1007/s10886-008-9485-4.
- Cali, K. and Persaud, K. C. (2020) 'Modification of an Anopheles gambiae odorant binding protein to create an array of chemical sensors for detection of drugs', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-60824-7.
- Cave, J. W., Wickiser, J. K. and Mitropoulos, A. N. (2019) 'Progress in the development of olfactory-based bioelectronic chemosensors', *Biosensors and Bioelectronics*, 123(August 2018), pp. 211–222. doi: 10.1016/j.bios.2018.08.063.
- Chen, Z. et al. (2020) 'Detection of bitter taste molecules based on odorant-binding protein-modified screen-printed electrodes', *ACS Omega*, 5(42), pp. 27536–27545. doi: 10.1021/acsomega.0c04089.
- Choo, Y.-M. et al. (2018) 'Reverse chemical ecology approach for the identification of an oviposition attractant for *Culex quinquefasciatus*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(4), p. 201718284. doi: 10.1073/pnas.1718284115.
- Crapnell, R. D. et al. (2019) 'Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection', *Sensors (Switzerland)*, 19(5). doi: 10.3390/s19051204.

Dimitratos, S. D. et al. (2019) 'Biosensors to monitor water quality utilizing insect odorant-binding proteins as detector elements', *Biosensors*, 9(2), pp. 1–15. doi: 10.3390/bios9020062.

Franco, T. A. et al. (2016) 'Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, pp. 82–90. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.02.012.

Full, J. et al. (2021) 'Market perspectives and future fields of application of odor detection biosensors within the biological transformation—a systematic analysis', *Biosensors*, 11(3), pp. 2–17. doi: 10.3390/bios11030093.

Gonçalves, F. et al. (2019) 'Release of Fragrances from Cotton Functionalized with Carbohydrate-Binding Module Proteins', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(31), pp. 28499–28506. doi: 10.1021/acsami.9b08191.

Gui, R. et al. (2018) 'Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors', *Biosensors and Bioelectronics*, 100, pp. 56–70. doi: 10.1016/j.bios.2017.08.058.

Guo, H., Kunwar, K. and Smith, D. (2017) 'Odorant receptor sensitivity modulation in *Drosophila*', *Journal of Neuroscience*, 37(39), pp. 9465–9473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1573-17.2017.

Khadka, R. et al. (2019) 'An ultrasensitive electrochemical impedance-based biosensor using insect odorant receptors to detect odorants', *Biosensors and Bioelectronics*, 126, pp. 207–213. doi: 10.1016/j.bios.2018.10.043.

Kotlowski, C. et al. (2018) 'Fine discrimination of volatile compounds by graphene-immobilized odorant-binding proteins', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 256, pp. 564–572. doi: 10.1016/j.snb.2017.10.093.

Leal, W. S. (2013) 'Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes', *Annual Review of Entomology*, 58, p. 120928130709004. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153635.

Liu, Z. et al. (2022) 'An odorant binding protein mediates *Bactrocera dorsalis* olfactory sensitivity to host plant volatiles and male attractant compounds', *International journal of biological macromolecules*. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.198.

Lu, Y. et al. (2014) 'Olfactory biosensor using odorant-binding proteins from honeybee: Ligands of floral odors and pheromones detection by electrochemical impedance', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 193(51471168), pp. 420–427. doi: 10.1016/j.snb.2013.11.045.

Malik, C. and Ghosh, S. (2022) 'A mutation in the S6 segment of the KvAP channel changes the secondary structure and alters ion channel activity in a lipid bilayer membrane', *Amino acids*. doi: 10.1007/S00726-022-03188-8.

Manoharan, M. et al. (2013) 'Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*.', *Genome biology and evolution*, 5(1), pp. 163–80. doi: 10.1093/gbe/evs131.

Mascini, M. et al. (2017) 'Tailoring gas sensor arrays via the design of short peptides sequences as binding elements', *Biosensors and Bioelectronics*, 93(September 2016), pp. 161–169. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.028.

Misawa, N. et al. (2010) 'Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp. 15340–15344. doi: 10.1073/pnas.1004334107.

Misawa, N. et al. (2019) 'Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip', *ACS Sensors*, 4(3), pp. 711–716. doi: 10.1021/acssensors.8b01615.

Murugathas, T. et al. (2019) 'Biosensing with Insect Odorant Receptor Nanodiscs and Carbon Nanotube Field-Effect Transistors', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(9), pp. 9530–9538. doi: 10.1021/acsmi.8b19433.

Oliveira, D. S. et al. (2018) 'Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from *rhodnius prolixus* antennae', *Frontiers in Physiology*, 9(AUG), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2018.01175.

Rebelo, P. et al. (2021) 'Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis', *Biosensors and Bioelectronics*, 172, p. 112719. doi: 10.1016/j.bios.2020.112719.

Sankaran, S., Panigrahi, S. and Mallik, S. (2011) 'Olfactory receptor based piezoelectric biosensors for detection of alcohols related to food safety applications', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 155(1), pp. 8–18. doi: 10.1016/j.snb.2010.08.003.

Shiao, M. S. et al. (2012) 'Transcriptomes of mouse olfactory epithelium reveal sexual differences in odorant detection', *Genome Biology and Evolution*, 4(5), pp. 703–712. doi: 10.1093/gbe/evs039.

Son, M. et al. (2016) 'Bioelectronic nose using odorant binding protein-derived peptide and carbon nanotube field-effect transistor for the assessment of salmonella contamination in food', *Analytical Chemistry*, 88(23), pp. 11283–11287. doi: 10.1021/acs.analchem.6b03284.

Su, Z., Leitch, J. J. and Lipkowski, J. (2022) 'Effect of Lipid Composition on the Inhibition Mechanism of Amiloride on Alamethicin Ion Channels in Supported Phospholipid Bilayers', *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 38(27). doi: 10.1021/ACS.LANGMUIR.2C00953.

Szunerits, S., Boukherroub, R. and Vasilescu, A. (2020) *Electrochemical biosensing with odorant binding proteins*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mie.2020.04.071.

Vinauger, C., Buratti, L. and Lazzari, C. R. (2011) 'Learning the way to blood: First evidence of dual olfactory conditioning in a bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus*. I. Appetitive learning', *Journal of Experimental Biology*, 214(18), pp. 3032–3038. doi: 10.1242/jeb.056697.

Wasilewski, T. et al. (2022) 'Olfactory receptor-based biosensors as potential future tools in medical diagnosis', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 150, p. 116599. doi: 10.1016/j.trac.2022.116599.

Wasilewski, T. and Gębicki, J. (2021) 'Emerging strategies for enhancing detection of explosives by artificial olfaction', *Microchemical Journal*, 164(December 2020). doi: 10.1016/j.microc.2021.106025.

Wasilewski, T., Gębicki, J. and Kamysz, W. (2018) 'Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 257, pp. 511–537. doi: 10.1016/j.snb.2017.10.086.

Zhang, A. and Lieber, C. M. (2016) 'Nano-Bioelectronics', *Chemical Reviews*, pp. 215–257. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00608.

Zhang, D. et al. (2015) 'Nanoplasmonic monitoring of odorants binding to olfactory proteins from honeybee as biosensor for chemical detection', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 221, pp. 341–349. doi: 10.1016/j.snb.2015.06.091.

Zhu, J. et al. (2020) *Site-directed mutagenesis of odorant-binding proteins*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mie.2020.05.014.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 23

Novas Abordagens para o Controle de Transmissão da Leishmaniose: Paratransgênese, Vacinas Bloqueadoras de Transmissão e CRISPR

Antonio J. Tempone¹
Erich Loza Telleria²
Felipe Soares Coelho¹
Yara M. Traub-Cseko¹

¹Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

²Charles University, Prague, Czech Republic.

Considerações iniciais

A leishmaniose é uma doença plural, com muitas manifestações clínicas, que vão de formas cutâneas consideradas leves, que podem deixar pequenas cicatrizes, até formas cutâneas graves, com efeitos em mucosas e, potencialmente deformantes e que, portanto, podem causar graves efeitos psicológicos, bem como estigma social. Finalmente, a forma visceral, que é a mais grave, atinge órgãos internos e pode ser fatal, se não for tratada. É uma doença negligenciada, que atinge milhões de indivíduos anualmente dentro de populações menos favorecidas de regiões tropicais e subtropicais (World Health Organization, 2022). Os tratamentos correntes ainda fazem uso de drogas desenvolvidas há décadas, que apresentam graves efeitos colaterais (McGwire, Satoskar, 2014), apesar dos esforços da comunidade científica para o desenvolvimento de novas terapias (Briones Nieva et al., 2021).

Cães são importantes reservatórios da doença, pela proximidade de convívio com seres humanos. O desenvolvimento de vacinas eficientes, tanto para humanos como para cães, ainda é incipiente. No caso de vacinas caninas já em uso, permanecem dúvidas a respeito de sua eficiência (Velez, Gállego, 2020). Apesar do grande número de patentes submetidas para o desenvolvimento de vacinas humanas antileishmaniose, (Thomaz-Soccol et al., 2017) ainda nenhuma se encontra em uso (Goodman et al., 2022).

O parasita *Leishmania*, causador da leishmaniose, é transmitido pelos insetos vetores flebotomíneos. Insetos que transmitem patógenos ou insetos que causam prejuízo para a agricultura são, primariamente, controlados através do uso de inseticidas. Essa abordagem é onerosa e pode ter graves impactos ambientais (Klingelhöfer et al., 2022). Abordagens alternativas de sucesso, como a liberação de machos estéreis para o controle de pestes agrícolas, já estão em uso há várias décadas (Vreysen et al., 2021).

Entretanto, desenvolvimentos tecnológicos recentes permitiram o surgimento de outras abordagens, principalmente voltadas a doenças causadas por patógenos transmitidos por mosquitos, como arboviroses e malária. Entre elas estão o uso de *gene drive*, que causa a disseminação de uma informação genética numa população de insetos, normalmente inserida nos indivíduos através de modificações gênicas estáveis, que dão origem a insetos transgênicos. Essas modificações podem estar ligadas diretamente tanto à sobrevivência dos mosquitos, como à produção de moléculas capazes de interferir na capacidade vetorial do inseto (Dong et al., 2022). Tentativas de criação de flebotomíneos transgênicos, sem muito sucesso, podem ser contadas nos dedos de uma mão (Louradour et al., 2019; Martin-Martin et al., 2018a).

Outra abordagem alternativa de sucesso é o emprego do endossimbionte *Wolbachia pipientis*, que já se mostrou eficiente no controle de vários arbovírus e, em estudos preliminares, no controle de *Plasmodium*, parasita causador da malária (Moreira et al., 2009). A liberação de mosquitos transfectados com *Wolbachia* na natureza já foi realizada em várias regiões do mundo, com subsequente redução do número de casos de dengue, inclusive no Brasil (Pinto et al., 2021). No flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, estudos preliminares foram feitos na tentativa de produzir células embrionárias com infecção estável pelo endossimbionte, como um primeiro passo para investigar o seu possível efeito em infecções por *Leishmania*. Essas células foram estabelecidas e suas respostas imunes contra *Wolbachia* investigadas. Foi visto que efetores de várias vias de imunidade inata foram afetados pela presença da bactéria (da Silva Gonçalves et al., 2019). Novamente, nessa área, estudos com os vetores de leishmaniose são bastante limitados ou quase inexistentes, restringindo-se, basicamente, à identificação da presença do endossimbionte nesses insetos.

Levando esses fatos em consideração, este capítulo pretende apresentar e discutir algumas abordagens alternativas, como paratransgênese, vacinas bloqueadoras de transmissão e CRISPR, para o controle de flebotomíneos ou da disseminação de patógenos por eles transmitidos.

Paratransgênese

Background

O advento das tecnologias do DNA recombinante, tendo o CRISPR-Cas9 (ver abaixo) como a mais recentemente desenvolvida, têm propiciado avanços significativos em diversas áreas da atividade humana, principalmente na medicina (Reshetnikov et al., 2022) e na agricultura (Ricroch et al., 2022). Na área da parasitologia, essas tecnologias também têm sido aventadas como alternativas para novas abordagens no controle de doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores, como as malárias, tripanossomíases e leishmanioses, causadas pelos agentes etiológicos *Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp., respectivamente. Essas novas abordagens incluem a transgênese e a paratransgênese de vetores, ambas com objetivo de interromper a transmissão do patógeno. Isso pode ser atingido, através da morte ou do não desenvolvimento do parasito, ou, ainda, da diminuição da competência do vetor. A diferença entre as duas abordagens é que a primeira altera o genoma do vetor, ao passo que a segunda altera a bagagem genética de microrganismos, naturalmente presentes ou artificialmente inseridos, na microbiota desses

vetores. A transgênese de vetores será discutida no subcapítulo CRISPR-Cas9, assim como suas vantagens e desafios. Aqui, abordaremos a utilização da paratransgênese no controle de doenças vetoriais.

Chamamos de insetos paratransgênicos aqueles que possuem microrganismos, bactérias, fungos ou vírus, preferencialmente oriundos da sua própria microbiota, que foram geneticamente manipulados de forma a sintetizar e liberar moléculas que interfiram na capacidade de transmissão do patógeno pelo vetor. Entre os requisitos necessários para a escolha do microrganismo ideal estão as premissas de que ele seja cultivável, de fácil manipulação genética, não patogênico para o vetor, nem para humanos, animais ou plantas, e que seja transmissível entre indivíduos vetores (Ratcliffe et al., 2022). Após a manipulação genética, os microrganismos transgênicos deverão ser reintroduzidos e colonizar o vetor. Outro importante aspecto a ser considerado é a escolha das moléculas que serão produzidas e entregues por esses comensais transgênicos. Essas moléculas efetoras, que interferem negativamente na relação entre o parasito e o inseto vetor, podem ser peptídeos antimicrobianos (AMP), imunoglobulinas recombinantes ou microRNA capazes de silenciar a expressão de genes do patógeno ou do vetor envolvidos na interação entre eles.

Além da seleção do comensal a ser alterado e da molécula a ser produzida, há a escolha da forma como essa alteração genética será induzida: pela adoção de vetores episomais ou pela integração no genoma (Figura 1). Como pode ser observado, a adoção da paratransgênese ou da transgênese, ou de ambas, como estratégias de controle de doenças transmitidas por vetores, demanda informações específicas a respeito das relações moleculares entre os diferentes patógenos e os seus respectivos vetores. Aqui, analisaremos o que se sabe em relação à paratransgênese dos transmissores das principais doenças vetoriais e o que tem sido realizado em relação ao controle da transmissão das leishmanias pelos seus vetores flebotomíneos. A definição de paratransgênese, descrita anteriormente, exclui do conceito o uso de endossimbiontes, como *Wolbachia* sp. (Kamtchum-Tatuene et al., 2017) ou comensais, como *Enterobacter* sp. (Cirimotich et al., 2011) que não tenham sido geneticamente alterados.

Uma das vantagens da paratransgênese sobre a transgênese de vetores é a possibilidade de que o mesmo microrganismo transgênico possa colonizar diferentes vetores, ao passo que, na transgênese, cada diferente vetor deverá ter a sua bagagem genética alterada. Isso fica mais evidente ao considerarmos que é mais simples e econômico produzir microrganismos transgênicos do que metazoários eucariotos superiores transgênicos (Wilke, Marrelli, 2015).

Estado da arte

Os primeiros estudos utilizando a paratransgênese para o controle de doenças transmitidas por vetores tiveram início na década de 90. Os trabalhos de Charles B. Beard e Ravi V. Durvasula foram os pioneiros na utilização de uma bactéria comensal actinomicete gram-positiva do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, *Rhodococcus rhodnii*, no controle da transmissão do tripanosomatídeo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Os autores demonstraram que *R. prolixus* colonizados por *R. rhodnii* expressando o gene da cecropina A, um AMP presente em vários insetos, tiveram diminuição de 65% na carga parasitária, quando comparados ao controle. Além da redução na carga parasitária, esses insetos também apresentaram uma redução significativa no número de parasitos na forma metacíclica infectiva (Beard et al., 1992; Durvasula et al., 1997).

Diversos outros estudos se sucederam, no uso da paratransgênese para o combate de outras doenças transmitidas por vetores, como, por exemplo, a manipulação genética de membros da microbiota de *Anopheles* sp. no combate às malárias. Nesses estudos, foram utilizadas bactérias gram-negativas como *Pantoea agglomerans* (Wang et al., 2012), *Asaia bogorensis* (Grogan et al., 2022; Shane et al., 2018; Wang et al., 2017) e *Enterobacter cloacae* (Dehghan et al., 2022), fungos como *Metarhizium anisopliae* (Fang et al., 2011) e vírus como o Mosquito Densovirus (MDV) alterado geneticamente para expressar microRNA (Liu et al., 2016; Ren et al., 2008). Os trabalhos supracitados que utilizaram bactérias comensais e o fungo *M. anisopliae* geneticamente alterados para expressar diferentes AMP apresentaram resultados promissores, com redução significativa da carga parasitária nos mosquitos por eles colonizados. Os estudos com MDV não expressaram moléculas efetoras contra o desenvolvimento do *Plasmodium* sp. Esses trabalhos se concentraram em evidenciar a possibilidade da utilização desse vírus em uma futura estratégia paratransgênica.

A transmissão do *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da tripanossomíase africana humana e animal, pelo díptero *Glossina* sp., também tem sido alvo de estudos envolvendo a manipulação genética de microrganismos simbiotes. Uma importante característica, que faz do vetor das tripanossomíases africanas um bom candidato para o uso de abordagem paratransgênica, é que as espécies de *Glossina*, também conhecida como mosca tsé-tsé, desenvolveram um complexo relacionamento com diferentes elementos da sua microbiota. Essas interações mutualísticas são fundamentais para suprir deficiências nutricionais, de forma a manter as funções metabólicas, respostas imunes e reprodução do

inseto. Entre os membros da microbiota da mosca tsé-tsé, destacam-se: o simbiote obrigatório *Wigglesworthia* sp., presente em todas as espécies, o simbiote comensal *Sodalis* sp. e o simbiote *Wolbachia* sp. E, mais recentemente, também foi identificada a bactéria *Spiroplasma* sp. (Attardo et al., 2020; Lee et al., 2022; Tsakeng et al., 2022). A íntima relação simbiótica entre essas bactérias e o vetor faz delas potenciais candidatas à paratransgenia de *Glossina* sp.

O fato de *Sodalis* sp. ser uma das poucas bactérias simbióticas capazes de cultivo axênico (quando as bactérias crescem, sem a presença células hospedeiras na cultura) e de permitir a sua manipulação genética *in vitro*, levou a sua seleção para os ensaios de paratransgenia em *Glossina* sp. Nesses estudos, a bactéria foi modificada para produzir e exportar anticorpos transgênicos constituídos apenas por cadeias pesadas (HCAs), conhecidas como Nanobodies®. Esses anticorpos recombinantes são projetados para se ligarem a diferentes alvos do parasito *Trypanosoma brucei brucei* (De Vooght et al., 2012; 2022). Como o ocorrido com os trabalhos com *Anopheles* supracitados, esses estudos também apresentaram resultados promissores, com uma significativa redução da população de parasitos em *Glossina*.

Um primeiro passo no desenvolvimento de um microrganismo transgênico capaz de expressar e secretar moléculas que interfiram nos mecanismos de transmissão de parasitoses é o estudo da composição das microbiotas de seus vetores. Isso possibilita a seleção dos candidatos a serem utilizados nessas abordagens. A análise do gene ribossomal 16S, através de sequenciamentos de alta vazão (HTS), tem permitido a identificação dos microrganismos existentes nos diferentes microbiomas dos vetores (Allaband et al., 2019; Saldaña et al., 2017; Wang et al., 2022). Esses trabalhos prospectivos para a escolha do microrganismo candidato à transgenia são uma informação valiosa. Mas, a condição *sine qua non*, para que um microrganismo seja utilizado em uma abordagem paratransgênica, é que ele seja cultivável e permita sua manipulação genética *in vitro*. Além disso, outros requisitos também devem ser observados, como a não patogenicidade para os demais seres vivos no bioma do vetor e a transmissibilidade desse comensal entre os vetores. Até o presente, a grande maioria dos microrganismos selecionados têm sido bactérias. Entretanto, fungos também estão sendo utilizados nesses ensaios (Fang et al., 2011; Rasgon, 2011) e vírus (Liu et al., 2017; Patterson et al., 2021; Werling et al., 2022). Na figura 1, nós temos uma representação esquemática do processo de produção de vetores paratransgênicos.

Os microrganismos comensais escolhidos terão, então, o seu genoma alterado pela inserção de genes codificantes para a produção de moléculas

efetoras, que irão interromper o ciclo de desenvolvimento e transmissão dos patógenos. Devido à facilidade de inserção de genes exógenos e de transfecção, os sistemas de vetores plasmidiais têm sido utilizados como o principal método de escolha para essas transformações genéticas (Masson et al., 2020; Rocha et al., 2021). Entretanto, apesar da alteração genética utilizando episomos plasmidiais ser efetiva e tecnicamente mais simples, esse procedimento pode apresentar um importante problema. Em alguns casos, é observada a perda do DNA episomal que produz as moléculas efetoras, à medida que as gerações dos microrganismos transformados se sucedem (Huang et al., 2020). Uma alternativa à utilização de plasmídeos para a entrega de moléculas que interfiram na transmissão de patógenos é a utilização de bacteriófagos. Esses vírus são capazes de infectar bactérias e realizar a incorporação de genes exógenos no genoma desses comensais, através do mecanismo de transdução de DNA (Keller et al., 2021).

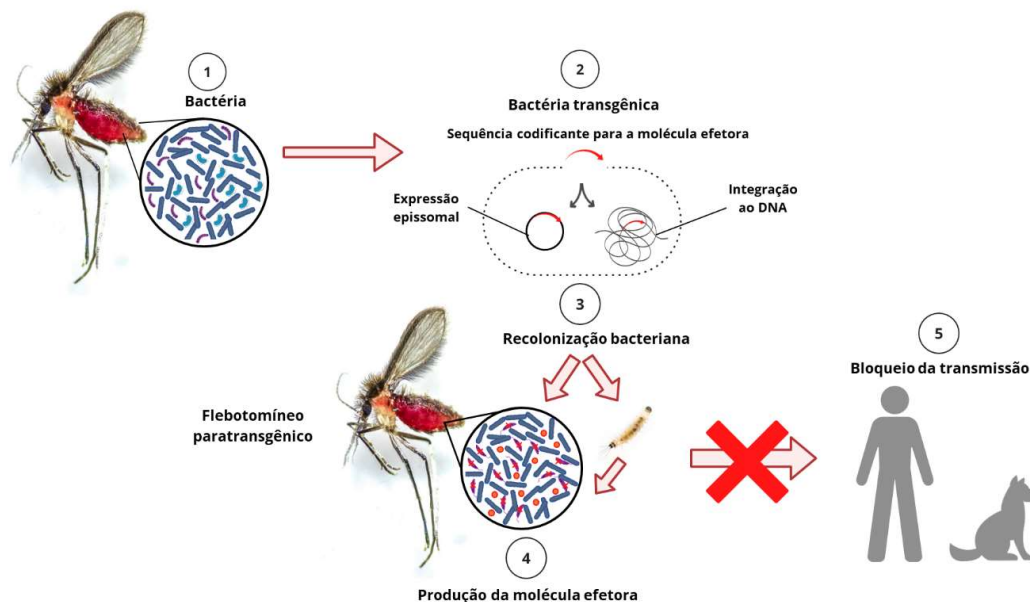


Figura 1: Representação das etapas envolvidas na criação de vetores paratransgênicos- 1- Seleção de comensais cultiváveis. 2- Transformação dos comensais com o gene codificante para a molécula efetora antipatógeno. 3- Introdução do comensal transgênico no intestino do inseto. 4- Ação da molécula sobre o patógeno. 5- Bloqueio da transmissão. Criação: Ana Carolina Pedro Santos Ribeiro.

Fonte: Arquivo pessoal

A recente introdução da tecnologia do CRISPR-Cas9 para a edição dos genomas dos microrganismos comensais selecionados têm colaborado para o desenvolvimento das abordagens paratransgênicas. A utilização dessa metodologia permite a inclusão de um ou mais genes exógenos de forma integrada ao genoma de vários comensais. Uma das vantagens desse sistema é

que ele produz uma integração estável em sítios específicos do genoma (Velázquez et al., 2021; Velázquez et al., 2022). Outra recente inovação foi a paratransgênese baseada em RNA de interferência (RNAi), na qual micróbios são alterados para produzir e liberar RNA de dupla fita (dsRNA), ao invés de proteínas, como moléculas efetoras (Asgari et al., 2020; Velázquez et al., 2021; Vogel et al., 2019). Essa metodologia visa à ativação do sistema de RNAi, com objetivo de silenciar genes expressos pelo parasito, pelo vetor, ou por ambos, e que sejam necessários ao desenvolvimento e à transmissão dos patógenos (Cui et al., 2022; Nyasembe et al., 2023). Após essa visão geral do que tem sido efetivado para o controle de doenças transmitidas por vetores através da abordagem paratransgênica, nas próximas seções, iremos abordar o que tem sido realizado, especificamente, para o combate à transmissão das leishmanioses.

Paratransgênese e leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses transmitidas por insetos, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae). Os membros do gênero *Leishmania* são parasitos digenéticos, cujo ciclo de vida envolve a infecção de um hospedeiro vertebrado e de um inseto flebotomíneo, que atua como vetor.

Diferentemente de outros patógenos, como *Plasmodium* sp. e algumas espécies do gênero *Trypanosoma*, que, além do intestino, migram para outros tecidos dos vetores durante o seu desenvolvimento (de Castro Neto et al., 2022; Guttery et al., 2022), as leishmanias colonizam somente o trato digestivo dos insetos flebotomíneos, o que faz da paratransgênese estratégia atraente para o controle da transmissão das leishmanioses.

Como mencionado anteriormente, a identificação dos microrganismos presentes na microbiota intestinal e o conhecimento dos mecanismos moleculares, que medeiam as relações entre microbiota, patógeno e inseto vetor são de fundamental importância. Essa relevância se dá tanto para a seleção do comensal a ser transformado, quanto para a seleção da molécula exógena a ser inserida nesse intrincado sistema interativo. Diversos trabalhos têm estudado a microbiota entérica de flebotomíneos, no Novo e no Velho Mundo.

Um dos primeiros trabalhos, nesse sentido, foi o de Schlein e colaboradores em 1985, quando foi identificada a presença de diversas bactérias e fungos em populações de *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus tobbi* provenientes do Vale do Jordão e da Grécia (Schlein et al., 1985). Bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Pseudo-*

monas, *Propionibacterium*, *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia*, *Leminorella*, *Pantoea*, *Staphylococcus* e *Bacillus* foram identificados em trabalhos posteriores (Dillon et al., 1996; Maleki-Ravasan et al., 2014; Volf et al., 2002). Variações significativas foram encontradas nas populações de bactérias, em populações de vetores da mesma espécie, de diferentes localizações geográficas, e entre diferentes espécies que vivem em simpatria, ou seja, na mesma região. Isso indica que a composição da flora intestinal de vetores do gênero *Phlebotomus* é resultante tanto da pressão de fatores ambientais, como da capacidade modulatória apresentada pelas diferentes espécies (Karimian et al., 2022; Papadopoulos et al., 2020).

No Novo Mundo, a composição da microbiota dos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* também tem sido alvo de estudos que identificaram a presença de diversas espécies, como *Ochrobactrum*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium* e *Wolbachia*, entre outras. Como observado em *Phlebotomus*, também foi visto que a composição da microbiota de *Lutzomyia* sp. é fruto da interação entre fatores ambientais e elementos idiossincráticos de cada espécie (Gouveia et al., 2008; Tabbabi et al., 2020; Vivero-Gomez et al., 2021; Vivero et al., 2019). Para um maior aprofundamento a respeito da composição da microbiota intestinal de flebotomíneos, sugerimos as revisões de Telleria et al., 2018 e Omondi et al., 2021 (Omondi, Demir 2021; Telleria et al., 2018).

Hurtwitz e colaboradores, em 2011 (Hurwitz et al., 2011), conduziram um dos primeiros experimentos em que a bactéria *Bacillus subtilis*, isolada de *P. argentipes*, foi transformada para expressar um gene exógeno codificante para uma proteína verde fluorescente recombinante (GFP_r). Essa bactéria foi oferecida oralmente para larvas e, posteriormente, recuperada em adultos, mostrando sua capacidade de colonização no interior do intestino dos insetos. Em ensaio semelhante, Abassi e colaboradores, em 2019, transformaram episossomalmente a bactéria *Enterobacter cloacae*, um comensal de *P. papatasi*, para expressar o AMP defensina e a reintroduziram no vetor através do oferecimento às larvas (Abassi et al., 2019). Nesse caso, não foi observada a transmissão transtadial, como no primeiro exemplo. Um dos motivos pode ser a perda dos plasmídeos ao longo das gerações do comensal, ou a perda da capacidade competitiva com os demais membros da microbiota do inseto.

Outro elemento fundamental para a estratégia paratransgênica no combate às leishmanioses é a seleção de moléculas com atividade anti-*Leishmania* em baixas concentrações e que não afetem o comensal transgênico que vai expressá-la. Entre as possíveis moléculas efetoras a serem utilizadas, destacam-se os

AMP, que são moléculas normalmente catiônicas, com massa molecular entre 1 a 3 kDa (Conlon 2011). Elas fazem parte do sistema imune inato de diversas classes de organismos, que incluem bactérias, invertebrados, vertebrados e plantas (Nogro et al., 2022).

Diversos AMP com atividade anti-*Leishmania* foram isolados de diferentes organismos. Entre eles, destacam-se uma dermaseptina (DS hypo-01) e a filoseptina-1, ambas isoladas de sapo (Pinto et al., 2013). AMP isolados de artrópodes também se mostram promissores para o combate às leishmanioses por meio da paratransgênese, principalmente os AMP melitina e cecropina, o primeiro isolado a partir do veneno de abelhas e o segundo presente em uma grande gama de insetos. A ação desses AMP contra diferentes espécies de *Leishmania* tem sido demonstrada em vários trabalhos (Akuffo et al., 1998; Patiño-Márquez et al., 2018; Pereira et al., 2016; Pérez-Cordero et al., 2011). Moléculas híbridas melitina-cecropina, como CA(1–8)M(1–18), D-CA(1–8)M(1–18) e N-Ac-CA(1–8)M(1–18), demonstraram excelentes resultados contra leishmanias, sendo letais nas concentrações respectivas de 1,3 µM, 0,4 µM, e 2,9 µM (Díaz-Achirica et al., 1998). A atividade anti-*Leishmania* de outros AMP é revisada em El-Dirany e colaboradores, 2021 e Santos e colaboradores, 2022 (El-Dirany et al., 2021; Santos et al., 2022).

Até o presente, é esse o quadro geral do uso da paratransgênese para o controle das leishmanioses. Há necessidade de mais estudos da biologia da interação das leishmanias nos seus vetores, para permitir a utilização de outros AMPs ou de outras moléculas efetoras para interferir na biologia delas. Como por exemplo, o uso de imunoglobulinas recombinantes contra proteínas específicas dos vetores e/ou patógenos, ou sRNA.

Finalizando nossas considerações sobre o uso da paratransgênese no combate às doenças transmitidas por vetores, devemos lembrar que devemos nos preocupar com os possíveis impactos ambientais que a introdução de vetores portando microrganismos transgênicos pode gerar. Além disso, é preciso ratificar a relevâncias das questões técnicas supracitadas, como a seleção dos comensais, a escolha das moléculas efetoras e a forma de inserção dos genes exógenos nos comensais. Estudos nesse sentido deverão ser realizados, à medida que os simbiontes transgênicos sejam produzidos e tenham a sua efetividade avaliada no combate às doenças vetoriais.

Vacinas bloqueadoras de transmissão

Background

As vacinas bloqueadoras de transmissão (VBT) representam um passo importante dentre muitas estratégias alternativas que visam ao controle de patógenos transmitidos por artrópodes (Saul et al., 2007). A proposta das VBT é interferir no desenvolvimento de patógenos dentro do vetor, interrompendo seu ciclo e, conseqüentemente, sua transmissão para hospedeiros vertebrados não infectados (Figura 2).

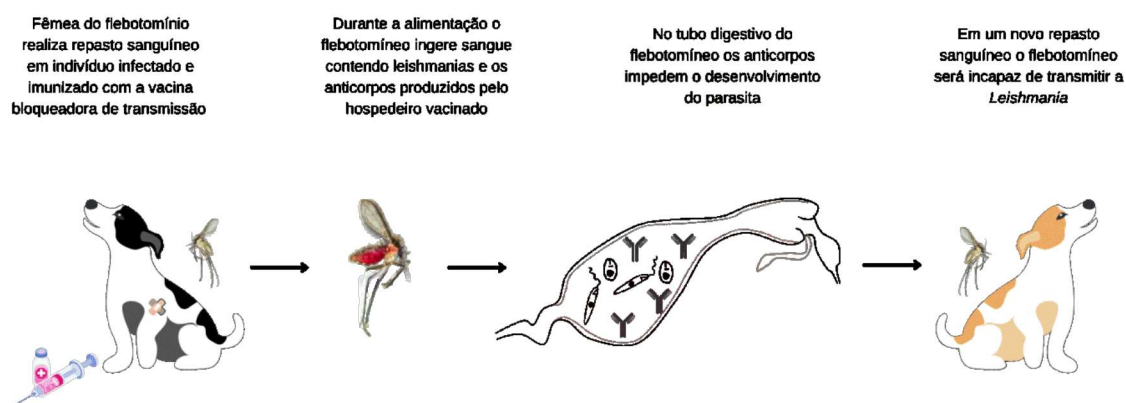


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação de vacinas bloqueadoras de transmissão. Criação: Thais Lemos da Silva.

Fonte: Arquivo pessoal

As VBT, geralmente, têm por estratégia imunizar hospedeiros vertebrados (infectados ou não) com moléculas derivadas do patógeno ou do vetor, que são fundamentais para o sucesso da infecção do inseto pelo patógeno. Tais moléculas (antígenos) induzem o sistema imunológico do hospedeiro a produzir anticorpos específicos (Singh, O'Hagan, 2002). Após uma refeição de sangue em um indivíduo vacinado e infectado, os anticorpos específicos adquiridos junto da alimentação poderão impedir o desenvolvimento do patógeno no interior do inseto vetor (Coutinho-Abreu, Ramalho-Ortigao, 2010; Saul et al., 2007).

Um bom candidato para VBT deve resultar em altos títulos de anticorpos pelo hospedeiro vertebrado imunizado (Kubler-Kielb et al., 2007), assim como ser seguro o suficiente para evitar efeitos colaterais significativos após a imunização (Saul et al., 2007), e, preferencialmente, ser capaz de reconhecer todas as variantes desse antígeno (Sattabongkot et al., 2003). Alternativamente, pode ser necessário combinar diferentes antígenos, uma vez que a ação combinada e sinérgica dos respectivos anticorpos pode produzir um resultado de bloqueio de transmissão mais eficiente (Kongkasuriyachai et al., 2004).

A estratégia de VBT tem demonstrado sucesso nos estudos de combate à malária utilizando antígenos presentes na superfície do estágio sexual dos parasitos. Inicialmente, os quatro principais antígenos de estágio sexual de *P. falciparum* foram identificados como alvos de anticorpos monoclonais, possivelmente bloqueadores de transmissão da malária. A expressão dos antígenos Pfs230 e Pfs48/45 se inicia em gametócitos intracelulares no interior dos eritrócitos, e os outros dois (Pfs25 e Pfs28) são antígenos cuja expressão é ativada a partir da liberação dos gametócitos pelos eritrócitos (Dinglasan et al., 2007).

Diversas tentativas de otimização da expressão de Pfs230 foram testadas em diversos sistemas de expressão. Duas formulações (Pfs230 conjugado à exoproteína A), uma com hidróxido de alumínio (Alhydrogel) e uma com AS01, estão, atualmente, em ensaios clínicos de fase I (Williamson et al., 1995). Recentemente, foi alcançada a expressão de Pfs48/45 em células de *Drosophila*, e sua utilização como VBT encontra-se em estágio pré-clínico de estudo (Dumbo et al., 2018).

O antígeno Pfs25 é o alvo mais estudado para o desenvolvimento de VBT para malária (Kaslow et al., 1988). No modelo murino, a imunização usando os plasmídeos que codificam Pfs25 apenas ou em combinação com plasmídeos que codificam Pfg27, induziu altos títulos de anticorpos após duas inoculações sem adjuvantes. Contudo, a imunização de macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) com plasmídeos expressando Pfs25 ou uma proteína quimérica Pfs25-Pfg27 não estimulou a produção de altos títulos de anticorpos, mesmo após quatro inoculações (Coban et al., 2004). Desde então, a expressão em uma variedade de sistemas recombinantes, incluindo levedura (Stowers et al., 2000), plantas (Farrance et al., 2011) e algas (Patra et al., 2015) tem sido testada, originando formulações que se mostraram seguras nos testes, mas não se mostraram efetivos em induzir a produção de anticorpos (Chichester et al., 2018; Sagara et al., 2018; Talaat et al., 2016).

Além desses, outros alvos foram descobertos: dois expressos pelo parasita, HAP2 e Pfs47, e uma proteína do intestino médio do mosquito, AnAPN1 (Dinglasan et al., 2007). Pfs47 é uma proteína de superfície de gametócitos e gametas femininos. Relatos na literatura indicam a ausência de um papel dessa proteína na infecção do mosquito, minando seu potencial como vacina candidata (Van Schaijk et al., 2006). Entretanto, outros estudos apontaram um papel da Pfs47 na evasão do sistema imune pelo parasito em diferentes espécies de mosquitos, deixando uma dúvida sobre sua utilização como alvo (Molina-Cruz et al., 2015).

O antígeno PfHAP2 está presente apenas em gametócitos e gametas masculinos ativados. Apesar de IgG purificada de soro obtido de camundongos imunizados com PfHAP2 inibir fortemente (em 97%) a formação de oocistos em mosquitos *Anopheles*, estudos ainda não alcançaram a fase clínica (Angrisano et al., 2017; Miura et al., 2013).

Alvos no mosquito também podem ser considerados para o desenvolvimento de VBTs. A aminopeptidase N (AnAPN1), encontrada na superfície do intestino médio de *Anopheles gambiae* alimentados com açúcar ou sangue, é o candidato mais promissor nesses estudos. Anticorpos contra esse antígeno foram capazes de inibir a evolução dos ciclos de vida de *P. falciparum* e *P. berghei* no mosquito (Dinglasan et al., 2007; Mathias et al., 2012). AnAPN1 já foi expressa em uma variedade de sistemas, incluindo *E. coli*, vetores virais (adenovírus de chimpanzé recombinante, vírus de vaccínia) e células de rim embrionário humano HEK293. Nenhum dos construtos atingiu a fase I, de desenvolvimento clínico (Acquah et al., 2017).

Estado da arte

A utilização de VBT também tem sido proposta no controle da transmissão das leishmanioses, especialmente em situações em que a doença apresenta um perfil em que os cães domésticos desempenham um papel crítico, como reservatórios do parasita. Em *Leishmania major*, os dois antígenos de superfície mais abundantes, lipofosfoglicano (LPG) e GP63, foram testados como alvos de VBT para *Phlebotomus duboscqi*. Os resultados indicaram que o soro proveniente de animais imunizados com um coquetel de LPG e GP63 foi capaz de reduzir os índices parasitários, de *L. major* no inseto (Tonui et al., 2001).

Curiosamente, uma vacina, comercialmente disponível para a leishmaniose visceral canina, (Leishmune[®]) demonstrou funcionar como uma VBT. Embora o antígeno em questão tenha sido isolado de *L. donovani*, Leishmune[®] exibiu atividade de bloqueio de transmissão em flebotomíneo do Novo Mundo, *L. longipalpis*, quando infectado com *Leishmania infantum chagasi*. Os anticorpos produzidos em cães após a injeção de Leishmune[®], reduziram em 79,3% a carga parasitária em *L. longipalpis*, mesmo após 12 meses da imunização (Saraiva et al., 2006).

A utilização de moléculas de flebotomíneos como VBT foi contemplada após a caracterização de PpGalec, uma proteína do tipo galectina (ligação à galactose) localizada na superfície das células do intestino médio de *P. papatasi*. Essa proteína serve como um receptor para LPG de *L. major* (Kamhawi et al.,

2004). Curiosamente, flebotomíneos alimentados artificialmente com sangue de camundongo contendo amastigotas de *L. major* e misturado com soro de camundongos imunizados com PpGalec, apresentaram uma redução de 86% nos níveis de infecção no intestino médio. Além disso, nenhuma forma metacíclica (infeciosa) foi detectada nos insetos alimentados com soros anti-PpGalec (Kamhawi et al., 2004). Embora esse estudo tenha demonstrado claramente que o uso de antissoro bloqueia a ligação parasita-hospedeiro vetor, deve-se levar em consideração que o PpGalec não está presente no vetor *L. longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral nas Américas.

Em uma abordagem semelhante, o antissoro criado contra outra molécula de flebotomíneo, a quitinase PpChit1 de *P. papatasi*, inibiu a atividade quitinolítica do intestino médio do inseto *in vitro*, e foi capaz de diminuir significativamente a infecção desse vetor por *L. major* (Coutinho-Abreu et al., 2010).

Encontram-se em foco também componentes da saliva de *L. longipalpis* como, por exemplo, a hialuronidase, enzima que ajuda no recrutamento de neutrófilos e no estabelecimento da infecção no vertebrado. Além disso, foi descrita uma redução de 56% no sucesso da alimentação de flebotomíneos, indicando que proteínas salivares são candidatas promissoras a vacinas contra a infecção por *Leishmania* (Martin-Martin et al., 2018b).

Em última análise, a identificação de novos antígenos essenciais à função bloqueadora de transmissão pode ser importante para a concepção e construção de vacinas mais eficazes. A estratégia de VBT pode, inclusive, ser usada em conjunto com outras intervenções que contribuam para a eliminação do parasito, como vacinas que ataquem outras rotas e estágios do parasito, drogas e medidas de controle de vetores (Duffy, 2021).

Perspectivas

Atualmente, testes com potenciais candidatos a VBT vêm sendo feitos, especialmente contra a malária e a leishmaniose. O otimismo em relação às VBT é justificado pelo sucesso de, pelo menos, dois estudos recentes, sendo o primeiro a aprovação do antígeno Pvs25 de *Plasmodium vivax* como VBT em um teste humano de fase I. Outro exemplo é a vacina canina Leishmune®, que também foi capaz de produzir redução da transmissão, prevenindo o desenvolvimento de *L. infantum chagasi* em seu vetor natural, o flebotomíneo *L. longipalpis* (Malkin et al., 2005; Saraiva et al., 2006).

Um recente artigo (Garber, Vinetz, 2021) discute o valor das vacinas chamadas altruístas. A adesão a essas vacinas, além de oferecer proteção

individual, traz benefícios também aos não vacinados, através da imunidade de rebanho. O artigo expõe os efeitos de posições individualistas de alguns países, que prejudicam essas metas de proteção da população. Em seguida a essa discussão, os autores comentam sobre as tentativas de desenvolvimento de uma vacina bloqueadora de transmissão da malária, também considerada uma vacina altruísta. O aceite de vacinas em países como o Brasil, ainda pouco expostos a ideologias antivacina e com uma população acostumada a eficientes campanhas de vacinação, ainda é bastante grande.

Um estudo sobre a aceitação desse tipo de vacina foi feito por White et al. (2018), no qual se indagou a integrantes de uma população da Amazônia peruana, vivendo em região endêmica da malária, se estariam dispostos a tomar uma vacina que não lhes daria proteção individual, mas que protegeria a comunidade contra a malária. Nesse cenário, uma vacina que bloquearia a transmissão foi considerada quase universalmente aceitável, com mais de 99% de aprovação. Resultado similar seria esperado no Brasil, sugerindo aos formuladores de políticas, que, muitas vezes, descartam a ideia de vacinas altruístas, que as VBT são uma possibilidade realista de abordagem vacinal. Portanto, aliada a outras formas de controle de transmissão da leishmaniose, a ideia de desenvolver uma vacina bloqueadora de transmissão desta doença deveria permanecer em nosso radar e ser encarada como uma possibilidade robusta.

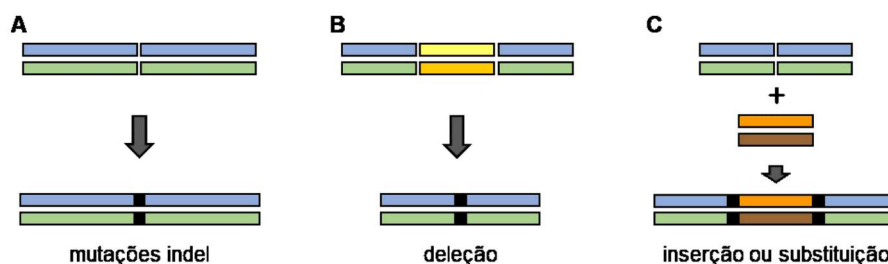
CRISPR

Background

Desde as primeiras descobertas sobre o código genético e sua íntima associação às características físicas e fisiológicas, foram desenvolvidas diversas formas de interferir e manipular a herança genética. Dentre as diversas motivações que promoveram inovações nessa direção, destacamos o real interesse em evitar doenças e promover o bem estar para nossa sociedade. Atualmente, o sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas – do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) – juntamente com a proteína-9 associada a CRISPR – do inglês, *CRISPR-associated protein 9* (Cas9) – é considerado uma das formas mais eficientes e rápidas de se editar o código genético (Gaj et al., 2013; Jinek et al., 2012). Nesta seção, abordaremos, de forma sucinta, os principais conceitos envolvidos na edição gênica, mais especificamente, o sistema CRISPR/Cas9, e sua potencial aplicação em flebotomíneos.

Um dos pontos de partida para iniciar um projeto de edição gênica é o conhecimento da sequência nucleotídica dos genes de interesse. Nesse sentido, as técnicas de sequenciamento, expressão e regulação gênica de larga escala propiciaram um grande avanço (McCarthy et al., 2008). Além disso, o desenvolvimento de métodos envolvendo o direcionamento homólogo possibilitaram fazer alterações na sequência nucleotídica de forma seletiva (Pardo et al., 2009). Essas estratégias baseiam-se em fatores de ligação que têm afinidade por uma sequência específica do DNA, associados a um complexo de clivagem não-específica de DNA (Kanchiswamy et al., 2016). Os fatores de ligação a DNA direcionam o sistema de clivagem a uma determinada região do genoma. Uma vez que o sistema de clivagem acopla a uma região definida, o sistema gera um corte da dupla hélice de DNA. Essa ruptura pode estimular mecanismos de reparo de DNA, através da união de extremidades não-homólogas – *non-homologous end joining* (NHEJ) (Figura 3 A-C) – ou por recombinação direcionada por homologia – *homology-directed repair* (HDR) (Figura 3 D-E) (Wyman, Kanaar 2006), permitindo, assim, a retirada ou a inativação de um gene (*knock-out*) e a inserção de um gene (*knock-in*).

União de extremidades não-homólogas – "non-homologous end joining" (NHEJ)



Recombinação direcionada por homologia – "homology-directed repair" (HDR)

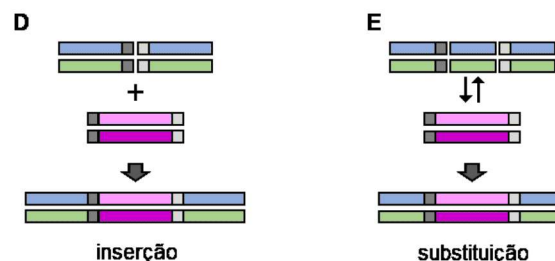


Figura 3: Mecanismos de NHEJ e HDR de reparo de DNA: retângulos coloridos representam segmentos de dupla fita de DNA; quadrados negros representam modificações resultantes do reparo de DNA; quadrados cinzas representam regiões homólogas. **A**, **B** e **C** representam possíveis resultados da via NHEJ. **D** e **E** representam possíveis resultados da via HDR.

Fonte: Arquivo pessoal

Uma das características que distinguem essas duas vias de reparo de DNA é a possível geração de erros em NHEJ, vindo a resultar na deleção ou inserção de algumas bases no local de corte, levando, assim, a uma mutação no DNA. Por outro lado, a HDR normalmente resulta em um reparo preciso, a partir da fita de DNA complementar (Kanchiswamy et al., 2016; Pardo et al., 2009; Wyman, Kanaar 2006).

O sistema CRISPR/Cas9 foi inicialmente identificado como um mecanismo de resposta antiviral em bactérias (Barrangou et al., 2007) e, posteriormente, como um potencial sistema de edição gênica (Jinek et al., 2012). As posteriores aplicações do sistema CRISPR/Cas9 demonstraram que ele não requer elaboradas etapas de engenharia molecular e que é menos oneroso do que as técnicas anteriores, que usam nucleases dedo de zinco –*zinc finger nucleases* (ZFNs) – e nucleases efectoras semelhantes à ativadores de transcrição –*transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) (Gaj et al., 2013).

Uma das primeiras nucleases Cas9 utilizadas em edição gênica foi extraída de *Streptococcus pyogenes* (Deltcheva et al., 2011). Atualmente, o sistema CRISPR/Cas9 mais comum utiliza a nuclease Cas9 do tipo II, que tem sua estrutura relativamente simples (Liu et al., 2020), e um RNA guia de fita simples –*single guide RNA* (sgRNA). Os vinte nucleotídeos na extremidade 5' do sgRNA direcionam o complexo Cas9/sgRNA a um local específico de DNA adjacente a um motivo protoespaçador –*protospacer adjacent motif* (PAM) – geralmente com sequência 5'-NGG-3' (Bolotin et al., 2005; Cencic et al., 2014) (Figura 4). Uma vez que o sistema Cas9/sgRNA se acopla ao sítio alvo, os domínios RuvC e HNH da Cas9 clivam as fitas de DNA (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012).

Sistema CRISPR/Cas9

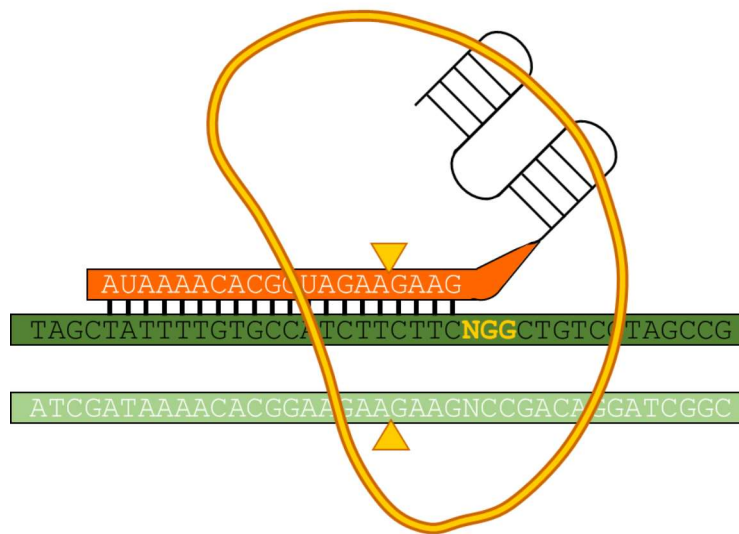


Figura 4: Sistemas de edição gênica CRISPR/Cas9: segmentos de dupla fita de DNA representados em retângulos verdes; sgRNA representado em retângulo laranja, seguido de linha preta; nuclease Cas9 representada em forma arredondada em amarelo; sequência PAM indicada em letras amarelas na sequência de DNA. O complexo Cas9/sgRNA se acopla à sequência de DNA-alvo e a nuclease cliva as fitas de DNA em dois sítios indicados por triângulos amarelos.

Fonte: Arquivo pessoal

A clivagem de DNA causada pelo sistema CRISPR/Cas9 ativa os mecanismos NHEJ ou HDR de reparo de DNA (Lin et al., 2014). Embora a probabilidade de ocorrer modificações fora dos alvos genéticos específicos seja mais baixa em CRISPR/Cas9 do que em RNAi, por exemplo, ainda assim é possível ocorrer alguns equívocos experimentais. O uso de ferramentas computacionais para projetar sgRNAs pode reduzir a probabilidade desses equívocos (Naito et al., 2015). Em muitos casos, vários sgRNAs podem ser necessários para editar um único gene, já que a quebra do DNA pode não ocorrer com um só sgRNA.

A técnica de CRISPR/Cas9 já foi aplicada em insetos vetores, como os mosquitos, como meio de controlar sua população sua capacidade de transmitir patógenos. Por exemplo, em *Aedes aegypti*, essa tecnologia foi utilizada para criar uma linhagem com a inativação (*knock-out*) do gene *Nix*, envolvido na determinação do sexo, resultando em machos feminilizados, e reduzindo potencialmente sua fertilidade (Hall et al., 2015). Em *Anopheles stephensi*, foi realizada a inserção de uma sequência de DNA (*knock-in*), contendo os genes m1C3 e m2A10, que codificam anticorpos com efeito antiplasmódio, provando,

assim, ser possível utilizar CRISPR/Cas9 para desenvolver uma linhagem resistente ao parasito (Gantz et al., 2015).

Já em *Anopheles gambiae*, três genes associados à fertilidade em fêmeas foram alvos de *knock-out*, de forma a produzir fêmeas homozigóticas estéreis ou heterozigóticas, com reduzida capacidade reprodutiva, resultando na supressão de uma população a níveis capazes de impossibilitar a transmissão de malária (Hammond et al., 2016). Além disso, a expressão de Cas9 foi utilizada em *An. gambiae* com o objetivo de fragmentar uma região de DNA ribossomal repetitiva do cromossomo X, resultando no aumento do número de machos em uma população (Galizi et al., 2016). Esses são alguns dos exemplos bem sucedidos de uso de edição gênica mediada por CRISPR-Cas9 em insetos vetores. Para uma maior compreensão sobre o histórico e a diversidade de aplicações desse sistema em artrópodes, recomendamos alguns trabalhos de revisão de literatura (Gantz, Akbari, 2018; Sun et al., 2017; Taning et al., 2017).

Mecanismo de edição gênica de CRISPR/Cas9 e sua aplicação em flebotomíneos

Em flebotomíneos, o uso do sistema CRISPR/Cas9 de edição gênica ainda está restrito a poucas tentativas. Existe uma dificuldade na manutenção de flebotomíneos em colônias de laboratório (Lawyer et al., 2017). Além disso, para o sucesso da estratégia de edição gênica, é necessário um número grande de insetos que produzam muitos ovos com embriões em estágio de desenvolvimento (Jeffries et al., 2018). Até o momento, dados de sequenciamento genômico estão disponíveis apenas para duas espécies: *L. longipalpis* e *P. papatasi* (Amos et al., 2022), o que reduz a aplicação em outras espécies desses insetos.

Um outro fator que exige especial atenção é a minuciosa técnica de microinjeção em ovos. O acesso aos embriões, dentro de ovos, é dificultado quando os ovos já estão melanizados e a cutícula externa (ou córion) está rígida, o que ocorre poucas horas após a oviposição (Jeffries et al., 2018; Martin-Martin et al., 2018a). Transpassá-la sem danificar os ovos ou mesmo as agulhas injetoras é um considerável desafio.

Apesar das limitações descritas, Jeffries et al., (2018) e Martin-Martin et al., (2018) estabeleceram protocolos detalhados para a coleta e a microinjeção de ovos de *L. longipalpis* destinados a experimentos de edição gênica. A escolha do sistema Cas9/sgRNA a ser utilizado nos experimentos de edição gênica depende, diretamente, da estratégia utilizada. Por exemplo, é possível injetar plasmídeos que codifiquem tanto a Cas9 como os sgRNA nos embriões, ou, até mesmo, injetar esses componentes previamente sintetizados *in vitro* (Sun et al., 2017).

Martin-Martin et al., (2018) sintetizaram Cas9 de *S. pyogenes* e sgRNA *in vitro*, projetados a partir do gene da proteína YELLOW de *L. longipalpis*. Nesse trabalho, é apresentada a clivagem *in vitro* de um produto de PCR, contendo uma região codificante do gene *yellow* (Martin-Martin et al., 2018a).

Em 2019, demonstrou-se, pela primeira vez, o *knock-out* mediado por CRISPR em flebotomíneos. Louradour et al., (2019) utilizaram ovos de *P. papatasi* de colônia para uma estratégia de *knock-out* do gene *relish*, codificante de um fator de transcrição envolvido na resposta imune mediada pela via de deficiência de imunidade –*immune deficiency* (IMD). Neste trabalho, foram utilizados: i) uma Cas9 recombinante, comercialmente disponível; e ii) sgRNAs sintetizados *in vitro* e injetados diretamente nos ovos de *P. papatasi* (Louradour et al., 2019). Um vídeo representativo das técnicas envolvidas nesse trabalho pode ser acessado no portal da Universidade de Maryland (EUA), produzido em um de seus institutos destinados à edição gênica (<https://www.ibbr.umd.edu/facilities/itf>).

Louradour et al. (2019) geraram linhagens mutantes detectáveis por PCR. Nesse trabalho, porém, não foi possível manter as linhagens homozigóticas *knock-out* de *relish* por muitas gerações. Como mencionado anteriormente, Relish é o fator de transcrição da via IMD (Hedengren et al., 1999; Tanji et al., 2007) e, muito provavelmente, esta mutação homozigótica não foi compatível com a abundante presença de microrganismos encontrados no ambiente de crescimento de larvas e no tubo digestivo desses insetos. No entanto, em experimentos de infecção artificial de gerações heterozigóticas, foi possível demonstrar que o *knock-out* de *relish* favoreceu o aumento tanto da carga bacteriana, como de *L. major*, quando comparados à linhagem selvagem, (Louradour et al., 2019).

O trabalho de Louradour et al., (2019) demonstra a factibilidade do uso do sistema CRISPR/Cas9 *in vivo* em flebotomíneos. Além disso, demonstra que o sistema imune do inseto está envolvido no controle de bactérias e de *L. major*. De fato, sabemos que infecções experimentais com parasitas do gênero *Leishmania* induzem uma resposta imunológica em flebotomíneos como, por exemplo, a expressão de defensinas (Boulanger et al., 2004; Kykalová et al., 2021; Telleria et al., 2013, 2021). Entretanto, ainda há muito a ser desvendado na complexa relação entre *P. papatasi*, *L. major* e a microbiota residente no intestino do flebotomíneo.

Perspectivas

A edição gênica mostrou-se viável e vantajosa em diversas espécies de insetos de interesse econômico ou relevantes para a saúde pública (Burt 2014; Tyagi et al., 2020). Por exemplo, para aumentar a produtividade do fio de seda a partir do desenvolvimento de novas linhagens de *Bombyx mori* (Xu et al., 2018), para suprimir uma população de *An. gambiae* (Kyrou et al., 2018), ou para reduzir a fertilidade de machos de *Ae. aegypti* (Chen et al., 2021). Esses são alguns dos exemplos promissores, com vantagens diretas para a economia e o bem estar da população.

A aplicação de edição gênica em flebotomíneos foi iniciada muito tempo depois de ser utilizada em outros modelos de estudos. Como apresentado, entre 2018 e 2019 foram publicados os primeiros resultados de edição gênica, aplicados a genes de *L. longipalpis* (Martin-Martin et al., 2018a) e *P. papatasi* (Louradour et al., 2019). Uma das dificuldades intrínsecas à aplicação da edição gênica mediada por CRISPR/Cas9 nesses insetos reside na dependência de realizar microinjeções em ovos, com diminutas proporções e delicadas estruturas.

Para um futuro próximo, talvez seja possível realizar procedimentos de edição gênica em fêmeas progenitoras, como no caso da técnica de transdução de conteúdo do ovário, mediada por receptor [*receptor-mediated ovary transduction of cargo* (ReMOT Control)], já aplicada a mosquitos, para direcionar Cas9 às células germinativas, sem necessidade de injetar ovos (Chaverra-Rodriguez et al., 2018). Outra alternativa mais recente, dedicada ao uso em fêmeas progenitoras, é chamada de *direct parental* CRISPR (DIPA-CRISPR). Essa técnica consiste em injetar o complexo Cas9/sgRNA adicionado a uma saponina, por exemplo, diretamente na hemocele do inseto, o que foi realizado com a barata *Blattella germanica* e com o besouro *Tribolium castaneum* (Shirai et al., 2022). A adaptação dessas técnicas ao modelo flebotomíneo e a outros insetos tem um grande potencial para otimizar o tempo e a manipulação dos insetos.

Devido à sua relevância ecológica, ressaltamos que a transferência de insetos geneticamente modificados criados em laboratórios para a natureza requer uma pesquisa mais detalhada, monitoramento e desenvolvimento de regulamentações específicas.

Esperamos motivar jovens pesquisadores e alunos entusiasmados a reunir esforços e a expandir o uso de CRISPR/Cas9, em flebotomíneos, e a avançar no desenvolvimento de novas estratégias moleculares, no combate à transmissão de patógenos.

Considerações finais

Vimos, anteriormente, que muitas abordagens alternativas estão sendo empregadas, com sucesso crescente, na tentativa de controlar a transmissão de doenças transmitidas por insetos. Esse sucesso é mais aparente em doenças que envolvem mosquitos, por várias razões. Uma delas é o número maior de grupos internacionais trabalhando com esses vetores, muito provavelmente devido à disponibilidade de apoio financeiro e à gravidade das doenças causadas, principalmente se considerado o número de mortes. Outro aspecto importante é a relativa facilidade de se trabalhar com mosquitos em laboratório. Em contraste e, como pudemos ver, ao longo desse texto, pouquíssima informação existe em relação aos flebotomíneos, vetores dos patógenos causadores de leishmaniose. Isso, em parte, se deve às dificuldades de se trabalhar com esses insetos e à pouca disponibilidade de insetários de flebotomíneos no mundo todo, com a decorrente exiguidade de grupos que enfrentam esse desafio. Entretanto, vários grupos estão determinados a seguir enfrentando esses desafios.

As abordagens vão desde alternativas ao uso indiscriminado de inseticidas, como o desenvolvimento de atraentes açucarados, contendo compostos deletérios ao inseto (Ferreira et al., 2022) e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas (Montenegro-Quiñonez et al., 2022), até as tecnologias mais sofisticadas, que foram abordadas nesse capítulo. Esta sintonia de esforços poderá levar a resultados exitosos no controle das leishmanioses.

Referências

- Abassi, R., Akhlaghi, M., Oshaghi, M. A., ... Mohtarami, F. (2019). Dynamics and Fitness Cost of Genetically Engineered *Enterobacter cloacae* Expressing Defensin for Paratransgenesis in *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 10(1), 1–6.
- Acquah, F. K., Adjah, J., Williamson, K. C., & Amoah, L. E. (2019). Transmission-Blocking Vaccines: Old Friends and New Prospects. *Infection and Immunity*, 87(6), e00775-18.
- Akuffo, H., Hultmark, D., Engstöm, A., Frohlich, D., & Kimbrell, D. (1998). *Drosophila* antibacterial protein, cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipathic peptides. *International Journal of Molecular Medicine*, 1(1), 77–82.
- Allaband, C., McDonald, D., Vázquez-Baeza, Y., ... Knight, R. (2019). Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 17(2), 218–230.
- American Chemical Society. (2009). Deciphering the Genetic Code - National Historic Chemical Landmark - American Chemical Society. Retrieved September 1, 2022, from <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/geneticcode.html>
- Amos, B., Aurrecochea, C., Barba, M., ... Zheng, J. (2022). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D898–D911.
- Angrisano, F., Sala, K. A., Da, D. F., ... Blagborough, A. M. (2017). Targeting the Conserved Fusion Loop of HAP2 Inhibits the Transmission of *Plasmodium berghei* and *falciparum*. *Cell Reports*, 21(10), 2868–2878.
- Asgari, M., Ilbeigikhamsehnejad, M., Rismani, E., Dinparast Djadid, N., & Raz, A. (2020). Molecular characterization of RNase III protein of *Asaia* sp. for developing a robust RNAi-based paratransgenesis tool to affect the sexual life-cycle of *Plasmodium* or *Anopheles* fitness. *Parasites & Vectors*, 13(1), 42.
- Attardo, G. M., Scolari, F., & Malacrida, A. (2020). Bacterial Symbionts of Tsetse Flies: Relationships and Functional Interactions Between Tsetse Flies and Their Symbionts. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 69, 497–536.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., ... Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
- Beard, C. B., Mason, P. W., Aksoy, S., Tesh, R. B., & Richards, F. F. (1992). Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Am J Trop Med Hyg*, 46(2), 195–200.

- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., ... Bulet, P. (2004). Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*, 72(12), 7140–7146.
- Briones Nieva, C. A., Cid, A. G., Romero, A. I., García-Bustos, M. F., Villegas, M., & Bermúdez, J. M. (2021). An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 221, 105988.
- Burt, A. (2014). Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369, 20130432.
- Cencic, R., Miura, H., Malina, A., ... Pelletier, J. (2014). Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Distal Sequences Engage CRISPR Cas9 DNA Target Cleavage. *PLOS ONE*, 9(10), e109213.
- Chaverra-Rodriguez, D., Macias, V. M., Hughes, G. L., ... Rasgon, J. L. (2018). Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing. *Nature Communications*, 9, 3008.
- Chen, J., Luo, J., Wang, Y., ... Montell, C. (2021). Suppression of female fertility in *Aedes aegypti* with a CRISPR-targeted male-sterile mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), e2105075118.
- Chichester, J. A., Green, B. J., Jones, R. M., ... Yusibov, V. (2018). Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*, 36(39), 5865–5871.
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., ... Dimopoulos, G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332(6031), 855–858.
- Coban, C., Philipp, M. T., Purcell, J. E., ... Kumar, N. (2004). Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations. *Infection and Immunity*, 72(1), 253–259.
- Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(13), 2303–2315.
- Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., & Ramalho-Ortigao, M. (2010). Targeting the Midgut Secreted PpChit1 Reduces *Leishmania major* Development in Its Natural Vector, the Sand Fly *Phlebotomus papatasi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e901.

Coutinho-Abreu, I. V., & Ramalho-Ortigao, M. (2010). Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(1), 1–12.

Cui C, Wang Y, Li Y, Sun P, Jiang J, ... Wang S. (2022). Expression of mosquito miRNAs in entomopathogenic fungus induces pathogen-mediated host RNA interference and increases fungal efficacy. *Cell Rep* 41(4),111527.

da Silva Gonçalves, D., Iturbe-Ormaetxe, I., Martins-da-Silva, A., ... Moreira, L. A. (2019). Wolbachia introduction into *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) cell lines and its effects on immune-related gene expression and interaction with *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*, 12(1), 33.

de Castro Neto, A. L., da Silveira, J. F., & Mortara, R. A. (2022). Role of Virulence Factors of Trypanosomatids in the Insect Vector and Putative Genetic Events Involved in Surface Protein Diversity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 807172.

De Vooght, L., Caljon, G., Stijlemans, B., De Baetselier, P., Coosemans, M., & Van Den Abbeele, J. (2012). Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody® in *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the tsetse fly. *Microbial Cell Factories*, 11, 23.

De Vooght, L., De Ridder, K., Hussain, S., ... Van Den Abbeele, J. (2022). Targeting the tsetse-trypanosome interplay using genetically engineered *Sodalis glossinidius*. *PLoS Pathogens*, 18(3), e1010376.

Dehghan, H., Mosa-Kazemi, S. H., Yakhchali, B., Maleki-Ravasan, N., Vatandoost, H., & Oshaghi, M. A. (2022). Evaluation of anti-malaria potency of wild and genetically modified *Enterobacter cloacae* expressing effector proteins in *Anopheles stephensi*. *Parasites & Vectors*, 15(1), 63.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., ... Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607.

Díaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D., & Rivas, L. (1998). The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 1(Pt 1), 453–460.

Dillon, R. J., el Kordy, E., Shehata, M., & Lane, R. P. (1996). The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 90(6), 669–673.

Dinglasan, R. R., Kalume, D. E., Kanzok, S. M., ... Jacobs-Lorena, M. (2007). Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13461–13466.

Dong, S., Dong, Y., Simões, M. L., & Dimopoulos, G. (2022). Mosquito transgenesis for malaria control. *Trends in Parasitology*, 38(1), 54–66.

Doumbo, O. K., Niaré, K., Healy, S. A., Sagara, I., & Duffy, P. E. (2018). Malaria Transmission-Blocking Vaccines: Present Status and Future Perspectives. In S. Manguin & V. Dev, eds., *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward*, IntechOpen, pp. 288–298.

Duffy, P. E. (2021). Transmission-Blocking Vaccines: Harnessing Herd Immunity for Malaria Elimination. *Expert Review of Vaccines*, 20(2), 185–198.

Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., ... Beard, C. B. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3274–3278.

El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., ... Nguewa, P. A. (2021). Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against Leishmania and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules*, 11(7), 984.

Fang, W., Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A. K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., & St. Leger, R. J. (2011). Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6020), 1074–1077.

Farrance, C. E., Chichester, J. A., Musiychuk, K., ... Yusibov, V. (2011). Antibodies to plant-produced Plasmodium falciparum sexual stage protein Pfs25 exhibit transmission blocking activity. *Human Vaccines*, 7 Suppl(SUPPL.), 191–198.

Ferreira, T. N., Brazil, R. P., McDowell, M. A., ... Genta, F. A. (2022). Effects of anti-Leishmania compounds in the behavior of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. *Pest Management Science*, 78(7), 2792–2805.

Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405.

Galizi, R., Hammond, A., Kyrou, K., ... Crisanti, A. (2016). A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Sci Rep*, 6, 31139.

Gantz, V. M., & Akbari, O. S. (2018). Gene Editing Technologies and Applications for Insects. *Current Opinion in Insect Science*, 28, 66–72.

Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., ... James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), E6736–E6743.

Garber, L., & Vinetz, J. M. (2021). Transmission-Blocking Preventive Measures for Infectious Diseases: Altruism, Solidarity, and the Common Good. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(5), 1609–1610.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586.

Goodman, A. G., Bautista, J., Sanctis, D., ... Kishore, U. (2022). Host-Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies. *Immuno*, 2(1), 218–254.

Gouveia, C., Asensi, M. D., Zahner, V., Rangel, E. F., & Oliveira, S. M. (2008). Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol*, 37(5), 597–601.

Grogan, C., Bennett, M., & Lampe, D. J. (2022). An evaluation of fusion partner proteins for paratransgenesis in *Asaia bogorensis*. *PLoS One*, 17(9), e0273568.

Guttery, D. S., Zeeshan, M., Ferguson, D. J. P., Holder, A. A., & Tewari, R. (2022). Division and Transmission: Malaria Parasite Development in the Mosquito. *Annual Review of Microbiology*, 76(1), 113–134.

Hall, A. B., Basu, S., Jiang, X., ... Tu, Z. (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 348(6240), 1268–1270.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., ... Nolan, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*, 34(1), 78–83.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M. S., ... Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell*, 4(5), 827–837.

Huang, W., Wang, S., & Jacobs-Lorena, M. (2020). Self-limiting paratransgenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), e0008542.

Hurwitz, I., Hillesland, H., Fieck, A., Das, P., & Durvasula, R. (2011). The paratransgenic sand fly: a platform for control of *Leishmania* transmission. *Parasit Vectors*, 4, 82.

Institute of Medicine (US) Committee on Assessing Interactions Among Social, Behavioral, and G. F. in H. (2006). Genetics and Health. In L. M. Hernandez & D. G. Blazer, eds., *Genes, Behavior, and the Social Environment: Moving Beyond the Nature/Nurture Debate*, Washington, DC: National Academies Press (US). doi:10.17226/11693

Jeffries, C. L., Rogers, M. E., & Walker, T. (2018). Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly embryo microinjection: The first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis. *Wellcome Open Res*, 3, 55.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., ... Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3), 329–341.

Kamtchum-Tatuene, J., Makepeace, B. L., Benjamin, L., Baylis, M., & Solomon, T. (2017). The potential role of Wolbachia in controlling the transmission of emerging human arboviral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(1), 108–116.

Kanchiswamy, C. N., Maffei, M., Malnoy, M., Velasco, R., & Kim, J. S. (2016). Fine-Tuning Next-Generation Genome Editing Tools. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 562–574.

Karimian, F., Koosha, M., Choubdar, N., & Oshaghi, M. A. (2022). Comparative analysis of the gut microbiota of sand fly vectors of zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) in Iran; host-environment interplay shapes diversity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(7), e0010609.

Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C., ... Miller, L. H. (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, 333(6168), 74–76.

Keller, C. M., Kendra, C. G., Bruna, R. E., Craft, D., & Pontes, M. H. (2021). Genetic Modification of Sodalis Species by DNA Transduction. *MSphere*, 6(1), e01331-20.

Klingelhöfer, D., Braun, M., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2022). Neonicotinoids: A critical assessment of the global research landscape of the most extensively used insecticide. *Environmental Research*, 213, 113727.

Kongkasuriyachai, D., Bartels-Andrews, L., Stowers, A., ... Kumar, N. (2004). Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding Plasmodium vivax transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 - Evaluation of homologous and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy. *Vaccine*, 22(23–24), 3205–3213.

Kubler-Kielb, J., Majadly, F., Wu, Y., ... Schneerson, R. (2007). Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to Plasmodium falciparum elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 293–298.

Kykalová, B., Tichá, L., Volf, P., & Telleria, E. L. (2021). Phlebotomus papatasi Antimicrobial Peptides in Larvae and Females and a Gut-Specific Defensin Upregulated by Leishmania major Infection. *Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 2307*, 9(11), 2307.

Kyrou, K., Hammond, A. M., Galizi, R., ... Crisanti, A. (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged Anopheles gambiae mosquitoes. *Nature Biotechnology*, 36(11), 1062–1071.

Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E., & Volf, P. (2017). Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24, 42.

- Lee, M. H., Medina Munoz, M., & Rio, R. V. M. (2022). The Tsetse Metabolic Gambit: Living on Blood by Relying on Symbionts Demands Synchronization. *Frontiers in Microbiology*, 13, 905826.
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *ELife*, 3, e04766.
- Liu, P., Li, X., Gu, J., ... Chen, X. (2016). Development of non-defective recombinant dengue virus vectors for microRNA delivery in the invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 6, 20979.
- Liu, P. W., Xu, J. B., Dong, Y. Q., Chen, X. G., & Gu, J. B. (2017). Use of a Recombinant Mosquito Dengue Virus As a Gene Delivery Vector for the Functional Analysis of Genes in Mosquito Larvae. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (128), 56121.
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19, 172.
- Louradour, I., Ghosh, K., Inbar, E., & Sacks, D. L. (2019). CRISPR/Cas9 mutagenesis in *Phlebotomus papatasi*: The immune deficiency pathway impacts vector competence for *Leishmania major*. *MBio*, 10(4), e01941-19.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M. A., Hajikhani, S., ... Afshar, D. (2014). Aerobic Microbial Community of Insectary Population of *Phlebotomus papatasi*. *J Arthropod Borne Dis*, 8(1), 69–81.
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., ... Saul, A. (2005). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, 23(24), 3131–3138.
- Martin-Martin, I., Aryan, A., Meneses, C., Adelman, Z. N., & Calvo, E. (2018a). Optimization of sand fly embryo microinjection for gene editing by CRISPR/Cas9. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(9), e0006769.
- Martin-Martin, I., Chagas, A. C., Guimaraes-Costa, A. B., ... Calvo, E. (2018b). Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog*, 14(5), e1007006.
- Masson, F., Schüpfer, F., Jollivet, C., & Lemaitre, B. (2020). Transformation of the *Drosophila* Sex-Manipulative Endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* and Persisting Hurdles for Functional Genetic Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14), e00835-20.
- Mathias, D. K., Plieskatt, J. L., Armistead, J. S., ... Dinglasan, R. R. (2012). Expression, Immunogenicity, Histopathology, and Potency of a Mosquito-Based Malaria Transmission-Blocking Recombinant Vaccine. *Infect Immun*, 80(4), 1606–1614.

- McCarthy, M. I., Abecasis, G. R., Cardon, L. R., ... Hirschhorn, J. N. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews Genetics* 2008 9:5, 9(5), 356–369.
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, 107(1), 7–14.
- Miura, K., Takashima, E., Deng, B. B., ... Tsuboi, T. (2013). Functional comparison of Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect Immun*, 81(12), 4377–4382.
- Molina-Cruz, A., Canepa, G. E., Kamath, N., ... Carolina Barillas-Mury. (2015). Plasmodium evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), 15178–15183.
- Montenegro-Quiñonez, C. A., Buhler, C., Horstick, O., Runge-Ranzinger, S., & Rahman, K. M. (2022). Efficacy and community-effectiveness of insecticide treated nets for the control of visceral leishmaniasis: A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(3), e0010196.
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., ... O'Neill, S. L. (2009). A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268–1278.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7), 1120–1123.
- Nogradio, K., Adisakwattana, P., & Reamtong, O. (2022). Antimicrobial peptides: On future antiprotozoal and anthelmintic applications. *Acta Tropica*, 235, 106665.
- Nyasembe VO, Hamerly T, López-Gutiérrez B, ... Dinglasan RR. (2023). Adipokinetic hormone signaling in the malaria vector Anopheles gambiae facilitates Plasmodium falciparum sporogony. *Commun. Biol.* 13(1), 171.
- Omondi, Z. N., & Demir, S. (2021). Bacteria composition and diversity in the gut of sand fly: impact on Leishmania and sand fly development. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 25–32.
- Papadopoulos, C., Karas, P. A., Vasileiadis, S., ... Karpouzas, D. G. (2020). Host Species Determines the Composition of the Prokaryotic Microbiota in Phlebotomus Sandflies. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(6), 428.
- Pardo, B., Gómez-González, B., & Aguilera, A. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009 66:6, 66, 1039–1056.
- Patiño-Márquez, I. A., Patiño-González, E., Hernández-Villa, L., Ortíz-Reyes, B., & Manrique-Moreno, M. (2018). Identification and evaluation of Galleria mellonella peptides with antileishmanial activity. *Analytical Biochemistry*, 546, 35–42.

Patra, K. P., Li, F., Carter, D., ... Vinetz, J. M. (2015). Alga-produced malaria transmission-blocking vaccine candidate Pfs25 formulated with a human use-compatible potent adjuvant induces high-affinity antibodies that block *Plasmodium falciparum* infection of mosquitoes. *Infection and Immunity*, 83(5), 1799–1808.

Patterson, E. I., Kautz, T. F., Contreras-Gutierrez, M. A., ... Forrester, N. L. (2021). Negeviruses Reduce Replication of Alphaviruses during Coinfection. *Journal of Virology*, 95(14), e0043321.

Pereira, A. V., de Barros, G., Pinto, E. G., ... Barraviera, B. (2016). Melittin induces in vitro death of *Leishmania (Leishmania) infantum* by triggering the cellular innate immune response. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(1). doi:10.1186/S40409-016-0055-X

Pérez-Cordero, J. J., Lozano, J. M., Cortés, J., & Delgado, G. (2011). Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides*, 32(4), 683–690.

Pinto, E. G., Pimenta, D. C., Antoniazzi, M. M., Jared, C., & Tempone, A. G. (2013). Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 135(4), 655–660.

Pinto, S. B., Riback, T. I. S., Sylvestre, G., ... Moreira, L. A. (2021). Effectiveness of *Wolbachia*-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other *Aedes*-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), e0009556.

Rasgon, J. L. (2011). Using infections to fight infections: paratransgenic fungi can block malaria transmission in mosquitoes. *Future Microbiol*, 6(8), 851–853.

Ratcliffe, N. A., Furtado Pacheco, J. P., Dyson, P., ... Mello, C. B. (2022). Overview of paratransgenesis as a strategy to control pathogen transmission by insect vectors. *Parasites & Vectors*, 15(1), 112.

Ren, X., Hoiczyk, E., & Rasgon, J. L. (2008). Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 4(8), e1000135.

Reshetnikov, V. V., Chirinskaite, A. V., Sopova, J. V., Ivanov, R. A., & Leonova, E. I. (2022). Translational potential of base-editing tools for gene therapy of monogenic diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 942440.

Ricroch, A. E., Martin-Laffon, J., Rault, B., Pallares, V. C., & Kuntz, M. (2022). Next biotechnological plants for addressing global challenges: The contribution of transgenesis and new breeding techniques. *New Biotechnology*, 66, 25–35.

Rocha, E. M., Marinotti, O., Serrão, D. M., ... Tadei, W. P. (2021). Culturable bacteria associated with *Anopheles darlingi* and their paratransgenesis potential. *Malaria Journal*, 20(1), 40.

- Sagara, I., Healy, S. A., Assadou, M. H., ... Duffy, P. E. (2018). Safety and immunogenicity of Pfs25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(9), 969–982.
- Saldaña, M. A., Hegde, S., & Hughes, G. L. (2017). Microbial control of arthropod-borne disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(2), 81–93.
- Santos, F. A., Cruz, G. S., Vieira, F. A., ... Souza, P. F. N. (2022). Systematic review of antiprotozoal potential of antimicrobial peptides. *Acta Tropica*, 236, 106675.
- Saraiva, E. M., Barbosa, A. D. F., Santos, F. N., ... Palatnik-De-Sousa, C. B. (2006). The FML-vaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24(13), 2423–2431.
- Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Hisaeda, H., ... Torii, M. (2003). Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates pvs25 and pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(5), 536–541.
- Saul, A., Hensmann, M., Sattabongkot, J., ... Thomas, A. W. (2007). Immunogenicity in rhesus of the *Plasmodium vivax* mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720. *Parasite Immunology*, 29(10), 525–533.
- Schlein, Y., Polacheck, I., & Yuval, B. (1985). Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*, 90 (Pt 1), 57–66.
- Shane, J. L., Grogan, C. L., Cwalina, C., & Lampe, D. J. (2018). Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota. *Nature Communications*, 9(1), 4127.
- Shirai, Y., Piulachs, M. D., Belles, X., & Daimon, T. (2022). DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing. *Cell Reports Methods*, 2(5), 100215.
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, 19(6), 715–728.
- Stowers, A. W., Keister, D. B., Muratova, O., & Kaslow, D. C. (2000). A region of *Plasmodium falciparum* antigen Pfs25 that is the target of highly potent transmission-blocking antibodies. *Infection and Immunity*, 68(10), 5530–5538.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y., & Zhang, Y. (2017). Progress and Prospects of CRISPR/Cas Systems in Insects and Other Arthropods. *Front Physiol*, 8, 608.
- Tabbabi, A., Watanabe, S., Mizushima, D., ... Kato, H. (2020). Comparative Analysis of Bacterial Communities in *Lutzomyia ayacuchensis* Populations with Different Vector Competence to *Leishmania* Parasites in Ecuador and Peru. *Microorganisms*, 9(1), 68.

- Talaat, K. R., Ellis, R. D., Hurd, J., ... Duffy, P. E. (2016). Safety and Immunogenicity of Pfs25-EPA/Alhydrogel(R), a Transmission Blocking Vaccine against *Plasmodium falciparum*: An Open Label Study in Malaria Naive Adults. *PLoS One*, 11(10), e0163144.
- Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., & Smagghe, G. (2017). CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *J Insect Physiol*, 98, 245–257.
- Tanji, T., Hu, X. D., Weber, A. N. R., & Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 27(12), 4578–4588.
- Telleria, E. L., Martins-Da-Silva, A., Tempone, A. J., & Traub-Cseko, Y. M. (2018). Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10), 1336–1353.
- Telleria, E. L., Sant'Anna, M. R. V., Alkurbi, M. O., Pitaluga, A. N., Dillon, R. J., & Traub-Csekö, Y. M. (2013). Bacterial feeding, Leishmania infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites and Vectors*, 6, 12.
- Telleria, E. L., Tinoco-Nunes, B., Leštínová, T., ... Traub-Csekö, Y. M. (2021). *Lutzomyia longipalpis* Antimicrobial Peptides: Differential Expression during Development and Potential Involvement in Vector Interaction with Microbiota and Leishmania. *Microorganisms*, 9(6), 1271.
- Thomaz-Soccol, V., Ferreira da Costa, E. S., Karp, S. G., Junior Letti, L. A., Soccol, F. T., & Soccol, C. R. (2017). Recent Advances in Vaccines Against Leishmania Based on Patent Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 12(1), 21–32.
- Tonui, W. K., Mbatii, P. A., Anjili, C. O., ... Koech, D. K. (2001). Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: I. Lipophosphoglycan is a promising transmission blocking vaccine molecule against cutaneous leishmaniasis. *East African Medical Journal*, 78(2), 84–89.
- Tsakeng, C. U. B., Tanekou, T. T. M., Soffack, S. F., ... Wondji, C. S. (2022). Assessing the Tsetse Fly Microbiome Composition and the Potential Association of Some Bacteria Taxa with Trypanosome Establishment. *Microorganisms*, 10(6), 1141.
- Tyagi, S., Kesiraju, K., Saakre, M., ... Sreevathsa, R. (2020). Genome editing for resistance to insect pests: An emerging tool for crop improvement. *ACS Omega*, 5(33), 20674–20683.
- van Schaijk, B. C. L., van Dijk, M. R., van de Vegte-Bolmer, M., ... Sauerwein, R. W. (2006). Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(2), 216–222.

- Velázquez, E., Al-Ramahi, Y., Tellechea-Luzardo, J., Krasnogor, N., & De Lorenzo, V. (2021). Targetron-Assisted Delivery of Exogenous DNA Sequences into *Pseudomonas putida* through CRISPR-Aided Counterselection. *ACS Synthetic Biology*, 10(10), 2552–2565.
- Velázquez, E., Al-Ramahi, Y., & de Lorenzo, V. (2022). CRISPR/Cas9-enhanced Targetron Insertion for Delivery of Heterologous Sequences into the Genome of Gram-Negative Bacteria. *Current Protocols*, 2(9), e532.
- Velez, R., & Gállego, M. (2020). Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine & International Health*, 25(5), 540–557.
- Vivero-Gomez, R. J., Castañeda-Monsalveid, V. A., Atencia, M. C., ... Moreno-Herrera, C. X. (2021). Molecular phylogeny of heritable symbionts and microbiota diversity analysis in phlebotominae sand flies and *Culex nigripalpus* from Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(12), e0009942.
- Vivero, R. J., Villegas-Plazas, M., Cadavid-Restrepo, G. E., Herrera, C. X. M., Uribe, S. I., & Junca, H. (2019). Wild specimens of sand fly phlebotomine *Lutzomyia evansi*, vector of leishmaniasis, show high abundance of *Methylobacterium* and natural carriage of *Wolbachia* and *Cardinium* types in the midgut microbiome. *Scientific Reports*, 9(1), 17746.
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonckt, T. W., & Broeck, J. Vanden. (2019). RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. *Frontiers in Physiology*, 9, 1912.
- Volf, P., Kiewegová, A., & Nemeč, A. (2002). Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboseqi* (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica*, 49(1), 73–77.
- Vreysen, M. J. B., Abd-Alla, A. M. M., Bourtzis, K., ... Pereira, R. (2021). The Insect Pest Control Laboratory of the Joint FAO/IAEA Programme: Ten Years (2010–2020) of Research and Development, Achievements and Challenges in Support of the Sterile Insect Technique. *Insects 2021, Vol. 12, Page 346*, 12(4), 346.
- Wang, J., Gou, Q., Luo, G., Hou, X., Liang, G., & Shi, M. (2022). Total RNA sequencing of *Phlebotomus chinensis* sandflies in China revealed viral, bacterial, and eukaryotic microbes potentially pathogenic to humans. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 2080–2092.
- Wang, S., Dos-Santos, A. L. A., Huang, W., ... Jacobs-Lorena, M. (2017). Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6358), 1399–1402.
- Wang, S., Ghosh, A. K., Bongio, N., Stebbings, K. A., Lampe, D. J., & Jacobs-Lorena, M. (2012). Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12734–12739.

Werling, K. L., Johnson, R. M., Metz, H. C., & Rasgon, J. L. (2022). Sexual transmission of *Anopheles gambiae* densovirus (AgDNV) leads to disseminated infection in mated females. *Parasites & Vectors*, 15(1), 218.

White, S. E., Harvey, S. A., Meza, G., ... Vinetz, J. M. (2018). Acceptability of a herd immunity-focused, transmission-blocking malaria vaccine in malaria-endemic communities in the Peruvian Amazon: An exploratory study. *Malaria Journal*, 17, 179.

Wilke, A. B., & Marrelli, M. T. (2015). Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit Vectors*, 8, 342.

Williamson, K. C., Criscio, M. D., & Kaslow, D. C. (1993). Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58(2), 355–358.

World Health Organization. (2022). Leishmaniasis. Retrieved September 1, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well. *Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Genet.40.110405.090451*, 40, 363–383.

Xu, J., Dong, Q., Yu, Y., ... Tan, A. (2018). Mass spider silk production through targeted gene replacement in *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(35), 8757–8762.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 24

Tecnologia do RNA interferente no controle de insetos: aplicações, mecanismos e desafios

Brenda Martins Vasconcellos¹
Victor Guimarães Ribeiro¹
Mônica Ferreira Moreira¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Copyright: © 2024 [Brenda Martins Vasconcellos, Victor Guimarães Ribeiro, Mônica Ferreira Moreira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

O silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi) é um sofisticado mecanismo regulatório pós-transcricional que ocorre em organismos eucariotos, tendo um papel importante na regulação da expressão gênica e na defesa contra vírus e *transposons* (Baulcombe, 2002; Bonning, Saleh, 2021). Esse mecanismo foi observado, pela primeira vez, por Napoli, Lemieux e Jorgensen (1990), através da introdução de um gene quimérico de *chalcona sintase*, enzima chave na biossíntese de antocianinas, com o objetivo de superexpressar esse gene para intensificar a coloração violeta de petúnias. Entretanto, foi visualizado o efeito contrário, visto que ocorreu o bloqueio na biossíntese do pigmento, de modo que as flores se tornaram variegadas ou totalmente brancas. O mecanismo responsável por esse fenótipo não estava claro, mas foi chamado, pelos autores, de cossupressão.

Fire et al. (1998) descobriram, no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, que a dupla fita de RNA (dsRNA) do gene *unc22*, responsável pela contração muscular, potencializava a interferência, diminuindo ou interrompendo a transcrição do mRNA endógeno. Observou-se, ainda, que nos organismos nos quais o dsRNA foi injetado, os nematódeos apresentaram mudanças fenotípicas, como a movimentação desordenada, devido à atividade de interferência dos dsRNA, corroborando com os resultados de Napoli, Lemieux e Jorgensen (1990). Os autores também cunharam o nome de RNAi para o mecanismo de RNA interferente. Posteriormente, esse fenômeno também foi observado em outros grupos de organismos, como no parasita *Trypanosoma brucei* (Ngo et al., 1998) e na mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (Kennerdell, Carthew, 1998).

Vias de RNAi

Os insetos, assim como outros organismos eucarióticos, apresentam três principais vias de RNAi, que são mecanismos imunes contra infecções virais. São elas: a via do microRNA (miRNA), a do Piwi-interação com RNA (piRNA) e a via do pequeno RNA interferente (siRNA- do inglês, *small interfering RNA*). O ponto comum entre essas vias é a presença de uma pequena molécula de RNA, produzida pela família das proteínas Argonautas, capaz de silenciar o RNA-alvo de uma rota metabólica (Zhu & Palli, 2020; Bonning, Saleh, 2021).

Na via do microRNA, os transcritos têm origem em *locus* endógenos pela ação da RNA polimerase II (Lee et al., 2004a) e são chamados miRNAs primários, moléculas altamente estruturadas, que são clivadas pela enzima Drosha em

hairpins de aproximadamente 60 nucleotídeos (nt), denominados miRNAs precursores (Lee et al., 2003). Esses precursores são exportados para o citoplasma e clivados pela enzima RNase-III Dicer-1 (*dcr1*) para formar uma dupla fita de miRNA (Lee et al., 2004b; Lund et al., 2004). Uma das fitas dessa dupla fita é carregada no complexo silenciador Argonauta-1 (*Ago1*) e, assim, o miRNA dentro do complexo induz o silenciamento. Os miRNA maduros têm aproximadamente 22 nts e, em insetos, eles direcionam o silenciamento de alvos endógenos pelo pareamento imperfeito de bases (Bartel, 2009), ocorrendo repressão translacional (Iwakawa, Tomari, 2015).

O potencial antiviral de miRNA em insetos tem sido pouco estudado. Nos mamíferos, os miRNA são conhecidos por exercerem efeitos antivirais ao direcionar as alterações transcricionais, que resultam em um estado desfavorável para a replicação do vírus. Mais raramente, foi relatado que miRNA de mamíferos podem direcionar diretamente o RNA viral (Cullen, 2011). Embora a infecção por vírus em insetos seja conhecida por alterar a abundância de alguns miRNA dos hospedeiros, de modo temporal e tecido específico, os efeitos que tais mudanças têm sobre a replicação do vírus não foram ainda elucidados (Monsanto-Hearne, Johnson, 2018).

A via piRNA é o principal mecanismo de repressão de elementos de transposição (TE) na linhagem germinativa animal (Czech, Hannon, 2016). Nessas células, o mecanismo de regulação pós-transcricional é mais bem descrito em *D. melanogaster* e em humanos, mas possui algumas semelhanças com o que ocorre em células somáticas. Neste caso, o RNAi é denominado de piRNA (Piwi-interação-RNAs). A biogênese do piRNA é classicamente dividida em vias primária e secundária (Brennecke et al., 2007).

Na via piRNA primária de *D. melanogaster*, *loci* genômicos dão origem a transcritos de precursores de piRNA longos, que são exportados para o citoplasma e fragmentados pela enzima Zucchini endonuclease (*Zuc*) em piRNA precursores (Brennecke et al., 2007; Nishimasu et al., 2012). Os piRNA precursores são, então, carregados em proteínas Piwi ou Aubergina (*Aub*), e suas extremidades 3' são aparadas, resultando em piRNAs primários maduros de 26-32 nts (Brennecke et al., 2007; Ipsaro et al., 2012; Sato, Siomi, 2020). Assim, o *pool* de piRNA primários contém uma abundância de piRNA específicos para TE (Brennecke et al., 2007).

A via secundária do piRNA é produzida somente em células germinativas, por meio de um mecanismo de amplificação chamado de pingue-pongue (Brennecke et al., 2007). Nesse mecanismo, os piRNA primários ou de origem materna são necessários para iniciar a via, uma vez que os piRNA antisense

precisam ser ligados às proteínas Piwi ou Aub. Quando esse complexo (piRNA-proteína) é formado, ele é capaz de degradar transcritos complementares (no sentido senso) de TE, que, provavelmente, estavam ativos no genoma. Essa clivagem produz, então, transcritos de piRNA senso, os quais são ligados à proteína Argonauta 3 (Ago3), que degradam transcritos antissenso de TE, levando, então, ao mecanismo de amplificação do tipo pingue-pongue. Adicionalmente, em tecidos germinativos de *Drosophila* sp. foi verificado que os complexos Piwi-piRNA também são capazes de reprimir a transcrição de TE por modificação do estado da cromatina (Iwasaki et al., 2016). Assim, o ciclo de pingue-pongue é formado por uma série de eventos de clivagem recíproca, que serve como mecanismo de silenciamento pós-transcricional e amplifica a resposta baseada em piRNA contra TE ativos (Brennecke et al., 2007).

Os piRNA são diferenciados de outros tipos de pequenos RNA por seu tamanho (26-32 nts). Curiosamente, piRNA dependentes de pingue-pongue (piRNA) derivados de vírus estão presentes durante a infecção de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, com vários vírus de fita simples de RNA (Miesen, Joosten & Van Rij, 2016), bem como em linhagens celulares derivadas dessas espécies. Os piRNA derivados de um vírus de DNA de fita simples também foram observados durante a infecção de células Aag2, derivadas de *A. aegypti* (Parry et al., 2019). Ao contrário de *D. melanogaster*, que expressa apenas três proteínas Argonauta do clado Piwi (Aub, Ago3 e Piwi), *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* expressam oito proteínas (Ago3 e Piwi1–7) (Campbell et al., 2008).

Na via do RNAi dirigida pelo siRNA, o silenciamento começa pelo reconhecimento de uma dsRNA de vírus de origem citoplasmática, que é clivada pela enzima RNase-III Dicer-2 (Dcr2) (Bernstein et al., 2001). As pequenas duplas fitas resultantes têm, aproximadamente, 21 nts (Santos et al., 2019), contendo 19 nts pareados com bases flanqueadas por saliências de 2-3 nts (Elbashir, Lendeckel, Tuschl, 2001). A fita antissenso ou guia do pequeno fragmento de nucleotídeo é associada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), enquanto a fita senso é degradada (Martinez et al., 2002; Rand et al., 2005). A fita guia é, subsequentemente, metilada na posição 2-O, no fim da extremidade 3', pela enzima DmHen1 metiltransferase, para formar um complexo RISC maduro (Förstemann et al., 2007). A proteína Argonauta-2 (Ago2) é o núcleo catalítico do RISC e se liga de forma estável à fita guia dentro complexo proteico, por meio de interações entre as extremidades 3' e 5' da fita guia e dos domínios de Ago2, PAZ e MID, respectivamente (Cenik, Zamore, 2011).

Os siRNA ligados à Ago2 guiam o complexo RISC para os RNA complementares no citoplasma. A clivagem por Ago2 é sequência-específica e

requer o pareamento perfeito de bases entre 2–21 nts da fita guia (Ma et al., 2005). Após o reconhecimento do alvo, Ago2 catalisa a clivagem de RNA alvo entre 10 e 11 nts, medidos a partir da extremidade 5' do siRNA guia (Elbashir et al., 2001; Rand et al., 2004). As moléculas de RNA são rapidamente degradadas através da atividade das enzimas exoribonuclease XRN1 e da exosoma (Orban & Izaurralde, 2005). Os vírus de RNA de fita simples (ssRNA), dsRNA, DNA de fita simples e DNA de fita dupla são todos direcionados para a via siRNA em insetos (Van Rij et al., 2006; Zambon, Vakharia, Wu, 2006; Bronkhorst et al., 2012; Mueller et al., 2010; Parry et al., 2019).

Captura de dsRNA

O RNAi pode ser classificado em RNAi autônomo celular, em que o silenciamento gênico limita-se à célula onde a molécula silenciadora foi inserida ou expressa, ou RNAi autônomo não-celular, quando o efeito do silenciamento é experimentado em células/tecidos diferentes do local de inserção ou expressão da molécula de dsRNA. Este último subdivide-se em: RNAi sistêmico e RNAi ambiental (Huvenne, Smagghe, 2010).

O RNAi ambiental pode ser definido como o modo pelo qual a molécula de dsRNA presente no ambiente é absorvida por uma célula. Assim, subentende-se que esse processo também ocorra em organismos unicelulares. Em contrapartida, o RNAi sistêmico acontece obrigatoriamente apenas em organismos multicelulares, uma vez que o sinal de silenciamento é espalhado de uma célula para a outra ou de um tecido para o outro (Huvenne, Smagghe, 2010).

O mecanismo de captação mediado por canais transmembrana é bem elucidado em *C. elegans*. Durante a alimentação, o dsRNA é adquirido e, em seguida, o alimento é absorvido pelo lúmen do intestino. O dsRNA absorvido, bem como os sinais de silenciamento, são espalhados de maneira sistêmica para outras células e tecidos (Whangbo, Hunter, 2008). O mecanismo por trás deste RNAi sistêmico não era conhecido, até que Winston (2002) descobriu que o gene *sid-1* codifica uma proteína transmembrana (SID-1), necessária para o RNAi sistêmico, localizada na periferia da célula.

Neste trabalho, foi inferido que SID-1 poderia atuar como uma espécie de canal para dsRNA e siRNA, e, além disso, possivelmente funcionaria como um receptor, envolvido na endocitose do sinal sistêmico de RNAi. Feinberg & Hunter (2003) confirmaram que SID-1 faz a mediação do processo de internalização do dsRNA. Também foi observado que SID-1 transporta dsRNA de modo passivo para as células; portanto, este transporte não poderia ser feito por bombas de íons

ou por fagocitose e endocitose e, possivelmente, ocorreria por difusão. Posteriormente, Winston et al. (2007) identificaram e caracterizaram o gene *sid-2*, que é importante para a captação do dsRNA ambiental, mas, diferentemente de *sid-1*, não é relevante para a disseminação do dsRNA entre as células e tecidos. Também foi verificado que a proteína SID-2 é expressa no lúmen intestinal e os resultados observados indicaram que SID-2 permite a importação de dsRNA do lúmen intestinal.

Outro mecanismo descrito é de captação mediado por endocitose, bem elucidado no inseto-modelo *D. melanogaster*. Saleh et al. (2006) identificaram as vias de captura de dsRNA nas células de Schneider (S2) de *D. melanogaster*, através de uma triagem funcional por todo o genoma. Neste trabalho, foram encontrados os genes *clathrin heavy chain (Chc)* e seu adaptador AP-50, ambos responsáveis por mediar a captação endocítica precoce. Além disso, foram identificados outros genes envolvidos no controle do tráfego de vesículas endocíticas. Esse achado gerou a hipótese de que o dsRNA exógeno pode ser inserido na via do RNAi, por meio da rede de vesículas intracelulares. Em complemento, foi realizada uma abordagem farmacológica para testar o efeito de inibidores de mecanismos de captação celular no silenciamento de RNAi, verificando-se que a V-H-ATPase é crucial para a entrada de dsRNA e para o silenciamento em células S2 de *D. melanogaster*.

Os resultados de Ulvila et al. (2006) indicaram que os fragmentos de dsRNA são inseridos nas células S2 de *D. melanogaster* por endocitose mediada pelos já caracterizados receptores *scavengers* de classe C, SR-CI e pelo fator de crescimento epidérmico *repeat*, contendo o receptor *scavenger, eater*. Esse mecanismo é, aparentemente, conservado evolutivamente, como proposto por Saleh et al. (2006), que sugere que o silenciamento de genes ortólogos envolvidos neste mecanismo em *C. elegans* resultou na inativação do RNAi no nematoide. Além disso, também em *C. elegans*, a proteína RSD-3 aparentemente controla o tráfego de vesículas em uma via específica, para a importação do sinal de silenciamento na linhagem germinativa (Jose, Hunter, 2007).

O mecanismo de captura por endocitose também se relaciona com a resposta antiviral. Isso porque as moscas *D. melanogaster* com defeitos nos genes envolvidos na captação de dsRNA, mais precisamente mutantes homocigotos do receptor *egh*, da proteína *ninaC* e do gene *CG4572*, tornam-se hipersensíveis à infecção pelo vírus DCV (*Drosophila C virus*) ou Sindbis, encurtando o ciclo de vida destes insetos. Logo, é possível concluir que, em organismos multicelulares, a imunidade demanda de mecanismos celulares autônomos e sistêmicos, para assim criar uma imunidade pré-existente, a fim de proteger as células não infectadas (Saleh et al., 2009; Huvenne, Smaghe, 2010).

Amplificação de dsRNA

Uma vez que ocorra a captura do dsRNA, o sinal referente ao silenciamento deve ser transmitido da célula que o gerou ou recebeu para os demais tecidos. Adicionalmente, o dsRNA deve ser continuamente sintetizado pela amplificação desta molécula via RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) ou, então, constantemente adquirido para a manutenção das respostas de silenciamento (Rodrigues, Figueira, 2016).

Em *C. elegans*, siRNA gerados pela enzima Dcr2 servem como molde para a ação da RdRP e, dessa forma, dsRNA secundários são produzidos (Sijen et al., 2001). A atividade da RdRP desempenha um papel-chave na amplificação do sinal de silenciamento. Por outro lado, até o momento, nenhuma proteína relacionada à RdRP foi descrita em insetos.

A evidência de um mecanismo de amplificação em insetos origina-se de estudos de imunidade viral em *D. melanogaster*. Experimentos utilizando um inibidor da transcriptase reversa demonstraram que o RNA viral é convertido em DNA complementar viral (vDNA) pela transcriptase reversa endógena, que é, então, usada como molde para sintetizar siRNA para *priming* imunológico. Esse mesmo estudo utilizou sequenciamento para distinguir siRNA primários e secundários, mostrando que o RNA viral é transcrito em DNA nos hemócitos, em um processo dependente de Ago2. Este DNA foi, então, utilizado como molde para síntese de siRNA secundários e se tornou, com isso, a primeira evidência de um mecanismo de amplificação de RNAi descrito em insetos (Tassetto, Kunitomi, Andino, 2017).

Fatores que afetam o efeito do silenciamento gênico e a eficiência do RNAi

Métodos de entrega

O sucesso ou o fracasso do silenciamento gênico é atrelado a alguns fatores. Nesse contexto, muitos esforços têm sido empregados para ultrapassar as barreiras fisiológicas e celulares encontradas na maioria das espécies de insetos, a fim de aumentar a eficácia do silenciamento por RNAi (Christiaens et al., 2020). Dentre as barreiras encontradas, destaca-se o método de entrega de dsRNA a ser administrado. Um dos métodos mais antigos e eficazes é a microinjeção, utilizada, pela primeira vez, por Fire et al. (1998) no nematoide *C. elegans*.

Em insetos, essa metodologia foi experimentada pela primeira vez em *D. melanogaster*, por Kennerdell & Carthew (1998). Para isso, realizou-se a injeção em embriões desse inseto, tendo como alvo os genes *frizzled* e *frizzled 2*, produzindo alterações no padrão embrionário. Esse método tem como vantagem o controle na quantidade exata de dsRNA que está sendo entregue ao organismo. Além disso, o dsRNA é imediatamente inserido no tecido selecionado ou na hemolinfa, evitando possíveis empecilhos, como o tegumento ou o epitélio intestinal. Entretanto, existem algumas desvantagens, como o volume utilizado, a escolha da agulha e o local de inserção, além de exigir destreza e delicadeza do pesquisador (Yu et al., 2013).

A entrega de dsRNA através de ingestão é bem antiga e, assim como a microinjeção, também foi aplicada pela primeira vez em *C. elegans* (Yu et al., 2013). Em insetos, muitos autores utilizaram essa metodologia, como Turner et al. (2006), que administraram dsRNA diluídos em solução de sacarose em placas de Petri contendo larvas de terceiro estágio de *Epiphyas postvittana*. Tais dsRNA eram específicos para os genes da carboxilesterase (EposCXE1) e para o gene da proteína de ligação de feromônio (EposPBP1), resultando em redução dos níveis de transcrição desses genes. Essa metodologia pode ser aplicada como descrita anteriormente, com o dsRNA produzido *in vitro* e adicionado à dieta, ou obtido por expressão heteróloga. Isso foi mostrado por Zhu et al. (2011), que utilizaram colônias da bactéria *Escherichia coli* com atividade de polimerase T7 induzida por IPTG, transformadas com o vetor de expressão L4440. As bactérias transformadas foram administradas em folhas de batata em placas de Petri contendo larvas de *Leptinotarsa decemlineata*, com efeitos satisfatórios de silenciamento gênico.

Na literatura, também são relatados outros métodos de entrega por microrganismos, como leveduras, algas e vírus (Munawar et al., 2020). Apesar de apresentar resultados interessantes em diversos trabalhos, ser vantajosa quanto ao baixo custo (Tian et al., 2009) e menos invasiva (Araújo, 2006; Tian et al., 2009), essa metodologia apresenta algumas limitações. Ela é, por exemplo, menos efetiva, em função da quantidade realmente ingerida do que outras abordagens, como a injeção (Araújo, 2006).

Um outro método de entrega oral é feito através de nanopartículas, como as quitosanas, lipossomas e dendrímeros catiônicos. Essas estruturas são capazes de proteger as moléculas de dsRNA/siRNA contra a degradação enzimática e promover o transporte através das membranas celulares (Ahmadzada, Reid, McKenzie, 2018; Chalbatani et al., 2019; Yan, Ren, Shen, 2021). Zhang et al. (2015), utilizaram essa metodologia para alimentar larvas de

mosquitos *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti*. Devido às interações eletrostáticas entre o grupamento amino da quitosana e os grupos fosfatos das moléculas de dsRNA, as nanopartículas de quitosana/dsRNA se formam. Assim, o silenciamento gênico foi direcionado de modo eficaz durante o desenvolvimento larval dessas espécies. Anteriormente, Mysore et al. (2014) realizaram experimentos similares com nanopartículas de quitosana/siRNA direcionadas ao gene *sim* de *Ae. aegypti* e, dessa maneira, caracterizaram a função desse gene no desenvolvimento do sistema olfatório de larvas e pupas desse mosquito.

O método de imersão foi muito utilizado nos últimos anos, sendo observado, pela primeira vez, por Tabara; Grishok, Mello (1998). Nesse método, *C. elegans* imersos por 24 horas em solução de dsRNA direcionados ao gene materno essencial, *pos-1*, exibiram fenótipo letal embrionário. No grupo dos insetos, os experimentos pioneiros utilizando essa abordagem foram realizados em linhas celulares (Yu et al., 2013). Clemens et al. (2000) utilizaram as células S2 de *D. melanogaster*, em que dsRNA foram adicionados no meio de cultura, causando o desaparecimento seletivo das proteínas codificadas correspondentes aos genes-alvo. Depois, esse método foi expandido para bioensaios com insetos, como foi feito por Lopez et al. (2019) em larvas do mosquito *Ae. aegypti*, obtendo o silenciamento dos genes quitina sintase 1 e 2, provocando a mortalidade das larvas e a alteração do conteúdo de quitina no intestino de adultos. Em *C. elegans*, a eficiência dessa abordagem é comparável ao método de microinjeção (Tabara, Grishok, Mello, 1998). Porém, em insetos, a cutícula pode ser uma barreira (Yu et al., 2013).

Construção/projeção do dsRNA

As diferentes ordens de insetos respondem ao dsRNA de maneira distinta. Sabe-se que a ordem Coleoptera representa o grupo de insetos com maior sensibilidade ao RNAi. Em contrapartida, as ordens Hemiptera, Orthoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera variam em suas respostas (Christiaens et al., 2020). Logo, a escolha do organismo-alvo deve ser bem analisada.

A efetividade do RNAi depende, em grande parte, da produção de uma molécula de RNAi específica, que será direcionada a um gene de interesse. Assim, é recomendada a escolha de um gene que produz um *pool* de mRNA de alta rotatividade e que codifica uma proteína com meia-vida curta (Scott et al., 2013). Neste contexto, a região gênica onde o dsRNA será projetado também deve ser considerada, tal qual foi observado por Pridgeon et al. (2008). Nesse estudo, diferentes construções de dsRNA em locais distintos do mesmo gene

induziram respostas diferentes ao RNAi, possivelmente, devido à dificuldade de interação da fita antissenso em alguma região do RNAm-alvo. A projeção do dsRNA determina o gene-alvo específico a ser silenciado, mas efeitos sobre genes não-alvo podem ocorrer, se os siRNA tiverem alguma semelhança de sequência com genes não intencionais. Isso é exemplificado no trabalho de Zhu et al. (2012), em que plantas de tabaco que expressam o dsRNA do receptor de ecdisona (EcR) de *Helicoverpa armigera*, melhoraram a resistência do vegetal a outro inseto, *Spodoptera frugiperda*, devido à alta homologia entre a sequência de nts dos genes-alvo. Araujo et al. (2006) fizeram uma construção de dsRNA para o silenciamento gênico de *nitroporina 2* (NP2) de *Rhodnius prolixus*. Esse tratamento promoveu a regulação negativa do gene; entretanto, a transcrição de outros genes de nitroforinas também foram afetados, possivelmente, devido à alta homologia entre as sequências.

Comprimento do dsRNA

O comprimento dos fragmentos de dsRNA desempenha um importante papel na eficácia da captação molecular por parte dos insetos. Essa captação está diretamente relacionada ao sucesso do silenciamento do gene-alvo. Em grande parte dos experimentos de RNAi, os insetos são alimentados com dsRNAs longos (Huvenne, Smaghe, 2010). Alguns trabalhos evidenciam que dsRNAs longos são absorvidos mais eficientemente que os siRNAs (Saleh et al., 2006). Bolognesi et al. (2012) verificaram que, para obter atividade biológica, as construções de dsRNA deveriam ter, ao menos, 60 pares de base. Adicionalmente, nesse mesmo trabalho, foram comparados dsRNAs maiores e menores, como o de 21 pares de bases, sendo esse último ineficaz para o silenciamento.

Estabilidade proteica e análise fenotípica

O tempo de meia-vida das proteínas interfere na resposta ao RNAi, como comentado anteriormente. Contudo, a sensibilidade ao RNAi não se relaciona completamente à diminuição dos níveis proteicos, uma vez que genes haplo-suficientes codificam proteínas capazes de realizar os processos biológicos normalmente, mesmo que os níveis de proteína estejam reduzidos (Pereira, 2013; Rodrigues, Figueira, 2016).

Assim, bioensaios de RNAi que são direcionados para genes que codificam proteínas de meia-vida longa, geralmente não apresentam alterações fenotípicas satisfatórias. O trabalho de Rinkevich, Scott (2013) discute essa questão. Nessa

publicação, os autores realizaram testes com dsRNA direcionados ao gene da subunidade $\alpha 6$ dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) das espécies *D. melanogaster* e *Tribolium castaneum*, com o objetivo de verificar a resistência ao inseticida *spinosad*. Apesar de os níveis transcricionais do gene de interesse apresentarem redução, tal efeito não foi o suficiente para causar alterações significativas na sensibilidade ao *spinosad*. Dessa maneira, essa resposta pode ser explicada pela estabilidade dos nAChR, que podem se manter estáveis por mais de duas semanas (Lomazzo et al., 2011).

Características fisiológicas do inseto

Para que o experimento de RNAi tenha uma resposta satisfatória, é interessante analisar as características fisiológicas do inseto, como o estágio do ciclo de vida. Griebler et al. (2008) verificaram que o silenciamento dos genes *alostatina* tipo AS-C e *alotropina* AT 2 da lagarta *S. frugiperda* foi muito eficiente nas larvas. Contudo, a mesma eficiência não foi observada na mariposa adulta, evidenciando que o estágio do ciclo de vida é um fator importante na resposta ao RNAi, sendo necessário verificar a expressão gênica do alvo ao longo do ciclo de vida do inseto.

Outra característica que deve ser considerada é a presença de enzimas nucleases e o pH intestinal do inseto. Allen e Walker (2012) perceberam que, os experimentos em que o dsRNA era administrado para *Lygus lineolaris* durante a alimentação, foram repetidamente malsucedidos. Entretanto, o mesmo não ocorria quando o dsRNA era administrado por microinjeção. Assim, os autores sugeriram que, de alguma forma, o dsRNA estava sendo degradado pelo inseto antes de ter acesso às células do intestino. Neste trabalho, os autores observaram que o dsRNA administrado não influenciava na sobrevivência dos insetos e não induzia o silenciamento gênico, uma vez que os níveis de transcrição gênica não foram alterados. Além disso, verificaram que a saliva desse inseto degradava as amostras de dsRNA, com atividade comparável às RNases III.

O pH intestinal é um fator importante, que pode apresentar grande variação, de acordo com a ordem do inseto. Em larvas de coleópteros, por exemplo, o pH é predominantemente ácido, enquanto em algumas espécies de Lepidoptera, o pH é muito alcalino. Adicionalmente, em um mesmo inseto, o pH intestinal pode variar entre as porções intestinais. Dessa forma, a estabilidade do dsRNA ingerido pode ser comprometida devido à hidrólise química, que é diretamente proporcional ao aumento do pH e devido à presença de enzimas contidas no intestino (Price, Gatehouse, 2008).

Supressores da via do RNAi

Para que ocorra a supressão da via do RNAi dentro de um organismo, são encontrados supressores virais de RNAi (VSR), que são codificados a partir de sequências de vírus de RNA ou de DNA. Supressores virais de diferentes famílias de vírus têm impacto negativo nessa via. Diversos VSR não apresentam sequência ou similaridade estrutural, indicando a evolução independente de diferentes mecanismos para combater a via do siRNA. São descritos 4 mecanismos de interferência: 1) a ligação de um dsRNA longo dificulta a clivagem pela enzima Dcr2; 2) a ligação de siRNA atrapalha o carregamento no complexo RISC; 3) qualquer molécula que interfira com Dcr2 ou Ago2, não permitindo o carregamento adequado do dsRNA ou da dupla fita de siRNA, respectivamente, que se deseja; 4) elementos que degradam o siRNA.

Também tem sido observado que experimentos que administram siRNA de 21-23 nts são menos eficientes no silenciamento, quando comparados a siRNA um pouco mais longos, com 27 nts, que são melhor processados pela Dcr2 e mais eficientes em promover o silenciamento. Os siRNA mais longos apresentam uma extremidade 3' com 2 nts não pareados e uma extremidade cega (*blunt end*), permitindo que o processamento pela Dcr2 resulte em um único siRNA (Aagaard, Roosi, 2007). Outro fator negativo é que os siRNA também podem reconhecer e interferir com a expressão de mRNA, que apresentam homologia parcial com o mRNA-alvo. De fato, a avaliação da atividade transcricional *in vitro* têm mostrado que siRNA podem alterar os níveis de mRNA de genes, que não constituem o alvo desejado (efeitos fora do alvo), embora com menor intensidade (Lin et al., 2005; Qiu, Adema, Lane, 2005).

Aplicações diversas do RNAi

Aplicações de RNAi como inseticida

Diversos trabalhos publicados têm mostrado a eficiência do RNAi como potencial ferramenta de controle para insetos vetores de doenças e pragas agrícolas (Kim et al., 2015). Foi demonstrado, no trabalho de Mansur et al. (2014), que uma construção de dsRNA direcionada ao gene quitina sintase (CHS) do inseto vetor da doença de Chagas, *R. prolixus*, injetada em ninfas e adultos, promoveu alterações na ecdise, bloqueou desenvolvimento dos ovários, bem como causou a diminuição da oviposição, alterações morfológicas nos ovos postos e redução da capacidade de eclosão. Ainda no enfoque do controle de vetores, o RNAi foi utilizado como técnica por Whitten et al. (2016) para evitar a

infecção por *Trypanosoma cruzi*, através das fezes do inseto barbeiro *R. prolixus*. Os autores transformaram a bactéria *Rhodococcus rhodnii*, simbiote do intestino do inseto, para produzir um dsRNA específico para um gene importante na fertilidade do barbeiro. Essa bactéria gram-positiva foi isolada do intestino de *R. prolixus* e transformada por um cassete de expressão do dsRNA para a vitelogenina (Vg), uma proteína fundamental na ovogênese do inseto. A bactéria transformada foi utilizada para colonizar o intestino de seu hospedeiro e liberar o dsRNA produzido, o, silenciando a produção de Vg e afetando a fertilidade, refletindo em uma redução na proliferação de barbeiros.

Em mosquitos vetores de doenças dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, o RNAi tem sido empregado para a caracterização da função gênica e nos estudos de interação vetor-patógeno (Munawar et al., 2020). Magalhães et al. (2019) mostraram a eficácia do RNAi na redução da infecção e na transmissão do vírus Zika em mosquitos vivos, sendo, então, considerada como uma potencial ferramenta antiviral. No mosquito *Ae. aegypti*, o silenciamento de diversos genes foi capaz de causar mortalidade de larvas e de adultos (Singh et al., 2013; Kumar et al., 2016; Chen et al., 2019; Lopez et al., 2019). Esses resultados indicam que o RNAi pode ser utilizado como uma ferramenta potencialmente bioinseticida.

No que diz respeito aos insetos-praga, a técnica de RNAi é considerada ecológica, estável e específica, em comparação com outras técnicas utilizadas para controle. Alguns trabalhos da literatura mostraram o potencial dessa ferramenta como alternativa de controle de pragas (Mamta, Rajam, 2017). Por exemplo, no trabalho de Badillo-Vargas et al. (2015), foi sintetizada uma construção de dsRNA para o gene vacuolar da subunidade da ATP sintase (VATPase-B) de *Frankliniella occidentalis*, uma importante praga de diversas culturas e vetor de tospovírus a várias espécies de plantas.

Aplicações do RNAi no campo

A aplicação do RNAi na agricultura visando ao controle de pragas ou patógenos pode ser realizada de diferentes formas. Essas formas são designadas como: silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS); silenciamento gênico induzido por spray (SIGS); ou silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) (Christiaens et al., 2020). HIGS são caracterizados pela criação de culturas transgênicas que expressam a sequência de dsRNA específica para determinada praga ou patógeno. O primeiro trabalho publicado utilizando essa abordagem foi de Baum et al. (2007), em que os autores utilizaram milho geneticamente modificado, expressando dsRNA direcionado ao gene ATPase

vacuolar (V-ATPase) de *Diabrotica virgifera*. Como resultado, as plantas que expressaram tal molécula silenciadora sofreram menos danos por esse inseto, se comparadas às plantas não-transgênicas. A primeira planta resistente liberada para uso comercial utilizando a abordagem do RNAi foi o milho híbrido da SmartStaxPro®, o qual foi lançado, em 2017, pela empresa Monsanto (atualmente Bayer/Monsanto). Esse cultivar foi projetado para expressar moléculas de dsRNA para o gene *Snf7* (proteína vacuolar essencial), apresentando resistência às larvas do besouro *D. virgifera* (Zhang et al., 2017).

VIGS é um método de entrega relativamente novo, que se baseia em vírus modificados para produzir o dsRNA de interesse para a praga. Nessa abordagem, é necessário levar em consideração o material genético do vírus escolhido. Assim, os vírus de DNA são os mais indicados, uma vez que vírus de RNA desencadeiam gatilhos de dsRNA durante a replicação e transcrição, sendo reconhecidos pela resposta imune inata dos insetos, incluindo o RNAi (Kolliopoulou et al., 2017). Dentre os vírus entomopatogênicos que possuem genoma de DNA, os baculovírus são os mais conhecidos. Grande parte desses vírus descritos infectam, principalmente, representantes da ordem Lepidoptera, mas também há relatos de infecção em Hymenoptera e Diptera (Herniou et al., 2011). No VIGS, a infecção e replicação viral levam à produção do dsRNA, diretamente nas células do inseto. Desse modo, pode-se alcançar uma grande eficiência, mesmo em células recalcitrantes (Christiaens et al., 2020). Seguindo essa abordagem, Taning et al. (2018) utilizaram o vírus Flock House (FHV) para expressar sequências de dsRNA de *D. melanogaster* e, dessa maneira, os níveis de expressão de todos os genes-alvo testados foram reduzidos em mais de 70%, mostrando, então, a eficiência do método.

SIGS tem como foco métodos de entrega não-transgênicos. É feito à base de sprays pesticidas; entretanto, outros métodos também são descritos. Nesse sentido, Hunter et al. (2012) foram os primeiros a validar essa metodologia, em que o dsRNA foi administrado de duas maneiras: por injeção de dsRNA no tronco de árvores ou através de irrigação da raiz com solução de dsRNA. Outros métodos não-transformantes também foram avaliados, como a imersão da semente em solução de dsRNA e o tratamento do solo (Andrade, Hunter, 2016; Liu et al., 2020). Quando comparado às estratégias transformantes, o SIGS possui bons resultados e, ainda, não promove alterações hereditárias no genoma, demanda menor tempo de produção e liberação de uso, e é bem aceito pelo público e por órgãos regulamentadores (Joga et al., 2016; Cagliari et al., 2019).

Outras aplicações de RNAi são: (i) o estudo das interações dos vírus com a via do siRNA, que tem possibilitado métodos para detecção de vírus encobertos

em linhagens celulares de insetos (Carrilo-Tripp et al., 2014, 2016); e (ii) o baculovírus otimizando sistemas de expressão (Chavez-Pena & Kamen, 2018, Possee et al., 2019) como controle de mosquitos. A (re)emergência de vírus transmitidos por insetos vetores, como os vírus Dengue, Chikungunya e Zika, destacam a importância de entender as interações das moléculas nos sistemas vetores-patógenos (nesses casos, inseto-vírus) para fornecer soluções para a maioria das doenças transmitidas por insetos que são, em geral, negligenciadas.

Mecanismo de supressão por RNAi como defesa imunológica

Uma pesquisa recente permitiu o início da melhor compreensão do papel do RNAi como memória imunológica ou primária em insetos. Uma das características da imunidade de vertebrados é a proteção duradoura conferida por anticorpos, com memória imunológica (Janeway et al., 2001). A resposta antiviral baseada na via do RNAi, constituindo uma defesa imunitária inata importante, foi proposta em *D. melanogaster* (Wang et al., 2006; Zambon, Vakharia, Wu, 2006) e um processo semelhante ocorre em *C. elegans* (Zhang, Lu & Bargmann, 2005). Os insetos não possuem anticorpos e, por isso, aparentemente, não registram a infecção. Alguns trabalhos mais recentes têm explorado o mecanismo de DNA formado a partir da sequência de RNA viral produzida durante a infecção como fonte de siRNA, mesmo depois da infecção, funcionando como memória imunológica. O DNA derivado de vírus pela ação da enzima transcriptase reversa induz a tolerância do mosquito vetor à infecção por arbovírus (Goic et al., 2016). A interferência do RNAi na transcriptase reversa controla a persistência do vírus RNA, em *Drosophila* (Goic et al., 2013).

Assim, as quimeras de DNA são transcritas e servem como fonte de siRNA, que modula a replicação viral (Qi et al., 2012; Goic et al., 2016; Goic et al., 2016, Poirier et al., 2018). A prevenção de formação de quimera de DNA durante a infecção viral de *D. melanogaster* e *Ae. albopictus* diminui os siRNA específicos e aumenta a mortalidade dos insetos (Goic et al., 2013; Goic et al., 2016). As quimeras de DNA também são captadas por hemócitos em *D. melanogaster* e as vesículas secretadas com siRNA específicos são capazes de iniciar uma resposta antiviral em células não infectadas (Tassetto, Kunito, Andino, 2017). Em vários ensaios, insetos injetados com vírions na cavidade intratorácica morrem imediatamente ou desenvolvem uma infecção persistente ao longo da vida, com formação de DNA quimérico (Goic et al., 2013; Goic et al., 2016). Esse mecanismo de defesa é, também, o único mecanismo de amplificação de RNAi descrito em inseto, uma vez que não foram identificados outros elementos descritos em *C. elegans*, nem em outros organismos.

Considerações finais

A magnitude de resposta de silenciamento gênico ao dsRNA é alterada, de acordo com a ordem, a espécie, o estágio de vida, o tecido e o gene. A escolha do gene candidato ao silenciamento é um dos principais aspectos para o sucesso da técnica. Outros fatores, como a estabilidade, o comprimento e a estrutura da molécula do dsRNA administrado, bem como a presença de enzimas nucleases nos órgãos dos insetos também afetam a resposta ao dsRNA (Kola et al., 2015; Taning et al., 2020). Além disso, a escolha de um método de entrega de dsRNA eficiente também influencia na resposta.

A entrega de dsRNA disponibilizada via alimentação e pulverização tem um grande potencial para o controle de pragas agrícolas e de produtos armazenados. Entretanto, alguns desafios precisam ser equacionados, tais como a atuação em organismos não-alvo, o destino, a estabilidade do dsRNA no ambiente e a dosagem adequada. Esses fatores precisam ser levados em consideração, dependendo do agrossistema onde o dsRNA será implantado. Para o controle de insetos vetores, o dsRNA também pode ser administrado por pulverização ou por adição de produtos encapsulados na água de criação da larva. No entanto, não há dúvida de que uma nova era de controle de insetos, com base em RNAi, promete novas oportunidades para o manejo mais eficaz e seletivo de pragas e vetores.

Acompanhando uma tendência mundial de controle seletivo de insetos e sustentabilidade, uma importante decisão foi tomada pelo governo brasileiro, a fim de regulamentar a técnica de RNAi. A normativa da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) foi publicada, no início do ano de 2018, e estabelece, em seu texto, que a tecnologia de RNAi é um método que não envolve transgenia sendo, dessa forma, classificada como uma Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP). Com isso, a tecnologia empregada não precisará atender aos critérios a que um organismo, geneticamente modificado, está sujeito à aprovação (Ministério da Ciência e Tecnologia, 2018; Vasconcelos, 2018).

Referências

- AAGAARD, L., & ROSSI, J. J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews*, 59(2-3), 75-86.
- AHMADZADA, T., REID, G. AND MCKENZIE, D.R. (2018). Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophysical Reviews*, 10, 69–86.
- ALLEN, M. L., & WALKER III, W. B. (2012). Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of insect physiology*, 58(3), 391-396.
- ANDRADE, E. D., & HUNTER, W. B. (2016). RNA interference–natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). *RNA interference*, 1.
- ARAUJO, R. N., SANTOS, A., PINTO, F. S., GONTIJO, N. F., LEHANE, M. J., & PEREIRA, M. H. (2006). RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(9), 683-693.
- BADILLO-VARGAS, I. E., ROTENBERG, D., SCHNEWEIS, B. A., & WHITFIELD, A. E. (2015). RNA interference tools for the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of insect physiology*, 76, 36-46.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- BAULCOMBE, D. (2002). RNA silencing. *Current biology*, 12(3), R82-R84.
- BAUM, J. A., BOGAERT, T., CLINTON, W., HECK, G. R., FELDMANN, P., ILAGAN, O., JOHNSON, S., PLAETINCK, G., MUNYIKWA, T., PLEAU, M., VAUGHN, T., ROBERTS, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*. 25(11), 1322-1326.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M., & HANNON, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.
- BOLOGNESI, R., RAMASESHADRI, P., ANDERSON, J., BACHMAN, P., CLINTON, W., FLANNAGAN, R., ILAGAN O, LAWRENCE C, LEVINE S, MOAR W, MUELLER G, TAN J, UFFMAN J, WIGGINS E, HECK G & SEGERS, G. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte).
- BONNING, B. C., & SALEH, M. C. (2021). The interplay between viruses and RNAi pathways in insects. *Annual Review of Entomology*, 66(1).
- BRENNECKE, J., ARAVIN, A. A., STARK, A., DUS, M., KELLIS, M., SACHIDANANDAM, R., & HANNON, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), 1089-1103.

BRONKHORST, A. W., VAN CLEEF, K. W., VODOVAR, N., ÎNCE, Î. A., BLANC, H., VLAK, J. M., SALEH MC & VAN RIJ, R. P. (2012). The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), E3604-E3613

CAGLIARI, D., DIAS, N. P., GALDEANO, D. M., DOS SANTOS, E. Á., SMAGGHE, G., & ZOTTI, M. J. (2019). Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. *Frontiers in plant science*, 10, 1319.

CAMPBELL CL, BLACK WC, HESS AM, FOY BD. (2008). Comparative genomics of small RNA regulatory pathway components in vector mosquitoes. *BMC Genomics*. 9:425.

CARRILLO-TRIPP J, KRUEGER EN, HARRISON RL, TOTH AL, MILLERWA, BONNING BC. (2014). *Lymantria dispar* iflavivirus 1 (LdIV1), a new model to study iflaviral persistence in lepidopterans. *Journal of General Virology*, 95(10), 2285–96.

CARRILLO-TRIPP, J., DOLEZAL, A. G., GOBLIRSCH, M. J., MILLER, W. A., TOTH, A. L., & BONNING, B. C. (2016). In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses. *Scientific reports*, 6(1), 22265.

CENIK, E. S., & ZAMORE, P. D. (2011). Argonaute proteins. *Current Biology*, 21(12), R446-R449.

CHAVEZ-PENA, C., & KAMEN, A. A. (2018). RNA interference technology to improve the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology advances*, 36(2), 443-451.

CHEN, J., LU, H. R., ZHANG, L., LIAO, C. H., & HAN, Q. (2019). RNA interference-mediated knockdown of 3, 4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase affects larval development and adult survival in the mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-11.

CHRISTIAENS, O., WHYARD, S., VÉLEZ, A. M., & SMAGGHE, G. (2020). Double-stranded RNA technology to control insect pests: Current status and challenges. *Frontiers in plant science*, 11, 451.

CLEMENS, J. C., WORBY, C. A., SIMONSON-LEFF, N., MUDA, M., MAEHAMA, T., HEMMINGS, B. A., & DIXON, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6499-6503.

CULLEN, B. R. (2011). Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes & development*, 25(18), 1881-1894.

CZECH, B., & HANNON, G. J. (2016). One loop to rule them all: the ping-pong cycle and piRNA-guided silencing. *Trends in biochemical sciences*, 41(4), 324-337.

ELBASHIR, S.M., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15:188–200.

- ELBASHIR, S.M., MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA A., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. (2001). Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20(23), 6877–88.
- FEINBERG, E. H., & HUNTER, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639), 1545-1547.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., & MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- FÖRSTEMANN, K., HORWICH, M. D., WEE, L., TOMARI, Y., & ZAMORE, P. D. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by *dicer-1*. *Cell*, 130(2), 287-297.
- GOIC, B., STAPLEFORD, K. A., FRANGEUL, L., DOUCET, A. J., GAUSSON, V., BLANC, H., SCHEMMELE-JOFRE N, CRISTOFARI G, LAMBRECHTS L, VIGNUZZI M & SALEH, M. C. (2016). Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nature communications*, 7(1), 12410.
- GOIC, B., VODOVAR, N., MONDOTTE, J. A., MONOT, C., FRANGEUL, L., BLANC, H., GAUSSON V, VERA-OTAROLA J, CRISTOFARI G & SALEH, M. C. (2013). RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nature immunology*, 14(4), 396-403.
- GRIEBLER, M., WESTERLUND, S. A., HOFFMANN, K. H., & MEYERING-VOS, M. (2008). RNA interference with the allato regulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *Journal of insect physiology*, 54(6), 997-1007.
- HERNIOU, E.A., ARIF, B.M., BECNEL, J.J., BLISSARD, G.W., BONNING, B.C., HARRISON, R., JEHLE, J.A., THEILMANN, D.A., VLAK, J.M. (2005). *Baculoviridae*. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 163-173.
- HUNTER, W. B., GLICK, E., PALDI, N., & BEXTINE, B. R. (2012). Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. *Southwest Entomol*, 37(1), 85-87.
- HUVENNE, H., & SMAGGHE, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*, 56(3), 227-235.
- IPSARO, J. J., HAASE, A. D., KNOTT, S. R., JOSHUA-TOR, L., & HANNON, G. J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 491(7423), 279-283.
- IWAKAWA, H. O., & TOMARI, Y. (2015). The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in cell biology*, 25(11), 651-665.

IWASAKI, Y. W., MURANO, K., ISHIZU, H., SHIBUYA, A., IYODA, Y., SIOMI, M. C., SIOMI H & SAITO, K. (2016). Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons. *Molecular cell*, 63(3), 408-419.

JANEWAY JR, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., & SHLOMCHIK, M. J. (2001). Immunological memory. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Garland Science. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27158/>>.

JOGA, M. R., ZOTTI, M. J., SMAGGHE, G., & CHRISTIAENS, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in physiology*, 7, 553.

JOSE, A. M., & HUNTER, C. P. (2007). Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual review of genetics*, 41, 305.

KENNERDELL, J. R., & CARTHEW, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7), 1017-1026.

KIM, Y. H., ISSA, M. S., COOPER, A. M., & ZHU, K. Y. (2015). RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120, 109-117.

KOLA VS, RENUKA P, MADHAV MS, MANGRAUTHIA SK. (2015). Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Front Physiol*. 6:119.

KOLLIPOULOU, A., TANING, C. N., SMAGGHE, G., & SWEVERS, L. (2017). Viral delivery of dsRNA for control of insect agricultural pests and vectors of human disease: prospects and challenges. *Frontiers in physiology*, 8, 399.

KUMAR, D. R., KUMAR, P. S., GANDHI, M. R., AL-DHABI, N. A., PAULRAJ, M. G., & IGNACIMUTHU, S. (2016). Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International journal of biological macromolecules*, 86, 89-95.

LEE, Y. S., NAKAHARA, K., PHAM, J. W., KIM, K., HE, Z., SONTHEIMER, E. J., & CARTHEW, R. W. (2004b). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69-81.

LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE J, PROVOST P, RÅDMARK O, KIM S & KIM, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.

LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H., & KIM, V. N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051-4060.

LIN, X., RUAN, X., ANDERSON, M. G., MCDOWELL, J. A., KROEGER, P. E., FESIK, S. W., & SHEN, Y. (2005). siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic acids research*, 33(14), 4527-4535.

- LIU, S., JAOUANNET, M., DEMPSEY, D. M. A., IMANI, J., COUSTAU, C., & KOGEL, K. H. (2020). RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnology advances*, 39, 107463.
- LOMAZZO, E., HUSSMANN, G.P., WOLFE, B.B., YASUDA, R.P., PERRY, D.C. AND KELLAR, K.J. (2011) Effects of chronic nicotine on heteromeric neuronal nicotinic receptors in rat primary cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 119, 153–164.
- LOPEZ, S. B. G., GUIMARÃES-RIBEIRO, V., RODRIGUEZ, J. V. G., DORAND, F. A., SALLES, T. S., SÁ-GUIMARÃES, T. E., ALVARENGA E.S.L, MELO A.C.A, ALMEIDA R.V & MOREIRA, M. F. (2019). RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- LUND E, GÜTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, KUTAY U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95–98.
- MA, J.B., YUAN, Y-R., MEISTER. G, PEI, Y., TUSCHL, T., PATEL, D.J. 2005. Structural basis for 5-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434:666–70.
- MAGALHAES, T., BERGREN, N. A., BENNETT, S. L., BORLAND, E. M., HARTMAN, D. A., LYMPEROPOULOS, K., SAYRE R, BORLEE BR, CAMPBELL CL, FOY BD, OLSON KE, BLAIR CD, BLACK W 4TH & KADING, R. C. (2019). Induction of RNA interference to block Zika virus replication and transmission in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 111, 103169.
- MAHMOODI CHALBATANI, G., DANA, H., GHARAGOUZLOO, E., GRIJALVO, S., ERITJA, R., LOGSDON, C. D., MEMARI F, MIRI SR, RAD MR & MARMARI, V. (2019). Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. *International journal of nanomedicine*, 3111-3128.
- MAMTA, B., & RAJAM, M. V. (2017). RNAI TECHNOLOGY: A NEW PLATFORM FOR CROP PESTCONTROL. *PHYSIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS*, 23(3), 487-501.
- MANSUR, J. F., ALVARENGA, E. S., FIGUEIRA-MANSUR, J., FRANCO, T. A., RAMOS, I. B., MASUDA, H., MELO A. C. & MOREIRA, M. F. (2014). Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 110-121.
- MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., URLAUB, H., LÜHRMANN, R., TUSCHL, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563–574.
- MIESEN, P., JOOSTEN, J., & VAN RIJ, R. P. (2016). PIWIs go viral: arbovirus-derived piRNAs in vector mosquitoes. *PLoS pathogens*, 12(12), e1006017.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. (2018). CNTBio, Resolução Normativa N° 16, 15 de janeiro de 2018”. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio/-/asset_publisher/58KNi0CuF68J/content/resolucao-normativa> Acesso em: 10/09/2021.

MONSANTO-HEARNE, V., & JOHNSON, K. N. (2018). miRNAs in insects infected by animal and plant viruses. *Viruses*, 10(7), 354.

MUELLER, S., GAUSSON, V., VODOVAR N., DEDDOUCHE, S., TROXLER, L., PEROT J, PFEFFER S, HOFFMANN JA, SALEH MC, IMLER JL. (2010). RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19390-19395.

MUNAWAR, K., ALAHMED, A. M., & KHALIL, S. M. (2020). Delivery methods for RNAi in mosquito larvae. *Journal of Insect Science*, 20(4), 12.

MYSORE, K., ANDREWS, E., LI, P., & DUMAN-SCHEEL, M. (2014). Chitosan/siRNA nanoparticle targeting demonstrates a requirement for single-minded during larval and pupal olfactory system development of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *BMC developmental biology*, 14(1), 1-16.

NA YU; OLIVIER CHRISTIAENS; JISHENG LIU; JINZHI NIU; KAAT CAPPELLE; SILVIA CACCIA; HANNEKE HUVENNE; GUY SMAGGHE (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*, 20(1), 4-14.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., AND JORGENSEN, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in irreversible co-suppression of homologous genes in trans. *PlantCell* 2,279 –289.

NGO, H., TSCHUDI, C., GULL, K., & ULLU, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14687-14692.

NISHIMASU H, ISHIZU H, SAITO K, FUKUHARA S, KAMATANI MK, BONNEFOND L, MATSUMOTO N, NISHIZAWA T, NAKANAGA K, AOKI J, ISHITANI R, SIOMI H, SIOMI MC, NUREKI O. (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491:284–87.

ORBAN, T.I., IZAURRALDE, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11:459–69.

PARRY, R., BISHOP, C., DE HAYR, L., & ASGARI, S. (2019). Density-dependent enhanced replication of a dengue virus in *Wolbachia*-infected *Aedes* cells is associated with production of piRNAs and higher virus-derived siRNAs. *Virology*, 528, 89-100.

POIRIER, E. Z., GOIC, B., TOMÉ-PODERTI, L., FRANGEUL, L., BOUSSIER, J., GAUSSON, V., BLANC H, VALLET T, LOYD H, LEVI LI, LANCIANO S, BARON C, MERKLING SH, LAMBRECHTS L, MIROUZE M, CARPENTER S, VIGNUZZI M & SALEH, M. C. (2018). Dicer-2-dependent generation of viral DNA from defective genomes of RNA viruses modulates antiviral immunity in insects. *Cell Host & Microbe*, 23(3), 353-365.

POSSEE, R. D., CHAMBERS, A. C., GRAVES, L. P., AKSULAR, M., & KING, L. A. (2019). Recent developments in the use of baculovirus expression vectors. *Current Issues in Molecular Biology*, 34(1), 215-230.

- PRICE, D. R., & GATEHOUSE, J. A. (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in biotechnology*, 26(7), 393-400.
- PRIDGEON, J. W., ZHAO, L., BECNEL, J. J., STRICKMAN, D. A., CLARK, G. G., & LINTHICUM, K. J. (2008). Topically applied AaelAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 45 (3): 414–420.
- QI, N., ZHANG, L., QIU, Y., WANG, Z., SI, J., LIU, Y., XIANG X, XIE J, QIN CF, ZHOU X & HU, Y. (2012). Targeting of dicer-2 and RNA by a viral RNA silencing suppressor in *Drosophila* cells. *Journal of virology*, 86(10), 5763-5773.
- QIU, S., ADEMA, C. M., & LANE, T. (2005). A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic acids research*, 33(6), 1834-1847.
- RAND, T. A., GINALSKI, K., GRISHIN, N. V., & WANG, X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14385-14389.
- RAND, T. A., PETERSEN, S., DU, F., & WANG, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621-629.
- RINKEVICH, F. D., & SCOTT, J. G. (2013). Limitations of RNAi of $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunits for assessing the in vivo sensitivity to spinosad. *Insect science*, 20(1), 101-108.
- RODRIGUES, T. B., & FIGUEIRA, A. (2016). Management of insect pest by RNAi—A new tool for crop protection. *RNA interference*, 371-390.
- SALEH, M. C., TASSETTO, M., VAN RIJ, R. P., GOIC, B., GAUSSON, V., BERRY, B., JACQUIER C, ANTONIEWSKI C & ANDINO, R. (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458(7236), 346-350.
- SALEH, M. C., VAN RIJ, R. P., HEKELE, A., GILLIS, A., FOLEY, E., O'FARRELL, P. H., & ANDINO, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology*, 8(8), 793-802.
- SANTOS, D., MINGELS, L., VOGEL, E., WANG, L., CHRISTIAENS, O., CAPPELLE K, WYNANT N, GANSEMANS Y, VAN NIEUWERBURGH F, SMAGGHE G, SWEVERS L, VANDEN BROECK J. (2019). Generation of virus- and dsRNA derived siRNAs with species-dependent length in insects. *Viruses*, 11(8), 738.
- SATO, K., & SIOMI, M. C. (2020). The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 96(1), 32-42.
- SCOTT, J. G., MICHEL, K., BARTHOLOMAY, L. C., SIEGFRIED, B. D., HUNTER, W. B., SMAGGHE, G., ZHU KY & DOUGLAS, A. E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of insect physiology*, 59(12), 1212-1221.

- SIJEN, T., FLEENOR, J., SIMMER, F., THIJSEN, K. L., PARRISH, S., TIMMONS, L., PLASTERK RH & FIRE, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4), 465-476.
- SINGH, A. D., WONG, S., RYAN, C. P., WHYARD, S., & GORDON, K. (2013). Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *Journal of insect science*, 13(1), 69.
- TABARA, H., GRISHOK, A., & MELLO, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282(5388), 430-431.
- TANING, C. N., CHRISTIAENS, O., LI, X., SWEVERS, L., CASTEELS, H., MAES, M., & SMAGGHE, G. (2018). Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) in vitro and in vivo. *Frontiers in physiology*, 9, 805.
- TANING, C.N., ARPAIA, S., CHRISTIAENS, O., DIETZ-PFEILSTETTER, A., JONES, H., MEZZETT, B., SABBADINI, S., SORTEBERG, H.G., SWEET, J., VENTURA, V., SMAGGHE, G. (2020). RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, 76(3), 841-845.
- TASSETTO, M., KUNITOMI, M., & ANDINO, R. (2017). Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. *Cell*, 169(2), 314-325.
- TIAGO CAMPOS PEREIRA (2013). Introdução à técnica de interferência por RNA - RNAi. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. Acesso em: 31/08/2022.
- TIAN, H., PENG, H., YAO, Q., CHEN, H., XIE, Q., TANG, B., & ZHANG, W. (2009). Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS one*, 4(7), e6225.
- TURNER, C. T., DAVY, M. W., MACDIARMID, R. M., PLUMMER, K. M., BIRCH, N. P., & NEWCOMB, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect molecular biology*, 15(3), 383-391.
- ULVILA, J.; PARIKKA, M.; KLEINO, A.; SORMUNEN, R.; EZEKOWITZ, R. A.; KOCKS, C.; RAMET, M. (2006). Double-stranded RNA Is Internalized by Scavenger Receptor-mediated Endocytosis in *Drosophila* S2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14370–14375.
- VAN RIJ, R. P., SALEH, M. C., BERRY, B., FOO, C., HOUK, A., ANTONIEWSKI, C., & ANDINO, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & development*, 20(21), 2985-2995.
- VASCONCELOS, Y. Genes em silêncio. (2018). Revista pesquisa FAPESP, Ed. 268.

- WHANGBO, J. S., & HUNTER, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in genetics*, 24(6), 297-305.
- WHITTEN MM, FACEY PD, DEL SOL R, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ LT, EVANS MC, MITCHELL JJ, BODGER OG, DYSON PJ. (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1825), 20160042.
- WINSTON, W. M. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1. *Science*, 295(5564), 2456–2459.
- WINSTON, W. M., SUTHERLIN, M., WRIGHT, A. J., FEINBERG, E. H., & HUNTER, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10565-10570.
- X.H. WANG, R. ALIYARI, W.X. LI, H.W. LI, K. KIM, R. CARTHEW, P. ATKINSON, S.W. DING. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*, 312, pp. 452-454
- YAN, S., REN, B. Y., & SHEN, J. (2021). Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. *Insect science*, 28(1), 21-34.
- ZAMBON, R.A., VAKHARIA, V.N., WU, L.P. (2006). RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell. Microbiol.* 8:880–89.
- ZHANG Y, LU H, BARGMANN C. I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438(7065), 179-184.
- ZHANG, J.; KHAN, S.A.; HECKEL, D.G.; BOCK, R. (2017). Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. *Trends in Biotechnology*, v. 35, p. 871-882.
- ZHANG, X., MYSORE, K., FLANNERY, E., MICHEL, K., SEVERSON, D. W., ZHU, K. Y., & DUMAN-SCHEEL, M. (2015). Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (97), e52523.
- ZHU, F., XU, J., PALLI, R., FERGUSON, J., & PALLI, S. R. (2011). Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest management science*, 67(2), 175-182.
- ZHU, J. Q., LIU, S., MA, Y., ZHANG, J. Q., QI, H. S., WEI, Z. J., YAO Q, ZHANG WQ & LI, S. (2012). Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *EcR*. *PloS one*, 7(6), e38572.
- ZHU, K. Y., & PALLI, S. R. (2020). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual review of entomology*, 65, 293-311.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 25

Desenvolvimento de Vacinas contra Carrapatos

Jéssica Waldman¹
Luís Fernando Parizi¹
Abid Ali²
Itabajara da Silva Vaz Junior¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

²Abdul Wali Khan University Mardan, Mardan, Paquistão.

Considerações iniciais

Os carrapatos são ectoparasitos obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres. Há, atualmente, cerca de 950 espécies de carrapatos descritas (Guglielmone et al., 2020), distribuídas em duas famílias principais: Argasidae (família dos carrapatos moles [*soft ticks*], ausência de um rígido escudo quitinoso no dorso de macho e fêmea) com, aproximadamente, 200 espécies (Ali, et al., 2022) e Ixodidae (família dos carrapatos duros [*hard ticks*], apresentam um escudo dorsal) com mais de 700 espécies. Há, também, uma terceira família, Nuttalliellidae, que apresenta apenas uma espécie, que vive apenas no sul da África (Guglielmone et al., 2020). Todas as espécies descritas alimentam-se do sangue de seus hospedeiros e, durante esse processo, podem transmitir uma variedade de patógenos. Há uma crescente importância desses parasitos na saúde humana e animal, devido à transmissão de patógenos ao homem e aos animais e às perdas econômicas decorrentes dos custos da prevenção e do tratamento das doenças. O controle desses ectoparasitos é baseado, majoritariamente, no uso de acaricidas sintéticos; porém, o uso incorreto desses compostos levou à seleção de populações a eles resistentes. Essas drogas também apresentam toxicidade a outros organismos (Obaid et al., 2022). Apesar dos problemas relacionados ao uso dos acaricidas, ainda não há formas de controle alternativas eficazes, que possam substituí-lo. Nesse sentido, o desenvolvimento de vacinas anticarrapatos torna-se uma alternativa técnica e economicamente viável. Ademais, vacinas não são prejudiciais a outros animais, ao consumidor e ao meio ambiente, como os acaricidas sintéticos.

Neste capítulo, será abordada, principalmente, a espécie *Rhipicephalus microplus*, responsável por grandes impactos econômicos no Brasil e no mundo, bem como serão analisadas estratégias utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra esse e outros carrapatos. A ênfase será dada ao desenvolvimento de diferentes alternativas para o controle desse ectoparasito, sendo descrito o ciclo biológico. Em seguida, será realizada uma análise de estudos envolvendo possíveis alvos para o desenvolvimento do controle imunológico, através de vacinas. Também serão apresentados aspectos relevantes da história do desenvolvimento de vacinas contra carrapatos (Tabela 1).

Ano/ Pesquisadores	Eventos
1918 Johnston et al.	Observação de resistência em carrapatos de campo
1976 Roberts e Kerr	Transferência passiva de anticorpos
1976 Brossard	Imunização com antígenos de glândula salivar
1982 Wikel	Caracterização da imunidade mediada por células
1988 Willadsen et al.	Purificação da Bm86
1994 Ridding et al.	Purificação e clonagem da Bm91
1994/1995	Testes de campo com Bm86 (vacina comercial)
1996 Willadsen et al.	Imunização com Bm86-Bm91
1998 McKenna et al.	Purificação e imunização com BMA7
1999 De-Rose et al.	Vacina de DNA (gene da Bm86)
2000 García-García et al.	Imunização com Bm95
2002 Andreotti et al.	Imunização com inibidores de proteinases
2002 Patarroyo et al.	Imunização com peptídeos sintéticos de Bm86
2002 Valenzuela et al.	Transcriptoma da saliva de <i>I. scapularis</i>
2005 Guerrero et al.	Proposta de sequenciar o genoma do <i>R. microplus</i>
2005 Hill et al.	Genoma do <i>I. scapularis</i>
2011 Parizi et al.	Imunização de bovinos com HIGST
2015 Ali et al.	Caracterização funcional de metaloproteases
2019 Ndaqula et al.	Vacina multi-antigênica GST de <i>R. decoloratus</i> e <i>A. variegatum</i>
2020 Tirloni et al.	Transcriptomas de órgão/estágio de <i>R. microplus</i>
2020 Jia et al.	Genoma de seis espécies de carrapatos
2020 Almazán et al .	Vacina multi-antigênica de neuropeptídeos contra carrapatos
2021 Sajid et al.	Vacina de mRNA previne transmissão de <i>B. burgdorferi</i>
2022 Scoles et al.	Vacina de peptídeos de aquaporinas reduz alimentação

Tabela I: Eventos no estudo para uma vacina contra carrapato.

Fonte: Arquivo pessoal

O carrapato *R. microplus*

No Brasil, prejuízos significativos à pecuária são causados, principalmente, pelo carrapato bovino *R. microplus* (Grisi et al., 2014), que pertence à família Ixodidae. Essa espécie já foi denominada de *Boophilus microplus*. Entretanto, uma reclassificação foi feita em 2003 (Murrell et al., 2003), com base em análises moleculares e morfológicas, na qual se concluiu que esse carrapato deveria ser incluído no gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*. *Rhipicephalus microplus*

é originário da Ásia Meridional e tem os bovídeos como seus principais hospedeiros. Ele também se encontra amplamente distribuído nos rebanhos das Américas, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S (Jonsson et al., 2000). É um dos principais parasitos que afetam a pecuária bovina dessas áreas, tendo seu desenvolvimento favorecido pelas condições climáticas (Figura 1).

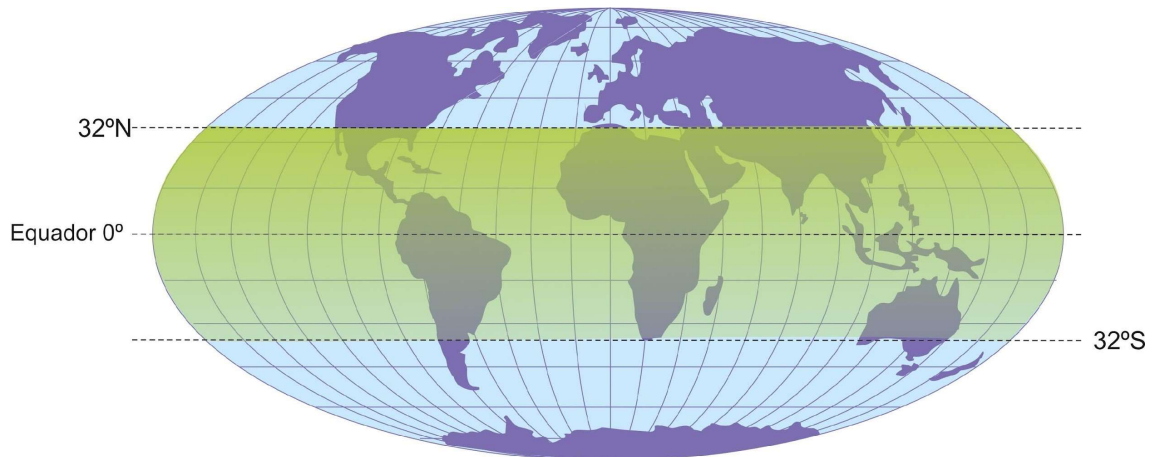


Figura 1: Regiões de ocorrência natural do carrapato *Rhipicephalus microplus* nos rebanhos das Américas, África, Ásia e Oceania (áreas delimitadas em verde).

Fonte: Arquivo pessoal

Ciclo biológico

No ciclo biológico do carrapato *R. microplus*, a fêmea ingurgitada (teleógi-na), que apresenta um aumento de mais de dez vezes o tamanho corporal causado pelo volume de sangue e fluídos do hospedeiro ingeridos durante o final da fase parasitária, se desprende do hospedeiro, procura um local mais úmido e ao abrigo do sol (como a superfície do solo junto às raízes de plantas), e inicia a postura dos ovos (de 2.500 a 3.000 ovos) (Figura 2), morrendo ao término da postura. Posteriormente, as larvas eclodem dos ovos e, após alguns dias, sobem pelas gramíneas e arbustos, aguardando a passagem dos hospedeiros para se fixarem, dando início à fase parasitária, que dura, em média, 21 dias. Entretanto, dependendo da temperatura e da umidade ambiental, a larva pode sobreviver por até quatro meses sem encontrar um hospedeiro.

Após fixar-se e se alimentar no hospedeiro, a larva sofre muda, com o desenvolvimento de uma nova cutícula, passando para o estágio de ninfa, que por sua vez, se ingurgita e sofre nova muda, ocorrendo a diferenciação sexual para macho ou fêmea. Após a cópula, a fêmea inicia o ingurgitamento, passando para a fase de fêmea parcialmente ingurgitada (partenógina). Um grande aumento da

sua massa corpórea ocorre nas últimas 24 horas, quando, totalmente ingurgitada, finalmente ela se desprende do hospedeiro, dando início a um novo ciclo. Os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro e podem fecundar outras fêmeas.

No Brasil, principalmente na região Sul, durante a primavera e o verão, diferenças nas temperaturas e umidade relativa do ar estão associadas à variação do intervalo de tempo da fase não-parasitária. São observados, nesse período, os maiores índices de produção e de viabilidade dos ovos e, por consequência, uma maior abundância de larvas. No outono e inverno, ocorre o prolongamento da fase não-parasitária e a diminuição da eficiência reprodutiva e da taxa de eclosão das larvas. Além disso, as baixas temperaturas estão associadas a uma maior permanência das larvas nos campos, resultando de três a quatro gerações anuais de *R. microplus* no sul do Brasil.

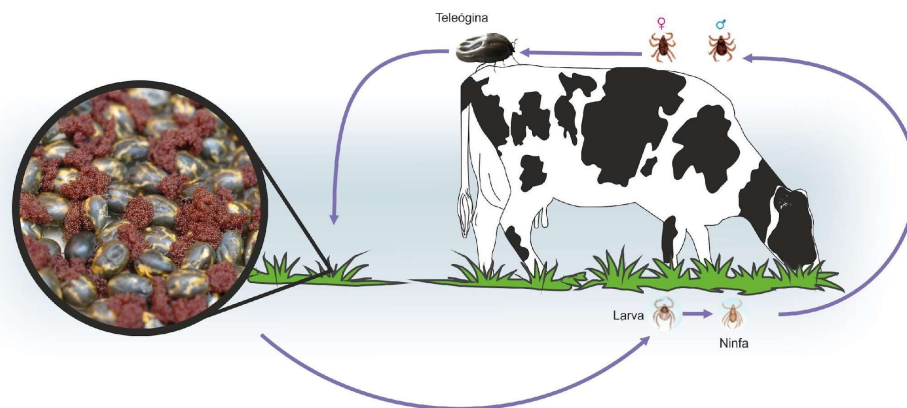


Figura 2: Ciclo biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Em destaque, fêmeas realizando a postura dos ovos.

Fonte: Arquivo pessoal

Prejuízos relacionados ao parasitismo

O parasitismo realizado por *R. microplus* acarreta diversos danos econômicos (Grisi et al., 2014), o que torna esse parasito um dos principais alvos de controle nos rebanhos da América do Sul (Nari et al., 1995). Cada fêmea dessa espécie se alimenta, em média, de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro (Gonzales, 1995), o que resulta em significativas perdas na produção de leite e carne (Jongejan et al., 2004; Jonsson et al., 2006), bem como em danos na pele causados por reações inflamatórias, nos locais de fixação do carrapato (Seifert et al., 1968). Esse parasito pode atuar como vetor de agentes causadores de doenças, como os protozoários do gênero *Babesia* e as bactérias do gênero

Anaplasma, causadores da tristeza parasitária bovina (Jonsson et al., 2006). Além disso, existem diversos custos relacionados à mão-de-obra necessária para seu controle, tais como despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e compra de equipamentos adequados para aplicação desses compostos sintéticos nos rebanhos (Cordoves, 1996). Em 2016, estudos revelaram uma perda mundial anual de até 30 bilhões de dólares na atividade pecuária devido a infestações por *R. microplus* (Tabor, 2021).

O principal método de controle dos carrapatos, que tem sido utilizado desde a década de 50, é o uso de acaricidas sintéticos (Pruett, 1999). Apesar de ser, atualmente, o único método eficaz para uso em larga escala, é dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Atualmente, as sete principais classes de acaricidas que estão disponíveis comercialmente são: i) organofosforados; ii) piretroides sintéticos; iii) lactonas macrocíclicas; iv) formamidinas; v) benzoil fenil ureias; vi) fenilpirazóis e vii) isoxazolininas (Gassel et al., 2014; Reck et al., 2014; Zhou et al., 2022). A troca dos princípios ativos ou a sua combinação têm sido uma necessidade, devido à seleção de populações resistentes a esses compostos (Jongejan et al., 2004). Interessantemente, *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente do que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (Kocan, 1995). No Brasil, já foram descritas populações de carrapatos de campo multirresistentes a todas as classes de acaricidas disponíveis (Reck et al., 2014; Dzemo et al., 2022; Rodriguez-Vivas et al., 2018; Vilela et al., 2020), o que impõe a necessidade de desenvolver formas alternativas de controle para essa espécie.

Controles alternativos contra os carrapatos

Biológico

O controle biológico de *R. microplus* inclui a seleção de raças de bovinos menos sensíveis ao carrapato, cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do parasito (Farias et al., 1986; Sutherst et al., 1982), ação de predadores naturais, como a garça-vaqueira *Egretta ibis* (Alves-Branco et al., 1983) e as formigas (Gonzales, 1995), manejo do rebanho (Wharton et al., 1980) e rotação de pastagens (Elder et al., 1980).

A utilização de fungos no controle desse parasito também tem sido muito investigada, sendo identificados isolados de *Metarhizium robertsii* (anteriormente conhecido como *Metarhizium anisopliae*) ocorrentes no Brasil, infectantes naturais de *R. microplus* (da Costa et al., 2002). Interessantemente, a aplicação

de *M. robertsii* em conjunto com cipermetrina e clorpirifós se mostrou efetiva no tratamento contra *R. microplus*, reduzindo a viabilidade dos carrapatos em 97,9% nos grupos tratados (Webster et al., 2015). Além disso, quando incubados com acaricida por mais de cinco dias, esses fungos não perdem sua capacidade de infectar o carrapato, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (Kaaya et al., 1996).

Ensaio *in vitro* e a campo têm demonstrado que esse fungo causa mortalidade também em outras espécies de carrapato, bem como reduz o tamanho das gerações subsequentes, devido a efeitos na eficácia reprodutiva das fêmeas infectadas (Fernandes et al., 2008). A aplicação de *M. robertsii* reduz o número de ninfas de *Ixodes scapularis* (Bharadwaj et al., 2010); foi também demonstrado que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados do fungo podem causar morte de até 100% dos carrapatos por eles infectados (Frazzon et al., 2000). Apesar dos resultados promissores com carrapatos, o desenvolvimento tecnológico de pesticidas biológicos baseados em fungos, denominados micoinseticidas ou micoacaricidas, têm avançado lentamente, embora haja expectativa para um uso mais amplo, tendo em vista a sua utilidade no controle de patógenos de plantas (Michereff Filho et al., 2009). O uso desse método alternativo ainda depende da identificação de novas linhagens e de avanços nas estratégias de produção, formulação e aplicação que resultem no desenvolvimento de novos produtos (Polar et al., 2008; Samish et al., 2004). Outros parasitos, tais como nematódeos, também têm sido avaliados como possíveis agentes no controle biológico de carrapatos, pois têm se mostrado eficientes no controle de insetos (Samish et al., 2001, 2004;).

Além disso, a utilização de fitoterápicos, com atividades pesticidas, também tem sido considerada. Em bovinos, foram testadas concentrações diferentes de spinosad, um acaricida natural obtido a partir da mistura de dois metabólitos de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), espinosina A e D. Os resultados mostraram uma queda drástica no número de teleóginas, na massa de ovos e no índice de fecundidade (Davey et al., 2001). Interessantemente, reduzidos níveis de resistência em *R. microplus* foram observados quando foi realizado um tratamento rotativo entre amitraz e spinosad (Jonsson et al., 2010). Além disso, foi mostrado que, em bovinos banhados com moxidectina, um composto endectocida (produto utilizado no controle de ecto e endoparasitos), que também atua como anti-helmíntico, a infestação por carrapatos foi reduzida em quase 95% (Guglielmone et al., 2000).

Extratos de plantas com propriedades acaricidas e repelentes também podem ser uma alternativa para o controle dos carrapatos. O tratamento de *R.*

microplus com extratos de óleos essenciais de orégano (*Lippia graveolens*), alho (*Allium sativum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) demonstrou 100% de mortalidade (Martinez-Velazquez et al., 2011). Além disso, a exposição a compostos do orégano também leva a uma redução na oviposição de fêmeas de carrapatos (Flores-Fernández et al., 2016). Também foi observado que gramíneas, tais como as do gênero *Stylosanthes*, que produzem fluidos viscosos venenosos para os carrapatos, são capazes de repelir, capturar e até mesmo matar os carrapatos (Kaaya, 2000). Dessa forma, é possível que, no futuro, acaricidas naturais venham a assumir o papel dos compostos sintéticos como método para o controle dos carrapatos.

Desenvolvimento de vacinas

O controle de carrapatos através do sistema imunológico do hospedeiro tem sido investigado nos últimos cem anos (Johnston et al., 1918) e tem se imposto, cada vez mais, como alternativa ou complemento ao uso de acaricidas. Mais recentemente, o uso da biotecnologia tem permitido o desenvolvimento de novas estratégias para a pesquisa, desenvolvimento, formulação e produção de vacinas. Para o desenvolvimento de uma vacina, a identificação de moléculas do parasito capazes de induzir uma resposta imune protetora é essencial e, para isso, é necessário o conhecimento dos mecanismos da resposta imunológica do animal a ser vacinado. Nesse sentido, descobriu-se que bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória contra moléculas dos carrapatos, o que permite uma resposta imune mais eficiente em futuras infestações (Wikel, 1996). A importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz foi bem definida, apesar de não estar totalmente esclarecida a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra carrapatos (Wikel et al., 1997). A imunidade adquirida, obtida pelo hospedeiro após repetidas infestações com carrapatos, serve como base para os estudos na busca de potenciais antígenos vacinais (Ali et al., 2022; Narasimhan et al., 2020).

Um fator importante para o desenvolvimento de vacinas é que a saliva dos carrapatos, secretada durante a infestação, apresenta a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, interferindo na produção de interleucinas pelos macrófagos bovinos, assim como a proliferação das células mononucleares (Figura 3) (Kotál et al., 2015; Turni et al., 2002). Além disso, a alimentação do carrapato, quando realizada em hospedeiros de espécies diferentes, promove a expressão de um perfil específico de proteínas na saliva, ou seja, proteínas são

diferencialmente expressas de acordo com o hospedeiro no qual o parasito realiza a sua alimentação (Tirloni et al., 2017). Além disso, o padrão transcricional é modulado, resultando em proteínas diferencialmente expressas nas glândulas salivares, de acordo com o estágio em que o carrapato se encontra e o tempo de alimentação (Garcia et al., 2020). Interessantemente, foi demonstrado que a picada do carrapato, bem como sua alimentação, também induz diferenças na transcrição de genes das células da pele, que codificam para proteínas imunomodulatórias e anti-inflamatórias, considerando hospedeiros suscetíveis e resistentes. Em bovinos suscetíveis, tem se observado um recrutamento tardio de células pró-inflamatórias (Franzin et al., 2017), enquanto a hipersensibilidade cutânea apresentada por bovinos resistentes é mais rápida, quando comparada aos animais suscetíveis. Adicionalmente, a identificação de possíveis genes, relacionados ao fenótipo de resistência de bovinos a carrapatos, já pode ser realizada (Otto et al., 2018). O entendimento dos padrões transcricionais e proteômicos nas diferentes fases do estágio de vida do carrapato, assim como a indução da expressão diferencial por diferentes hospedeiros, poderá acelerar a identificação de potenciais antígenos vacinais.

Outro ponto importante é que a resposta humoral e o desenvolvimento natural de resistência podem ser influenciados pelo nível de infestação do hospedeiro e, conseqüentemente, pela quantidade de antígenos salivares nele injetados durante a alimentação (Cruz et al., 2008). Proteínas do cimento [secreção da glândula salivar, que se solidifica em volta das peças bucais, evitando o extravasamento de fluidos e auxiliando a fixação do carrapato no hospedeiro (Suppan et al., 2018)] e proteínas ricas em glicina são produzidas, durante o início do parasitismo, sendo importantes para o sucesso da fixação do carrapato (Hollmann et al., 2018). Além disso, proteínas importantes para a regulação da hemostase, como a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária, a angiogênese, e proteínas envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro (Šimo et al., 2017) estão presentes na saliva e são secretadas, durante a alimentação. Um exemplo importante são as serpinas (inibidores de serino proteases), que modulam as serino proteases do hospedeiro. De fato, a redução da transcrição e, conseqüentemente, dos níveis proteicos de duas serpinas, leva à ingestão de uma menor quantidade de sangue pelo carrapato *Amblyomma americanum* (Kim et al., 2020). Em *I. scapularis* foi mostrado que a imunização de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) com glicoproteínas da saliva é suficiente para restaurar a resistência desse hospedeiro contra a infestação por esse carrapato (Narasimhan et al., 2020).

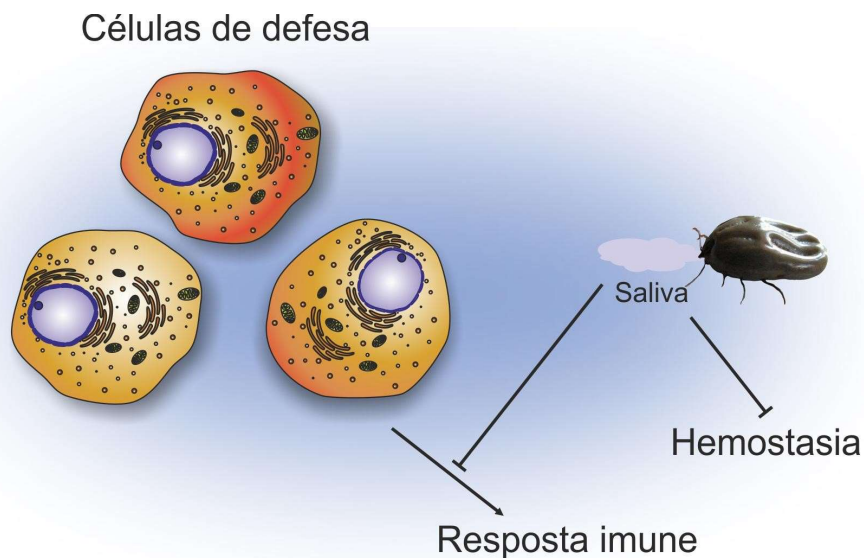


Figura 3: Ação da saliva de carrapatos durante a alimentação. A saliva contém diversas moléculas que interferem na fisiologia do hospedeiro, como na inibição dos mecanismos da resposta imunológica e cascata de coagulação.

Fonte: Arquivo pessoal

A primeira vacina comercial contra carrapatos: Bm86

A primeira vacina comercial contra carrapatos, desenvolvida pelo grupo australiano liderado por Willadsen (Willadsen et al., 1988), foi baseada em uma proteína purificada do intestino de carrapato, denominada de Bm86. Esse foi um marco, uma vez que também foi a primeira vacina desenvolvida contra parasitos. A imunização com a Bm86 induz uma resposta imunológica protetora em bovinos e foi usada como base de duas vacinas comercializadas: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO (Jonsson et al., 2000), e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba (de la Fuente et al., 1999). Posteriormente, foi proposta a teoria dos antígenos ocultos, em que um potencial antígeno para a produção de uma vacina seria aquele que não fosse exposto ao sistema imunológico do hospedeiro durante uma infestação natural, como, por exemplo, proteínas do intestino ou outros órgãos internos.

Essa hipótese foi baseada no fato de que os carrapatos não teriam desenvolvido nenhum mecanismo de evasão contra a resposta imunológica do hospedeiro para esses antígenos. Isso seria resultante da falta de pressão seletiva para esses alvos durante a evolução. Existem, ainda, outros antígenos, como a 64TRP (descrita adiante) que, quando usados em vacinas, resultam em resposta imune para epítomos antigênicos secretados e ocultos (Nuttall et al.,

2006). Embora o 64TRP seja um antígeno exposto, a resposta imune gerada reage de forma cruzada com epítomos antigênicos ocultos, em diferentes tecidos e estádios de *Rhipicephalus appendiculatus* (Trimnell et al., 2002, 2005). Corroborando essa resposta, constatou-se que, apesar de 64TRP ser um antígeno exposto, a infestação de carrapatos em animais imunizados resulta em um reforço vacinal para os antígenos ocultos. Isso é observado pelo aumento do título de anticorpos para essas proteínas.

Em Cuba, foram analisados os efeitos da vacinação de mais de meio milhão de bovinos com a Gavac, durante oito anos. Os resultados mostraram que o uso da vacina permitiu reduzir em 87% a necessidade de acaricidas e, também, causou uma redução de 96% nos casos de babesiose (Valle et al., 2004). No entanto, tanto a TickGard como a Gavac não asseguram o grau de proteção necessário para substituir o uso de acaricidas, devido a uma variação de eficácia observada quando a vacina é utilizada em diferentes regiões do mundo (Willadsen et al., 1996; Jonsson et al., 2000). Análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene da Bm86, que tornam os carrapatos resistentes à vacinação. A variabilidade na sequência do gene Bm86 é um dos possíveis responsáveis pela variação no grau de proteção induzida pelas vacinas que utilizam esse antígeno (García-García et al., 2000).

Esse polimorfismo decorre de uma mutação de ponto, que cria um códon de terminação no gene. Como consequência, tem-se a produção de uma proteína solúvel ao invés de uma proteína de membrana, que é detectada em carrapatos da Austrália e de Cuba. Além disso, foi observada uma variação de 6% na sequência de aminoácidos da Bm86 de isolados de carrapatos obtidos de diferentes localidades da América do Sul (Sossai et al., 2005). A Bm86 isolada de carrapatos coletados no sul do Texas apresentou 90% de identidade para as sequências de Bm86 australiana e cubana (Freeman et al., 2010).

Visando melhorar os resultados obtidos com a proteína Bm86, foram selecionadas três regiões imunogênicas dessa proteína para a produção de peptídeos sintéticos (Patarroyo et al., 2002). Bovinos imunizados com os peptídeos produziram anticorpos que foram capazes de reconhecer a Bm86 *in situ*, especialmente no interior dos vacúolos digestivos. Os resultados da infestação experimental por *R. microplus* demonstraram uma eficácia da vacinação entre 36 a 81% (Patarroyo et al., 2002, 2020).

Além disso, um segundo antígeno oculto, Bm91, foi avaliado. Quando a Bm91 foi associada à Bm86, um pequeno aumento da eficácia da vacinação foi observado (Willadsen et al., 1996; Riding et al., 1994). Posteriormente, uma nova vacina recombinante foi desenvolvida, utilizando a Bm95, homóloga à Bm86,

presente em carrapatos argentinos. Essa vacina mostrou-se eficaz na proteção dos bovinos contra infestações tanto de carrapatos presentes na Argentina, como em Cuba (García-García et al., 2000). Sendo assim, os resultados parcialmente efetivos obtidos com diferentes antígenos geraram confiança sobre a viabilidade técnica do desenvolvimento de uma vacina contra carrapatos.

Embora a Bm86 e seus homólogos sejam a base das vacinas comerciais já desenvolvidas contra carrapatos, a associação com outros antígenos em uma mesma vacina pode aumentar a proteção induzida (Parthasarathi et al., 2003). Para o sucesso dessa estratégia, é necessário a identificação de novas moléculas com potencial de induzir uma resposta imune protetora. Além disso, apesar de não ser essencial, a caracterização das funções biológicas e a participação em mecanismos de interação parasito-hospedeiro de moléculas do carrapato pode auxiliar na identificação de potenciais antígenos protetores. Com base em diferentes estudos, outras proteínas, além dos antígenos descritos anteriormente, têm sido identificadas como potenciais antígenos vacinais.

Estratégias para o desenvolvimento de vacinas

Uma estratégia anteriormente aplicada na identificação de potenciais antígenos vacinais foi a imunização com clones derivados de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) em vetores de expressão. O método consiste na imunização de animais com grupos aleatórios de cDNA clonados em vetores de expressão de eucariotos. Quando os animais são inoculados com os plasmídeos, as regiões codificadoras de genes do parasito são transcritas e traduzidas, resultando em expressão de proteínas do carrapato no vertebrado, induzindo uma resposta imune e a produção de anticorpos contra as proteínas do parasito. A seguir, os animais são infestados com larvas para se observar o efeito protetor da imunização, que é avaliada comparando o desenvolvimento dessas larvas com o desenvolvimento daquelas alimentadas em animais não vacinados. Em *I. scapularis*, foram identificadas três proteínas com capacidade de induzir uma resposta imune protetora (Almazán et al., 2003). A capacidade imunoprotetora não foi só para a infestação por *I. scapularis*, mas também para a infestação por *Dermacentor variabilis* e *A. americanum* (Almazán et al., 2003, 2005a, 2005b).

Estudos ômicos para o estudo da fisiologia do carrapato

Atualmente, metodologias “ômicas” como transcriptômica, proteômica, imunogenômica, biologia de sistemas e bioinformática têm sido utilizadas para

auxiliar o desenvolvimento de novas vacinas. A necessidade de conhecer o genoma para avançar na pesquisa sobre carrapatos e patógenos transmitidos por eles tem sido reconhecida há vários anos. O primeiro organismo a ter o seu genoma completo sequenciado foi a bactéria *Haemophilus influenzae*, em 1995, seguindo-se de genomas de outros microrganismos e de genomas de organismos eucarióticos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 1996, *Drosophila melanogaster* em 2000 e o genoma humano em 2003. Em 2004, um consórcio internacional de pesquisadores iniciou um primeiro esforço para obter a sequência completa do genoma de carrapatos relevantes para a medicina humana. O carrapato *I. scapularis*, transmissor de *Borrelia burgdorferi* (causador da doença de Lyme), *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmose) e *Babesia microti* (responsável pela babesiose) (Belongia et al., 2002; Krause et al., 2002), foi o primeiro carrapato a ter o genoma sequenciado em 2016 (Gulia-Nuss et al., 2016). Apesar dos esforços realizados, o sequenciamento dos genomas de carrapatos foi demorado, devido a dificuldades técnicas, uma vez que esses genomas são grandes e possuem muitas regiões repetitivas (Barrero et al., 2017; Hill et al., 2009; Palmer et al., 1994; Ullmann et al., 2005).

Recentemente, genomas de sete espécies de carrapatos ixodídeos foram estudados (Gulia-Nuss et al., 2016; Jia et al., 2020), quando foi explorada a base genética comum dos carrapatos, incluindo digestão de heme e hemoglobina, metabolismo do ferro e espécies reativas de oxigênio, os quais são alvos averiguados para o desenvolvimento de métodos de controle para os carrapatos. Na análise comparativa, diferentes perfis genéticos e a distinta composição de patógenos, como *Babesia sp.*, *Rickettsia sp.* e *Ehrlichia sp.*, foram observados entre as espécies de carrapatos estudadas, sugerindo, pela primeira vez, que isso possa estar relacionado à adaptação dos ectoparasitos em relação à distribuição geográfica e aos hospedeiros parasitados (Jia et al., 2020). Além disso, vários novos grupos de proteínas exclusivas de carrapatos foram e continuam sendo identificados.

Em 2011, o sialoma do carrapato *Amblyomma variegatum* foi descrito em um estudo proteômico das glândulas salivares desse parasito (Ribeiro et al., 2011). As principais revelações trazidas pelos projetos de sialoma de carrapatos, realizados nas últimas décadas, foram revisadas recentemente (Martins et al., 2021). Entre elas, destaca-se o desenvolvimento de alguns medicamentos derivados de moléculas dos carrapatos e identificação de alvos na fisiologia do carrapato, que podem ser utilizados para a obtenção de novos métodos de controle, incluindo acaricidas e vacinas. Proteínas secretadas na saliva despertam o interesse como antígenos vacinais, uma vez que são inoculadas

durante a alimentação do carrapato e modulam o sistema imune do hospedeiro (Kim et al., 2020; Tirloni et al., 2020), e a inibição de suas funções pode dificultar a alimentação e/ou digestão. Entretanto, mais observações são necessárias para identificar esses alvos, entre eles o estágio de alimentação e o hospedeiro em que o parasito se alimenta.

Foi demonstrado que o perfil proteico da saliva sofre alterações, de acordo com a fase de alimentação em que o carrapato se encontra (parcialmente ou totalmente alimentado) (Tirloni et al., 2014), bem como o estágio de vida (ninfas ou adultos) (Tirloni et al., 2015). Além disso, observou-se que a estimulação da alimentação do carrapato, quando realizada em diferentes hospedeiros e, de acordo com o tempo transcorrido da alimentação, também influenciam na composição e secreção das proteínas presentes na saliva. A maioria das proteínas associadas à transmissão de patógenos e à regulação da alimentação é secretada nos estágios iniciais (até 48 horas) (50,86). Por isso, proteínas presentes nas diferentes condições são consideradas candidatas a serem estudadas como antígenos vacinais.

Além disso, a busca por outros alvos envolvendo a caracterização de moléculas do sistema nervoso central, que coordenam processos fisiológicos, pode ajudar no estudo de novos métodos para o controle dos carrapatos. Um neuro-hormônio, o periviscerokinina, envolvido na regulação do balanço osmótico em *Ixodes ricinus* e *R. microplus* foi identificado (Neupert et al., 2005). Uma análise do singânglio (sistema nervoso central) do *I. scapularis* revelou a presença de neuropeptídeos e precursores com alta similaridade com neuropeptídeos de insetos (Neupert et al., 2009). Alguns genes transcritos nesse órgão e em órgãos neurosecretórios acessórios do carrapato *D. variabilis* codificam para acetilcolinesterases, receptor muscarínico de acetilcolina (Ach), receptores de dopamina, receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), transportadores de GABA, entre outros (Bissinger et al., 2011). Também foram identificados hormônio de eclosão, corazonina e bursicon no singânglio de *D. variabilis*. Em insetos, essas moléculas participam da regulação do desenvolvimento da cutícula e da muda, sistemas que podem ser modulados para regular a alimentação hematófaga (Bissinger et al., 2011).

Mais recentemente, foram estudados transcriptomas de *R. microplus* órgão/estádio específico (embrião e ovário, glândulas salivares, singânglio, corpo gorduroso e intestino de fêmeas, parcialmente e totalmente ingurgitadas) (Tirloni et al., 2020; Waldman et al., 2022). Precursores de neuropeptídeos foram identificados em um transcriptoma de *R. microplus* e no genoma de diferentes espécies de carrapatos: *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato,

Ixodes persulcatus, *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis longicornis* e *Hyalomma asiaticum* (Jia et al., 2020, bem como em *I. scapularis* (Gulia-Nuss et al., 2016). Como previsto, a maioria das sequências de precursores de neuropeptídeos apresenta mais transcritos no singânglio de *R. microplus* do que nos outros órgãos e estádios avaliados. Além disso, alguns neuropeptídeos foram descritos pela primeira vez em carrapatos, sendo ainda necessário a caracterização fisiológica e funcional (Waldman et al., 2022). Também foi testada uma vacina multiantigênica, usando os neuropeptídeos SIF amida e o peptídeo mioinibitório de *I. scapularis* como antígenos vacinais. Embora tenha levado à produção de altos níveis de anticorpos IgG, a vacinação não reduziu a infestação por carrapatos (Almazán et al., 2020). Esses trabalhos identificaram muitas proteínas, cujas funções permanecem desconhecidas, gerando oportunidades de estudos para análise funcional e/ou descobertas de novos compostos farmacológicos.

Em outra estratégia, a vacinologia reversa permite identificar *in silico* potenciais antígenos vacinais inferidos, com base nas sequências disponibilizadas pelos estudos transcriptômicos (Lew-Tabor et al., 2016; Rappuoli et al., 2000). Em um estudo do sialotranscriptoma (do grego, *sialon*, saliva) de *Rhipicephalus Bursa*, foram selecionados alvos associados à membrana ou secretados pelo carrapato (Couto et al., 2021). Essas proteínas são exclusivas do parasito e são capazes de estimular células T e B em uma resposta imune robusta, assim como não são alergênicos ou tóxicos para o hospedeiro (Couto et al., 2021). Além disso, proteínas possivelmente essenciais para *I. scapularis* foram, recentemente, identificadas e caracterizadas *in silico* (Ali et al., 2021). Uma vez preditas, as proteínas candidatas podem ser expressas e testadas *in vitro* ou *in vivo* e serem exploradas como antígenos vacinais. Com estratégia semelhante, foi realizada a predição de epítomos conservados de células B nas sequências de glutathione-S transferase (GST) de várias espécies de carrapatos de importância econômica (*R. microplus*, *R. appendiculatus*, *A. variegatum*, *H. longicornis* e *Rhipicephalus decoloratus*). Também foi demonstrado que um soro anti-GST recombinante reconheceu, de forma cruzada, os peptídeos derivados das diferentes GST (Ndawula et al., 2020).

A caracterização funcional de proteínas de parasitos por ensaios de RNA de interferência (RNAi) (Almazán et al., 2010; Barnard et al., 2012), também pode ser usada para identificar potenciais alvos vacinais. Por exemplo, o silenciamento de serpinas mediado por RNAi leva à ingestão de menor quantidade de sangue por *A. americanum*. A inibição da atividade de uma serpinapelo uso de anticorpos produz o mesmo efeito, reforçando a sugestão de que essas proteínas sejam candidatos a antígenos vacinais (Kim et al., 2020).

Após a identificação de antígenos vacinais, diferentes estratégias podem ser aplicadas para potencializar a resposta imunogênica. Como exemplo, pode-se citar a seleção racional de peptídeos antigênicos baseada em estudos físico-químicos, com base na composição e estrutura das proteínas candidatas (Tong et al., 2014). Uma vacina na qual o antígeno é construído para conter duas ou mais sequências peptídicas de diferentes antígenos é denominada de vacina quimérica. Essa abordagem pode ser usada para aumentar a proteção gerada pela resposta imune do hospedeiro ou para desenvolver novas construções de vacinas.

Essa estratégia visa ao bloqueio simultâneo de várias funções dos carrapatos pela seleção de epítomos protetores e pela remoção de epítomos que não são imunogênicos e/ou interferem na resposta imune protetora. Esse conjunto de análises vem sendo aprimorado (Nuccitelli et al., 2011; Patarroyo et al., 2009; Shrivastava et al., 2013; Singh et al., 2012), resultando em uma estratégia racional para a identificação de sequências de aminoácidos para a composição de uma vacina quimérica. Foi proposto que diferentes antígenos/epítomos de carrapatos podem ser expressos como uma única proteína, que pode ter capacidade de induzir proteção cruzada contra outras espécies de carrapatos (Parthasarathi et al., 2003).

A relativamente nova técnica de CRISPR (Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas) é considerada uma ferramenta de edição de DNA com alta capacidade de manipulação de genes e elevada precisão, rapidez e menor custo (Adli et al., 2018; Lau et al., 2017). Essa técnica está sendo utilizada em muitos organismos, inclusive em parasitos (Bryant et al., 2019; McVeigh et al., 2019; Zhang et al., 2015), tanto para estudos básicos como para o tratamento de doenças (Mittal et al., 2019; Zhao et al., 2021). Até o momento, seu uso em carrapatos ainda é escasso pela falta de sequências genômicas bem estudadas e também por desafios técnicos relacionados à manipulação de ovos e embriões de carrapatos. Só recentemente que alguns protocolos estão sendo desenvolvidos para uso de CRISPR nesse ectoparasito (Sharma et al., 2022). Imagina-se que, futuramente, essa técnica seja de grande valia em estudos relativos aos mecanismos fisiológicos de carrapatos e patógenos transmitidos por eles (Nuss et al., 2021).

Alvos relacionados à embriogênese de carrapatos

Diferentes alvos têm sido analisados para interferir em processos fisiológicos que possam ser úteis para o desenvolvimento de vacinas. Essa

estratégia requer o estudo das vias metabólicas, que ocorrem em diferentes órgãos e nos estádios de vida dos carrapatos. A seguir, estão ressaltados os principais estudos realizados com este objetivo:

A glicolipoproteína BYC (*Boophilus* Yolk *pro*-Cathepsin) participa na digestão da vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos do carrapato (Logullo et al., 1998). Bovinos imunizados com BYC produzem imunoglobulinas que migraram para a hemolinfa dos carrapatos que parasitavam esses animais. Efetivamente, imunoglobulinas bovinas circulantes na hemolinfa mantêm suas atividades biológicas (medida pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente). Esse resultado mostra que anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal do carrapato, e, possivelmente, se fixar em antígenos localizados em tecidos ou órgãos internos (da Silva Vaz et al., 1996). Por outro lado, a inoculação de fêmeas ingurgitadas com anticorpos monoclonais anti-BYC reduziu tanto o peso dos ovos, quanto a taxa de sobrevivência das fêmeas durante o período de postura, de forma dose-dependente (da Silva Vaz et al., 1998). Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas de *R. microplus*, houve a redução no número de teleóginas, na capacidade de postura e na viabilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%. Posteriormente, foi mostrado que a proteína BYC recombinante é imunoprotetora para bovinos, apresentando 25% de proteção contra *R. microplus* (Leal et al., 2006).

Além da BYC, o potencial imunogênico de proteínas envolvidas no metabolismo da vitelina foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelo experimental (Tellam et al., 2002). A sequência de duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina (VIT87 e GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente, foram analisadas. Essas proteínas apresentaram identidade em, no mínimo, 11 resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal, demonstrando serem altamente relacionadas (Tellam et al., 2002). Ovinos imunizados com VIT87 ou GP80 reduziram o número de larvas de *R. microplus* após um ciclo completo em 68% e 66%, respectivamente.

Alvos relacionados ao processo digestório dos carrapatos

Inibidores de tripsina de *R. microplus* (BmTI) foram detectados em concentrações variáveis nas diferentes fases de desenvolvimento do carrapato, sugerindo terem um papel na interação parasito-hospedeiro. BmTIs, purificados de larvas, foram usados como antígeno para vacinação de bovinos que, então, foram desafiados com larvas de *R. microplus* (Andreotti et al., 2002). A eficácia total da vacinação com BmTIs foi de 73%.

O uso de serpinas como antígeno vacinal vem sendo explorado para diferentes espécies de carrapato (*R. microplus*, *I. ricinus*, *R. appendiculatus* e *A. americanum*) (Imamura et al., 2006; Imamura et al., 2008; Jittapalapong et al., 2010; Kim et al., 2016; Mulenga et al., 2000; Prevot et al., 2007). Como exemplo, duas serpinas de *H. longicornis* com atividade anticoagulante, quando inoculadas em coelhos, induzem proteção parcial (aproximadamente 40% de mortalidade dos parasitos) contra infestação pelo carrapato (Imamura et al., 2005; Sugino et al., 2003).

Também foram estudadas proteínas que armazenam ferro e que desempenham funções críticas no metabolismo, como as ferritinas. Nos carrapatos, as ferritinas são essenciais para a alimentação sanguínea, a reprodução, o transporte de ferro e a proteção contra o estresse oxidativo mediado pelo ferro durante a alimentação e a digestão do sangue (Galay et al., 2013; Galay et al., 2014; Hernandez et al., 2020; Oleaga et al., 2022; Zhao et al., 2022). Os carrapatos possuem duas formas de ferritinas, uma intracelular e uma secretada, sendo que essa última foi descrita apenas em carrapatos (Hajdusek et al., 2009). Ensaios de vacinação utilizando ferritinas reduziram o peso, o número e capacidade reprodutiva de diferentes espécies de carrapato (Galay et al., 2013; Githaka et al., 2020; Hajdusek et al., 2010), tornando essas proteínas candidatas para comporem vacinas mono e multi-antigênicas.

Ademais, uma superfamília de proteínas evolutivamente conservadas em bactérias a mamíferos, denominadas aquaporinas (AQP) foram analisadas. As AQP formam poros nas membranas celulares, através dos quais água e pequenos solutos neutros, incluindo glicerol e ureia, podem ser transportados. Em carrapatos, essas proteínas participam de vários processos fisiológicos, incluindo produção de saliva, alimentação, concentração do sangue ingerido e regulação do estresse osmótico (Pérez-Sánchez et al., 2022). Infestações por algumas espécies de carrapatos, entre elas *I. ricinus*, *R. microplus* e *R. sanguineus* sensu lato, foram reduzidas pela imunização dos hospedeiros quando AQP foram utilizadas como antígenos vacinais (Contreras et al., 2017; Scoles et al., 2022).

Alvos relacionados a modulação do sistema imune dos hospedeiros

Metaloproteases são endopeptidases multidomínio e componentes bioativos-chaves em processos fisiológicos vitais de invertebrados. Dessa forma, são vistas como possíveis alvos para o controle de microrganismos e parasitos (Barnard et al., 2012). Por sua vez, os carrapatos dependem de metaloproteases

para a infestação. Essas enzimas estão envolvidas em interações moleculares complexas entre os carrapatos e os processos imunológicos, inflamatórios e hemostáticos do hospedeiro (Ali et al., 2015; Perner et al., 2020). Efetivamente, ensaios de vacinação de hospedeiros com essas endopeptidases afetam diversos parâmetros fisiológicos, como o inorgitamento e a fecundidade de *I. ricinus* (Decrem et al., 2008), a sobrevivência de *H. longicornis* (Imamura et al., 2009) e de *R. microplus* (Ali et al., 2015).

Cistatinas são inibidores reversíveis de cisteino endopeptidases que, entre outras funções, atuam como mediadoras da atividade proteolítica dentro dos lisossomos. Em carrapatos, essas endopeptidases são importantes para o sucesso da alimentação, como demonstrado em *A. americanum* (Karim et al., 2005), *H. longicornis* (Yamaji et al., 2009) e *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2007). Em *I. scapularis*, foi demonstrado que existem, pelo menos, duas cistatinas, sendo expressas em diferentes momentos do ciclo de vida e em diferentes tecidos (Kotsyfakis et al., 2007). Essas cistatinas inibem catepsinas L e S humanas, sugerindo que podem ter atividade na modulação do sistema imune e do remodelamento tecidual dos hospedeiros, facilitando a alimentação hematófaga. Imunizações de cobaias, camundongos e coelhos com cistatinas recombinantes conferiram proteção parcial contra *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2008), *Ornithodoros moubata* (Salat et al., 2010) e *R. microplus* (Parizi et al., 2020), respectivamente. Esses resultados demonstraram que as cistatinas têm um papel importante na alimentação dos carrapatos e, também, têm potencial para serem usadas como componentes de uma vacina contra esses parasitos.

Alvos relacionados a outros processos fisiológicos

Além dos antígenos avaliados imunologicamente e descritos anteriormente, várias moléculas envolvidas em outros processos fisiológicos do carrapato e na sua interação com o hospedeiro têm sido propostas como possíveis antígenos vacinais.

Foi observado que a imunização de cobaias com uma proteína recombinante do cemento de *R. appendiculatus* (64TRP) induz proteção parcial contra esse carrapato (Trimnell et al., 2002). Uma vacina contendo essa proteína também protegeu cobaias contra a infestação por *R. sanguineus sensu lato*, assim como coelhos e camundongos contra a infestação por *I. ricinus* (Trimnell et al., 2005). Apesar dos índices de proteção parcial serem baixos, esses achados indicam a possibilidade de usar tal antígeno em vacinas multiespécies. Além disso, a imunização com 64TRP interfere na transmissão do vírus da encefalite

por *I. ricinus*, possivelmente devido à resposta inflamatória cutânea no local da picada do carrapato (Labuda et al., 2006). Isso demonstrou que o uso dessa vacina pode auxiliar na prevenção da transmissão de patógenos.

As GST constituem uma família multifuncional de enzimas presentes em animais e vegetais. Suas funções incluem transporte intracelular, participação em processos digestórios, síntese de prostaglandinas e, principalmente, destoxificação de substâncias endógenas e exógenas e proteção contra o estresse oxidativo (Lee et al., 2002; Rosa De Lima et al., 2002). Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticidas em vários organismos (Rufingier C. 1999). Além disso, foi demonstrado o papel dessa enzima na destoxificação de ácaros expostos à permetrina e à ivermectina (Mounsey et al., 2010). Em carrapatos, as GST são sintetizadas nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas (Rosa De Lima et al., 2002; Freitas et al., 2008). Uma GST recombinante de *H. longicornis* (GST-HI) foi utilizada em ensaios de proteção cruzada, reduzindo em 57% a infestação por *R. microplus* em bovinos (Parizi et al., 2011), e em 67% a infestação por *R. appendiculatus* em coelhos (Sabadin et al., 2017). Interessantemente, apesar da GST-HI não proteger coelhos contra *R. sanguineus sensu lato* (Sabadin et al., 2017), uma vacina multiantigênica, constituída por GST de *R. decoloratus* e *A. variegatum*, apresentou uma proteção de 35% contra esse carrapato (Ndawula et al., 2019).

Subolesina e a akirina são proteínas ortólogas em carrapatos e mosquitos, respectivamente, envolvidas na regulação da expressão gênica (Artigas-Jerónimo et al., 2021a, b). Ambas as proteínas induziram uma resposta imune protetora quando usadas como antígenos vacinais contra carrapatos (Almazán et al., 2005; 2010; Almazán et al., 2012; Kasaija et al., 2020; Lee et al., 2020) e mosquitos (Letinić et al., 2021). Pela alta similaridade de aminoácidos entre a subolesina e a akirina em regiões contendo epítomos antigênicos, essas proteínas poderiam ser usadas no controle desses vetores em uma vacina universal (Canales et al., 2009). Nesse sentido, foi realizado um ensaio de proteção cruzada contra a infestação de carrapatos em veados vermelhos imunizados com a akirina de *Aedes albopictus*, resultando na redução da infestação por *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. (Carreón et al., 2012). Uma quimera composta por regiões da subolesina e a akirina mostrou proteção contra múltiplas espécies de carrapato (Contreras et al., 2020).

A proteína P0 é essencial para a montagem da subunidade ribossomal 60S e foi demonstrado que a imunização com um peptídeo imunogênico, derivado dessa proteína, reduziu a sobrevivência de *R. sanguineus sensu lato* em coelhos

(Rodríguez-Mallon et al., 2012) e de *R. microplus* em bovinos (Rodríguez-Mallon et al., 2015). Isso indica que a P0 tem potencial como antígeno para o controle de carrapatos. A capacidade de uma vacina multiantigênica, composta de subolesina e de um peptídeo da P0, de interferir na viabilidade de adultos de *H. longicornis* foi avaliada (Hassan et al., 2020). A primeira dose foi constituída de vacina de DNA para a expressão de subolesina, seguida de reforços de um único antígeno (subolesina) ou um polipeptídeo quimérico (subolesina/P0), afetando a sobrevivência, a ingestão de sangue e a reprodução. As eficácias da vacinação foram de 79,3% e 86,6% para os grupos que receberam as segundas doses de subolesina e subolesina/P0, respectivamente.

Estudos sobre *R. microplus* no Brasil

A contribuição do Brasil para os estudos sobre o carrapato *R. microplus* pode ser inferida, analisando o número de publicações em revistas científicas que tem esse parasito como foco. No período de 1986 a 1996, usando a palavra-chave “*microplus*” foram localizados 22 artigos de pesquisadores brasileiros em revistas indexadas no ISI, 2 deles de autoria de pesquisadores do Instituto de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM). Em comparação, no período de 2001 a 2011, foram localizados 308 artigos de pesquisadores brasileiros (61 artigos de autoria de pesquisadores do INCT-EM). Pesquisando-se a palavra-chave “*tick*” no período de 2012 a 2021, 255 artigos, dos 24.028 encontrados, pertenciam aos pesquisadores do INCT-EM. É importante ressaltar que, nesse período, os trabalhos envolveram diferentes aspectos da biologia do carrapato. Alguns exemplos são os estudos sobre métodos de controle biológico e imunológico, identificação de novas proteínas com a caracterização da função biológica, clonagem e transcrição de genes. Em uma parcela significativa desses trabalhos, existiu a associação entre pesquisadores do grupo Arthromint.

Considerações finais

Os problemas ocasionados pela seleção de carrapatos resistentes a acaricidas, o alto custo dos produtos sintéticos e da mão de obra na aplicação desses compostos, bem como o aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levam, cada vez mais, à procura de métodos biológicos e imunológicos, como formas alternativas de controle do carrapato. Apesar de o controle imunológico ainda não satisfazer completamente as necessidades da pecuária, os diversos resultados obtidos com proteções

parciais, tanto em experimentos controlados como em testes a campo, indicam que o desenvolvimento de uma vacina para o controle de carrapatos é um objetivo viável a médio e longo prazo, podendo vir a ser utilizado como complemento aos métodos existentes, atualmente, e como alternativa ao uso dos acaricidas sintéticos.

Referências

- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* Dezembro de 2018;9(1):1911.
- Ali A, Ahmad S, de Albuquerque PMM, Kamil A, Alshammari FA, Alouffi A, et al. Prediction of novel drug targets and vaccine candidates against human lice (insecta), acari (arachnida), and their associated pathogens. *Vaccines.* Dezembro de 2021;10(1):8.
- Ali A, Khan S, Ali I, Karim S, da Silva Vaz I, Termignoni C. Probing the functional role of tick metalloproteases: Tick metalloproteases. *Physiol Entomol.* Setembro de 2015;40(3):177–88.
- Ali A, Numan M, Khan M, Aiman O, Muñoz-Leal S, Chitimia-Dobler L, et al. *Ornithodoros* (Pavlovskyella) ticks associated with a *Rickettsia* sp. in Pakistan. *Parasit Vectors.* Dezembro de 2022;15(1):138.
- Ali A, Parizi LF, Guizzo MG, Tirloni L, Seixas A, Vaz Ida S Jr, et al. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* metalloprotease. *Vet Parasitol.* Janeiro de 2015;207(1–2):107–14.
- Ali A, Zeb I, Alouffi A, Zahid H, Almutairi MM, Ayed Alshammari F, et al. Host immune responses to salivary components - A critical facet of tick-host interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* Março de 2022;12:809052.
- Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, et al. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine.* Agosto de 2005a;23(35):4403–16.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine.* Março de 2003;21(13–14):1492–501.
- Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine.* Novembro de 2005b;23(46–47):5294–8.
- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, et al. Identification and characterization of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res.* Janeiro de 2010;106(2):471–9.
- Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine.* Janeiro de 2012;30(2):265–72.
- Almazán C, Šimo L, Fourniol L, Rakotobe S, Borneres J, Cote M, et al. Multiple antigenic peptide-based vaccines targeting *Ixodes ricinus* neuropeptides induce a specific antibody response but do not impact tick infestation. *Pathogens.* Outubro de 2020;9(11):900.

Alves-Branco FP, Echevarria FAM, Siqueira AS. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. EMBRAPA; 1983.

Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CAM, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. Int Immunopharmacol. Março de 2002;2(4):557–63.

Artigas-Jerónimo S, Villar M, Cabezas-Cruz A, Caignard G, Vitour D, Richardson J, et al. Tick importin- α is implicated in the interactome and regulome of the cofactor subolesin. Pathogens. Abril de 2021b;10(4):457.

Artigas-Jerónimo S, Villar M, Estrada-Peña A, Velázquez-Campoy A, Alberdi P, de la Fuente J. Function of cofactor Akirin2 in the regulation of gene expression in model human Caucasian neutrophil-like HL60 cells. Biosci Rep. Julho de 2021a;41(7):BSR20211120.

Barnard AC, Nijhof AM, Gaspar ARM, Neitz AWH, Jongejan F, Maritz-Olivier C. Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol. Maio de 2012;186(3–4):403–14.

Barrero RA, Guerrero FD, Black M, McCooke J, Chapman B, Schilkey F, et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. Int J Parasitol. Agosto de 2017;47(9):569–83.

Belongia EA, Naimi TS, Gale CM, Besser RE. Antibiotic Use and Upper Respiratory Infections: A survey of knowledge, attitudes, and experience in Wisconsin and Minnesota. Prev Med. Março de 2002;34(3):346–52.

Bharadwaj A, Stafford KC. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strain F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. Setembro de 2010;47(5):862–7.

Bissinger BW, Donohue KV, Khalil SMS, Grozinger CM, Sonenshine DE, Zhu J, et al. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): Tick synganglion transcriptome. Insect Mol Biol. Agosto de 2011;20(4):465–91.

Bryant JM, Baumgarten S, Glover L, Hutchinson S, Rachidi N. CRISPR in parasitology: not exactly cut and dried! Trends Parasitol. Junho de 2019;35(6):409–22.

Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. BMC Biotechnol. Março de 2009;9(1):29.

Carreón D, Pérez de la Lastra JM, Almazán C, Canales M, Ruiz-Fons F, Boadella M, et al. Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer. Vaccine. Janeiro de 2012;30(2):273–9.

Contreras M, de la Fuente J. Control of infestations by *Ixodes ricinus* tick larvae in rabbits vaccinated with aquaporin recombinant antigens. *Vaccine*. Março de 2017;35(9):1323–8.

Contreras M, San José C, Estrada-Peña A, Talavera V, Rayas E, Isabel León C, et al. Control of tick infestations in wild roe deer (*Capreolus capreolus*) vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine*. Setembro de 2020;38(41):6450–4.

Cordoves Céspedes CO. Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Gralha; 1996.

Couto J, Seixas G, Stutzer C, Olivier NA, Maritz-Olivier C, Antunes S, et al. Probing the *Rhipicephalus bursa* sialomes in potential anti-tick vaccine candidates: A Reverse vaccinology approach. *biomedicines*. Março de 2021;9(4):363.

Cruz APR, Silva SS, Mattos RT, Da Silva Vaz I, Masuda A, Ferreira CAS. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet Parasitol*. Novembro de 2008;158(1–2):152–8.

da Costa GL, Sarquis MIM, de Moraes AML, Bittencourt VREP. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. Agosto de 2002;154(4):207–9.

da Silva Vaz I, Logullod C, Sorgine M, Velloso FF, Rosa de Lima MF, Gonzales JC, et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol*. Dezembro de 1998;66(3–4):331–41.

da Silva Vaz I, Moraes Martinez RH, Oliveira A, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol*. Março de 1996;62(1–2):155–60.

Davey RB, George JE, Snyder DE. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Vet Parasitol*. Julho de 2001;99(1):41–52.

de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine GavacTM. *Genet Anal - Biomol Eng*. Novembro de 1999;15(3–5):143–8.

Decrem Y, Mariller M, Lahaye K, Blasioli V, Beaufays J, Zouaoui Boudjeltia K, et al. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*. Abril de 2008;38(5):549–60.

Dzemo WD, Thekiso O, Vudriko P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. Janeiro de 2022;8(1):e08718.

Elder JK, Emmerson FR, Kearnan JF, Waters KS, Dunwell GH, Morris RS, et al. A survey concerning cattle tick control in queensland. *Chemical Control. Aust Vet J.* Maio de 1980;56(5):212–8.

Évora PM, Sanches GS, Guerrero FD, de León AP, Bechara GH. Immunogenic potential of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin 1 against *Rhipicephalus sanguineus* in domestic dogs. *Rev Bras Parasitol Vet.* Janeiro de 2017;26(1):60–6.

Farias NA da R, Gonzales JC, de Saibro JC. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesqui Agropecuária Bras.* Dezembro de 1986;21(12).

Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp Appl Acarol.* Dezembro de 2008;46(1–4):71–93.

Flores-Fernández JM, Padilla-Camberos E, Castillo Herrera GA, Martínez-Velázquez M. Adulticidal and oviposition- and hatching-altering activities of essential oil from Mexican oregano leaves (*Lippia graveolens* H.B.K.) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Trop Biomed.* Junho de 2016;33(2):290–4.

Franzin AM, Maruyama SR, Garcia GR, Oliveira RP, Ribeiro JMC, Bishop R, et al. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors.* Dezembro de 2017;10(1):51.

Frazzon APG, Vaz Junior I da S, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* Dezembro de 2000;94(1–2):117–25.

Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit Vectors.* Novembro de 2010;3(1).

Freitas DRJ de, Vaz Junior I da S, Masuda A. Expressão e atividade enzimática de glutationa s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* Junho de 2008;17(2):99–104.

Galay RL, Aung KM, Umemiya-Shirafuji R, Maeda H, Matsuo T, Kawaguchi H, et al. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Exp Biol.* Maio de 2013;216(10):1905–15.

Galay RL, Umemiya-Shirafuji R, Bacolod ET, Maeda H, Kusakisako K, Koyama J, et al. Two kinds of ferritin protect Ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress. *Mans BJ, organizador. PLoS ONE.* Março de 2014;9(3):e90661.

Garcia GR, Chaves Ribeiro JM, Maruyama SR, Gardinassi LG, Nelson K, Ferreira BR, et al. A transcriptome and proteome of the tick *Rhipicephalus microplus* shaped by the genetic composition of its hosts and developmental stage. *Sci Rep.* Dezembro de 2020;10(1):12857.

García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. Abril de 2000;18(21):2275–87.

Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol*. Fevereiro de 2014;45:111–24.

Githaka NW, Konnai S, Isezaki M, Goto S, Xavier MA, Fujisawa S, et al. Identification and functional analysis of ferritin 2 from the Taiga tick *Ixodes persulcatus* Schulze. *Ticks Tick-Borne Dis*. Novembro de 2020;11(6):101547.

Gonzales JC. O controle do carrapato do boi. 2^o ed. Porto Alegre: edição do autor; 1995.

Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. Junho de 2014;23(2):150–6.

Guerrero FD, Andreotti R, Bendele KG, Cunha RC, Miller RJ, Yeater K, et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2014;7(1):475.

Guglielmone AA, Mangold AJ, Muñoz Cobeñas ME, Scherling N, García Posse F, Anziani OS, et al. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Vet Parasitol*. Janeiro de 2000;87(2–3):237–41.

Guglielmone AA, Petney TN, Robbins RG. Ixodidae (Acari: Ixodoidea): descriptions and redescriptions of all known species from 1758 to December 31, 2019. *Zootaxa*. 5 de novembro de 2020;4871(1):1–322.

Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun*. Abril de 2016;7(1):10507.

Hajdusek O, Almazán C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. Abril de 2010;28(17):2993–8.

Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, et al. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci*. Janeiro de 2009;106(4):1033–8.

Hassan IA, Wang Y, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Cross protection induced by combined Subolesin-based DNA and protein immunizations against adult *Haemaphysalis longicornis*. *Vaccine*. Janeiro de 2020;38(4):907–15.

Hernandez EP, Shimazaki K, Niihara H, Umemiya-Shirafuji R, Fujisaki K, Tanaka T. Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Heliyon*. Março de 2020;6(3):e03644.

Hill CA, Guerrero FD, Van Zee JP, Geraci NS, Walling JG, Stuart JJ. The position of repetitive DNA sequence in the southern cattle tick genome permits chromosome identification. *Chromosome Res*. Janeiro de 2009;17(1):77–89.

Hollmann T, Kim TK, Tirloni L, Radulović ŽM, Pinto AFM, Diedrich JK, et al. Identification and characterization of proteins in the *Amblyomma americanum* tick cement cone. *Int J Parasitol*. Março de 2018;48(3–4):211–24.

Imamura S, da Silva Vaz I, Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M, et al. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol*. Agosto de 2009;48(4):345.

Imamura S, Junior I da SV, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. Janeiro de 2005;23(10):1301–11.

Imamura S, Konnai S, Vaz IDS, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Jpn J Vet Res*. Agosto de 2008;56(2):85–98.

Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*. Março de 2006;24(13):2230–7.

Jia N, Wang J, Shi W, Du L, Sun Y, Zhan W, et al. Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell*. Setembro de 2020;182(5):1328-1340.e13.

Jittapalapong S, Kaewhom P, Pumhom P, Canales M, De La Fuente J, Stich RW. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*: Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor. *Transbound Emerg Dis*. Abril de 2010;57(1–2):103–6.

Johnston TH, Brancroft MJ. A tick resistant condition in cattle. *Proc R Soc Qld*. 1918;30:209–317.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129:S3–14.

Jonsson NN, Mayer DG, Green PE. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol*. Fevereiro de 2000;88(1–2):79–92.

Jonsson NN, Miller RJ, Kemp DH, Knowles A, Ardila AE, Verrall RG, et al. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Vet Parasitol.* Abril de 2010;169(1–2):157–64.

Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol.* Abril de 2006;137(1–2):1–10.

Kaaya GP, Mwangi EM, Ouna EA. Prospects for biological control of livestock ticks, and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* Janeiro de 1996;67(1):15–20.

Kaaya GP. The potential for antitick plants as components of an integrated tick control strategy. *Ann N Y Acad Sci.* Janeiro de 2000;916:576–82.

Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochem Biophys Res Commun.* Setembro de 2005;334(4):1336–42.

Kasaija PD, Contreras M, Kabi F, Mugerwa S, de la Fuente J de la. Vaccination with recombinant subolesin antigens provides cross-tick species protection in *Bos indicus* and crossbred cattle in Uganda. *Vaccines.* Junho de 2020;8(2):319.

Kim TK, Radulovic Z, Mulenga A. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks Tick-Borne Dis.* Abril de 2016;7(3):405–14.

Kim TK, Tirloni L, Berger M, Diedrich JK, Yates JR, Termignoni C, et al. *Amblyomma americanum* serpin 41 (AAS41) inhibits inflammation by targeting chymase and chymotrypsin. *Int J Biol Macromol.* Agosto de 2020;156:1007–21.

Kim TK, Tirloni L, Pinto AFM, Diedrich JK, Moresco JJ, Yates JR, et al. Time-resolved proteomic profile of *Amblyomma americanum* tick saliva during feeding. *PLoS Negl Trop Dis.* Fevereiro de 2020;14(2):e0007758.

Kocan KM. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Vet Parasitol.* Março de 1995;57(1–3):121–51.

Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, Andersen JF, Francischetti IMB, Chavakis T, et al. Modulation of host immunity by tick saliva. *J Proteomics.* Outubro de 2015;128:58–68.

Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, et al. Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol.* Outubro de 2008;181(8):5209–12.

Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem.* 5 de outubro de 2007;282(40):29256–63.

Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, et al. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis*. Maio de 2002;34(9):1184–91.

Labuda M, Trimnell AR, Ličková M, Kazimírová M, Davies GM, Lissina O, et al. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog*. Abril de 2006;2(4):e27.

Lau V, Davie JR. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation. *Biochem Cell Biol*. Abril de 2017;95(2):203–10.

Leal AT, Seixas A, Pohl PC, Ferreira CAS, Logullo C, Oliveira PL, et al. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol*. Dezembro de 2006;114(3–4):341–5.

Lee AJ, Huntley J, Van den Broek A, Coates D, Elwyn Isaac R. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Vet Parasitol*. Abril de 2002;105(1):49–63.

Lee SH, Li J, Moumouni PFA, Okado K, Zheng W, Liu M, et al. Subolesin vaccination inhibits blood feeding and reproduction of *Haemaphysalis longicornis* in rabbits. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2020;13(1):478.

Letinić BD, Contreras M, Dahan-Moss Y, Linnekugel I, de la Fuente J, Koekemoer LL. Additional evidence on the efficacy of different Akirin vaccines assessed on *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. Dezembro de 2021;14(1):209.

Lew-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis*. Junho de 2016;7(4):573–85.

Logullo C, Da Silva Vaz I, Sorgine MHF, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali RB, et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. Junho de 1998;116:525–32.

Martinez-Velazquez M, Rosario-Cruz R, Castillo-Herrera G, Flores-Fernandez JM, Alvarez AH, Lugo-Cervantes E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. Julho de 2011;48(4):822–7.

Martins LA, Bensaoud C, Kotál J, Chmelař J, Kotsyfakis M. Tick salivary gland transcriptomics and proteomics. *Parasite Immunol*. Maio de 2021;43(5):e12807. McVeigh P, Maule AG. Can CRISPR help in the fight against parasitic worms? *eLife*. Janeiro de 2019;8:e44382.

Michereff Filho M, Faria M, Wraight SP, Silva KFAS. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? *Arq Inst Biológico*. Dezembro de 2009;76(4):769–79.

- Mittal RD. Gene editing in clinical practice: Where are we? *Indian J Clin Biochem.* Janeiro de 2019;34(1):19–25.
- Mounsey KE, Pasay CJ, Arlian LG, Morgan MS, Holt DC, Currie BJ, et al. Increased transcription of Glutathione S-transferases in acaricide exposed scabies mites. *Parasit Vectors.* Maio de 2010;3(1):43.
- Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: Identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect.* Setembro de 2000;2(11):1353–61.
- Murrell A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.* Novembro de 2003;56(3):169–72.
- Narasimhan S, Kurokawa C, Diktas H, Strank NO, Černý J, Murfin K, et al. *Ixodes scapularis* saliva components that elicit responses associated with acquired tick-resistance. *Ticks Tick-Borne Dis.* Maio de 2020;11(3):101369.
- Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol.* Março de 1995;57(1–3):153–65.
- Ndawula C, Amaral Xavier M, Villavicencio B, Cortez Lopes F, Juliano MA, Parizi LF, et al. Prediction, mapping and validation of tick glutathione S-transferase B-cell epitopes. *Ticks Tick-Borne Dis.* Julho de 2020;11(4):101445.
- Ndawula C, Sabadin GA, Parizi LF, da Silva Vaz I. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine.* Março de 2019;37(14):1918–27.
- Neupert S, Predel R, Russell WK, Davies R, Pietrantonio PV, Nachman RJ. Identification of tick periviscerokinin, the first neurohormone of Ixodidae: Single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* Dde 2005;338(4):1860–4.
- Neupert S, Russell WK, Predel R, Russell DH, Strey OF, Teel PD, et al. The neuropeptidomics of *Ixodes scapularis* synganglion. *J Proteomics.* Agosto de 2009;72(6):1040–5.
- Nuccitelli A, Cozzi R, Gourlay LJ, Donnarumma D, Necchi F, Norais N, et al. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus* infections. *Proc Natl Acad Sci.* Junho de 2011;108(25):10278–83.
- Nuss A, Sharma A, Gulia-Nuss M. Genetic manipulation of ticks: A paradigm shift in tick and tick-borne diseases research. *Front Cell Infect Microbiol.* Maio de 2021;11:678037.
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* Abril de 2006;28(4):155–63.

- Obaid MK, Islam N, Alouffi A, Khan AZ, da Silva Vaz I, Tanaka T, et al. Acaricides resistance in ticks: Selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Front Cell Infect Microbiol*. Julho de 2022;12:941831.
- Oleaga A, González-Pérez S, Pérez-Sánchez R. First molecular and functional characterisation of ferritin 2 proteins from *Ornithodoros* argasid ticks. *Vet Parasitol*. Abril de 2022;304:109684.
- Otto PI, Guimarães SEF, Verardo LL, Azevedo ALS, Vandenplas J, Soares ACC, et al. Genome-wide association studies for tick resistance in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle: A deeper look into this intricate mechanism. *J Dairy Sci*. Dezembro de 2018;101(12):11020–32.
- Palmer MJ, Bantle JA, Guo X, Fargoxy WS. Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Mol Biol*. Fevereiro de 1994;3(1):57–62.
- Parizi LF, Rangel CK, Sabadin GA, Saggin BF, Kiio I, Xavier MA, et al. *Rhipicephalus microplus* cystatin as a potential cross-protective tick vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks Tick Borne Dis*. Maio de 2020;11(3):101378.
- Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, et al. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp Parasitol*. Janeiro de 2011;127(1):113–8.
- Parthasarathi BC, Kumar B, Ghosh S. Current status and future prospects of multi-antigen tick vaccine. *J Vector Borne Dis*. Setembro de 2021;58(3):183–92.
- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Couto Pimentel J, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol*. Setembro de 2002;88(3–4):163–72.
- Patarroyo JH, Vargas MI, González CZ, Guzmán F, Martins-Filho OA, Afonso LCC, et al. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. Dezembro de 2009;166(3–4):333–9.
- Patarroyo S. JH, de Sousa Neves E, Fidelis CF, Tafur-Gómez GA, de Araujo L, Vargas MI, et al. Bovine immunisation with a recombinant peptide derived from synthetic SBm7462® (Bm86 epitope construct) immunogen for *Rhipicephalus microplus* control. *Ticks Tick-Borne Dis*. Setembro de 2020;11(5):101461.
- Pérez-Sánchez R, Cano-Argüelles AL, González-Sánchez M, Oleaga A. First data on *Ornithodoros moubata* aquaporins: structural, phylogenetic and immunogenic characterisation as vaccine targets. *Pathogens*. Junho de 2022;11(6):694.
- Perner J, Helm D, Haberkant P, Hatalova T, Kropackova S, Ribeiro JM, et al. The central role of salivary metalloproteases in host acquired resistance to tick feeding. *Front Cell Infect Microbiol*. Novembro de 2020;10:563349.

Polar P, Moore D, Kairo MTK, Ramsubhag A. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol*. Dezembro de 2008;46(1–4):119–48.

Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*. Abril de 2007;25(17):3284–92.

Pruett JH. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review. *Int J Parasitol*. Janeiro de 1999;29(1):25–32.

Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. Outubro de 2000;3(5):445–50.

Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol*. Março de 2014;201(1–2):128–36.

Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*. Dezembro de 2011;12(1):136.

Riding GA, Jarmey J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J Immunol Baltim Md 1950*. Dezembro de 1994;153(11):5158–66.

Rodríguez-Mallon A, Encinosa PE, Méndez-Pérez L, Bello Y, Rodríguez Fernández R, Garay H, et al. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-Borne Dis*. Junho de 2015;6(4):530–7.

Rodríguez-Mallon A, Fernández E, Encinosa PE, Bello Y, Méndez-Pérez L, Ruiz LC, et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*. Fevereiro de 2012;30(10):1782–9.

Rodríguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol Res*. 2018;117(1):3–29.

Rosa De Lima MF, Sanchez Ferreira CA, Joaquim De Freitas DR, Valenzuela JG, Masuda A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione s-transferase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32(7):747–54.

Rufingier C. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. *Insect Biochem Mol Biol*. Abril de 1999;29(4):385–91.

Sabadin GA, Parizi LF, Kiio I, Xavier MA, da Silva Matos R, Camargo-Mathias MI, et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. *Vaccine*. Dezembro de 2017;35(48):6649–56.

Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, et al. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochem J*. Julho de 2010;429(1):103–12.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. *Parasitology*. Outubro de 2004;129(S1):S389–403.

Samish M, Glazer I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends Parasitol*. Agosto de 2001;17(8):368–71.

Scoles GA, Hussein HE, Olds CL, Mason KL, Davis SK. Vaccination of cattle with synthetic peptides corresponding to predicted extracellular domains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin 2 reduced the number of ticks feeding to repletion. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2022;15(1):49.

Seifert GW, Springell PH, Tatchell RJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adults of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*. Maio de 1968;58(2):415–30.

Sharma A, Pham MN, Reyes JB, Chana R, Yim WC, Heu CC, et al. Cas9-mediated gene editing in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*, by embryo injection and ReMOT Control. *iScience*. Março de 2022;25(3):103781.

Shrivastava N, Singh PK, Nag JK, Kushwaha S, Misra-Bhattacharya S. Immunization with a multisubunit vaccine considerably reduces establishment of infective larvae in a rodent model of *Brugia malayi*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Setembro de 2013;36(5):507–19.

Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 22 de Junho de 2017;7:281.

Singh B, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. *Infect Immun*. Abril de 2012;80(4):1491–501.

Skwarczynski M, Dougall AM, Khoshnejad M, Chandrudu S, Pearson MS, Loukas A, et al. Peptide-based subunit vaccine against hookworm infection. *PLoS ONE*. Outubro de 2012;7(10):e46870.

Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol*. Dezembro de 2005;37(3–4):199–214.

Sugino M, Imamura S, Mulenga A, Nakajima M, Tsuda A, Ohashi K, et al. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; Cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*. Junho de 2003;21(21–22):2844–51.

Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nürnberger S. Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system: Tick attachment cement. *Biol Rev*. Maio de 2018;93(2):1056–76.

Sutherst RW, Jones RJ, Schnitzerling HJ. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*. Janeiro de 1982;295(5847):320–1.

Tabor AE. A review of Australian tick vaccine research. *Vaccines*. Setembro de 2021;9(9):1030.

Tellam RL, Kemp D, Riding G, Briscoe S, Smith D, Sharp P, et al. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet Parasitol*. Janeiro de 2002;103(1–2):141–56.

Tirloni L, Braz G, Nunes RD, Gandara ACP, Vieira LR, Assumpcao TC, et al. A physiologic overview of the organ-specific transcriptome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep*. Dezembro de 2020;10(1):18296.

Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR, Pinto AFM, et al. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2015;8(1):338.

Tirloni L, Kim TK, Pinto AFM, Yates JR, da Silva Vaz I, Mulenga A. Tick-host range adaptation: Changes in protein profiles in unfed adult *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* saliva stimulated to feed on different hosts. *Front Cell Infect Microbiol*. Dezembro de 2017;7:517.

Tirloni L, Lu S, Calvo E, Sabadin G, Di Maggio LS, Suzuki M, et al. Integrated analysis of sialotranscriptome and sialoproteome of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.): Insights into gene expression during blood feeding. *J Proteomics*. Outubro de 2020;229:103899.

Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, et al. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*. Abril de 2014;9(4):e94831.

Tong JC, Ranganathan S. Computer-aided vaccine design. Oxford ; Philadelphia: Woodhead Publishing; 2014. 135 p. (Woodhead publishing series in biomedicine).

Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. Julho de 2005;23(34):4329–41.

Trimnell AR, Hails RS, Nuttall PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. Outubro de 2002;20(29–30):3560–8.

Turni C, Lee RP, Jackson LA. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* Julho de 2002;24(7):355–61.

Ullmann AJ, Lima CMR, Guerrero FD, Piesman J, Black WC. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol.* Abril de 2005;14(2):217–22.

Valle MR, Mèndez L, Valdez M, Redondo M, Espinosa CM, Vargas M, et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac™. *Exp Appl Acarol.* Janeiro de 2004;34(3–4):375–82.

Vilela VLR, Feitosa TF, Bezerra RA, Klafke GM, Riet-Correa F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* Julho de 2020;11(4):101413.

Waldman J, Xavier MA, Vieira LR, Logullo R, Braz GRC, Tirloni L, et al. Neuropeptides in *Rhipicephalus microplus* and other hard ticks. *Ticks Tick-Borne Dis.* Maio de 2022;13(3):101910.

Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol.* Janeiro de 2015;207(3–4):302–8.

Wharton RH, Norris KR. Control of parasitic arthropods. *Vet Parasitol.* Janeiro de 1980;6(1–3):135–64.

Wikel SK, Bergman D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol Today.* Outubro de 1997;13(10):383–9.

Wikel SK. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol.* Janeiro de 1996;41(1):1–22.

Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol Today.* Julho de 1988;4(7):196–8.

Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* Maio de 1996;18(5):241–6.

Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, et al. A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes. *Parasitol Res.* Dezembro de 2009;106(1):61–8.

Zhang WW, Matlashewski G. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *mBio.* Setembro de 2015;6(4):e00861-15.

Zhao Y, Liu L, Liu JB, Wu CY, Duan DY, Cheng TY. Cloning, expression, and function of ferritins in the tick *Haemaphysalis flava*. Ticks Tick-Borne Dis. Março de 2022;13(2):101892.

Zhao Z, Li C, Tong F, Deng J, Huang G, Sang Y. Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. Biol Proced Online. Dezembro de 2021;23(1):14.

Zhou X, Hohman AE, Hsu WH. Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. Janeiro de 2022;45(1):1–15.



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular
INCT – EM – 2024

INCTEM

CAPÍTULO 26

Mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos com ênfase em carrapatos

Isabele C Angelo¹
Patrícia S Golo²
Ricardo O B Bitencourt²
Éverton K K Fernandes³
Mariana G Camargo²
Elen R Muniz³
Jose Luiz Ramirez⁴
Nicolás Pedrini⁵
Vânia REP Bittencourt²

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

²Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos de Goytacazes.

³Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

⁴National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Estados Unidos.

⁵Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Copyright: © 2024 [Isabele C Angelo, Patrícia S Golo, Ricardo O B Bitencourt, Éverton K K Fernandes, Mariana G Camargo, Elen R Muniz, Jose Luiz Ramirez, Nicolás Pedrini, Vânia REP Bittencourt]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações iniciais

Mais de 750 espécies de fungo são documentadas causando infecção e doença em artrópodes (St. Leger, Wang, 2010). O interesse pelo uso de fungos entomopatogênicos se dá pela sua biodiversidade, que permite a seleção de isolados fúngicos cada vez mais seletivos/específicos contra um determinado alvo, além da sua virulência, resistência e persistência no meio ambiente (Butt et al., 2016; Wang et al., 2016).

Vidhate et al., (2023) revisaram a história evolutiva dos fungos entomopatogênicos, sugerindo que eles estavam associados, principalmente, a plantas, para as quais eram endossimbiontes (endófitos). Durante sua evolução, esses fungos divergiram para uma linhagem separada, passando de endossimbiontes de plantas para organismos patogênicos de insetos, trazendo consigo um “arsenal” de enzimas, que permitiram sobreviver ou causar infecção em diferentes espécies hospedeiras. Dessa forma, os fungos entomopatogênicos estão presentes em diversos ambientes, como no solo, na água e na rizosfera de plantas, e endofiticamente. Além disso, estão presentes na superfície de insetos mortos por eles (Wang et al., 2016; Shin et al., 2020; Bitencourt et al., 2021), sendo considerados um fator regulador importante de populações de insetos na natureza (Wang et al., 2016).

O controle de artrópodes por meio de fungos entomopatogênicos ocorre naturalmente no ambiente, o que despertou o interesse de pesquisadores e levou ao desenvolvimento de produtos para o controle de pragas agrícolas (Mascarin, Jaronski, 2016). *Beauveria bassiana* (Balsamo-Criv.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin foram os primeiros fungos causadores de doenças em insetos relatados (Alves, 1998). Metschnikoff, no século XIX, fez as primeiras publicações, utilizando fungos do gênero *Metarhizium* e, a partir daí, pesquisadores no mundo todo vêm estudando, testando e desenvolvendo produtos para o controle de pragas agrícolas (Rossoni et al., 2014; Mascarin et al., 2015; Catão et al., 2021). Igualmente, outros estudos vêm sendo realizados para o controle de artrópodes de interesse na Medicina Veterinária (Camargo et al., 2014; Nogueira et al., 2020; Marciano et al., 2021) e na Saúde Pública (Alkhaibari et al., 2018; Bitencourt et al., 2021; Ramirez et al., 2021).

Este capítulo resume os avanços da pesquisa sobre o mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos em insetos e carrapatos, levando em consideração estudos e revisões anteriores sobre o tema (Bittencourt et al., 1995; 1999; Arruda et al., 2005; Lubeck et al., 2008; Schrank, Vainstein, 2010; Shin et al., 2020; Cafarchia et al., 2022). Compreender o mecanismo de infecção no

hospedeiro, considerado uma das principais vantagens dos fungos entomopatogênicos, é importante para otimizar seu uso contra pragas de alto impacto econômico, como carrapatos. Pesquisas mais recentes estão sendo conduzidas, por meio da análise de transcriptoma e do silenciamento de genes, sendo os genes envolvidos em cada um desses processos constantemente identificados e avaliados (Valero-Jiménez et al., 2016a; Yang et al., 2016; Lee et al., 2018; Pedrini, 2018; Yang et al., 2020; Shin et al., 2020). Soma-se a esses fatores a segurança do uso desses microrganismos para o meio ambiente, para os vertebrados, incluindo os seres humanos, e para os artrópodes não-alvo (Zimmermann, 2007a, b; Tanada, Kaya, 2012), tornando possível o desenvolvimento de produtos que sejam mais seguros para o meio ambiente e que, ao mesmo tempo, sejam eficazes no controle de pragas.

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos, listados como os mais importantes vetores de agentes causadores de doenças infecciosas em animais. Além disso, ocupam o segundo lugar, depois dos mosquitos, no *ranking* dos principais vetores de agentes causadores de doenças em humanos (de la Fuente, 2018), incluindo àquelas emergentes, com grande impacto para a saúde pública (Madison-Antenucci et al., 2020). Os carrapatos podem transmitir patógenos como bactérias (incluindo riquetsias), protozoários e vírus e, muitas vezes, de mais de um agente, simultaneamente (Madison-Antenucci et al. 2020; Estrada-Peña et al. 2021). Em todo o mundo, os carrapatos causam perdas de bilhões de dólares anuais relacionadas aos prejuízos na produção animal, gastos diretos e indiretos com seu controle, custos com o diagnóstico e o tratamento de doenças causadas por agentes por eles transmitidos, tanto em animais quanto em humanos (Mac et al., 2019; Grisi et al., 2014).

Esforços no mundo inteiro vêm sendo realizados para controlar diferentes espécies de carrapatos associadas a prejuízos para animais e humanos, o que inclui o uso de produtos químicos repelentes e parasiticidas, produtos naturais à base de plantas, seleção genética de hospedeiros com maior resistência a carrapatos, vacinas e biopesticidas à base de fungos e nematoides entomopatogênicos (de la Fuente et al., 2017; Franzin et al., 2017; Monteiro et al., 2020; Beys-da-Silva et al., 2010; Marchesini et al., 2021; Marciano et al., 2021, Shanmuganath et al., 2021, Sullivan et al., 2022). Nesse sentido, o controle biológico de artrópodes, utilizando fungos entomopatogênicos, vem se mostrando uma alternativa promissora, ecologicamente correta e segura. No contexto da Saúde Única, a investigação das interações que ocorrem entre artrópodes e fungos fornecerá informações valiosas para o desenvolvimento de potenciais agentes de biocontrole, exibindo estratégias sustentáveis, eficazes e ecologicamente corretas para o manejo integrado de pragas.

Mecanismos de infecção de fungos entomopatogênicos em artrópodes

De um modo geral, o mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos (Figura 1) se inicia após o contato direto com seu hospedeiro alvo. A germinação dos seus conídios leva ao desenvolvimento de um tubo germinativo na superfície do hospedeiro. Esse tubo desenvolve um apressório, que promove uma pressão mecânica e libera enzimas, facilitando a penetração do tegumento do artrópode. Na hemolinfa, o fungo passa a produzir corpos hifais que, concomitantemente, liberam toxinas e se diferenciam em hifas, ao mesmo tempo que colonizam os tecidos internos. O processo de extrusão só ocorre após o fungo esgotar os nutrientes presentes no hospedeiro. As etapas envolvidas nesse processo de infecção por fungos entomopatogênicos serão detalhadas a seguir.

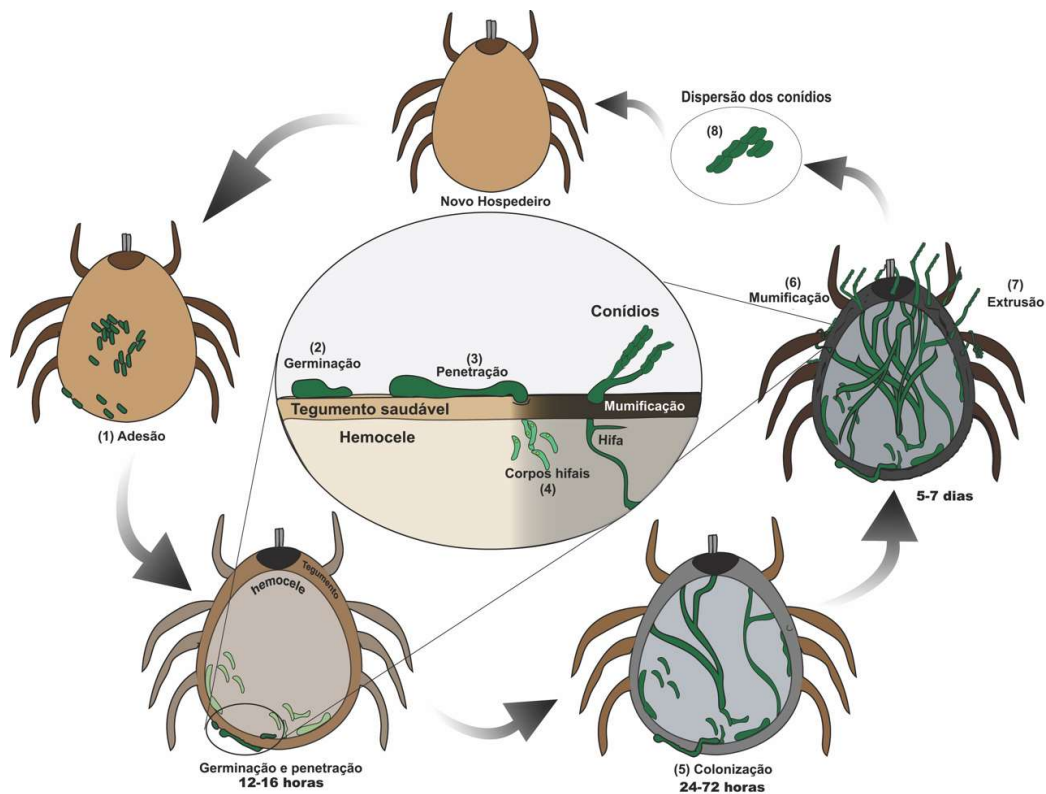


Figura 1: Esquema do processo de infecção por fungos entomopatogênicos em carrapatos. Os conídios do fungo se aderem (1) à cutícula do hospedeiro, passam por processo de germinação (2) e penetram (3) no tegumento do artrópode. Na hemocela, o fungo produz corpos hifais (4) e coloniza (5) o interior do hospedeiro-alvo. Conseqüentemente, há o processo de mumificação (6) do carrapato e o fungo retorna para a superfície através do processo de extrusão (7), passando a produzir novos conídios que se dispersam (8) e poderão infectar outros hospedeiros. O tempo de infecção varia de acordo com o hospedeiro, a virulência do isolado fúngico e as condições ambientais. Porém, todo o processo tem duração de aproximadamente 5 a 7 dias, de acordo com Shrank, Vainstein (2010).

Fonte: Arquivo pessoal

Interação inicial com o hospedeiro e eventos pré-adesão e adesão

Os fungos iniciam seu mecanismo de infecção após contato direto da sua unidade infectante, chamada de conídio, com a cutícula do hospedeiro alvo (Butt et al., 2016). O conídio é um esporo produzido assexuadamente, que germina no tegumento do artrópode em condições apropriadas de umidade e de temperatura (Schrank, Vainstein, 2010). Os substratos derivados de hidrocarbonetos presentes na cutícula podem estimular o desenvolvimento fúngico (Pedrini, 2007) ou podem inibi-lo, quando se trata de compostos antifúngicos presentes na superfície de alguns artrópodes (Butt et al., 2016). Os conídios possuem uma camada denominada *rodlet*, composta por proteínas chamadas de hidrofobinas, que interagem com a superfície do hospedeiro por meio de um mecanismo hidrofóbico (Boucias et al., 1988; Bidochka et al., 2001). Essas hidrofobinas podem ser do tipo *hyd1*, *hyd2*, ou *hyd3*, conferindo a hidrofobicidade necessária para que o inóculo interaja com o tegumento do artrópode (Butt et al., 2016). Atualmente, já foi detectada a presença de *hyd3* em *Metarhizium acridum* (Jiang et al., 2020). Fang et al., (2007) reportaram o envolvimento de *cag8* (do inglês *conidiation-associated gene*) na síntese das hidrofobinas. Outras proteínas, como CWP10 e MAD1 (*adhesin like proteins*) (Li et al., 2010; Abro et al., 2019) estão envolvidas na adesão do conídio à cutícula de insetos, influenciando na germinação, formação de blastosporos e virulência (Wang, St Lager, 2007a), enquanto MAD2 faz parte do processo de adesão em plantas (Barelli et al., 2011).

Germinação

Durante o processo de adesão, o esporo precisa rapidamente reconhecer seu hospedeiro para que o processo infeccioso seja continuado (Wang et al., 2016). O reconhecimento da cutícula é determinado pelas moléculas GPCR (do inglês. *G-protein coupled receptor*), que, com a ajuda das proteínas quinase ativadas por mitógeno (PQAM ou MAPK; do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) e proteína quinase A, (PQA ou PKA; do inglês, *protein kinase A*) estimularão a formação do apressório. O processo de germinação também conta com genes autofágicos, como o NB, que desenvolve uma estrutura denominada de tubo germinativo (Schrank, Vainstein, 2010), o qual se achata na sua extremidade, formando o apressório, responsável pela pressão mecânica e a liberação de um coquetel de enzimas proteolíticas que facilitam o processo de penetração (Wang et al., 2016). Para que ocorra o desenvolvimento do tubo

germinativo e do apressório, alguns genes estão envolvidos, como, por exemplo, o gene Mpl1 (*Metarhizium perlipin-like protein*) em fungos do gênero *Metarhizium* (Wang, St Leger, 2007b; Barelli et al., 2018), ou a proteína MrSkn7 (*Metarhizium robertsii* response regulator protein Skn7) e MapacC (PacC, pH-responsive transcription factor gene), que também estimulam a germinação fúngica (Shang et al., 2015).

Penetração fúngica e os eventos de destoxificação

Após o processo de adesão e reconhecimento do hospedeiro, o tubo germinativo se desenvolve e, em sua extremidade, ocorre a diferenciação do apressório (Butt et al., 2016). O apressório liberará enzimas digestivas e exercerá a pressão mecânica para penetrar o hospedeiro (Wang et al., 2016).

Para que ocorra a penetração, é necessário que o fungo produza e libere uma gama de enzimas proteolíticas que auxiliam na destoxificação cuticular e degradam a camada lipídica no tegumento do inseto, fazendo, assim, a assimilação dos hidrocarbonetos que lhe interessam (Pedrini, 2018, Huarte-Bonnet et al., 2018). A via MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) regula positivamente a transcrição de fatores, como a AFTF1, que estão intimamente ligados ao desenvolvimento do apressório (Fang et al., 2009; Meng et al., 2019). Fungos entomopatogênicos podem expressar uma gama de proteínas do complexo citocromo P450 (CYP450), além de lipases, proteases e quitinases, que auxiliam o fungo durante a infecção (Schrank, Vainstein, 2010; Lovett & St Leger, 2017). Como exemplo, a CYP52 é produzida ao ter contato com hidrocarbonetos e estimula a germinação fúngica (Lin et al., 2011; Huarte-Bonnet et al., 2018). Já as proteases Pr1 e Pr2 auxiliam na hidrólise de proteínas cuticulares (St. Leger et al., 1994).

Diferenciação fúngica e mecanismos de adaptação

Após a penetração, o fungo pode se diferenciar em estruturas chamadas de corpos hifais, que são inóculos especializados em colonizar o interior do hospedeiro (Pendland et al., 1993). Os corpos hifais possuem análogos chamados de blastosporos quando produzidos *in vitro* (Mascarin et al., 2015). A ausência ou menor expressão de epítomos de açúcares em sua parede celular dificulta a detecção pelo sistema imune do hospedeiro, o que lhes permite proliferar e colonizar os tecidos do artrópode (Li et al., 2021). Na hemolinfa, os corpos hifais podem produzir substâncias protetoras, que vão envolver sua

parede celular e podem auxiliar no processo de camuflagem. Por exemplo, *Metarhizium* sp. pode produzir a substância colagenosa Mcl1 (do inglês, *Metarhizium collagen-like protein*), mascarando os epítomos do açúcar β 1-3-glucano (Wang, St. Leger, 2005). Dentro da hemolinfa, os corpos hifais precisam se adaptar à pressão osmótica e, para isso, eles podem expressar osmoreceptores MOS1, permitindo que o fungo se adapte à alta pressão na hemocele (Wang et al., 2008).

A liberação de toxinas como destruxinas, beauvericinas, oesporinas, dentre outras, também auxilia no processo de colonização (Pedras et al., 2002; Pedrini, 2022). Essas toxinas são capazes de afetar canais de cálcio dos insetos, levando à paralisia flácida e à imunossupressão (Kershaw et al., 1999; Pal et al., 2007). Em um processo dinâmico, os corpos hifais se proliferam nos tecidos, se diferenciam em hifas e promovem a absorção dos nutrientes do hospedeiro (Schrank, Vainstein, 2010). Após completada essa etapa, o fungo emerge na superfície do cadáver por um processo chamado de extrusão e inicia a conidiogênese (Wang et al., 2016; Islam et al., 2021).

Metabólitos secundários

Uma vez que o fungo atinge a hemocele do artrópode, os corpos hifais produzem uma infinidade de metabólitos secundários (Pendland et al., 1993). Esses metabólitos são definidos como compostos orgânicos que, embora não estejam diretamente envolvidos no crescimento e no desenvolvimento regular de um organismo, são cruciais para sua sobrevivência e interação com outros organismos (Pichersky, Gang, 2000). Os metabólitos secundários produzidos por fungos entomopatogênicos têm sido apontados como fatores importantes para promover a invasão da hemocele do artrópode (Pedras et al., 2002; Altimira et al., 2022) e para suprimir sua resposta imune (Lu, St. Leger, 2016; Pedrini, 2018). Além disso, os metabólitos secundários desses fungos têm demonstrado, em sistemas *in vitro*, funções muito diferentes daquelas reportadas em artrópodes infectados, como: propriedades antibióticas e antitumorais (Liu, Tzeng, 2012) e atividade protetora às plantas contra doenças virais (Soesanto et al., 2020).

Com relação aos diferentes metabólitos secundários produzidos por fungos entomopatogênicos, *Metarhizium* spp. sintetiza principalmente destruxinas, uma família de hexadepsipeptídeos cíclicos composta por um hidroxíácido e cinco resíduos de aminoácidos, mas também os heptapeptídeos cíclicos serinociclina, os sideróforos hidroxamato metaquelinas, o hexapeptídeo ferricrocina, o dipeptídeo tirosina-betaína, entre outros (Zhang et al., 2020a).

Beauveria bassiana sintetiza, principalmente, os peptídeos ciclooligômeros não ribossomais, a beauvericina e a bassianolide, uma variedade de beauverolides (peptídeos cíclicos), além da dibenzoquinona oosporeína, dicetomorfolina bassiatina, 2-piridona tenelina, e da ciclosporina, um undecapeptídeo cíclico (Zhang et al., 2020a). Fungos do gênero *Akanthomyces* também produzem bassianolida, ciclosporina e oosporeína, mas também os depsipeptídeos cíclicos verticilídeos, vertinolídeos e vertinoides, entre outros compostos específicos (Zhang et al., 2020a). *Cordyceps* spp., assim como outros fungos entomopatogênicos, produzem beauvericina e beauverolides, e sintetizam terpenos tricocaranos, fumosorinona, farinosonas e militarinonas, além das lactonas cefarosporeolides (Zhang et al., 2020a).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de agrupamentos de genes, incluindo peptídeos sintetases não ribossomais (NRPS), policetídeos sintases (PKS), e genes híbridos NRPS-PKS (revisado por Zhang et al., 2020b). Dos principais genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários em *Metarhizium* spp., 12 agrupamentos de genes são conservados em sete espécies de *Metarhizium*. Um número maior de agrupamentos de genes é compartilhado por pelo menos duas espécies, e de 4 a 11 agrupamentos são espécie-específicos (Hu et al., 2014). Espécies hospedeiro-generalistas de *Metarhizium* contêm mais agrupamentos de genes de metabólitos secundários do que as espécies hospedeiro-especialistas. Desse modo, sugere-se que tanto evoluções conservadas quanto divergentes em agrupamentos de genes que sintetizam metabólitos secundários podem ter ocorrido durante a especiação fúngica (Xu et al., 2016). Enquanto isso, o genoma de *B. bassiana* abriga 21 genes NRPS ou NRPS-like (Xiao et al., 2012). Um estudo de genômica comparativa, no entanto, relatou um alto nível de diversidade genética relacionada à virulência entre isolados de fungos entomopatogênicos, e alguns deles mostram agrupamentos únicos de genes NRPS e PKS (Valero-Jiménez et al., 2016b).

A indução desses agrupamentos de genes é alcançada quando fungos entomopatogênicos são confrontados com infecções em insetos inteiros ou em tecidos isolados de insetos (Lobo et al., 2015; Sbaraini et al., 2016; Pedrini, 2022). Mas muitos dos agrupamentos de genes conhecidos não possuem metabólito secundário atribuído, e vice-versa. A respeito disso, mais de 80% dos genes associados a metabólitos secundários putativos identificados em *Metarhizium* spp. e *B. bassiana* não possuem produtos específicos identificados, e suas sequências são exclusivas de fungos entomopatogênicos (Gibson et al., 2014). Embora bassiacridina e beauverolides sejam metabólitos secundários de origem desconhecida, atualmente, existem muitos metabólitos caracterizados, com vias

biossintéticas conhecidas em *B. bassiana* (por exemplo: tenellin, beauvericina, oosporeína e bassianolide) e *Metarhizium* spp. (por exemplo, destruxinas) (Zhang et al., 2020b).

A expressão de genes NRPS específicos de *B. bassiana* que infectam insetos está claramente relacionada ao isolado do fungo (Pedrini, 2022). Mas ela mostra dois picos de expressão: i) o primeiro durante os primeiros dias de infecção, com as toxinas talvez funcionando como fatores de virulência (Lobo et al., 2015; Sbaraini et al., 2016; Baldiviezo et al., 2020); e ii) o segundo, com pico posterior, em insetos moribundos e/ou cadáveres para protegê-los de microrganismos competitivos (Lobo et al., 2015).

Estudos funcionais dos genes NRPS e PKS em *Metarhizium* spp. e *B. bassiana* têm atribuído funções relevantes à virulência do fungo contra o hospedeiro alvo. Nesse sentido, o gene da bassianolide sintetase (*Bbbs/S*) tem importância proeminente na morte do artrópode (Xu et al., 2009), enquanto o gene da beauvericina sintetase (*Bbbs/S*), embora tenha relação direta com a mortalidade, não possui papel fundamental neste processo (Xu et al., 2008). Além do mais, apesar do gene da tenelina sintetase (*Bbten/S*) ter demonstrado não contribuir para a virulência do fungo (Eley et al., 2007), tanto a oosporeína policetídeo sintase (*Bbop/S1*) (Feng et al., 2015) quanto a destruxina sintase (*Madtx/S1* e *Madtx/S2*) (Wang et al., 2012) parecem participar diretamente na evasão da imunidade do artrópode e facilitar o crescimento fúngico.

Em ensaios de expressão dupla, ou seja, em que foi medida, em uma mesma amostra, a expressão de genes que participam da resposta imune de insetos e a expressão daqueles que codificam metabólitos secundários de fungos, foi demonstrado que a resposta imune é mais tardia do que a expressão dos genes que codificam peptídeos sintetases não ribossomais (Lobo et al., 2015; Baldiviezo et al., 2020). Dessa maneira, a resposta imune do inseto ocorre quando o processo de infecção parece ser irreversível, e confirma que, uma vez que o fungo atinge a hemocele, o inseto tem pouca chance de sobreviver à infecção, apesar da ativação da resposta imune ser o último esforço para superar a infecção.

Diante da ação citotóxica observada em diferentes hospedeiros, acredita-se que inseticidas e acaricidas podem ser originários de metabólitos secundários produzidos em extratos de fungos entomopatogênicos (Vyas et al., 2015; Jin et al., 2021). Entre eles, a ação inseticida dos compostos beauvericina (detectados nos gêneros *Beauveria*, *Akanthomyces* e *Cordyceps*) e destruxina A e E (identificado em *Metarhizium* spp.) já é bem descrita (Berestetskiy, Hu, 2021). Além de causar mortalidade nos modelos de artrópodes testados, esses compostos possuem

propriedade imunossupressora, que é importante para o desenvolvimento fúngico no inseto (Zhang et al., 2020c). Comercialmente, apenas em 2018, foi registrado um primeiro produto inseticida à base de metabólito secundário fúngico, o Inscalis[®], composto por Pyripyropene A produzido pelo fungo da espécie *Penicillium coprobium* (Koradin et al., 2021).

Especificamente em carrapatos, o ácido oxálico é um importante metabólito secundário secretado por *B. bassiana* durante o processo de infecção (Kirkland et al., 2005). Acredita-se que o oxalato, ao ser secretado, é responsável pela acidificação da cutícula do hospedeiro, atuando, também, no sequestro de íons, como cálcio, manganês, magnésio e ferro (Gadd, 1999). Além disso, é possível que o oxalato atue na inibição ou no rompimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro; contudo, esse processo ainda não foi confirmado (Kirkland et al., 2005). Já a destruxina A de *M. anisopliae* parece não ser um fator determinante para a virulência fúngica em fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, ao contrário do observado em tratamentos de insetos, como, por exemplo, *Galleria mellonella* (Golo et al., 2011).

Mecanismos de defesa

O mecanismo de defesa dos invertebrados compreende uma série de barreiras físicas, químicas, fisiológicas e, até mesmo, comportamentais, que dificultam o acesso do patógeno ao interior do artrópode. No entanto, quando o patógeno consegue ultrapassar as barreiras iniciais e atingir a hemocele do hospedeiro, o sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores tanto em artrópodes quanto em mamíferos, inicia uma série de respostas caracterizadas por um processo de várias etapas. Esse processo começa com o reconhecimento do patógeno e resulta na ativação do mecanismo imunológico apropriado, podendo ser classificados em: resposta celular e humoral (Hoffmann, Reichhart, 2002; Lavine, Strand, 2003; Luo et al., 2003; Marmaras, Lampropoulou, 2009; Sheehan et al., 2018; Waring et al., 2022). Tais linhas de defesa serão detalhadas a seguir, com especial ênfase em carrapatos.

Barreiras naturais

A primeira interação do carrapato com o propágulo fúngico infectante (conídios ou blastosporos) ocorre na cutícula, a qual atua como uma barreira física e química. A cutícula de carrapatos ixodídeos é semelhante à dos insetos e é composta por várias camadas (a partir do exterior: cera, epi-, exo- e endocutícula).

A maior parte das propriedades mecânicas são encontradas nas camadas exo e endocuticular, que constituem a maior espessura da cutícula (Vincent, Wegst, 2004) (Figura 2). Essas duas camadas juntas formam a procutícula, a qual é composta, principalmente, por proteínas e α -quitina (Clarkson, Charnley, 1996). A exocutícula pode ser esclerotizada (aparelho bucal, pernas, espiráculo respiratório e escudo dorsal) ou não (demais partes do corpo, que exigem flexibilidade) (Hackman, 1982). Já a epicutícula, camada mais externa, difere-se de acordo com o estágio de ingurgitamento da fêmea, a região cuticular e a espécie de carrapato (Filshie, 1976). Em Argasídeos, a epicutícula está recoberta também por uma camada de cimento (Hackman, 1982).

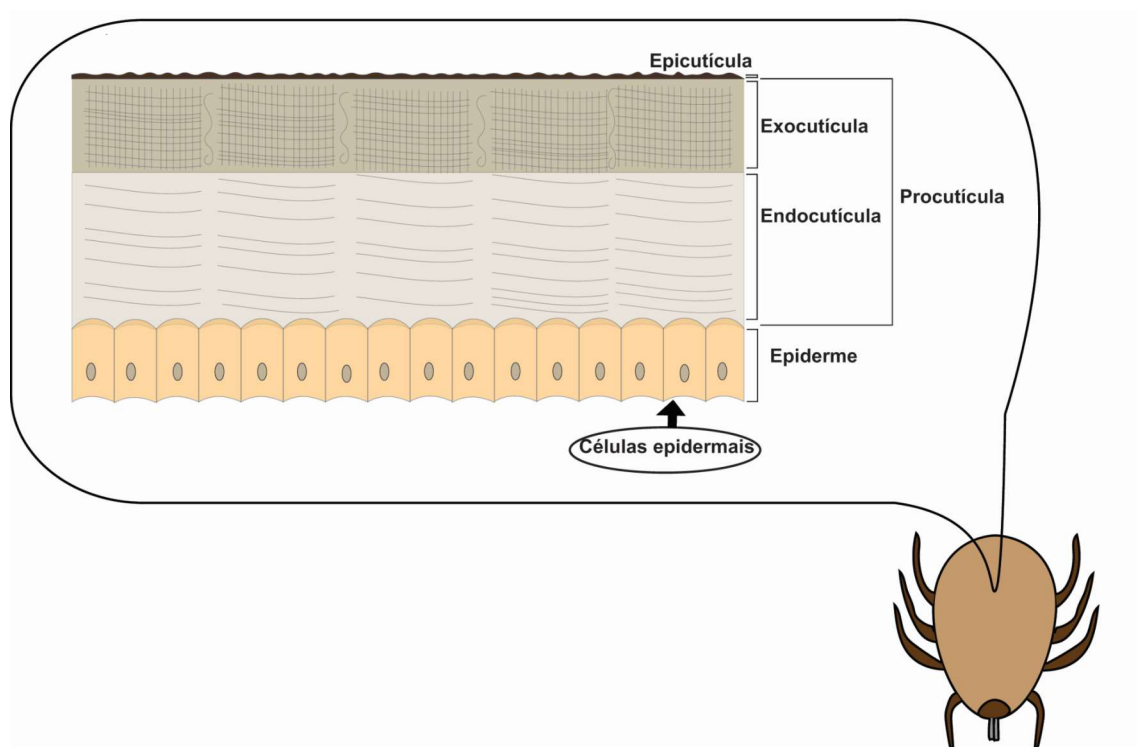


Figura 2: Esquema da cutícula de um carrapato da família Ixodidae. Esquema elaborado com base na fotomicrografia da cutícula de *Rhipicephalus microplus*, realizada por Arruda et al. (2005).

Fonte: Arquivo pessoal

A epicutícula é impermeável e age como a primeira barreira contra o ataque de agentes microbianos patogênicos. Essa superfície cuticular constitui um ambiente árduo para o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos, pois, nela, os propágulos fúngicos estão expostos à radiação solar ultravioleta, à variação de umidade e à temperatura, à presença de microrganismos antagonistas e à defesa inata do hospedeiro (Hackman, 1982). A susceptibilidade à infecção fúngica, no entanto, pode variar de acordo com o estágio de

desenvolvimento do artrópode. Aqueles que recém sofreram muda são, particularmente, vulneráveis, pois a cutícula jovem é mais macia e não totalmente esclerotizada (Vicent, Wegst, 2004). Particularmente, fêmeas de *R. microplus*, durante o processo de ingurgitamento, têm a composição da epicutícula alterada, com o acréscimo de 215% de lipídios, sendo os álcoois e os ácidos graxos combinados por esterificação os mais encontrados (Hackman, 1982). Esse é um dos motivos pelos quais esse estágio de desenvolvimento do carrapato é considerado o mais resistente às diversas formas de controle (Furlong et al., 2007).

Em artrópodes terrestres, pelo menos quatro variáveis influenciam as propriedades da cutícula: i) quantidade relativa de microfibrilas de α -quitina e matriz proteica; ii) composição de proteínas; iii) o teor de pH / água da matriz; e iv) o grau de reticulação da matriz proteica. As variações nesses parâmetros demonstram a vasta gama de propriedades observadas no exoesqueleto dos artrópodes (Chandran, 2016). Além da barreira física imposta pela cutícula, os fungos entomopatogênicos podem entrar em contato com substâncias tóxicas aos conídios presentes nessa estrutura (Golebiowski et al., 2008). Ment et al. (2012). Em um estudo da interação entre *Metarhizium* spp. e fêmeas ingurgitadas de *Hyalomma excavatum*, foi concluído que, na cutícula dessas fêmeas, são produzidos compostos que inibem a germinação fúngica e que tornam essa espécie naturalmente mais tolerante à infecção do que outros ixodídeos.

Hidrocarbonetos, principalmente n-alcenos e cadeias saturadas de metil, são sintetizados por ácidos graxos via alongamento da cadeia e descarboxilação (Blomquist et al., 1993; Nelson, 1993), e constituem uma camada de lipídios presentes na camada mais externa da epicutícula de carrapatos. Esses hidrocarbonetos cuticulares protegem o organismo do carrapato contra a dessecação (Filshie, 1982), e estão envolvidos na comunicação química, servindo como feromônios sexuais e caïromônios (Wyatt, 2010). Análises químicas revelaram, ainda, que cada espécie de carrapato possui um perfil distinto de hidrocarboneto cuticular, e que hidrocarbonetos específicos também estão associados a diferentes tipos de hospedeiros (Dupraz et al., 2022). Por exemplo, Shimshoni et al. (2013) encontraram espécies de carrapato do gênero *Rhipicephalus* com diferentes composições de ácidos graxos cuticulares em relação ao tipo de hospedeiro. No entanto, ainda não se sabe se essas diferenças estão ligadas à sobrevivência adaptativa ou à variação de subprodutos absorvidos do hospedeiro.

Diferentes composições de hidrocarbonetos cuticulares nas variadas espécies de artrópodes podem interferir na patogenicidade dos fungos

entomopatogênicos (Pedrini et al., 1997; Jarrold et al., 2007). Alguns hidrocarbonetos podem, inclusive, limitar ou inibir a germinação de conídios, enquanto outros estimulam a germinação de conídios e o crescimento fúngico (Smith, Gurla, 1982; Lord, Howard, 2004). Outros, porém, atuam apenas como substratos de ligação para determinados propágulos fúngicos (Sosa-Gomez et al., 1997; Jarrold et al., 2007; Pedrini, 2018).

Nesse sentido, extratos cuticulares de *Dermacentor nitens* e *Amblyomma sculptum* inibiram o crescimento de *M. robertsii* e limitaram a germinação de conídios de *B. bassiana*. Os mesmos extratos também causaram efeitos citotóxicos e a morte de conídios expostos (Ribeiro-Silva et al., 2022). Além disso, conídios de *M. robertsii* aderidos à cutícula de *D. nitens* e de *A. sculptum* também sofreram atraso na germinação, indicando que a cutícula desses ixodídeos possui compostos que limitam o seu desenvolvimento (Ribeiro-Silva et al., 2022).

Em outros estudos, a composição lipídica cuticular de *Rhipicephalus annulatus*, espécie de carrapato susceptível à infecção fúngica, foi analisada e comparada à composição lipídica cuticular de *H. excavatum*, espécie de carrapato sabidamente resistente à infecção fúngica. Os resultados demonstraram que o ácido graxo presente em maior abundância na epicutícula da espécie resistente inibiu o desenvolvimento de apressório, indicando que a presença de compostos antifúngicos em concentração específica na cutícula de *H. excavatum* tem relação direta com a sua tolerância natural à infecção fúngica (Ment et al., 2013). Em uma análise proteômica dessa interação patógeno-hospedeiro, foram identificadas diversas proteínas envolvidas na resposta fúngica às condições de estresse (Ment et al., 2020). Esses achados sugerem que, em contato com a cutícula de carrapato resistente, o fungo encontra um ambiente com baixos índices nutricionais (estresse nutricional), acúmulo de peróxido de hidrogênio (hipóxia) e substâncias antifúngicas (Ment et al., 2020).

A relação carbono-nitrogênio (C:N) possui um grande efeito no desenvolvimento fúngico em meios de cultura (Jackson, Bothast, 1990). Dessa forma, concentrações específicas de C:N são necessárias para a eficiente germinação, bem como a conidiogênese e a produção de enzimas fúngicas. Ademais, o desequilíbrio dessa relação C:N pode afetar negativamente o desenvolvimento fúngico (El-Sayed et al., 1993). Desse modo, a escassez de nutrientes na cutícula e as altas concentrações de ácidos graxos sugerem uma defesa seletiva dos artrópodes contra agentes patogênicos específicos (Kyoaki, 1957; Smith, Gurla, 1982; Bogus et al., 2010).

Resposta imune celular em carrapatos infectados por fungos entomopatogênicos

A resposta imune celular é mediada por hemócitos, como são chamadas as células presentes na hemolinfa de artrópodes. A hemolinfa é o fluido circulante no corpo dos artrópodes, que é composta por plasma e células. Estudos envolvendo hemócitos são extremamente relevantes para o melhor entendimento das relações parasito-hospedeiro. Em artrópodes, os hemócitos desempenham um importante papel, não somente na resposta às infecções causadas por microrganismos, mas na defesa contra injúrias físicas, uma vez que participam do processo de coagulação e melanização, apesar desses processos ainda não estarem bem elucidados nos carrapatos (Sonenshine, Hynes, 2008; Fogaça et al., 2021). No entanto, quando comparados com carrapatos, esses estudos em insetos são mais abundantes.

Vários estudos reportam alterações, seja acréscimo ou decréscimo, nas quantidades dos hemócitos em carrapatos ixodídeos infectados por microrganismos, incluindo fungos entomopatogênicos (Johns et al., 1998; 2000; de Paulo et al., 2018). No estudo que envolveu a inoculação de *Metarhizium* spp. em carrapatos da espécie *R. microplus*, os autores reportaram a diminuição do número de células na hemolinfa, 24 horas após a infecção (de Paulo et al., 2018). Também houve a redução no número de hemócitos quando a mesma espécie de carrapato foi infectada por *B. bassiana* (Silva et al., 2006). Outro estudo, conduzido em 2019, reportou a toxicidade do fungo entomopatogênico *M. robertsii* para hemócitos de *R. microplus in vitro* (Fiorotti et al., 2019). Houve redução na viabilidade celular 24 horas, após a adição dos propágulos fúngicos aos hemócitos, principalmente quando altas concentrações fúngicas (10^7 e 10^8 conídios/ml) foram usadas.

O estudo de Borovikova, Hyspa (2005) estabeleceu um sistema confiável de classificação de hemócitos em carrapatos, baseado, predominantemente, em dados morfológicos e ultraestruturais. Apesar de haver variações na classificação dos tipos de hemócitos encontrados em carrapatos ixodídeos, os seguintes tipos celulares são relatados com mais frequência nas publicações: i) pró-hemócitos, ii) granulócitos, iii) plasmatócitos, iv) esferulócitos e v) oenocitoides (Borovikova, Hyspa, 2005; Sonenshine, Hynes, 2008; Feitosa et al., 2015, 2018; Fiorotti et al., 2019). Alguns autores consideram os pró-hemócitos células agranulares com pouco conteúdo citoplasmático, precursores dos outros tipos celulares (Fiorotti et al., 2019). Em insetos, sugere-se que os esferulócitos estejam envolvidos no processo de renovação tecidual, transporte e produção de substâncias (Negreiro

et al., 2004) e os oenocitoides sejam células não-fagocíticas envolvidas no processo de encapsulamento (Eggenberger et al., 1990). Os granulócitos e plasmatócitos estão envolvidos no processo de fagocitose de agentes microbianos e, portanto, diretamente relacionados à resposta imune celular.

O tipo celular mais abundante na hemolinfa dos carrapatos ixodídeos pode variar, de acordo com a espécie em questão. Segundo Pereira et al. (2001), plasmatócitos e granulócitos são mais abundantes em *R. microplus*, sendo o primeiro o tipo celular mais predominante. Já em *Ixodes ricinus*, os granulócitos foram os principais tipos celulares encontrados na hemolinfa (Kuhn, Haug, 1994). Em termos de resposta imune mediada por células nos carrapatos, os processos de fagocitose, encapsulamento, nodulação, coagulação e produção de moléculas relacionadas à imunidade são consideradas as respostas mais importantes (Fogaça et al., 2021).

A fagocitose em hemócitos de carrapatos é um processo que vem sendo estudado *in vivo* e *in vitro* por diversos autores (Pereira et al., 2001; Fiorotti et al., 2019; 2022; Corrêa et al., 2021). A fagocitose é uma ação mediada pela membrana celular para englobar partículas grandes, que podem ser microrganismos, auxiliando tanto no processo de remoção de patógenos quanto de células mortas. Estudos com *R. microplus* demonstraram que, principalmente os plasmatócitos, estão envolvidos na fagocitose de leveduras (Pereira et al., 2001) e de fungos entomopatogênicos (Fiorotti et al., 2019; 2022). Fiorotti et al. (2022) demonstraram que a mortalidade de *I. ricinus* desafiados com o fungo entomopatogênico *M. robertsii* aumentou, drasticamente, quando os hemócitos desses carrapatos tinham a sua capacidade reduzida de fagocitar os conídios pela inoculação prévia de cápsulas de látex.

Fiorotti et al. (2022) também analisaram como genes que codificam proteínas contendo itoéster (TEP; do inglês, *thioester-containing proteins*) em hemócitos de *I. ricinus* se comportam frente à infecção por *M. robertsii* e o efeito do silenciamento desses genes no processo de fagocitose desse fungo entomopatogênico. As TEP foram recentemente descritas em carrapatos (Urbanová et al., 2014; Urbanová et al., 2017) e são proteínas relacionadas ao sistema complemento. Em mamíferos, o sistema complemento é composto por proteínas que opsonizam os patógenos e induzem uma série apropriada de respostas inflamatórias, que auxiliam no combate à infecção. Em animais invertebrados, a descoberta de um sistema complemento primitivo é extremamente relevante, já que a fagocitose nos hemócitos pode ser mediada pelas proteínas do sistema complemento (Browne et al., 2013; Fiorotti et al., 2022). A maior parte dos genes que expressam TEP em *I. ricinus* foi responsiva

(aumento da expressão) à infecção por *M. robertsii* e o silenciamento desses genes reduziu a capacidade fagocítica dos hemócitos no desafio com conídios (Fiorotti et al., 2022).

Além da fagocitose, os processos de encapsulamento e nodulação são mecanismos de defesa celular descritos em artrópodes para auxiliar o processo de remoção de agentes invasores (Fogaça et al., 2021). Esses processos estão, geralmente, relacionados à neutralização de grandes corpos estranhos (bióticos ou não), não passíveis de serem removidos pelo processo de fagocitose, como protozoários e helmintos, por exemplo. Eggenberger et al. (1990) descreveram o processo de encapsulamento na hemocele de *Dermacentor variabilis* implantados com um fragmento de resina Araldite-Epon. Uma hora após o implante, os autores observaram a uma película ao redor do implante. Esses autores também relataram que o processo de encapsulamento foi mediado por granulócitos e plasmatócitos. Apesar da degranulação dos hemócitos ter sido relatada, não foi observada melanização. Um estudo que inoculou *Escherichia coli* em *D. variabilis* relatou a formação de massas de tecido celular (possivelmente hemócitos) envolvendo agregados da bactéria, sugerindo eventos semelhantes a nodulação (Ceraul et al., 2002). Apesar dos eventos de encapsulamento e nodulação já terem sido descritos em carrapatos, esse tipo de resposta não foi reportado no estudo, envolvendo a ultraestrutura de hemócitos de carrapatos, frente ao desafio com *M. robertsii* (Fiorotti et al., 2019).

Sob condições de injúria tecidual, os artrópodes podem ativar os sistemas de coagulação para evitar a perda de hemolinfa. A principal finalidade do processo de coagulação é a formação de um coágulo estável, capaz de ocluir o ferimento, prevenir/interromper a perda de fluidos e, ainda, imobilizar e neutralizar patógenos. Apesar da infecção de fungos entomopatogênicos envolver a penetração ativa do agente patogênico, até o presente momento, não há estudos que relatem esse tipo de resposta no processo de infecção por fungos em carrapatos.

Resposta imune humoral

Vias de sinalização imunológica (TOLL, IMD, JAK/STAT)

Assim como em outros artrópodes, os carrapatos contam com uma resposta imunológica humoral contra patógenos (Taylor, 2006; Sonenshine, Macaluso, 2017; Fogaça et al., 2021), incluindo fungos entomopatogênicos. Os microrganismos invasores são reconhecidos por meio de receptores de reconhecimento padrão (RRP), que detectam moléculas padrões associadas aos

patógenos (PAMP), ativando diferentes cascatas de sinalização humoral, dentre elas, as vias Toll e a IMD (do inglês, immunodeficiency) (Pal, Wu, 2009; Oliva Chávez et al., 2017). Os efetores dessas vias, como os peptídeos antimicrobianos (PAM), são responsáveis por neutralizar e eliminar o microrganismo invasor (Yi et al., 2014).

Inicialmente descrita em *Drosophila* sp., a via Toll se ativa na presença de moléculas de quitina, manana ou epítomos de açúcares β 1-3-glucano presentes na parede celular de fungos e bactérias, e que são detectados pelas moléculas RRP (Kaneko, Silverman, 2005; Valanne et al., 2011). Mas, para que ocorra a ativação da cascata de sinalização, RRP, em conjunto com outras moléculas serino-proteases, tais como ModSP, ativam a molécula Spätzle (Spz) que, então, se associa ao receptor Toll, na sua porção extracelular (Kellenberger et al., 2011), estimulando o domínio intracelular TIR associado às moléculas tubo/Pelle/Myd88. Isso leva à degradação de Cactus, permitindo, assim, a translocação dos fatores de transcrição Dif/Dorsal ao núcleo celular e induzindo a produção dos peptídeos antimicrobianos (Valanne et al., 2011). Os carrapatos possuem, preservados em seu genoma, quase todas as moléculas envolvidas na cascata de sinalização dessa via. Entretanto, algumas moléculas parecem não estar presentes ou ainda não foram detectadas, como é o caso da molécula Dif, e da ausência de alguns subtipos RTTs (Palmer, Jiggins, 2015; Rosa et al., 2016; Oliva Chávez et al., 2017).

IMD é a via análoga à via do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) em mamíferos (McClure Carroll et al., 2019). As proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP) são os receptores responsáveis por detectar a presença de diaminopimélico (DAP) e peptidoglicanos (PGN), inicialmente em bactérias gram-negativas e *Plasmodium* sp., estimulando a via IMD em artrópodes (Kleino, Silverman, 2014; Kumar et al., 2018). Esses receptores contam com duas porções, sendo uma extracelular (PGRP-LC) e uma intracelular (PGRP-LE) associados à molécula IMD, que está diretamente acoplada a moléculas Dredd/Fadd (Myllymäki et al., 2014). Após o reconhecimento do invasor, a molécula Dredd ativada cliva IMD, levando à ativação dos complexos Tab2/Tak1 e IKK, promovendo a fosforilação de Relish 2, que se transloca para o núcleo celular e induz a transcrição de peptídeos antimicrobianos (Kumar et al., 2018).

Em carrapatos, a via IMD tem sido identificada; porém, alguns dos seus componentes, que estão presentes em outros artrópodes, parecem não estar presentes (Rosa et al., 2016). Por exemplo, as proteínas homólogas Fadd, Pirk, os receptores PGRP com domínio transmembranar, bem como a própria IMD, não foram encontradas em carrapatos. Outras moléculas importantes, como PGRP,

Caudal e o fator de transcrição Rel/NF-kB não apresentam uma clara relação estrutural ou filogenética com os seus homólogos, em outros invertebrados (Rosa et al., 2016).

Apesar dessas diferenças, vários estudos apontam o envolvimento dessa via contra patógenos (Shaw et al., 2017; McClure Carroll et al., 2019). Por exemplo, McClure Carroll et al. (2019) reportaram o envolvimento do substrato enzimático p47 na ativação da proteína inibidora da apoptose, ligada à X (XIAP), que participa da via IMD, em carrapatos *Ixodes scapularis* infectados com a espiroqueta *Borrelia burgdorferi* e a riquetsia *Anaplasma phagocytophilum*. Em um estudo similar, Capelli-Peixoto et al. (2017) demonstraram que o fator de transcrição Relish é importante para o controle de *Anaplasma marginale*.

Outra via de sinalização imune nos invertebrados é a via JAK/STAT, que desempenha um papel importante na defesa contra as infecções por bactéria, fungos entomopatogênicos, protozoários e vírus (Bahia et al., 2011; Dong et al., 2012; Liu et al., 2012; Bang et al., 2019). As células afetadas pela infecção microbiana produzem citocinas ligantes UPD (Unpaired) que, uma vez liberadas, se ligam aos receptores DOME (Agaisse, Perrimon, 2004), iniciando a ativação da via JAK-STAT. A porção intracelular de DOME é conectada a um complexo intracelular, composto das moléculas HOP/JAK, que levam à fosforilação das moléculas STAT, permitindo a formação de dímeros e a sua translocação no núcleo celular, para a produção de efetores (Myllymäki, Rämetsä 2014; Bang, 2019).

Estudos recentes indicam que, nos carrapatos, a via JAK-STAT é evolutivamente conservada, na qual somente UPD, o ligante de JAK-STAT, não foi identificado (Rosa et al., 2016). Outro ponto importante é que pesquisas realizadas no contexto patógeno-hospedeiro indicam que essa via desempenha um papel crítico na defesa contra *A. phagocytophilum*, importante patógeno humano transmitido pelo carrapato *I. scapularis* (Aguilar-Díaz et al., 2021; Liu et al., 2012).

O envolvimento das vias Toll, IMD e JAK-STAT foi bem reportado em mosquitos *Aedes aegypti* contra fungos entomopatogênicos (Dong et al., 2012; Ramirez et al., 2019). A literatura, no entanto, ainda carece de informação que afirmem se cascatas de sinalização semelhantes a essas ocorrem em carrapatos infectados por fungos.

Peptídeos antimicrobianos e outras moléculas efetoras

A falta de uma resposta imune adaptativa faz com que o envolvimento da resposta imune humoral desempenhe um papel fundamental na proteção dos

artrópodes (Martins et al., 2019). Uma vez detectado o patógeno, as cascatas de sinalização da resposta humoral podem sintetizar diferentes tipos de PAM. Os PAM são moléculas compostas por pequenas cadeias de aminoácidos (20-100) capazes de interagir com fungos, bactérias, vírus ou protozoários, através de interação eletrostática (Lowenberger et al., 2001; Brogden, 2005; Boparai, Sharma, 2020). Os PAM se dividem em três grupos, variando de acordo com o peso molecular, o tamanho, a conformação e a composição dos aminoácidos (Bulet et al., 1999; Boparai, Sharma, 2020). No primeiro grupo, os peptídeos possuem resíduos de cisteína que estão ligados por pontes de dissulfeto; no segundo grupo, possuem ligações anfipáticas, com moléculas em α -hélice, enquanto o último grupo possui uma alta concentração de resíduos de prolina e de glicina (Bulet et al., 1999).

Os PAM podem interagir com a parede celular do hospedeiro, causando lise celular. Além disso, alguns PAM são capazes de se unir e criar poros na membrana celular, afetando a osmorregulação do microrganismo (Wu et al., 2018). Em contrapartida, existem outros tipos de PAM que são capazes de atravessar a membrana celular e afetar, diretamente, a síntese de proteínas primordiais para o bom funcionamento celular, como, por exemplo, a síntese de componentes da parede celular (Boparai, Sharma, 2020). Atualmente, existem três modelos de ação de PAM sobre a membrana plasmática de microrganismos aceitos pela comunidade científica: o modelo de poro toroidal, o modelo de tapete, e o modelo de barril-stave (Wu et al., 2022).

O volume de informações sobre o envolvimento de PAM na proteção de insetos é extenso; porém, pouco se sabe acerca do papel por eles desempenhados em carrapatos. Detectou-se, em carrapatos, a presença de defensinas e lisozimas, microplusinas (Sonenshine, 2008). As defensinas são pequenos PAM (menores que 10 kDa) ricos em cisteína, que possuem características catiônicas e anfipáticas. Estas, foram, inicialmente, reportadas em *Ornithodoros moubata* e *D. variabilis*. Atualmente, cerca de 52 subtipos de defensinas e moléculas semelhantes à defensina (do inglês, *defensin-like*, devido à falta de alguns aminoácidos, como a arginina e o aspartato) já foram descritas em diferentes espécies das famílias Argasidae e Ixodidae (Lv et al., 2016; Wu et al., 2022). Lisozimas são peptídeos, com cerca de 14 kDa, que participam de processos digestivos e na proteção contra patógenos, rompendo a camada de peptidoglicano do invasor (Nash et al., 2006). A microplusina foi detectada em *R. microplus* e possui atividade contra fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (Silva et al., 2009).

Outros efetores podem atuar na imunidade humoral de carrapatos, como as lectinas, os fatores inibidores de proteases (serpinas e α 2-macroglobulina) e as

TEP. As lectinas são proteínas capazes de se ligar a epítomos de açúcares do patógeno e de facilitar a fagocitose por hemócitos (Sonenshine, 2008; Xia et al., 2018). Dentre as lectinas, as lectinas do tipo C (C-type lectin) são amplamente estudadas em artrópodes, e possuem diversos mecanismos de ação, como a opsonização, a formação de nódulos, a aglutinação, o encapsulamento e a melanização (Xia et al., 2018).

Os inibidores de proteases são moléculas com tamanho variando em 29-400 aminoácidos. Os inibidores que pertencem ao grupo das serpinas são estruturalmente grandes e constituídos por glicoproteínas, capazes de se ligar irreversivelmente à protease-alvo, causando uma mudança conformacional e desativando-a (Clynen et al., 2005). As α -2-macroglobulinas funcionam como iscas para os patógenos e, após interagirem com essas moléculas, são capazes de aprisionar a protease-alvo, clivando a ligação tioéster da estrutura do patógeno. Em seguida, os hemócitos circulantes fagocitam as macroglobulinas e suas proteases aprisionadas (Sonenshine, Hynes, 2008; Chmelař et al., 2016). Os carrapatos contam ainda com outros tipos de inibidores de proteases, como inibidores com domínio Kunitz, inibidores com domínio Kazal e inibidores de tripsina do tipo TIL, que estão envolvidos com a hematofagia (Dai et al., 2012; Valdés et al., 2014; Schwarz et al., 2014; Blisnick et al., 2017; Chmelař et al., 2016). As TEP são moléculas opsonizantes, facilitando a fagocitose do patógeno (Buresova et al., 2011).

É relevante destacar que poucos trabalhos estudaram a expressão de PAM, em carrapatos expostos a fungos, e nada ainda envolvendo a exposição a fungos entomopatogênicos. O trabalho de Leannec, Rialland et al., (2021) utilizou a defensina de *I. ricinus* contra *Fusarium graminearum*. No entanto, Tonk et al. (2014) reportaram a utilização de defensinas de *I. scapularis*, também contra *F. graminearum* e *Fusarium culmorum*. Fiorotti et al., (2022) reportaram o envolvimento de PCTs e α -2-macroglobulina na capacidade fagocítica de hemócitos de *I. ricinus* infectados com *M. robertsii*. Mesmo não trabalhando com fungos entomopatogênicos, Urbanová et al. (2015) também publicaram informações valiosas, através das quais observaram um aumento na expressão relativa de diversas moléculas envolvidas com PCTs e α -2-macroglobulina em *I. ricinus* expostos à levedura *Candida albicans*.

Melanização

Nos artrópodes, a melanina desempenha diversas funções, tais como a reparação tecidual, o enrijecimento tegumentar e o encapsulamento de

patógenos (Yassine et al., 2012). Após o reconhecimento do patógeno pelos receptores de reconhecimento padrão, os hemócitos liberam a pró-fenoloxidase (PPO). Para que a fenoloxidase (PO) se ative, a PPO precisa ser clivada por serino proteases. Após a clivagem, a PO adiciona hidroxila à tirosina, transformando-a em DOPA (González-Santoyo , Córdoba-Aguilar, 2012). Para que a dopamina seja formada, a enzima DOPA-descarboxilase retira o ácido carboxílico de DOPA. A dopamina, então, sofre a ação da PO, que promove a formação de moléculas das quinonas dopaquinona e dopacromo (Sugumaram et al., 2000). A formação dessas quinonas também pode se dar pela interação direta entre PO e DOPA (González-Santoyo , Córdoba-Aguilar, 2012). Essas quinonas, então, se polimerizam, formando a melanina. Uma vez formada, a melanina promove a degradação da parede celular do patógeno, devido ao processo de oxidação (Yassine et al., 2012; Sonderhall , Cerenius, 1998). Além dos hemócitos, o intestino médio de alguns artrópodes parece ser capaz de liberar melanina (Shao et al., 2012)

Apesar de, em carrapatos ixodídeos, não existir evidência da existência de um sistema de ativação da PPO (Kopacek et al., 2010), a presença de atividade de PO foi observada por Kadota et al. (2002) em *O. moubata*, durante o processo de ecdise em ninfas. Embora a análise da atividade de PO em hemócitos de *R. microplus* infectados com *M. anisopliae* não tenha demonstrado alteração na comparação com carrapatos não infectados (Corrêa et al., 2021), Ment et al. (2012) descreveram um processo semelhante à melanização na cutícula de *Hyalomma excavatum* tratado com *M. robertsii*. Nesse último estudo, áreas escuras na cutícula do carrapato foram formadas em resposta à infecção fúngica, parecendo limitar o desenvolvimento fúngico e evidenciando uma possível resposta do carrapato.

Considerações sobre a infecção fúngica em carrapatos

Muitos trabalhos vêm reportando o potencial de isolados fúngicos no controle de diferentes espécies de carrapatos, como o carrapato bovino *R. microplus* (Marciano et al., 2021; Santos et al., 2021), o carrapato-mamona *I. ricinus* (Szczeпаńska et al., 2020; Bonnet et al., 2021), o carrapato-ornamentado-cão *Dermacentor reticulatus* (Szczeпаńska et al., 2020), *Amblyomma sculptum* (membro de complexo de espécies *Amblyomma cajennense* s.l.) (Lopes et al., 2007), *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Cafarchia et al., 2015) e *Amblyomma parvum* (Garcia et al., 2018).

O mecanismo de penetração de fungos entomopatogênicos em carrapatos ocorre via tegumento, através de processos físicos, por pressão mecânica, e de

processos químicos, por digestão enzimática (Bittencourt et al., 1995; Bittencourt et al., 1999; Schrank, Vainstein, 2010). A atividade de proteases, quitinases e lipases de fungos em contato com a cutícula de carrapato foi reportada por diversos autores (Krieger de Moraes et al., 2003; Da Silva et al., 2005, Perinotto et al., 2014; Sbaraini et al., 2021). A atividade dessas enzimas está relacionada não somente ao processo de infecção, mas também à virulência dos fungos contra carrapatos (Beys-da-Silva et al., 2010; Golo et al., 2015; Coutinho-Rodrigues et al., 2021; Muniz et al., 2021).

Alguns autores já mostraram que a virulência dos fungos contra carrapatos pode variar, de acordo com a suscetibilidade da população-alvo (Perinotto et al., 2012) e com o propágulo fúngico testado (Bernardo et al., 2018). Perinotto et al. (2012) relataram variação na virulência de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre duas populações de *R. microplus*, localizadas em regiões distintas. Enquanto isso, Bernardo et al. (2018) observaram o processo de infecção de blastosporos e de conídios de diferentes isolados fúngicos na cutícula de *R. microplus*. Ao comparar a virulência de conídios e de blastosporos de um mesmo isolado fúngico contra fêmeas ingurgitadas, os autores concluíram que blastosporos de *M. robertsii*, *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. foram mais virulentos do que os conídios dos seus respectivos isolados.

Virulência destaque foi observada no isolado IP 361 de *B. bassiana*, no qual foi possível detectar a formação de apressório no tubo germinativo de blastosporos sobre a cutícula de carrapatos, em apenas 4 horas após tratamento. Enquanto isso, conídios deste mesmo isolado desenvolveram apressório 48 horas após o tratamento. Além de blastosporos germinarem e infectarem *R. microplus* via cutícula, os autores também relataram a infecção fúngica via aberturas naturais das fêmeas ingurgitadas. Sendo assim, blastosporos são considerados propágulos fúngicos promissores para a utilização no biocontrole de carrapatos (Bernardo et al., 2018).

A morte do hospedeiro infectado ocorre em um período de três a 10 dias, em função da perda de água, da privação de nutrientes, de danos mecânicos e da ação de toxinas (Chandler et al., 2000). Golo et al. (2011) expuseram *R. microplus* à destruxina A e observaram que a toxina não afetou a sobrevivência e os parâmetros biológicos do carrapato. Já Morais-Urano et al. (2012) observaram uma eficácia de destruxina produzida por *Beauveria felina* no controle de *R. microplus*. Utilizando a técnica de RNA-seq, Sbaraini et al. (2019) observaram, em *M. robertsii*, uma gama de expressão de moléculas como a Mcl1, metabólitos secundários, enzimas digestivas dentre outras, durante o processo infeccioso em carrapato *R. microplus*.

Desafios para a aplicação de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos

Apesar de todo conhecimento a respeito do processo de infecção dos fungos entomopatogênicos em carrapatos e da sua resposta imune a esses patógenos, muitos desafios precisam ser enfrentados para a aplicação efetiva do controle biológico desses parasitos. A utilização dos fungos entomopatogênicos contra pragas da agricultura é uma realidade em diversos países. O Brasil possui um dos maiores programas do mundo de controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos, com a aplicação do fungo *M. anisopliae* no controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar (Mascarin et al., 2019). Existem, aproximadamente, 82 produtos registrados no Brasil para o controle de pragas agrícolas à base de microrganismos, sendo 60% à base de fungos entomopatogênicos (Mascarin et al., 2019). Porém, ainda não há registro de um produto à base de fungos para o controle de carrapatos no Brasil.

Um dos fatores que está relacionado a essa realidade é a diferença na susceptibilidade entre carrapatos e insetos-praga aos fungos entomopatogênicos. Normalmente, os carrapatos duros (ixodídeos) são menos susceptíveis à ação dos fungos entomopatogênicos, quando comparados aos insetos, necessitando de uma maior quantidade de propágulos fúngicos para acarretar a morte dos carrapatos. Esse fato impacta na aplicação efetiva dos entomopatógenos no seu controle, havendo a necessidade de investir em tecnologias mais eficientes para a produção em larga escala (Islam et al., 2021) dos propágulos fúngicos, além do desenvolvimento de formulações (Cafarchia et al., 2022) para a aplicação destes propágulos a campo.

Existe uma grande variação na suscetibilidade aos fungos entre as diferentes espécies de carrapatos e, até mesmo, entre as diferentes populações de carrapatos de uma mesma espécie (Perinotto et al., 2012; Beys-da-Silva et al., 2020; Ebani, Mancianti, 2021). Ademais, os isolados fúngicos também apresentam diferenças em sua virulência, o que demonstra a importância de testes laboratoriais preliminares, com diferentes isolados fúngicos, antes de sua aplicação efetiva a campo de isolados promissores.

Apesar da eficácia dos fungos entomopatogênicos já ter sido comprovada em condições de laboratório, sua ação diminui consideravelmente quando são testados a campo. Seu desempenho é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas e ventos, além do microclima em que o patógeno vive (Inglis et al., 2001; Rangel et al., 2008a,b; Jaronski, 2010). Dentre esses fatores, as variações extremas de

temperatura e de umidade relativa, e a radiação ultravioleta são citados como os mais impactantes para os fungos. Temperaturas elevadas ou muito baixas podem afetar o fungo de diferentes maneiras, já que interferem no seu metabolismo de forma geral, alterando os processos de produção de toxinas e enzimas, a germinação de conídios, a penetração, a colonização e a reprodução (Alves, 1998; Zimmermann, 2007 a, b; Ment et al., 2011). A umidade relativa é de extrema importância para a sobrevivência desses patógenos, atuando nas fases de germinação, penetração e disseminação, sendo também um fator limitante para a reprodução de algumas espécies (Zimmermann, 2007a, b; Ment et al., 2010).

Além da umidade, a precipitação tem papel importante na dispersão dos propágulos fúngicos, podendo remover os conídios da superfície dos artrópodes (Cafarchia et al., 2022). A radiação solar, principalmente as frações UV-A e UV-B, é um dos fatores ambientais que mais afeta a viabilidade e persistência dos propágulos fúngicos (Braga et al., 2015). Geralmente, poucas horas de exposição direta ao sol de meio dia no verão, em regiões de clima tropical ou temperado, são suficientes para inativar totalmente ou pelo menos atrasar a germinação dos conídios (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2008). Além disso, fatores relacionados ao solo, como acidez e quantidade de matéria orgânica, também podem influenciar na presença/persistência dos fungos entomopatogênicos no ambiente (Abdul Qayyum et al., 2021).

Devido à possível ação deletéria dos fatores ambientais, a aplicação dos fungos entomopatogênicos *in natura*, ou seja, sem uma formulação associada ao propágulo fúngico, mostra-se, em geral, ineficaz e inviável. Formular um patógeno consiste em acrescentar a ele substâncias que irão potencializar seu desempenho, facilitar seu manuseio e aplicação, além de permitir o armazenamento, com perda mínima da qualidade do produto (Alves, 1998). Essas substâncias adicionadas às formulações fúngicas, são, em geral, inertes, e atuam como veículos e adjuvantes que protegem e potencializam a ação e a persistência do propágulo fúngico (Skinner et al., 2014). As formulações com conídios em pó a serem dispersos em água e aplicados como formulação líquida apresentam mais estudos para o controle de carrapatos, por serem de simples elaboração e baixo custo.

Os principais adjuvantes utilizados em formulações líquidas são os óleos minerais e vegetais. Os óleos atuam não só protegendo os propágulos fúngicos das intempéries ambientais, tendo ação termoprotetora e antievaporante (Bateman et al., 1993; Muniz et al., 2020), como também favorecem a aderência dos conídios à cutícula dos artrópodes, por apresentarem características hidrofóbicas (Prior et al., 1988; Camargo et al., 2012). Outro constituinte

importante das formulações fúngicas são os surfactantes, que atuam reduzindo a tensão superficial da água, facilitando a adesão dos conídios aéreos (normalmente hidrofóbicos) à cutícula dos carrapatos (Bidochka et al., 1995; Jackson et al., 2010). Além das formulações contendo conídios, líquidas ou em pó, existem diferentes tipos de formulações em que são utilizados outros propágulos, como os blastosporos (Faria, Wraight, 2007; Lorenz et al., 2020), e, mais recentemente, tem-se estudado formulações em *pellets* com microescleródios (Mascarin, et al., 2019; Marciano et al., 2021), ambas apresentando resultados promissores contra carrapatos.

Existem, ainda, estudos sobre o desenvolvimento de partículas através do encapsulamento de microrganismos para o controle biológico (Fraceto et al., 2018; Quiroz et al., 2019). O microencapsulamento utiliza polímeros para criar uma matriz de revestimento, que protege o agente contra os fatores abióticos, além de aumentar o tempo de prateleira, facilitar o manuseio, o transporte e a aplicação (Vemmer, Patel, 2013; Qiu et al., 2019). Apesar de pesquisadores terem demonstrado os benefícios dos processos de encapsulamento para proteção contra a radiação ultravioleta (Maruyama et al., 2020; Przyklenk et al., 2017), contra o processo de secagem com temperaturas elevadas (Locatelli et al., 2018) e para o aumento da vida útil dos fungos (Liu; Liu, 2009; Przyklenk et al., 2017), poucos trabalhos testaram propágulos fúngicos encapsulados contra carrapatos. Lorenz et al., (2020) observaram 100% de mortalidade de ninfas de *Ixodes ricinus* tratadas com blastosporos de *Metarhizium pemphigi* encapsulados. Meirelles et al., (2023) relataram que conídios de *M. anisopliae* encapsulados apresentaram maior tempo de prateleira, tolerância à temperatura e à radiação UV-B, além de ação contra fêmeas de *R. microplus*.

A escolha da formulação fúngica adequada para o controle de carrapatos está relacionada, também, à abordagem utilizada, ou seja, se a formulação será aplicada no hospedeiro, visando ao controle das fases parasitárias do carrapato, ou se será aplicada na pastagem/ambiente para o controle das fases não parasitárias. Cada estratégia de controle apresenta os seus desafios, vantagens e desvantagens. A aplicação no hospedeiro, geralmente, ocorre através de formulação líquida aspergida na superfície do corpo do animal, já avaliada para o controle de *R. microplus* (Camargo et al., 2014; Camargo et al., 2016; Zeina et al., 2022), *R. evertsi evertsi* (Kaaya et al., 2011), *R. decoloratus* (Kaaya et al., 2011; Murigu et al., 2016) e *R. sanguineus* (Rot et al., 2013). Ao aplicar a formulação fúngica no hospedeiro, o entomopatógeno fica exposto aos fatores ambientais, uma vez que o método de infecção do fungo ocorre por penetração ativa através da cutícula, necessitando da germinação na superfície externa do artrópode. Além

disso, existem fatores relacionados ao hospedeiro, tais como secreções, pH e a presença de outros microrganismos na pele, que podem atrapalhar o desenvolvimento fúngico (revisado por Polar et al., 2008).

No entanto, essa abordagem tende a ter uma melhor aceitação do produtor rural, principalmente quando o alvo é o carrapato dos bovinos, já que o produtor enxerga a facilidade da aplicação da formulação fúngica, por manter o manejo já empregado na aplicação dos carrapaticidas químicos. Além disso, uma menor quantidade de produto será necessária para tratar os animais, quando comparada à aplicação em áreas de pastagem.

Um dos principais desafios para a utilização das formulações na pastagem/ambiente visando ao controle da fase não parasitária dos carrapatos é a quantidade de produto necessária, principalmente em se tratando do carrapato dos bovinos, *R. microplus*, já que as pastagens são, em geral, extensas áreas. Por outro lado, ao serem aplicados na pastagem, os fungos são protegidos pela cobertura vegetal que forma um ambiente com microclima favorável ao seu desenvolvimento, com temperatura amena, umidade relativa elevada e proteção contra a radiação ultravioleta, o que tem apresentado resultados promissores para o controle de carrapatos na pastagem (Marciano et al., 2020; Mesquita et al., 2020).

Fatores como armazenamento, transporte e tempo de prateleira são desafios importantes quando se trata de produtos à base de fungos entomopatogênicos. Quando comparados aos acaricidas químicos, que possuem prazo de validade de anos, os produtos biológicos apresentam baixa durabilidade, o que é um ponto limitador para sua comercialização, principalmente em países de dimensões continentais e clima tropical, como o Brasil. Estudos com diferentes tipos de embalagens (Faria et al., 2012; Jackson, Mascarin, 2015; Mascarin et al., 2016), bem como com formulações de propágulos fúngicos encapsulados (Przyklenk et al., 2017; Locatelli et al., 2018; Mancera-López et al., 2019; Maruyama et al., 2020) têm sido desenvolvidos visando ao prolongamento do tempo de prateleira dos produtos à base de fungos entomopatogênicos, para que esses se tornem produtos comerciais viáveis para serem aplicados a campo, sem perderem sua eficácia.

Outro fator que limita a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos, especialmente no Brasil, é a ausência de uma legislação regulatória específica para o registro dos produtos biológicos junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pois, até o momento, o país dispõe apenas de uma legislação para antiparasitários químicos. Discussões vêm sendo realizadas entre o MAPA e os produtores e indústrias de biológicos, com o

intuito de aprimorar as políticas para o registro de bioprodutos. Um passo importante foi o estabelecimento de critérios simplificados para o registro de produtos fitossanitários a serem utilizados na agricultura orgânica. Entretanto, mais avanços são necessários para o estabelecimento de uma legislação regulatória que respeite as características específicas dos produtos biológicos. Além do mais, são necessárias campanhas de esclarecimento junto aos produtores rurais sobre a importância e a correta utilização dos fungos entomopatogênicos sobre os carrapatos. Isso porque sua eficácia e tempo de ação são bem distintos dos químicos e, muitas vezes, são interpretados como baixa eficiência, dificultando sua aceitação por parte dos produtores.

Apesar dos desafios enfrentados para a aplicação do controle biológico de carrapatos, os fungos apresentam-se como ferramentas importantes a serem empregadas no controle integrado. Existem trabalhos que apresentam, por exemplo, a associação de fungos com produtos químicos para o controle de carrapatos (Bahense et al., 2006, 2008; Webster et al., 2015; Carneiro et al., 2022). Além disso, muitos exemplos de sucesso da aplicação dos fungos no controle integrado de pragas agrícolas (Khun et al., 2020; Jaiswal et al., 2022) também indicam o seu potencial como micoacaricidas para um controle mais sustentável e integrado de carrapatos.

Considerações finais

Os carrapatos causam grandes prejuízos à Saúde Pública e à pecuária mundial, principalmente em países considerados grandes produtores, como é o caso do Brasil. Os fungos entomopatogênicos apresentam potencial de controle desses parasitos, por já terem demonstrado eficácia, segurança em seu uso, e por possibilitarem a redução do uso de acaricidas químicos e não impactarem o ambiente. Por esses motivos, contribuem para a manutenção da Saúde Única, que envolve a indissociação entre a saúde humana, animal e do ambiente.

Sendo assim, a identificação de isolados de fungos entomopatogênicos virulentos, o desenvolvimento de uma formulação que garanta a virulência do isolado fúngico e o aprofundamento do entendimento sobre as bases moleculares e funcionais da imunidade de carrapatos, quando desafiados com fungos entomopatogênicos, é essencial para o sucesso da utilização de biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos.

Referências

28Abdul Qayyum M, Bilal H, Naeem Ullah U, Ali H, Raza H. Factors affecting the epizootics of entomopathogenic fungi-a review. J Bioresour Manag. 2021;8, 78–85.

Abro NA, Wang G, Ullah H, Long GL, Hao K, Nong X, Cai N, Tu X, Zhang Z. Influence of *Metarhizium anisopliae* (IMI330189) and Mad1 protein on enzymatic activities and Toll-related genes of migratory locust. Environ Sci Pollut Res Int. 2019;26(17):17797-17808.

Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. Immunol Rev. 2004;198:72-82.

Aguilar-Díaz H, Quiroz-Castañeda RE, Salazar-Morales K, Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E. Tick Immunobiology and Extracellular Traps: An Integrative Vision to Control of Vectors. Pathogens. 2021 19;10(11):1511.

Alkhaibari AM, Lord AM, Maffei T, Bull JC, Olivares FL, Samuels RI, Butt TM. Highly specific host-pathogen interactions influence *Metarhizium brunneum* blastospore virulence against *Culex quinquefasciatus* larvae. Virulence. 2018;9(1):1449-1467.

Altimira F, Arias-Aravena M, Jian L, Real N, Correa P, González C, Godoy S, Castro JF, Zamora O, Vergara C, Vitta N, Tapia E. Genomic and experimental analysis of the insecticidal factors secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184. J Fungi. 2022; 8(3):253.

Alves SB. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

Arruda W, Lübeck I, Schrank A, Vainstein MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Exp. Appl. Acarol. 2005; 37(3-4): 231–244.

Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HR, Guedes BA, Orfanó AS, Tadei WP, Ríos-Velásquez CM, Han YS, Secundino NF, Barillas-Mury C, Pimenta PF, Traub-Csekö YM. The JAK-STAT pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(11):e1317.

Bahiense TC, Fernandes EKK, Angelo IC, Perinotto WMS, Bittencourt VREP. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008;1149, 242–245.

Bahiense TC, Fernandes EKK, Bittencourt VREP. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. Vet. Parasitol. 2006; 141, 319–324.

Baldiviezo LV, Pedrini N, Santana M, Mannino MC, Nieva LB, Gentile A, Cardozo RM. Isolation of *Beauveria bassiana* from the chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Gran Chaco region of Argentina: Assessment of Gene Expression during Host–Pathogen Interaction. *J Fungi*. 2020;6(4):219.

Bang IS. JAK/STAT signaling in insect innate immunity. *Entomol Res*. 2019; 49(8), 339-353.

Barelli L, Moreira CC, Bidochka MJ. Initial stages of endophytic colonization by *Metarhizium* involves rhizoplane colonization. *Microbiology*. 2018;164(12):1531-1540.

Barelli L, Padilla-Guerrero IE, Bidochka MJ. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Biology*. 2011;115(11), 1174e1185.

Bateman RP, Carey M, Moore DE, Prior C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann Appl Biol*. 1993;122(1):145-152.

Berestetskiy A, Hu Q. The chemical ecology approach to reveal fungal metabolites for arthropod pest management. *Microorganisms*. 2021;9(7), 1379.

Bernardo CC, Barreto LP, Ribeiro-Silva, CS, Luz C, Arruda W., Fernandes ÉKK. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2018; 9(5):1334–1342.

Beys-da-Silva, WO, Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A, Bittencourt, VREP, Santi, L. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitol*. 2020; 208, p. 107812.

Beys da Silva WO, Santi L, Schrank A, Vainstein MH. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal Biol*. 2010;114(1):10-5.

Bidochka MJ, De Koning J, St Leger R J. Analysis of a genomic clone of hydrophobin (ssgA) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*. 2001;105:360–364.

Bidochka MJ, St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycol. Res*. 1995;99, 403–406.

Bittencourt VREP, Mascarenhas AG, Faccini JLH. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, Santa Maria. 1999;29(2):351-354.

Bittencourt VREP, Massard CL, Lima AF. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschinikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev Univ Rural*. 1995;17:83-88.

Blisnick AA, Foulon T, Bonnet SI. Serine protease inhibitors in ticks: An overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;22(7):199.

Blomquist GJ, Tillman-Wall JA, Guo L, Quilici D, Gu P, Schal C. Hydrocarbon and hydrocarbon derived sex pheromones in insects: biochemistry and endocrine regulation. In: Stanley-Samuels DW ND, editor. *Insect Lipids: Chem and Biol.* 1993; 317–351.

Bogus MI, Czygier M, Golebiowski M, Kedra E, Kucinska J, Mazgajska J, Samborski J, Wieloch W, Wloka E. Effects of insect cuticular fatty acids on *in vitro* growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Exp Parasitol.* 2010;125(4):400-408.

Bonnet SI, Blisnick T, Al Khoury C, Guillot J. Of fungi and ticks: Morphological and molecular characterization of fungal contaminants of a laboratory-reared *Ixodes ricinus* colony. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021;12(5):101732.

Boparai JK, Sharma PK. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein Pept Lett.* 2020;27(1):4-16.

Borovicková B, Hypsa V. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol.* 2005;35:317-333.

Boucias DG, Pendland JC, Latge JP. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(7):1795-805.

Braga GU, Rangel DE, Fernandes ÉK, Flint SD, Roberts DW. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Curr Genet.* 2015;61(3):405-425.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-50.

Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence.* 2013;4:597-603.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 1999;23(4-5):329-44.

Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Loosova G, Grunclova L, Levashina EA, Kopacek P. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun.* 2011;3(6):623-30.

Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Adv Genet.* 2016;94:307-64.

Cafarchia C, Immediato D, Iatta R, Ramos RA, Lia RP, Porretta D, Figueredo LA, Dantas-Torres F, Otranto D. Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Parasit Vectors.* 2015;5;8:80.

Cafarchia C, Pellegrino R, Romano V, Friuli M, Demitri C, Pombi M, Benelli G, Otranto D. Delivery and effectiveness of entomopathogenic fungi for mosquito and tick control: Current knowledge and research challenges. *Acta Tropica*. 2022; 106627.

Camargo MG, Golo PS, Angelo IC, Perinotto WM, Sá FA, Quinelato S, Bittencourt VR. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Vet Parasitol*. 2012;188(1-2):140-147.

Camargo MG, Marciano AF, Sá FA, Perinotto WM, Quinelato S, Gôlo PS, Angelo IC, Prata MC, Bittencourt VR. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Vet Parasitol*. 2014;205(1-2):271-276.

Camargo MG, Nogueira MR, Marciano AF, Perinotto WM, Coutinho-Rodrigues CJ, Scott FB, Angelo IC, Prata MC, Bittencourt VR. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Vet Parasitol*. 2016;223:38-42.

Campos RA, Arruda W, Boldo JT, da Silva MV, de Barros NM, de Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr Microbiol*. 2005;50(5):257-61.

Capelli-Peixoto J, Carvalho DD, Johnson WC, Scoles GA, Fogaça AC, Daffre S, Ueti MW. The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. *Dev Comp Immunol*. 2017;74:32-39.

Carneiro AS, Mesquita E, Meirelles LN, Bittencourt VREP, Golo PS. Compatibility of different *Metarhizium* spp. propagules with synthetic acaricides for controlling *Rhipicephalus microplus*. *Braz J Vet Parasitol* 2022; 31(1): e018221

Catão AML, Rodrigues J, Marreto RN, Mascarin GM, Fernandes ÉKK, Humber RA, Luz C. Optimization of granular formulations of *Metarhizium humberi* microsclerotia with humectants. *J Basic Microbiol*. 2021;61(9):808-813.

Ceraul SM, Sonenshine DE, Hynes WL. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J Med Entomol*. 2002;39(2):376-83.

Chandler D, Davidson G, Pell JK, Ball BV, Shaw K, Sunderland KD. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Sci Technol*. 2000;10,357-384.

Chandran R, Williams L, Hung A, Nowlin K, LaJeunesse D. SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles. *Micron*. 2016;82:74-85.

Chmelař J, Kotál J, Karim S, Kopacek P, Francischetti IMB, Pedra JHF, Kotsyfakis, M. Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick–host interactions. *Trends Parasitol*. 2016;32,242–254.

Clarkson J, Charnley A. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 1996;4(5):197-203.

Clynen E, Schoofs L, Salzet M. A review of the most important classes of serine protease inhibitors in insects and leeches. *Med Chem Rev.* 2005;2(3):197-206.
Corrêa TA, Fiorotti J, Mesquita E, Meirelles LN, Camargo MG, Coutinho-Rodrigues CJB, Marciano AF, Bittencourt VREP, Golo PS. How Dopamine Influences Survival and Cellular Immune Response of *Rhipicephalus microplus* Inoculated with *Metarhizium anisopliae*. *J Fungi (Basel).* 2021;10;7(11):950.

Coutinho-Rodrigues CJB, Rosa RLD, Freitas MC, Fiorotti J, Berger M, Santi L, Beys-da-Silva WO, Yates JR, Bittencourt VREP. Exposure to a sublethal menadione concentration modifies the mycelial secretome and conidial enzyme activities of *Metarhizium anisopliae* sensu lato and increases its virulence against *Rhipicephalus microplus*. *Microbiol Res.* 2021 Jul;248:126753.

da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein MH, Schrank A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. *Res Microbiol.* 2005;156(3):382-92.

Dai SX, Zhang AD, Huang JF. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*. *BMC Evol. Biol.* 2012;12:4.

de la Fuente J, Contreras M, Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A. Targeting a global health problem: Vaccine design and challenges for the control of tick-borne diseases. *Vaccine.* 2017;35(38):5089-5094.

de la Fuente J. Controlling ticks and tick-borne diseases...looking forward. *Ticks Tick-borne Dis.* 2018;9:1354–1357.

de Oliveira BB, Salcedo-Porras N, Umaña-Díaz C, Angelo IC, Lowenberger C. Antifungal immune responses in mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. *J Invertebr Pathol.* 2021;178:107505.

de Paulo JF, Camargo MG, Coutinho-Rodrigues CJB, Marciano AF, de Freitas MC, da Silva EM, Gôlo PS, Morena DDS, Angelo IC, Bittencourt VREP. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. *Parasitol Res.* 2018;117(6):1847-1856.

Dong Y, Morton JC Jr, Ramirez JL, Souza-Neto JA, Dimopoulos G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2012;42(2):126-32.

Dupraz M, Leroy C, Thórarinnsson TL, d'Ettorre P, McCoy KD. Within and among population differences in cuticular hydrocarbons in the seabird tick *Ixodes uriae*. *bioRxiv* 2022;477272.

Ebani VV, Mancianti F. Entomopathogenic Fungi and Bacteria in a Veterinary Perspective. *Biology* 2021;10, 479.

- Eggenberger LR, Lamoreaux WJ, Coons LB. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol*. 1990;9:279-87.
- Eley KL, Halo LM, Song Z, Powles H, Cox RJ, Bailey AM, Lazarus CM, Simpson TJ. Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem Bio Chem*. 2007;8(3):289-297.
- El-Sayed G, Ignoffo C, Leathers T, Gupta S. Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia*. 1993;122(3):149-152.
- Estrada-Peña A, Cevidanes A, Sprong H, Millán J. Pitfalls in Tick and Tick-Borne Pathogens Research, Some Recommendations and a Call for Data Sharing. *Pathogens* 2021,10,6,712.
- Fang W, Pava-ripoll M, Wang S, St Leger R. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol*. 2009;46(3):277-85.
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology (Reading)*. 2007;153(Pt 4):1017-1025.
- Faria M, Hotchkiss JH, Wraight SP. Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. *Biol Control*. 2012;61(1):78-88.
- Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control*. 2007;43(3):237–256.
- Feitosa APS, Alves LC, Chaves MM, Veras DL, Silva EM, Aliança ASS, França IRS, Gonçalves GGA, Lima-Filho JL, Brayner FA. Hemocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae): Characterization, Population Abundance, and Ultrastructural Changes Following Challenge with *Leishmania infantum*. *J Med Entomol*. 2015;1-10.
- Feitosa APS, Chaves MM, Veras DL, De Deus DMV, Portela NCJ, Araújo AR. Assessing the cellular and humoral immune response in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) infected with *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908). *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:1421–30.
- Feng P, Shang Y, Cen K, Wang C. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(36):11365-11370.
- Fernandes EK, Rangel DE, Moraes AM, Bittencourt VR, Roberts DW. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J Invertebr Pathol*. 2008;98(1):69-78.

Fernandes EK, Rangel DE, Moraes AM, Bittencourt VR, Roberts DW. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *J Invertebr Pathol.* 2007;96(3):237-243.

Filshie RK. The structure and deposition of the epicuticle of the adult female cattle tick (*Boophilus microplus*). In *The Insect Integument*, ed. H. R. Hepburn, 1976, pp. 193-206. Amsterdam: Elsevier. 571 pp.

Fiorotti J, Urbanová V, Gôlo PS, Bittencourt VREP, Kopáček P. The role of complement in the tick cellular immune defense against the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Dev Comp Immunol.* 2022;126:104234.

Fiorotti J, Menna-Barreto RFS, Gôlo PS, Coutinho-Rodrigues CJB, Bittencourt ROB, Spadaci-Morena DD, Angelo IC, Bittencourt VREP. Ultrastructural and Cytotoxic Effects of *Metarhizium robertsii* Infection on *Rhipicephalus microplus* Hemocytes, *Front Physiol.* 2019;10.

Fogaça AC, Sousa G, Pavanelo DB, Esteves E, Martins LA, Urbanová V, Kopáček P, Daffre S. Tick immune system: What is known, the interconnections, the gaps, and the challenges. *Front Immunol.* 2021;2(12):628054.

Fraceto LF, Maruyama CR, Guilger M, Mishra S, Keswani C, Singh HB, De Lima R. Trichoderma harzianum-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 2018;93,2056-2063.

Franzin AM, Maruyama SR, Garcia GR, Oliveira RP, Ribeiro JM, Bishop R, Maia, AA, Moré DD, Ferreira BR, Santos IK. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasit. Vectors.* 2017;10(51).

Furlong J, Martins J, Prata M. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária.* 2007;27(159):1-7.

Gadd GM. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol.* 1999;41:47-92.

Garcia MV, Rodrigues VS, Monteiro AC, Simi LD, Higa LOS, Martins MM, Prette N, Mochi DA, Andreotti R, Szabó MPJ. *In vitro* efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato against unfed *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 2018;76:507–512.

Gibson DM, Donzelli BGG, Krasnoff SB, Keyhani NO. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat Prod Rep.* 2014;31(10):1287-1305.

Gołebiowski M, Maliński E, Boguś MI, Kumirska J, Stepnowski P. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008;38(6):619-27.

Gôlo PS, Angelo IC, Perinotto WMS, Camargo MG, Bittencourt VREP. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(4):338-341.

Golo PS, Santos HA, Perinotto WM, Quinelato S, Angelo IC, Camargo MG, Sá FA, Massard CL, Fernandes ÉKK, Roberts DW, Bittencourt VR. The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* sensu lato to ticks. Parasitol Res. 2015;114(6):2309-15.

González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. Entomol Exp Appl. 2012;142(1), 1-16.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Leon AAP, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. 2014, 23:150-156.

Hackman R. Structure and function in tick cuticle. Ann Rev Entomol. 1982; 27:75-95.

Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol. 2002;3,2.

Hu X, Xiao GH, Zheng P, Shang YF, Su Y, Zhang XY, Liu X, Zhan S, St. Leger RJ, Wang C. Trajectory and genomic determinants of fungal pathogen speciation and host adaptation. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111(47):16796-16801.

Huarte-Bonnet C, Kumar S, Saparrat MCN, Girotti JR, Santana M, Hallsworth JE, Pedrini N. Insights into hydrocarbon assimilation by Eurotiales and Hypocreales fungi: Roles for CYP52 and CYP53 clans of cytochrome P450 genes. Appl Biochem Biotechnol. 2018;184(3):1047-1060.

Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. CABI Publishing, Wallingford. 2001:23–70.

Islam W, Adnan M, Shabbir A, Naveed H, Abubakar YS, Qasim M, Tayyab M, Noman A, Nisar MS, Khan KA, Ali H. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. Microb Pathog. 2021;159:105122.

Jackson M, Bothast R. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. Appl Environ Microbiol. 1990;56(11):3435-3438.

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. BioControl 2010;55, 129–145.

Jackson MA, Mascarin GM. Stable fungal blastospores and methods for their production, stabilization and use. Patent US20160075992. 2015.

- Jaiswal DK, Gawande S J, Soumia PS, Krishna R, Vaishnav A, Ade AB. Biocontrol strategies: an eco-smart tool for integrated pest and diseases management. *BMC microbiology*. 2022;22(1),1-5.
- Jaronski ST. Ecological factors in the inundative use of fungal Entomopathogens. *BioControl*. 2010;55(1):159–185.
- Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res*. 2007; 111(2):240-249.
- Jiang Z, Ligoxygakis P, Xia Y. HYD3, a conidial hydrophobin of the fungal entomopathogen *Metarhizium acridum* induces the immunity of its specialist host locust. *Int J Biol Macromol*. 2020;165(Part A):1303-1311.
- Jin L, Niu G, Guan L, Ramelow J, Zhan Z, Zhou X, Li J. Discovery of mosquitocides from fungal extracts through a high-throughput cytotoxicity-screening approach. *Parasit Vectors*. 2021; 14, 595.
- Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol*. 1998; 3S:458-464.
- Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J Med Entomol*. 2000;31:265-270.
- Kaaya GP, Samish M, Hedimbi M, Gindin G, Glazer I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Exp Appl Acarol*. 2011;55(3):273-81.
- Kadota K, Satoh E, Ochiai M, Inoue N, Tsuji N, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Claveria FG, Fujisaki K. Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Parasitol Res*. 2002;88(8):781-4.
- Kaneko T, Silverman N. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell Microbiol*. 2005;7(4):461-9. Erratum in: *Cell Microbiol*. 2005;7(7):1049-50.
- Kellenberger C, Leone P, Coquet L, Jouenne T, Reichhart JM, Roussel A. Structure-function analysis of grass clip serine protease involved in *Drosophila* Toll pathway activation. *J Biol Chem*. 2011;8;286(14):12300-7.
- Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S.E., Charnley, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol*. 1999;74, 213e223.
- Kirkland B, Eisa A, Keyhani N. Oxalic acid as a fungal acaricidal virulence factor. *J. Med. Entomol*. 2005;42(3):346-51.
- Kirkland BH, Cho EM, Keyhani NO. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Contr*. 2004;31, 414–421

- Kiyoaki K. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J Insect Physiol.* 1957;1(1):40-51.
- Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev Comp Immunol.* 2014;42(1):25-35.
- Khun KK, Wilson BAL, Stevens MM, Huwer RK, Ash GJ. Integration of entomopathogenic fungi into IPM programs: Studies involving weevils (Coleoptera: Curculionoidea) affecting horticultural crops. *Insects.* 2020;11(10):659.
- Kopacek P, Hajdusek O, Buresova V, Daffre S. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2010;708:137–62.
- Koradin C, Schröder H, Oyama K, Ōmura S. Chapter 12 - Chemistry and biology connected: the development of Inscalis. Editor(s): Peter Maienfisch, Sven Mangelinckx, Recent Highlights in the Discovery and Optimization of Crop Protection Products. Academic Press. 2021; 231-239.
- Krieger de Moraes C, Schrank A, Vainstein MH. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol.* 2003;46(3):205-10.
- Kuhn KH, Haug T. Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). *Cell and Tissue Research.* 1994;277:493–504.
- Khun KK, Wilson BAL, Stevens MM, Huwer RK, Ash GJ. Integration of Entomopathogenic Fungi into IPM Programs: Studies Involving Weevils (Coleoptera: Curculionoidea) Affecting Horticultural Crops. *Insects.* 2020; 11(10):659
- Kumar A, Srivastava P, Sirisena P, Dubey SK, Kumar R, Shrinet J, Sunil S. Mosquito innate immunity. *Insects.* 2018;9(3):95.
- Lavine MD, Strand MR. Haemocytes from *Pseudomonas includens* express multiple α and β integrin subunits. *Insect Mol. Biol.* 2003, 12(5),441-452.
- Leannec-Rialland V, Cabezas-Cruz A, Atanasova V, Chereau S, Ponts N, Tonk M, Vilcinskis A, Ferrer N, Valdés JJ, Richard-Forget F. Tick defensin γ -core reduces *Fusarium graminearum* growth and abrogates mycotoxins production with high efficiency. *Sci Rep.* 2021;11:7962.
- Lee SJ, Lee MR, Kim S, Kim JC, Park SE, Li D, Kim JS. Genomic analysis of the insect killing fungus *Beauveria bassiana* JEF-007 as a biopesticide. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-12.
- Li J, Ying SH, Shan LT, Feng MG. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(4):975-84.

- Li L, Zhong K, Wang JL, Liu XS. Mechanism of *Metarhizium rileyi* evading cellular immune responses in *Helicoverpa armigera*. Arch Insect Biochem Physiol. 2021;106(3):e21769.
- Lin L, Fang W, Liao X, Wang F, Wei D, St Leger RJ. The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of *Metarhizium robertsii* is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons. PLoS One. 2011;6(12):e28984.
- Liu CP, Liu SD. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. J Microencapsul. 2009;26, 5, 377-384.
- Liu BL, Tzeng YM. Development and applications of destruxins: A review. Biotechnol Adv. 2012;30(6):1242–1254.
- Liu L, Dai J, Zhao YO, Narasimhan S, Yang Y, Zhang L, Fikrig E. *Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. J Infect Dis. 2012;206(8):1233-41.
- Lobo LS, Luz C, Fernandes ÉK, Juárez MP, Pedrini N. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. J Invertebr Pathol. 2015;128:14–21.
- Locatelli GO, dos Santos GF, Botelho OS, Finkler CLL, Bueno LA. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. Biol Control. 2018;117:21–29.
- Lopes RB, Alves SB, Padulla LF, Pérez CA. Efficiency of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* formulations on *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) nymphae. Rev Bras Parasitol Vet. 2007;16(1):27-31.
- Lord JC, Howard RW. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. Mycopathologia. 2004;158(2):211-217.
- Lorenz SC, Humbert P, Patel AV. Chitin increases drying survival of encapsulated *Metarhizium pemphigi* blastospores for *Ixodes ricinus* control. Ticks Tick Borne Dis. 2020;11(6):101537.
- Lovett B, St Leger RJ. The Insect Pathogens. Microbiol Spectr. 2017;5(2).
- Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2001;31(3):219-29.
- Lu HL, St Leger RJ. Insect immunity to entomopathogenic fungi. Adv Genet. 2016;94: 251–285.

Lubeck I, Arruda W, Souza BK, Stanisçuaski F, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. Fungal Ecol. 2008;1:78-88.

Luo T, Zhang X, Shao Z, Xu X. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. FEBS Lett. 2003, 551, 53-57.

Lv M, Mohamed AA, Zhang L, Zhang P, Zhang L. A Family of CS α β Defensins and Defensin-Like Peptides from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*, and Their Expression Dynamics during Mycosis and Nosemosis. PLoS One. 2016;11(8):e0161585.

Mac S, da Silva SR, Sander B. The economic burden of Lyme disease and the cost-effectiveness of Lyme disease interventions: A scoping review. PLoS One. 2019,14, e0210280.

Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E. 2020. Emerging tick-borne diseases. Clin Microbiol Ver 33:e00083-18.

Mancera-López ME, Izquierdo-Estévez WF, Escalante-Sánchez A, Ibarra JE, Barrera-Cortés J. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. Biocontrol Sci Technol. 2019;29(2):107-130.

Marchesini P, Oliveira DR, Gomes GA, Rodrigues THS, Maturano R, Fidelis QC, Catunda-Jr. FEA, Carvalho MG, Bittencourt VREP, Monteiro CMO. Acaricidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* and *Eremanthus erythropappus*, major compounds and cinnamyl acetate in *Rhipicephalus microplus*. Rev Bras Parasitol Vet. 2021;30:009221.

Marciano AF, Golo PS, Coutinho-Rodrigues CJB, Camargo MG, Fiorotti J, Mesquita E, Corrêa TA, Perinotto WMS, Bittencourt VREP. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. Med Vet Entomol. 2020;34(4):488-492.

Marciano AF, Mascarin GM, Franco RFF, Golo PS, Jaronski ST, Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. Sci Rep. 2021;11(1):4972.

Marmaras VJ, Lampropoulou M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. Cell. Signal. 2009, 21, 186-195.

Martins LA, Malossi CD, Galletti MFBM, Ribeiro JM, Fujita A, Esteves E, Costa FB, Labruna MB, Daffre S, Fogaça AC. The Transcriptome of the Salivary Glands of *Amblyomma aureolatum* Reveals the Antimicrobial Peptide Microplusin as an Important Factor for the Tick Protection Against *Rickettsia rickettsii* Infection. Front Physiol. 2019;3(10):529.

Maruyama CR, Bilesky-José N, de Lima R, Fraceto LF. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. Front Bioeng Biotechnol. 2020;25(8):225.

Mascarin GM, Jackson MA, Behle RW, Kobori NN, Júnior ÍD. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(19):8359-70.

Mascarin GM, Jackson MA, Kobori NN, Behle RW, Delalibera Júnior Í. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *J Invertebr Pathol*. 2015;127:11-20.

Mascarin GM, Jaronski ST. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(11):177.

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í Jr, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol*. 2019;165:46-53.

McClure Carroll EE, Wang X, Shaw DK, O'Neal AJ, Oliva Chávez AS, Brown LJ, Boradia VM, Hammond HL, Pedra JHF. p47 licenses activation of the immune deficiency pathway in the tick *Ixodes scapularis*. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 2019;116(1):205-210.

Meirelles LM, Mesquita E, Corrêa TA, Bitencourt ROB, Oliveira JL, Fraceto LF, Camargo MG, Bittencourt VREP. Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhizoglyphus microplus*. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2023; 14:102184

Meng Y, Zhang X, Guo N, Fang W. MrSt12 implicated in the regulation of transcription factor AFTF1 by Fus3-MAPK during cuticle penetration by the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Fungal Genet Biol*. 2019;131:103244.

Ment D, Churchill AC, Gindin G, Belausov E, Glazer I, Rehner SA, et al. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. *Environ Microbiol*. 2012;14(6):1570-83.

Ment D, Gindin G, Glazer I, Perl S, Elad D, Samish M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biol*. 2010;114(1):49-56.

Ment D, Gindin G, Rot A, Eshel D, Teper-Bamnolker P, Ben-Ze'ev I, et al. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. *Biocontrol Sci Technol*. 2013; 23(8):956-967.

Ment D, Gindin G, Samish M, Glazer I. Comparative response of *Metarhizium brunneum* to the cuticles of susceptible and resistant hosts. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2020;105(4):e21756.

Ment D, Gindin G, Soroker V, Glazer I, Rot A, Samish M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(2):132-9.

Ment D, Iraki N, Gindin G, Rot A, Glazer I, Abu-Jreis R, Samish M. Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy: selection for application on warm-blooded vertebrates. *BioControl*. 2011;56(1):81-89.

Mesquita E, Marciano AF, Corval ARC, Fiorotti J, Corrêa TA, Quinelato S, Bittencourt VREP, Golo PS. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semi-field conditions. *BioControl*. 2020;65(3):353-362.

Monteiro CMO, Brito LCM, Paula LGF, Fernandes ÉKK, Dolinski C, Bittencourt VREP, Furlong J, Prata MCA. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. *Ticks and Tick-Borne Dis*. 2020;11:online.

Morais-Urano RP, Chagas AC, Berlinck RG. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol*. 2012;132(3):362-6.

Muniz ER, Paixão FRS, Barreto, LP, Luz, C. Arruda, W. Angelo, IC. Fernandes, ÉK. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* conidia in oil-in-water emulsion against the tick *Rhipicephalus microplus* under heat and dry conditions. *BioControl*. 2020;65(3):339-351.

Muniz ER, Ribeiro-Silva CS, Arruda W, Keyhani NO, Fernandes EKK. The Msn2 Transcription Factor Regulates Acaricidal Virulence in the Fungal Pathogen *Beauveria bassiana*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021;11:690731.

Murigu MM, Nana P, Waruiru RM, Nga'nga' CJ, Ekesi S, Maniania NK. Laboratory and field evaluation of entomopathogenic fungi for the control of amitraz-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus decoloratus*. *Vet Parasitol*. 2016;225:12-18.

Myllymäki H, Rämet M. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scand J Immunol*. 2014;79(6):377-85.

Myllymäki H, Valanne S, Rämet M. The *Drosophila* imd signaling pathway. *J Immunol*. 2014;15;192(8):3455-62.

Nash JA, Ballard TN, Weaver TE, Akinbi HT. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. *J Immunol*. 2006;1;177(1):519-26.

Nelson DR. Methyl-branched lipids in insects. In: Stanley-Samuelson DW ND, editors. *Insect Lipids: Chemistry and Biology*. Lincoln: University of Nebraska Press.; 1993:271–315.

Negreiro MCC, Andrade FG, Falleiros AMF. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semin Ciênc Agrár*. 2004;25,293–308.

Nogueira MRDS, Camargo MG, Rodrigues CJBC, Marciano AF, Quinelato S, Freitas MC, Fiorotti J, Sá FA, Perinotto WMS, Bittencourt VREP. *In vitro* efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Rev Bras Parasitol Vet. 2020;29(2):e000220.

Oliva Chávez AS, Shaw DK, Munderloh UG, Pedra JH. Tick Humoral Responses: Marching to the Beat of a Different Drummer. Front Microbiol. 2017;8:223.

Pal S, Wu LP. Lessons from the fly: pattern recognition in *Drosophila melanogaster*. Adv Exp Med Biol. 2009;653:162-74.

Pal S, St Leger RJ, Wu LP. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 2007; 282, 8969e8977.

Palmer WJ, Jiggins FM. Comparative genomics reveals the origins and diversity of arthropod immune systems. Mol Biol Evol. 2015;32(8):2111-29.

Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochem Lett. 2002;59(6):579-596.

Pedrini N, Crespo R, Juárez MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. CBP. 2007;146C(1-2):124-137.

Pedrini N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. Fungal Biol. 2018;122(6):538-545.

Pedrini N. The Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: Expression of genes encoding secondary metabolites during pathogenesis. J Fungi. 2022;8(5):488.

Pedrini N, Crespo R, Juarez MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2007;146:124–137.

Pendland JC, Hung SY, Boucias DG. Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. J Bacteriol. 1993;175(18):5962-9.

Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fdalgo C. Production of Reactive Oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. Exp Parasitol. 2001;99:66-72.

Perinotto WM, Angelo IC, Golo PS, Quinelato S, Camargo MG, Sá FA, Bittencourt VR. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Parasitol. 2012;130(3):257-60.

Perinotto WM, Golo PS, Coutinho Rodrigues CJ, Sá FA, Santi L, Beys da Silva WO, Junges A, Vainstein MH, Schrank A, Salles CM, Bittencourt VR. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 2014;203(1-2):189-96.

Pichersky E, Gang DR. Genetics and Biochemistry of Secondary Metabolites in Plants: An Evolutionary Perspective. *Trends in Plant Science Perspectives.* 2000, 5, 439-445.

Polar P, Moore D, Kairo MT, Ramsubhag A. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol.* 2008;46(1-4):119-148.

Prior C, Jollands P, Le Patourel G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J Invertebr Pathol.* 1988;52(1):66-72.

Przyklenk M, Vemmer M, Hanitzsch M, Patel A. A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. *J Microencapsul.* 2017;34(5):498-512.

Qiu HL, Fox EG, Qin CS, Zhao DY, Yang H, Xu JZ. Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. *Biological Control,* 2019,134,141-149.

Quiroz CR, Maldonado JJC, Alanis MDJR, Torres JA, Saldívar RP. Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. *J Pest Sci.,* 2019;92,1003-1015.

Rangel DEN, Alston DG, Roberts DW. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol. Res.* 2008a;112, 1355-1361.

Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol. Res.* 112, 2008b; 1362-1372.

Ramirez JL, Schumacher MK, Ower G, Palmquist DE, Juliano SA. Impacts of fungal entomopathogens on survival and immune responses of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquitoes in the context of native *Wolbachia* infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(11):e0009984.

Ramirez JL, Muturi EJ, Barletta ABF, Rooney AP. The *Aedes aegypti* IMD pathway is a critical component of the mosquito antifungal immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 2019;95,1-9.

Ribeiro-Silva, Cárita S., Elen R. Muniz, Valesca H. Lima, Cíntia C. Bernardo, Walquíria Arruda, Rosane N. Castro, Patrícia S. Gôlo, Isabele C. Angelo, and Éverton K. K. Fernandes. Cuticular Lipids as a First Barrier Defending Ixodid Ticks against Fungal Infection. *J. Fungi,* 2022.;8(11):1177.

Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem*. 2012;287:14270–9.

Shaw DK, Wang X, Brown LJ, Chávez AS, Reif KE, Smith AA, Scott AJ, McClure EE, Boradia VM, Hammond HL, Sundberg EJ, Snyder GA, Liu L, DePonte K, Villar M, Ueti MW, de la Fuente J, Ernst RK, Pal U, Fikrig E, Pedra JH. Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nat Commun*. 2017;8:14401.

Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*. 2018;9(1):1625-1639.

Shimshoni JA, Erster O, Rot A, Cuneah O, Soback S, Shkap V. Cuticular fatty acid profile analysis of three *Rhipicephalus* tick species (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2013; 61(4):481-9.

Shin TY, Lee MR, Park SE, Lee SJ, Kim WJ, Kim JS. Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2020;105(4):e21747.

Silva FD, Rezende CA, Rossi DC, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, Gueiros-Filho F, Campos CB, Pires JR, Daffre S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34735-46.

Silva SB, Savastano G, Bittencourt V.R.E.P. Cellular types involved in the immune response of engorged females of *Boophilus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium* sp. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2006;15:128-131.

Skinner M, Parker BL, Kim JS. Role of entomopathogenic fungi. In: Abrol, D. P. (Ed.), *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, 2014;169–191.

Smith RJ, Grula EA. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol*. 1982;39(1):15-22.

Soesanto L, Prastyani N, Sri Utami D, Manan A. Application of raw secondary metabolites from four entomopathogenic fungi against Chilli disease caused by viruses. *J HPT Tropika*; 2020;20(2):100-107.

Sonderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:23-8.

Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:390.

Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci*. 2008;13:7046–63.

Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem.* 2012;287:14270–9.

Shaw DK, Wang X, Brown LJ, Chávez AS, Reif KE, Smith AA, Scott AJ, McClure EE, Boradia VM, Hammond HL, Sundberg EJ, Snyder GA, Liu L, DePonte K, Villar M, Ueti MW, de la Fuente J, Ernst RK, Pal U, Fikrig E, Pedra JH. Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nat Commun.* 2017;8:14401.

Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence.* 2018;9(1):1625-1639.

Shimshoni JA, Erster O, Rot A, Cuneah O, Soback S, Shkap V. Cuticular fatty acid profile analysis of three *Rhipicephalus* tick species (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 2013; 61(4):481-9.

Shin TY, Lee MR, Park SE, Lee SJ, Kim WJ, Kim JS. Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2020;105(4):e21747.

Silva FD, Rezende CA, Rossi DC, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, Gueiros-Filho F, Campos CB, Pires JR, Daffre S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Biol Chem.* 2009;284(50):34735-46.

Silva SB, Savastano G, Bittencourt V.R.E.P. Cellular types involved in the immune response of engorged females of *Boophilus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium* sp. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15:128-131.

Skinner M, Parker BL, Kim JS. Role of entomopathogenic fungi. In: Abrol, D. P. (Ed.), *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, 2014;169–191.

Smith RJ, Grula EA. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol.* 1982;39(1):15-22.

Soesanto L, Prastyani N, Sri Utami D, Manan A. Application of raw secondary metabolites from four entomopathogenic fungi against Chilli disease caused by viruses. *J HPT Tropika*; 2020;20(2):100-107.

Sonderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:23-8.

Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:390.

Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci.* 2008;13:7046–63.

Rosa RD, Capelli-Peixoto J, Mesquita RD, Kalil SP, Pohl PC, Braz GR, Fogaça AC, Daffre S. Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Dev Comp Immunol*. 2016;59:1-14.

Rossoni C, Loureiro ES, Pereira FF, Kassab SO, Costa DP, Barbosa RH. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on adults of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Folia Biol (Krakow)*. 2014;62(3):269-75.

Rot A, Gindin G, Ment D, Mishoutchenko A, Glazer I, Samish M. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Vet Parasitol*. 2013;193(1-3):229-237.

Shanmuganath C, Kumar S, Singh R, Sharma AK, Saminathan M, Saini M, Chigure G, Fular A, Kumar R, Juliet S, Upadhaya D, Kumar B, Srivastava S, Ghosh S. Development of an efficient antitick natural formulation for the control of acaricide-resistant ticks on livestock. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2021;12:101655.

Santos TR, da Paixão FRS, Catão AML, Muniz ER, Ribeiro-Silva CS, Taveira SF, Luz C, Mascarim GM, Fernandes ÉKK, Marreto RN. Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(12):5001-5012.

Sbaraini N, Bellini R, Penteriche AB, Guedes RLM, Garcia AWA, Gerber AL, Vainstein MH, de Vasconcelos ATR, Schrank A, Staats CC. Genome-wide DNA methylation analysis of *Metarhizium anisopliae* during tick mimicked infection condition. *BMC Genomics*. 2019;20(1):836.

Sbaraini N, Junges Â, de Oliveira ES, Webster A, Vainstein MH, Staats CC, Schrank A. The deletion of chiMaD1, a horizontally acquired chitinase of *Metarhizium anisopliae*, led to higher virulence towards the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*). *FEMS Microbiol Lett*. 2021;368(12):fnab066.

Sbaraini N, Muniz Guedes RL, Carrer Andreis F, Junges A, Loss de Moraes G, Henning Vainstein M, Ribeiro de Vasconcelos AT, Schrank A. Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. *BMC Genomics*. 2016;17(8):736.

Schrank A, Vainstein MH. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 2010;56(7):1267-74.

Schwarz A, Cabezas-Cruz A, Kopecký J. et al. Understanding the evolutionary structural variability and target specificity of tick salivary Kunitz peptides using next generation transcriptome data. *BMC Evol Biol*. 2014;14:4.

Shang Y, Chen P, Chen Y, Lu Y, Wang C. MrSkn7 controls sporulation, cell wall integrity, autolysis, and virulence in *Metarhizium robertsii*. *Eukaryot Cell*. 2015;14(4):396-405.

Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem*. 2012;287:14270–9.

Shaw DK, Wang X, Brown LJ, Chávez AS, Reif KE, Smith AA, Scott AJ, McClure EE, Boradia VM, Hammond HL, Sundberg EJ, Snyder GA, Liu L, DePonte K, Villar M, Ueti MW, de la Fuente J, Ernst RK, Pal U, Fikrig E, Pedra JH. Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nat Commun*. 2017;8:14401.

Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*. 2018;9(1):1625-1639.

Shimshoni JA, Erster O, Rot A, Cuneah O, Soback S, Shkap V. Cuticular fatty acid profile analysis of three *Rhipicephalus* tick species (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2013; 61(4):481-9.

Shin TY, Lee MR, Park SE, Lee SJ, Kim WJ, Kim JS. Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2020;105(4):e21747.

Silva FD, Rezende CA, Rossi DC, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, Gueiros-Filho F, Campos CB, Pires JR, Daffre S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34735-46.

Silva SB, Savastano G, Bittencourt V.R.E.P. Cellular types involved in the immune response of engorged females of *Boophilus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium* sp. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2006;15:128-131.

Skinner M, Parker BL, Kim JS. Role of entomopathogenic fungi. In: Abrol, D. P. (Ed.), *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, 2014;169–191.

Smith RJ, Grula EA. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol*. 1982;39(1):15-22.

Soesanto L, Prastyani N, Sri Utami D, Manan A. Application of raw secondary metabolites from four entomopathogenic fungi against Chilli disease caused by viruses. *J HPT Tropika*; 2020;20(2):100-107.

Sonderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:23-8.

Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:390.

Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci*. 2008;13:7046–63.

Sosa-Gomez DR, Boucias DG, Nation JL. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J Invertebr Pathol.* 1997;69(1):31-39.

St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys.* 1994;313(1):1-7.

St. Leger RJ, Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.85, p.901-907, 2010.

Sullivan CF, Parker BL, Skinner M. A Review of Commercial *Metarhizium*- and *Beauveria*-Based Biopesticides for the Biological Control of Ticks in the USA. *Insects.* 2022;13:260.

Szczepańska A, Kiewra D, Plewa-Tutaj K, Dyczko D, Guz-Regner K. Sensitivity of *Ixodes ricinus* (L., 1758) and *Dermacentor reticulatus* (Fabr., 1794) ticks to entomopathogenic fungi isolates: preliminary study. *Parasitol Res.* 2020;119(11):3857-3861.

Tanada Y, Kaya HK. *Insect pathology.* Academic Press. 2012.

Taylor D. Innate Immunity in Ticks: A review. *J Acarol Soc Jpn.* 2006;15(2):109-127.

Tonk M, Cabezas-Cruz A, Valdés JJ, Rego ROM, Chrudimská T, Strnad M, Šíma R, Bell-Sakyi L, Franta Z, Vilcinskas A, Grubhoffer L, Rahnamaeian M. Defensins from the tick *Ixodes scapularis* are effective against phytopathogenic fungi and the human bacterial pathogen *Listeria grayi*. *Parasit Vectors.* 2014;7:554.

Urbanová V, Šíma R, Šauman I, Hajdušek O, Kopáček P. Thioester-containing proteins of the tick *Ixodes ricinus*: gene expression, response to microbial challenge and their role in phagocytosis of the yeast *Candida albicans*. *Dev Comp Immunol.* 2015;48(1):55-64.

Urbanová V, Hajdušek O, Mondekova HH, Šíma R, Kopaček P. Tick thioester-containing proteins and phagocytosis do not affect transmission of *Borrelia afzelii* from the competent Vector *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:73, 2017.

Urbanová V, Hartmann D, Grunclová L, Šíma R, Flemming T, Hajdušek O. IrFC – An *Ixodes ricinus* injury-responsive molecule related to Limulus Factor C. *Dev Comp Immunol.* 2014;46:439-447.

Valanne S, Wang JH, Rämetsä M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol.* 2011;186(2):649-56.

Valdés JJ, Moal IH. Prediction of Kunitz ion channel effectors and protease inhibitors from the *Ixodes ricinus* sialome. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(6):947-50.

- Valero-Jiménez CA, Faino L, Veld D, Smit S, Zwaan BJ, Van Kan JAL. Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: Uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC Genom.* 2016b;17(1): 986.
- Valero-Jiménez CA, Wieggers H, Zwaan BJ, Koenraadt CJ, van Kan JA. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol.* 2016a;133:41-49.
- Vemmer M, Patel AV. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol Control*, 2013, 67, 380-389.
- Vidhate, R.P., Dawkar, V.V., Punekar, S.A., Giri, A.P. Genomic determinants of entomopathogenic fungi and their involvement in pathogenesis. *Microb Ecol.* 2023;85: 49–60.
- Vincent JF, Wegst UG. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct Dev.* 2004;33(3):187-99.
- Vyas N, Dua KK, Prakash S. Larvicidal activity of metabolites of *Metarhizium anisopliae* against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2015;4(4):1–3.
- Wang B, Kang Q, Lua Y, Bai L, Wang C. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(4):1287-1292.
- Wang C, Duan Z, St Leger RJ. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell.* 2008;7(2):302-9.
- Wang C, St Leger RJ. The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *J Biol Chem.* 2007b;282(29):21110-5.
- Wang JB, St Leger RJ, Wang C. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. *Adv Genet.* 2016;94:67-105.
- Wang C, St. Leger RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol.* 2005, 42(8):704-18.
- Wang C, St. Leger RJ. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell.* 2007a;6: 808–816.
- Waring AL, Hill J, Allen BM, Bretz NM, Le N, Kr P, Fuss D, Mortimer NT. Meta-Analysis of Immune Induced Gene Expression Changes in Diverse *Drosophila melanogaster* Innate Immune Responses. *Insects.* 2022, 13, 490.

Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, Beys-da-Silva WO, Martins JR, Schrank A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol.* 2015;207(3-4):302-8.

Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins (Basel).* 2018;10(11):461.

Wu J, Zhou X, Chen Q, Chen Z, Zhang J, Yang L, Sun Y, Wang G, Dai J, Feng T. Defensins as a promising class of tick antimicrobial peptides: a scoping review. *Infect Dis Poverty.* 2022;11,71.

Wyatt TD. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol.* 2010;196(10):685–700.

Xia X, You M, Rao XJ, Yu XQ. Insect C-type lectins in innate immunity. *Dev Comp Immunol.* 2018;83:70-79.

Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Feng MG. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep.* 2012;2:483.

Xu Y, Luo F, Li B, Shang Y, Wang C. Metabolic conservation and diversification of *Metarhizium* species correlate with fungal host-specificity. *Front Microbiol.* 2016;16(7):2020.

Xu Y, Orozco R, Wijeratne EMK, Gunatilaka AAL, Stock SP, Molnar I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem Biol.* 2008;15:898-907.

Xu Y, Orozco R, Wijeratne EMK., Espinosa-Artiles P, Gunatilaka AAL, Stock S., Molnar I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet Biol.* 2009;46:353-364.

Yang YT, Lee SJ, Nai YS, Kim JS. Complete genome sequence of a novel putative RNA virus, RiPV-2, from the bean bug *Riptortus pedestris*. *Microbiol. Resour. Announc.* 2020;9(21):e01584-19.

Yang YT, Lee SJ, Nai YS, Kim S, Kim JS. Up-regulation of carbon metabolism-related glyoxylate cycle and toxin production in *Beauveria bassiana* JEF-007 during infection of bean bug *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Fungal Biology.* 2016;120(10), 1236–1248.

Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathog.* 2012;8(11):e1003029.

Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(13):5807-22.

Zeina GW, Ahmed M, Saeed M, Ziena L, Laing M. Field evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for the biocontrol of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) ticks on cattle. *Exp Parasitol*. 2022;235:108215.

Zhang L, Fasoyin OE, Molnár I, Xu Y. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Novel bioactive compounds. *Nat Prod Rep*. 2020a;37:1181-1206.

Zhang L, Yue Q, Wang C, Xu Y, Molnár I. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Genomics as a tool to elucidate the encoded parvome. *Nat Prod Rep*. 2020b;37:1164–1180.

Zhang L, Fasoyin OE, Molnár I, Xu Y. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Novel bioactive compounds. *Nat. Prod. Rep*. 2020c 37(9), 1181-1206.

Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol*. 2007a;17(6):553-596.

Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol*. 2007b;17(9), 879-920.

