

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Luccas Gabriel Ferreira Malta

***Clogmia albipunctata*: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa**

BELO HORIZONTE – MG
2021

Luccas Gabriel Ferreira Malta

***Clogmia albipunctata*: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant’anna

BELO HORIZONTE – MG

2021

043

Malta, Luccas Gabriel Ferreira.

Clogmia albipunctata: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa
[manuscrito] / Luccas Gabriel Ferreira Malta. - 2021.

153 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo. Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'anna.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Insetos. 3. Psychodidae. 4. Fenômenos Fisiológicos do Sistema Digestório. 5. Adaptação Biológica. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Sant'anna, Maurício Roberto Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luccas Gabriel Ferreira Malta419/2021/02
entrada
1º/2019
2019654134

Às quatorze horas do dia 16 de abril do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/fep-arxq-nso>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “*Clogmia albipunctata*: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa” área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo** após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo	UFMG	Aprovado
Dr. Renato Santana de Aguiar	UFMG	Aprovado
Dr. Thiago de Castro Gomes	UFMG	Aprovado
Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Algumas sugestões foram passadas ao mestrando durante a arguição

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado. O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de abril de 2021.

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo
(Orientador)

Dr. Renato Santana de Aguiar

Dr. Thiago de Castro Gomes

Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna
(Coorientador)

A todos aqueles que nos seus mais singelos sonhos, nas suas mais simples vontades, nas mais verdadeiras atitudes, quiseram trazer luz ao mundo na forma de conhecimento. Ensinar é amar, é cativar, é inspirar, é fazer sonhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **Deus**, por tudo o que sou e tudo o que tenho, por ser meu guia e fortaleza

Aos meus pais, **Silvio e Isabel**, meus pilares e heróis, por nunca medirem esforços para que eu chegasse onde hoje estou; por todos os ensinamentos; por todos os valores transmitidos; por sempre apoiarem e acreditarem nos meus sonhos; por terem feito de mim o que sou hoje. Sem vocês, eu nada seria. Vocês são minha base, meu sustento e minha vida.

À **minha família**, tios (as) e primos (as), que mesmo com a distância sempre encontraram uma forma de se mostrarem presentes. Em especial ao primo **Alysson Malta**, que com sua alegria, espontaneidade e irreverência, fez com que dias de insegurança e o fardo do incerto não me subjugassem, meu muito obrigado!

À minha namorada, **Miriam Alves**, pelo amor, amizade, apoio e companheirismo. Sem dúvida alguma sua presença fez com que minhas energias fossem renovadas e eu ganhasse ar e fôlego para chegar ao fim dessa etapa de minha vida. Muito obrigado por não medir esforços para estar sempre comigo, te amo!

Ao meu orientador, professor **Nelder Gontijo**, não me canso de lembrar a primeira aula em que tivemos contato, ainda em minha graduação, daquele dia tenho comigo um ensinamento: “Tem um sonho? Lute por ele, corra atrás dele”. O senhor abriu as portas do seu laboratório para um aluno inexperiente e perdido em um mundo completamente novo, e com todo cuidado e atenção, me guiou pelo caminho da ciência, fazendo com que eu me apaixonasse cada vez mais pela arte de pesquisar e ensinar. Obrigado pela confiança e por todos os ensinamentos. Professor é quem demonstra tamanha paixão pelo que faz, que cativa todos aqueles ao seu redor, o que o senhor faz de maneira excepcional.

A **Monique Neves**, embora não tenhamos convivido durante o mestrado, ainda em minha iniciação científica, foi quem me deu o alicerce da pesquisa. Sem muitos de seus ensinamentos, não estaria onde estou. Com todo seu carinho, atenção e amizade tornou tudo mais fácil e leve.

A **César Nonato**, técnico do LFIH, que ao longo de sete anos sempre se mostrou um verdadeiro amigo e companheiro. As longas conversas no insetário tornaram os dias mais

tranquilos e mais leves. Sem dúvida alguma, foi uma das pessoas que mais contribuiu para meu crescimento pessoal. Ave César, resiliência sempre e meu muito obrigado!

A toda equipe do **Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – LFIH**. Nessa equipe encontrei uma família, encontrei uma casa, encontrei um porto seguro em meio ao mar agitado de incertezas e inseguranças de uma pessoa que saiu de casa aos dezessete anos para viver um mundo completamente novo. Aqui aprendi que o importante é o que importa, o resto é secundário; aprendi também que é vivendo que se vivencia a vida. Pois bem, vivi a vida e partilhei da vivência de pessoas incríveis, as quais, nas suas mais simples singularidades, deixaram marcas que levarei pra sempre comigo. Em especial agradeço aos alunos **Daniel Queiroz, Luisa Lara e Rodolfo César**, a amizade e companheirismo de vocês foi de extrema importância, das brincadeiras as discussões de artigos, passando pelo café da tarde e chegando no sanduíche ao final do trabalho, com vocês dissecar mil flebs ou mosquitos era moleza.

A **turma de mestrado 2019**, que durante quase um ano inteiro se tornou minha família. Encarar quase doze horas de aula por dia só é possível se estamos perto de pessoas que nos fazem bem e que, nas mais simples palavras e atitudes, fazem o dia valer a pena. Tenho orgulho de ter feito parte dessa turma!!!

As secretárias do PPG-Parasitologia, **Sibele e Sumara**, o carinho, atenção e cuidado de vocês torna tudo mais fácil. Em um lugar em que a maior parte das pessoas estão longe de casa e longe dos familiares, pessoas como vocês fazem com que tenhamos um pouco do cuidado e carinho de grandes mães.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**, pela oportunidade e apoio durante o curso de mestrado.

Às agências de fomento **CNPq, FAPEMIG e CAPES**, as quais garantiram o suporte financeiro para o desenvolvimento desta dissertação.

A todos que de alguma maneira, nas mais simples palavras, nos mais singelos gestos, fizeram com que eu me tornasse o que sou e chegasse onde estou. Como disse Guimarães Rosa: “Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”.

Muito obrigado!

*“Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais.
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!
O correr da vida embrulha tudo, a vida é
assim: Esquenta e esfria, aperta e daí
afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que
ela quer da gente é coragem.”*

(ROSA, Guimarães)

RESUMO

Clogmia albipunctata é um inseto pertencente à ordem Diptera e à família Psychodidae, que possui ciclo de vida holometábolo com larvas vivendo em ambientes semiaquáticos. Apesar de não serem hematófagos, alguns estudos atribuem a esses insetos o papel de vetores mecânicos, fato que se torna preocupante dado seu alto grau de sinantropia. Na subordem “Nematocera” se observam múltiplos eventos independentes de surgimento do processo de hematofagia, fato que desperta curiosidade sobre quais seriam as características que favoreceram seu aparecimento. Uma adaptação evolutiva é vista sob duas perspectivas: a primeira diz respeito a uma característica moldada pela seleção natural para sua atual função; a segunda diz respeito a uma característica que vem agregar valor adaptativo em determinada função, não necessariamente tendo relação com as pressões evolutivas a partir das quais ela foi selecionada. Esta segunda perspectiva é o que se conhece por exaptação. É sabido que insetos hematófagos controlam de maneira eficiente sua fisiologia intestinal, fato relacionado com sua capacidade de digestão de sangue. Além disso, certas características morfológicas são de extrema valia durante o processo de alimentação, como a forma do intestino. Uma vez que *C. albipunctata* pertence à mesma família de insetos hematófagos vetores de espécies de *Leishmania* conhecidos como flebotomíneos, e por não realizarem hematofagia, tais insetos mostram-se um excelente modelo para o estudo de exaptações fisiológicas e morfológicas relacionadas com a hematofagia. Com isso, o presente projeto tem por objetivo determinar e analisar aspectos da fisiologia intestinal de *C. albipunctata* que se relacionem com aqueles já descritos para outros insetos “Nematocera” hematófagos, realizando desde análises fisiológicas como comparações morfológicas, apontando para características de cunho exaptativo. Análises de diferenças morfológicas do tubo digestivo foram realizadas entre machos e fêmeas de *C. albipunctata*, bem como entre estes e indivíduos de espécies diferentes que são hematófagos, tais como *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. A fim de determinarmos o pH intestinal do inseto em diferentes condições de alimentação, fizemos uso de corantes indicadores de pH (Azul de Bromotimol e Púrpura de Bromocresol). Para estudo da produção de tripsina após ingestão de proteínas, foram realizados ensaios de cinética enzimática com o substrato sintético BApNA. Para o estudo da atividade da enzima catalase foi utilizado H₂O₂ como substrato. A fim de verificar a capacidade do extrato bruto de intestino de *C. albipunctata* de inibir a cascata do complemento humano, foram realizados ensaios para inibição da via clássica do sistema complemento humano. Para estudo da atividade de α -glicosidase, foram realizados ensaios enzimáticos utilizando o substrato p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo. Finalmente, foram também selecionadas proteínas sabidamente relacionadas com o sucesso da hematofagia em outros dípteros “Nematocera”, a partir das quais foi realizada análise do genoma de *C. albipunctata*, passando por análises de ortologia. Nossos resultados mostraram que não há diferença entre o intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, porém o intestino médio de machos das espécies hematófagas analisadas, mostraram-se morfológicamente diferentes do intestino das fêmeas. Em condições normais, tanto machos quanto fêmeas, de *C. albipunctata* apresentaram pH intestinal ácido (pH = ~6,0), condição semelhante ao

encontrado para flebotomíneos e outros insetos hematófagos da subordem “Nematocera”. Quando submetidos à alimentação proteica, observamos alcalinização da região do intestino médio desses insetos, com alcalinização mais evidente e mais pronunciada entre as fêmeas. Além disso, fêmeas de *C. albipunctata* mostraram-se responsivas aos hormônios alcalinizantes presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *L. longipalpis*. Não existe diferença na atividade de tripsina entre machos e fêmeas de *C. albipunctata*, com a menor atividade sendo encontrada nos insetos alimentados com soro humano inativado. A atividade de catalase encontrada em machos de duas espécies hematófagas se assemelha a atividade encontrada para machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Somente *L. longipalpis* apresentou diferença entre a atividade de α -glicosidase no intestino de machos e fêmeas. Para todas as espécies analisadas, observa-se regionalização enzimática de α -glicosidase, sendo a maior atividade encontrada na porção anterior do intestino médio. A tripsina de *C. albipunctata* apresenta homologia com a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis*. A enzima catalase está presente em um gene de cópia única no genoma de *C. albipunctata*. Não foram identificados genes correspondentes a enzima 4-HPPD no genoma de *C. albipunctata*. Nossos resultados confirmam a hipótese inicial de que algumas adaptações relacionadas à hematofagia já se encontram presentes em organismos não hematófagos, o que dá suporte a nossa ideia de que a maior parte das adaptações ao processo de hematofagia, tratam-se na verdade de exaptações, ou seja, modificações evolutivas que não necessariamente alteram a função de determinado caráter. Em conjunto, esse pensamento pode explicar pelo menos em parte os múltiplos eventos independentes de surgimento da hematofagia dentro dos dípteros “Nematocera”.

Palavras-chave: *Clogmia albipunctata*; Hematofagia; Fisiologia intestinal; Exaptação

ABSTRACT

Clogmia albipunctata is an insect belonging to the order Diptera, family *Psychodidae*, which has a holometabolous life cycle with immature stages living in semi-aquatic environments. Although this species is not hematophagous, previous studies have shown that this insect can mechanically transmit pathogens, which is an important feature considering its high synanthropy. The suborder Nematocera is a paraphyletic group, encompassing insects that share morphological and physiological features, including dipterans with medical and veterinary importance, allowing phylogenetic analysis among them. As hematophagy emerged several times within the Nematocera group, this instigated studies to understand basic features or adaptations to its development. An evolutive adaptation can be analyzed under two perspectives: the first one concerns about one features shaped by natural selection for your current function. The second concerns about one feature that gives adaptive value to one characteristic, which is not necessarily related to the evolutionary pressures which selected this attribute. This second is known by exaptation. Hematophagous insects have a tight gut physiology control through intestinal pH control and gut enzyme production. Some morphological features are extremely important for the feeding of these insects, such as gut shape and the mouthparts. As *C. albipunctata* belongs to the *Psychodidae* family (same family as sandflies, vectors of *Leishmania* species), these insects are excellent models for physiological and morphological studies about adaptations and exaptations to hematophagy. The aim of this work is to study aspects of *C. albipunctata* intestinal physiology in comparison to previous studies done with other nematoceran Diptera, through physiological and morphological comparisons, showing exaptative features. Midgut morphological analyses between male and female *C. albipunctata* and *L. longipalpis*, *A. aegypti* and *Culex quinquefasciatus* was performed by dissection and visual comparison under optic microscopy. In order to determine the gut pH of *C. albipunctata* maintained in different dietary conditions, we used the vital pH indicators dye Bromothymol Blue and Bromocresol Purple. To study trypsin production after protein ingestion, we performed kinetic assays using the BApNA substrate. To study catalase enzymatic activity we performed a kinetic assay using H₂O₂ as substrate. To study α -glucosidase activity in the male and female midgut of *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*, we used p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside as substrate. To test the capacity of *C. albipunctata* gut contents to inhibit the human complement, we performed classic pathway inhibitory assays. We selected proteins that are widely related to hematophagy, from which we performed gene orthology analyzes using the *C. albipunctata* genome . Our results showed that there is no morphological difference between male and female *C. albipunctata* midguts, despite the midguts of males and females of some hematophagous species show morphological differences. There is no difference between trypsin activity in midguts of male and female *C. albipunctata* , the lowest activity found in the midgut of insects that fed on human inactivated serum. The catalase activity found in males of two hematophagous species is similar to the activity found in male and female *C. albipunctata*. Among all insects analysed, only *L. longipalpis* showed a difference between male and female α -glucosidase

midgut activity. For all species analyzed, we observed α -glycosidase enzymatic regionalization, with the greatest activity found in the anterior portion of the midgut. In normal conditions, male and female *C. albipunctata* exhibit acidic intestinal pH (pH = ~ 6), same condition observed for sandflies and other hematophagous insects. When fed with a protein-rich solution, we observed midgut alkalinisation, with more evident alkalinisation for females. Females of *C. albipunctata* was responsive to hemolymph of engorged female *L. longipalpis*. The trypsin gene obtained from *C. albipunctata* whole genome shows homology with the trypsin type 2 from *L. longipalpis*. The catalase enzyme is present as a single copy gene in the *C. albipunctata* genome. No genes corresponding to the 4-HPPD enzyme were identified in the *C. albipunctata* genome. Our results confirm the initial hypothesis that some adaptations related to hematophagy are already present in non-hematophagous organisms, which supports our idea that most adaptations to the hematophagy process are exaptations, which represent evolutionary changes that do not necessarily change the function of a given character. This concept explains, at least in part, the multiple independent events related to hematophagy in “Nematocera” throughout the evolution process.

Key-words: *Clogmia albipunctata*; hematophagy; Intestinal physiology; exaptation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Adultos de *Clogmia albipunctata*.** Vista dorsal em **A**; vista frontal em **B**. Foto por: Salvador Vitanza, 2019. Disponível em <https://bugguide.net>..... 26
- Figura 2: Ciclo biológico de *Clogmia albipunctata*.** Ciclo biológico de *C. albipunctata* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Adaptado de Jiménez-Guri et al., 2014. 27
- Figura 3: Ciclo biológico de *Lutzomyia longipalpis*.** Ciclo biológico de *L. longipalpis* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. (Fotos por Nelder Gontijo)..... 29
- Figura 4: Distribuição espacial de duas espécies de flebotomíneos no território brasileiro: *Lutzomyia longipalpis* (em vermelho) e *Lutzomyia cruzi* (em azul).** Destaca-se também regiões de co-ocorrência das duas espécies (em verde). Em cinza vemos a distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral. Adaptado de Andrade-Filho et al., 2017. 30
- Figura 5: Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.** Ciclo biológico de *A. aegypti* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>..... 31
- Figura 6: Distribuição mundial de *Aedes aegypti*.** Probabilidade de ocorrência do inseto, variando de total presença (em vermelho) ou total ausência (em azul). Adaptado de Kraemer et al., 2015. 32
- Figura 7: Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus*.** Ciclo biológico de *C. quinquefasciatus* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki>. Autor(a): Mariana Ruiz Villarreal. 34
- Figura 8: Distribuição mundial de *Culex quinquefasciatus*.** Probabilidade de ocorrência do inseto, variando de total presença (em vermelho) ou total ausência (em azul). Adaptado de Alaniz et al., 2019..... 35

- Figura 9: Filogenia de Diptera.** Filogenia molecular combinada dos Diptera. Dados obtidos a partir de genes codificantes para proteínas nucleares, DNA ribossomal 18S e 25S. Destaque para as famílias e infraordens pertencentes aos “Nematocera”. Adaptado de Wiegmann et al., 2011. 36
- Figura 10: Características morfológicas compartilhadas entre alguns membros de “Nematocera”.** Em **A** fêmea de *Phlebotomus* sp., destaque para o corpo delgado do inseto. Em **B** larva de Culicinae, destaque para o tipo larvar (eucéfala) e para as peças bucais bem expostas. Em **C** cabeça de *Psychoda alternicula*, destaque para a antena multissegmentada. Adaptado de Andreadis, 2005; Bogitsh, Burton J.; Carter, Clint E.; Oeltmann, 2018; Ibáñez-Bernal, 2008..... 37
- Figura 11. Cenário evolutivo para o surgimento do voo.** As penas foram selecionadas a princípio como uma adaptação a incidência de raios solares, funcionando como isolantes térmicos. Organismos que apresentavam tal proteção encontravam-se mais adaptados a uma exposição prolongada ao sol. Posteriormente, sob diferentes pressões, as penas tiveram sua função inicial deslocada, passando a atuar como adaptação ao voo. Adaptado de Kurochkin & Bogdanovich, 2008..... 43
- Figura 12. Esquema da digestão de sangue entre os insetos hematófagos.** Em **1**, digestão dos eritrócitos pelas proteases e liberação de hemoglobina no lúmen intestinal (ressalta-se a participação de hemolisinas não proteolíticas, as quais não são apontadas no esquema). Em **2**, digestão extracelular de hemoglobina ainda no lúmen intestinal. Em **3**, internalização de aminoácidos e alguns di/tri-peptídeos. Em **4**, processo de detoxificação a partir da eliminação de grupamentos heme. Adaptado de Santiago et al., 2017..... 45
- Figura 13. Esquema das estratégias de defesa contra o estresse oxidativo no intestino médio de artrópodes hematófagos.** Destaque para ação das enzimas antioxidantes, em especial a catalase. Hb - hemoglobina; ROS – espécies reativas de oxigênio; $O_2^{\cdot -}$ - ânion superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; SOD – superóxido dismutase; TrxR— tioredoxina redutase; TrxPx— tioredoxina peroxidase; Trx red— tioredoxina reduzida; Trx ox— tioredoxina oxidada; GSH—glutationa reduzida; GSSG—glutationa oxidada; LMW— baixo peso molecular. Adaptado de Graça-Souza et al., 2006. 46

- Figura 14. Reações de digestão de açúcares em insetos.** Observa-se o sítio de clivagem de três importantes carboidrases. Destaque para o sítio de clivagem da α -glicosidase, no centro da imagem. Adaptado de Walter R. Terra & Ferreira, 2012..... 48
- Figura 15. Vias metabólicas da tirosina.** Destaque para a via de atuação da 4-HPPD. PAH, fenilalanina hidroxilase; TAT, tirosina aminotransferase; HPPD, 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase; HgD, homogentisato 1,2-dioxigenase; MAAI, maleilacetoacetato isomerase; FAH, fumarilacetoacetase; TH, tirosina hidroxilase; DDC, L-DOPA descarboxilase/descarboxilase L-aminoácido aromático; PO, fenoloxidase; DCT, dopacromo taltomerase; DCE, enzima de conversão de dopacromo; TbH, tiramina b-hidroxilase; 4-HPPA, ácido 4-hidroxifenilpiruvídico; L-DOPA, L-3,4-dihidroxifenilalanina; DHI, 5,6-dihidroxiindol; DHICA, ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico. Adaptado de Sterkel et al., 2016..... 50
- Figura 16. Cascata de ativação do Sistema Complemento.** Três vias de ativação do Sistema Complemento Humano. Resumidamente temos: via clássica do complemento, que possui ativação dependente de complexo antígeno-anticorpo; via alternativa é ativada a partir da hidrólise espontânea de C3; e via das lectinas que é ativada a partir do reconhecimento de carboidratos complexos por proteínas MBL (do inglês “mannose binding lectin”). Adaptado de Mathern & Heeger, 2015. 53
- Figura 17 – Padrão de cores para os corantes Azul de Bromotimol e Púrpura de Bromocresol em diferentes valores de pH.** Em A, soluções tamponadas padrão de Azul de Bromotimol (0,1%) com valores de pH de 6 – 8. Em B, soluções tamponadas padrão de Púrpura de Bromocresol (0,1%) com valores de pH de 5 – 7. Em C, soluções padrão do corante Azul de Bromotimol (0,1%) em soro humano, valores de pH de 6 – 8..... 58
- Figura 18. Intestino médio de fêmeas de *Clogmia albipunctata*.** À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de *Clogmia albipunctata*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio. 67
- Figura 19. Intestino médio de machos de *Clogmia albipunctata*.** À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de *Clogmia albipunctata*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio. 67

Figura 20. Intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>. À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> ; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.	68
Figura 21. Intestino médio de machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>. À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> ; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.	68
Figura 22. Intestino médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>. À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> ; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.....	69
Figura 23. Intestino médio de machos de <i>Aedes aegypti</i>. À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de <i>Aedes aegypti</i> ; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.....	69
Figura 24. Intestino médio de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>. Esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.	70
Figura 25. Intestino médio de machos de <i>Culex quinquefasciatus</i>. Esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.	70
Figura 26. Intestino médio de machos de <i>Culex quinquefasciatus</i>. Esquema ilustrativo mostrando o formato do intestino médio.	71
Figura 27. pH intestinal de fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i>. Número de observações por faixa de pH. Em A insetos alimentados com o corante Azul de Bromotimol [0,1%] em sacarose 30%; em B insetos alimentados com o corante Púrpura de Bromocresol [0,1%] em sacarose 30%. pH referente a região do intestino médio dos insetos.....	72
Figura 28. pH intestinal de machos de <i>Clogmia albipunctata</i>. Número de observações por faixa de pH. Em A insetos alimentados com o corante Azul de Bromotimol [0,1%] em sacarose 30%; em B insetos alimentados com o corante Púrpura de Bromocresol [0,1%] em sacarose 30%. pH referente a região do intestino médio dos insetos.....	73
Figura 29. pH intestinal de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> quando alimentados com solução de sacarose 30% tamponada com HEPES [30 mM] acrescida do corante indicador Azul de Bromotimol [0,1%]. Número de observações por faixa de	

pH. Em **A** fêmeas de *C. albipunctata*; em **B** machos de *C. albipunctata*. pH referente a região do intestino médio dos insetos. O pH final da solução foi ajustado para 7,5 antes de ser oferecido aos insetos..... 74

Figura 30. Alcalinização do intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* após alimentação com soro humano inativado (SHI). Em **A**, determinação do pH intestinal de fêmeas após ingestão de solução de sacarose 30% contendo Azul de Bromotimol (0,1%) ou após ingestão de soro humano inativado contendo Azul de Bromotimol (0,1%) com pH final ajustado para 6. Em **B**, resultados obtidos a partir do intestino de machos alimentados com as mesmas soluções descritas para as fêmeas. Foi utilizado o teste de Fisher para analisar as diferenças de proporção entre cada tratamento (** $p < 0.001$; * $p < 0.013$). 75

Figura 31. Efeito da aplicação da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue no pH intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Em **A**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de fêmeas de *C. albipunctata* ($P = 0.0003$). Em **B**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de machos de *C. albipunctata* ($P = 1$). As **barras pretas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH antes da aplicação de hemolinfa; as **barras brancas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH após a aplicação da hemolinfa. O número de observações em cada intervalo de pH (N) foi comparado com seu controle utilizando teste de Fisher. 76

Figura 32. Efeito da aplicação da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não-alimentadas com sangue no pH intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Em **A**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de fêmeas de *C. albipunctata*. Em **B**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de machos de *C. albipunctata*. As **barras pretas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH antes da aplicação de hemolinfa; as **barras brancas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH após a aplicação da hemolinfa. O número de observações em cada intervalo de pH (N) foi comparado com seu controle utilizando teste de Fisher. 77

Figura 33. Atividade de tripsina no intestino de *Clogmia albipunctata*. Atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* submetidos a

diferentes dietas alimentares. Em azul, insetos mantidos em jejum; em vermelho, insetos alimentados com sacarose 30%, em verde insetos alimentados com soro humano inativado (SHI). Os insetos foram submetidos aos tratamentos por um mesmo período de tempo, 24h. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA)..... 79

Figura 34. Atividade de tripsina no intestino de *Lutzomyia longipalpis*. Atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis* submetidos a diferentes dietas alimentares. Em azul, insetos machos submetidos ao jejum (à esquerda) ou a alimentação com sacarose 30% (à direita); em vermelho, insetos fêmeas submetidos ao jejum (à esquerda) ou a alimentação com sacarose 30% (à direita). Os insetos foram submetidos aos tratamentos por um mesmo período de tempo, 24h. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA)..... 80

Figura 35. Atividade de catalase no intestino médio. Atividade de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *C. quinquefasciatus* (duas populações: laboratório e campo). Em azul, insetos machos; em vermelho, insetos fêmeas. A população de campo é identificada pela letra B. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA)..... 82

Figura 36. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*. 83

Figura 37. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. *** $p < 0,0001$ (teste t). 84

Figura 38. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*...... 85

Figura 39. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Culex quinquefasciatus*...... 85

Figura 40. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos de diferentes espécies. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino de machos de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. * $p < 0,05$ (teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). 86

Figura 41. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de diferentes espécies. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino de fêmeas

de <i>Clogmia albipunctata</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> . * $p < 0,05$ (teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).	87
Figura 42. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de <i>Clogmia albipunctata</i>. ** $p < 0,001$ (teste t).	88
Figura 43. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i>. ** $p < 0,001$ (teste t).	88
Figura 44. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>. **** $p < 0,0001$ (teste t).	89
Figura 45. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>. **** $p < 0,0001$ (teste t).	89
Figura 46. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de <i>Aedes aegypti</i>. *** $p = 0,0008$ (teste t).	90
Figura 47. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>. *** $p = 0,0001$ (teste t).	90
Figura 48. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de <i>Culex quinquefasciatus</i>. *** $p = 0,0001$ (teste t).	91
Figura 49. Atividade de α-glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>. *** $p = 0,002$ (teste t).	91
Figura 50. Inibição da via clássica do sistema complemento por conteúdo intestinal de <i>Clogmia albipunctata</i>. Em preto, grupo controle (C+); em azul, conteúdo intestinal de machos; em vermelho, conteúdo intestinal de fêmeas.	92
Figura 51. Filogenia das tripsinas (1). Árvore filogenética dos genes de tripsina de algumas espécies de Diptera. Destaque para: retângulo bege , que identifica o grupo externo da árvore; retângulo vermelho , que identifica o grupo Muscomorpha; retângulo verde , que identifica do grupo dos Psychodomorpha; seta vermelha , indica a tripsina do tipo 2 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lulo Tryp2); seta azul , indica a tripsina do tipo 1 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lulo Tryp1); seta amarela , indica o agrupamento das tripsinas de <i>Clogmia albipunctata</i> . Calb, <i>Clogmia albipunctata</i> ; Lulo, <i>Lutzomyia longipalpis</i> ; Dmel, <i>Drosophila melanogaster</i> ; Dhyd, <i>Drosophila hydei</i> ; Gmor, <i>Glossina</i>	

morsitans; Mdom, *Musca domestica*; Ppap, *Phlebotomus papatasi*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa)..... 94

Figura 52. Filogenia das tripsinas (2). Árvore filogenética dos genes de tripsina de algumas espécies de Diptera. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica os grupos externos da árvore (superior referente às quimotripsinas / inferior referente a quitina sintase; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo Muscomorpha; **retângulo verde**, que identifica do grupo dos Psychodomorpha; **seta vermelha**, indica a tripsina do tipo 2 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp2); **seta azul**, indica a tripsina do tipo 1 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp1); **seta amarela**, indica o agrupamento das tripsinas de *Clogmia albipunctata*. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Dmel, *Drosophila melanogaster*; Dhyd, *Drosophila hydei*; Gmor, *Glossina morsitans*; Mdom, *Musca domestica*; Ppap, *Phlebotomus papatasi*; Isca, *Ixodes scapularis*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa)..... 95

Figura 53. Filogenia da catalase. Árvore filogenética dos genes de catalase de algumas espécies de Diptera. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica o grupo externo da árvore; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo do Culicomorpha; **retângulo verde**, que identifica do grupo dos Psychodomorpha; **retângulo azul**, que identifica o grupo dos Muscomorpha. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Agam, *Anopheles gambiae*; Aaeg, *Aedes aegypti*; Pper, *Phlebotomus perniciosus*; Mdom, *Musca domestica*; Scal, *Stomoxys calcitrans*; Dmel, *Drosophila melanogaster*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa). 96

Figura 54. Filogenia da 4-HPPD. Árvore filogenética dos genes de 4-HPPD de algumas espécies de Diptera e de *Rhodnius prolixus*. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica o grupo externo da árvore; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo do Culicomorpha; **retângulo azul**, que identifica o grupo dos Muscomorpha; **seta amarela**, que identifica a sequência de *Phlebotomus papatasi*; **seta vermelha**, que identifica as sequências de *C. albipunctata* e *L. longipalpis*. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Adar, *Anopheles darlingi*; Aaeg, *Aedes aegypti*; Ppap,

Phlebotomus papatasi; Mdom, *Musca domestica*; Scal, *Stomoxys calcitrans*; Rpro, *Rhodnius prolixus*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa). 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Classificação dos tipos de hematofagia.* 40

Tabela 2. *Classificação das características adaptativas.* 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA - N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

cm – centímetro

CO₂ – gás carbônico

DUOX – “*dual oxidases*”

h – horas

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

mg – miligramas

min - minutos

mL – mililitros

mm - milímetros

mM - milimolar

nm – nanômetro

O₂ – oxigênio gasoso

O₃[·] - superóxido

OH[·] - hidroxila

pH - potencial hidrogeniônico

pKa – potencial de dissociação ácida

ROS – espécies reativas de oxigênio

SHI – soro humano inativado

TRIS –2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

U – unidade de atividade enzimática

µg - micrograma

µL - microlitro

µM – micromolar

µmol – micromol(es)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1 <i>Clogmia albipunctata</i>	26
1.2 Insetos Hematófagos: <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	29
1.3 “Nematocera”	35
1.3 Hematofagia	38
1.4 Exaptação.....	41
1.5 Proteínas com provável ter caráter exaptativo.....	43
1.5.1 Tripsinas.....	43
1.5.2 Catalase	45
1.5.3 α -Glicosidasas	47
1.5.4 4-HPPD.....	48
1.6 pH intestinal.....	50
1.7 Sistema Complemento	51
2. JUSTIFICATIVA.....	54
3. OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos Específicos	56
4. METODOLOGIA	57
4.1 Material Biológico.....	57
4.2 Determinação do pH intestinal de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> ..	57
4.3 Análise da atividade de manutenção do pH intestinal em machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i>	58
4.4 Determinação do pH intestinal de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> alimentados com soro humano.....	59
4.5 Efeito da hemolinfa de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em intestino médio de machos e fêmeas de <i>C. albipunctata</i>	59
4.6 Análise comparativa da morfologia do intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	60
4.7 Comparação da atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	60
4.8 Comparação da atividade de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	61

4.9 Comparação da atividade de α -glicosidases no intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	62
4.10 Investigação da capacidade inibitória do sistema complemento humano por conteúdo intestinal de <i>Clogmia albipunctata</i>	63
4.11 Busca das sequências ortólogas por tBLASTn	64
4.12 Análises Estatísticas	65
5. RESULTADOS.....	67
5.1 Não existe diferença entre o intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i>	67
5.2 pH da região do intestino médio de machos e fêmeas é ácido ($\sim 6,0$)	71
5.3 pH intestinal é mantido ácido de forma ativa	73
5.4 Insetos alimentados com soro humano inativado aumentam o valor de pH intestinal.....	74
5.5 Somente intestino de fêmeas de <i>C. albipunctata</i> sofrem alcalinização do pH intestinal quando tratadas com hemolinfa de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com sangue.....	76
.....	77
5.6 Não existe diferença entre a atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> submetidos a diferentes dietas.....	77
5.7 A atividade de catalase de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> é semelhante àquela apresentada por machos de espécies hematófagas	80
5.8 <i>Clogmia albipunctata</i> apresenta atividade de α -glicosidase maior que aquela encontrada em <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	83
5.9 Existe diferença na atividade de α -glicosidase entre regiões do intestino médio tanto de <i>Clogmia albipunctata</i> como das espécies hematófagas analisadas.....	87
5.10 O conteúdo intestinal de machos e fêmeas de <i>Clogmia albipunctata</i> apresenta indícios de capacidade inibitória para a via clássica do Sistema Complemento	92
5.11 Análise filogenética da tripsina de <i>Clogmia albipunctata</i> aponta relação com a tripsina constitutiva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	93
5.12 <i>Clogmia albipunctata</i> possui uma única cópia para o gene de catalase	95
5.13 Não há relação filogenética entre o gene da 4-HPPD de <i>Clogmia albipunctata</i> e os demais dípteros analisados.....	96
6. DISCUSSÃO.....	98
7. CONCLUSÕES	117
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
9. ANEXOS.....	138
9.1 Manuscrito em Preparação	138

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Clogmia albipunctata*

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) é um inseto pertencente a ordem Diptera, à família Psychodidae e subfamília Psychodinae, é popularmente conhecido como mosca do ralo, mosquito chaminho ou mosca do banheiro, onde machos e fêmeas possuem disposição dorsal e ligeiramente paralela das asas, conferindo a estes insetos uma forma cordiforme (Figura 1). Algumas das sinónimas anteriormente atribuídas a esse inseto são: *Telmatoscopus albipunctatus*, *Psychoda albipunctata* e *Clogmia albipunctatus* (Ibáñez-Bernal, 2008). Trata-se de um inseto extremamente sinantrópico com distribuição mundial, excetuando-se as regiões polares (Forattini, 1973; Ibáñez-Bernal, 2008).

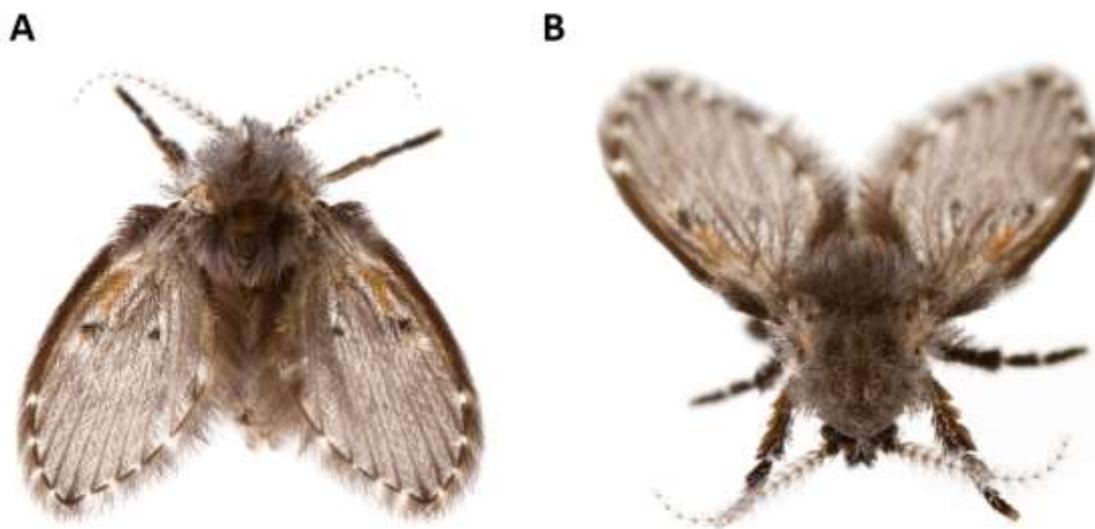


Figura 1: Adultos de *Clogmia albipunctata*. Vista dorsal em **A**; vista frontal em **B**. Foto por: Salvador Vitanza, 2019. Disponível em <https://bugguide.net>

Este inseto apresenta um ciclo de vida holometábolo, passando pelos estágios de ovo, larva (L1 –L4), pupa e adultos (Forattini, 1973; Jiménez-Guri et al., 2014)(Figura 2). A duração desse ciclo vai de 3 a 4 semanas em condições de laboratório, podendo os adultos viver aproximadamente 12 dias (García-Solache et al., 2010; Jiménez-Guri et al.,

2014). Há entre os adultos dimorfismo sexual evidenciado pelos últimos segmentos abdominais, que nos machos apresentam expansões quitinizadas, atuando como órgãos auxiliares de cópula, semelhante ao descrito para os flebotomíneos (Ibáñez-Bernal, 2008; Gunnar M. Kvifte & Wagner, 2017). Não há descrições sobre como as formas adultas se alimentam na natureza, e é provável que em condições naturais possam se alimentar de néctar ou outros alimentos ricos em açúcar. Por outro lado, os adultos parecem viver bem ingerindo apenas água e utilizando as reservas nutritivas armazenadas durante sua fase larval. É sabido que muitos dos adultos de espécies pertencentes à subfamília Psychodinae possuem redução ou ausência de certas peças bucais (Jiménez-Guri et al., 2014; Gunnar Mikalsen Kvifte, 2015; Quate, 1959), o que pode por vezes condicionar tais insetos a um tipo de alimentação restrita.

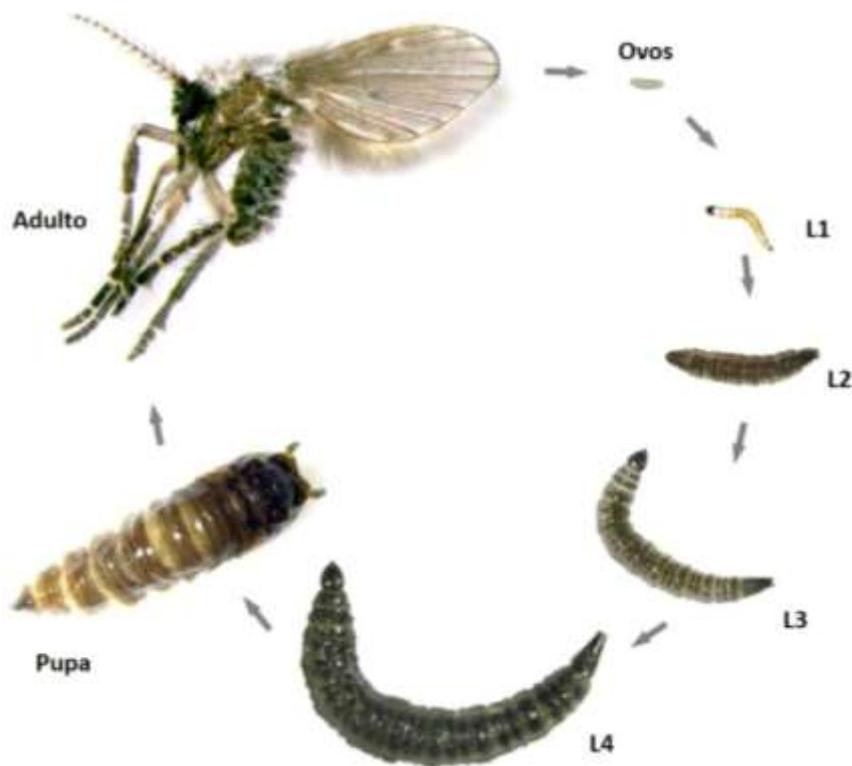


Figura 2: Ciclo biológico de *Clogmia albipunctata*. Ciclo biológico de *C. albipunctata* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Adaptado de Jiménez-Guri et al., 2014.

As formas larvais possuem hábito semiaquático, sendo escuras e possuindo cerdas abundantes e evidentes. Acredita-se que estas mesmas formas larvais se alimentam de detritos orgânicos ou lodo aderido à parede de seus criadouros, nos casos mais comuns e

evidentes aos olhos humanos, esgotos e ralos de banheiros (Forattini, 1973). Ambientes apresentando sobrecarga orgânica, portanto com maior disponibilidade de detritos, são apontados por Forattini (1973), como fonte de grande quantidade desses insetos.

A diagnose taxonômica do gênero com relação a outros psicodídeos é feita principalmente por metodologias que abordam características morfológicas (Forattini, 1973; Ibáñez-Bernal, 2008; Gunnar M. Kvifte & Wagner, 2017). São insetos com porte que varia de grande a médio (3 a 5 mm) nos insetos adultos, os quais por sua vez possuem o corpo recoberto de cerdas de coloração escura com manchas brancas espalhadas ao longo do corpo, sendo mais evidentes na extremidade das asas; sua antena possui espinhos geniculados bem desenvolvidos, sendo dois ramos anteriores nos machos e somente um nas fêmeas; sua asa é larga e possui um ápice agudo e veia R5 terminada no ápice alar (Forattini, 1973; Ibáñez-Bernal, 2008; Gunnar M. Kvifte & Wagner, 2017). Essas duas últimas características são extremamente importantes para diferenciação das espécies dentro do gênero.

Além dos estudos morfológicos, as análises moleculares vêm ganhando destaque, uma vez que contribuem para a compreensão da história filogenética não somente de Psychodidae, mas dos Diptera como um todo (Bertone et al., 2008; Espíndola et al., 2012; Friedrich & Tautz, 1997; Wiegmann et al., 2011).

C. albipunctata vem ganhando destaque como organismo modelo para o estudo da evolução e desenvolvimento de insetos em geral (Crombach et al., 2014; Janssens et al., 2014; Jiménez-Guri et al., 2018), fato relacionado com seu desenvolvimento rápido e fácil criação e manipulação em ambiente laboratorial.

Apesar de não se tratar de um inseto hematófago, existem relatos apontando os adultos como potenciais vetores mecânicos (Faulde & Spiesberger, 2013; Rupprecht et al., 2020), transportando patógenos como bactérias e ovos de helmintos, fato que se torna preocupante quando é levado em conta o elevado grau de sinantropia desses insetos. Esses insetos são apontados também como agentes infestantes em ambientes domiciliares e também hospitalares (Faulde & Spiesberger, 2012). Suas larvas são apontadas em alguns estudos como causadoras de miíases do trato geniturinário humano, embora esses sejam casos relativamente raros (El-Badry et al., 2014; El-Dib et al., 2017, 2020; Gökçe, 2020; Hjaija et al., 2018; Mokhtar et al., 2016).

1.2 Insetos Hematófagos: *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912), é um inseto pertencente a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. São popularmente conhecidos como mosquito-palha, biriguí, asa-caída entre tantos outros nomes, um reflexo de sua ampla distribuição, que vai do sul do México ao norte da Argentina (Young & Duncan, 1994).

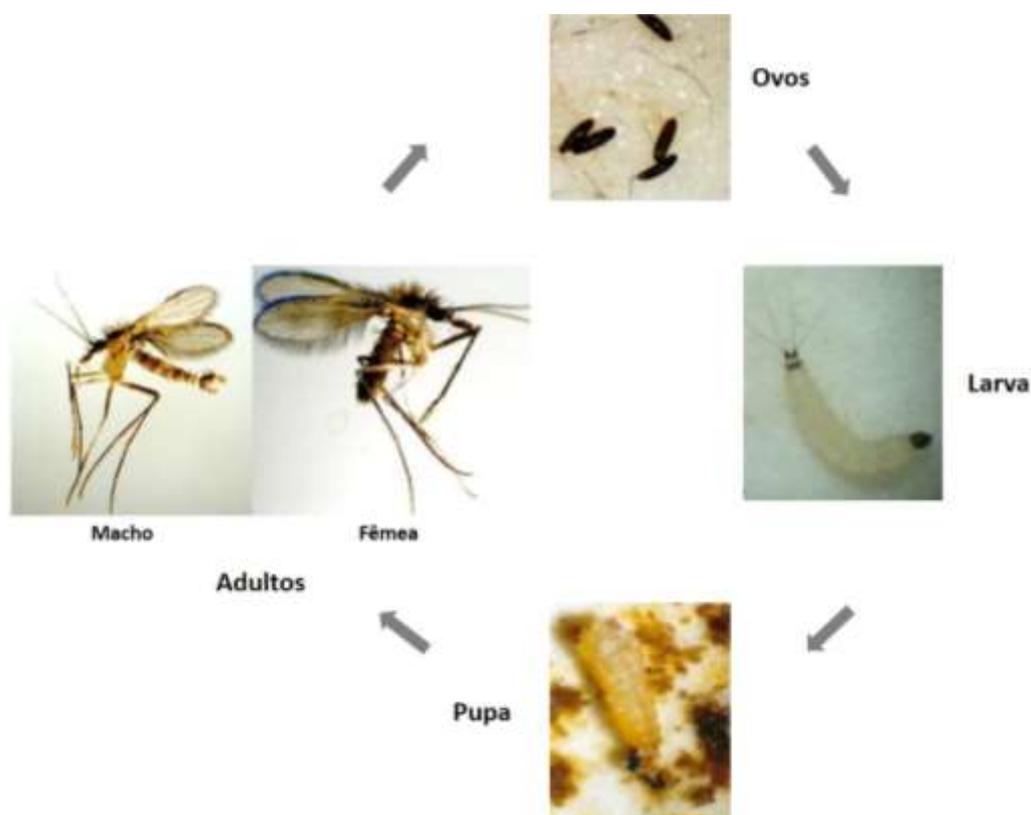


Figura 3: Ciclo biológico de *Lutzomyia longipalpis*. Ciclo biológico de *L. longipalpis* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. (Fotos por Nelder Gontijo)

Esses insetos apresentam ciclo de vida holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (com quatro estádios larvais), pupa e adultos (Sherlock, 2003; Soares & Turco, 2003). Diferente do observado para mosquitos, as larvas de flebotomíneos desenvolvem-se em solo rico em matéria orgânica de origem vegetal em decomposição, destacando-se em ambiente silvestre as serapilheiras, troncos de árvores em decomposição e fendas de

rochas; e em ambiente urbano destacam-se principalmente jardins e quintais arborizados (Ferro et al., 1997; Young & Duncan, 1994). Os adultos se alimentam de soluções açucaradas, como néctar de plantas ou secreções de afídeos, sendo que as fêmeas necessitam de repasto sanguíneo para que possam amadurecer e desenvolver seus ovários. Os ovos são colocados nos mesmos ambientes onde as larvas se desenvolvem (Soares & Turco, 2003; Young & Duncan, 1994).

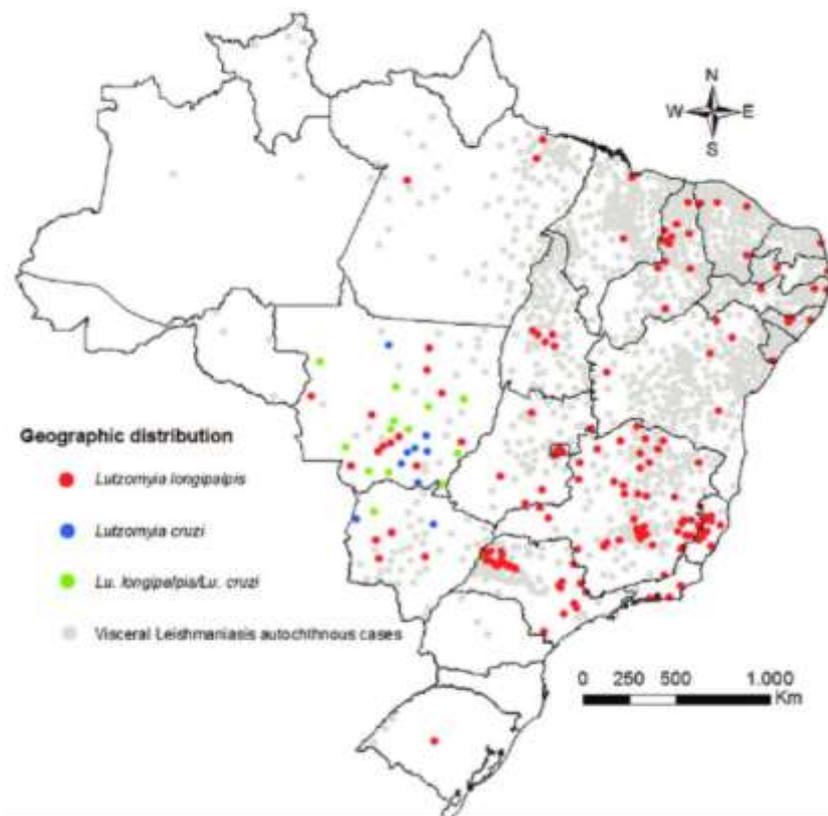


Figura 4: Distribuição espacial de duas espécies de flebotomíneos no território brasileiro: *Lutzomyia longipalpis* (em vermelho) e *Lutzomyia cruzi* (em azul). Destaca-se também regiões de co-ocorrência das duas espécies (em verde). Em cinza vemos a distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral. Adaptado de Andrade-Filho et al., 2017.

Nas Américas, *L. longipalpis* se destaca como o principal vetor de *Leishmania infantum*, agente causador da leishmaniose visceral americana (Soares & Turco, 2003). Esse fato se confirma quando se observa a correlação entre a distribuição de *L. longipalpis* e os casos de leishmaniose visceral na América Latina como um todo e no Brasil (Andrade-Filho et al., 2017; Harhay et al., 2011). No Brasil essa espécie de flebotomíneo encontra-se distribuída praticamente em todo o território, porém com mais concentração na região nordeste e alguns estudos apontam para a crescente expansão da distribuição

dessa espécie pelo país (Andrade-Filho et al., 2017). Destaca-se ainda o fato de que *L. longipalpis* é a espécie de flebotomíneo mais bem adaptada a viver em ambiente urbanizado, sendo que vários estudos apontam para um processo de urbanização da espécie a partir do início dos anos 80, o que aumenta sua importância como vetor (Lainson & Rangel, 2005; Harhay et al., 2011;). Alguns trabalhos suportam a teoria de que *L. longipalpis* é um complexo de espécies morfológicamente similares, onde diferentes populações desta espécie podem ter competências diferentes em transmitir *L. infantum* (Bauzer et al., 2007; Maingon et al., 2008; Silva Fernandes et al., 2020; Vigoder et al., 2010).

Aedes aegypti é um inseto pertencente a ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae (Forattini, 2002). É popularmente conhecido como pernilongo, mosquito rajado e mosquito da dengue, dentre outros nomes populares. São insetos de corpo delgado, apresentando coloração preta com manchas brancas pelo corpo, característica essa que tem grande importância em campanhas de conscientização para pessoas leigas, uma vez que mostra à população meios de identificar tal mosquito.

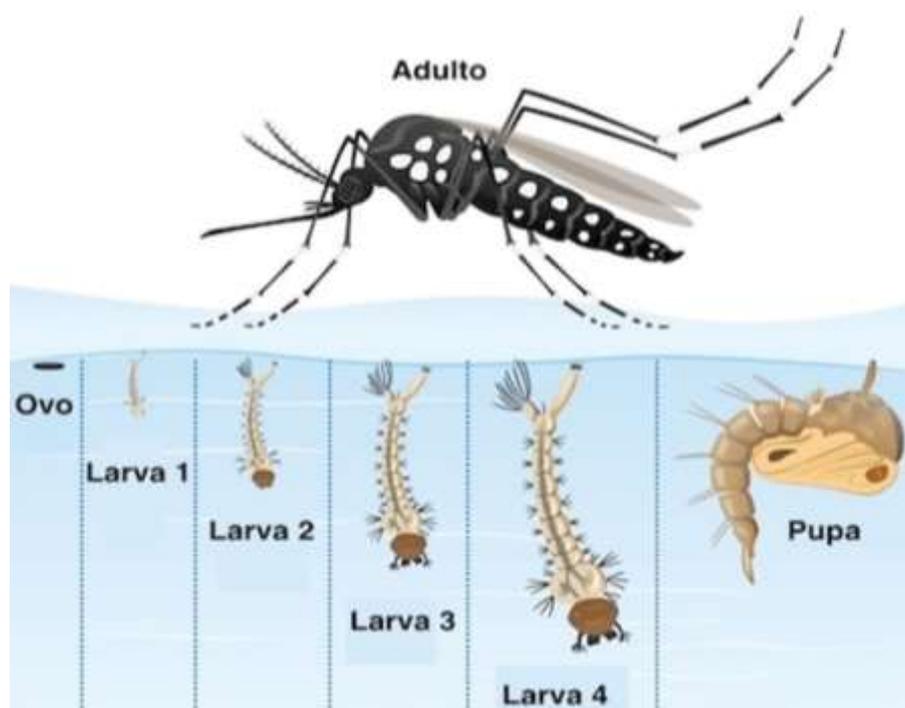


Figura 5: Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. Ciclo biológico de *A. aegypti* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>.

Apresenta ciclo de vida holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (com quatro estádios larvais), pupa e adultos (Forattini, 2002)(Figura 5). É considerado um mosquito altamente sinantrópico e antropofílico, possuindo hábitos predominantemente diurnos (Natal, 2002). Diferente do observado para flebotomíneos, suas larvas se desenvolvem em coleções aquáticas, de preferência coleções de água limpa e parada, sendo esses os locais de escolha pelas fêmeas para realizarem a oviposição (Forattini, 2002). Assim como os flebotomíneos, os adultos se alimentam de açúcares (néctar e seiva de plantas), sendo que somente as fêmeas se alimentam de sangue durante parte de sua vida, o que ocorre como requisito para o amadurecimento dos seus ovários (Carvalho & Moreira, 2017; Silva et al., 2008). Os adultos podem viver aproximadamente 40 dias.

Originário do continente africano, encontra-se atualmente distribuído em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo a distribuição limitada principalmente por fatores climáticas, uma vez que temperaturas baixas impossibilitam o desenvolvimento do mosquito (Hopp & Foley, 2001; Kraemer et al., 2015)(Figura 6).

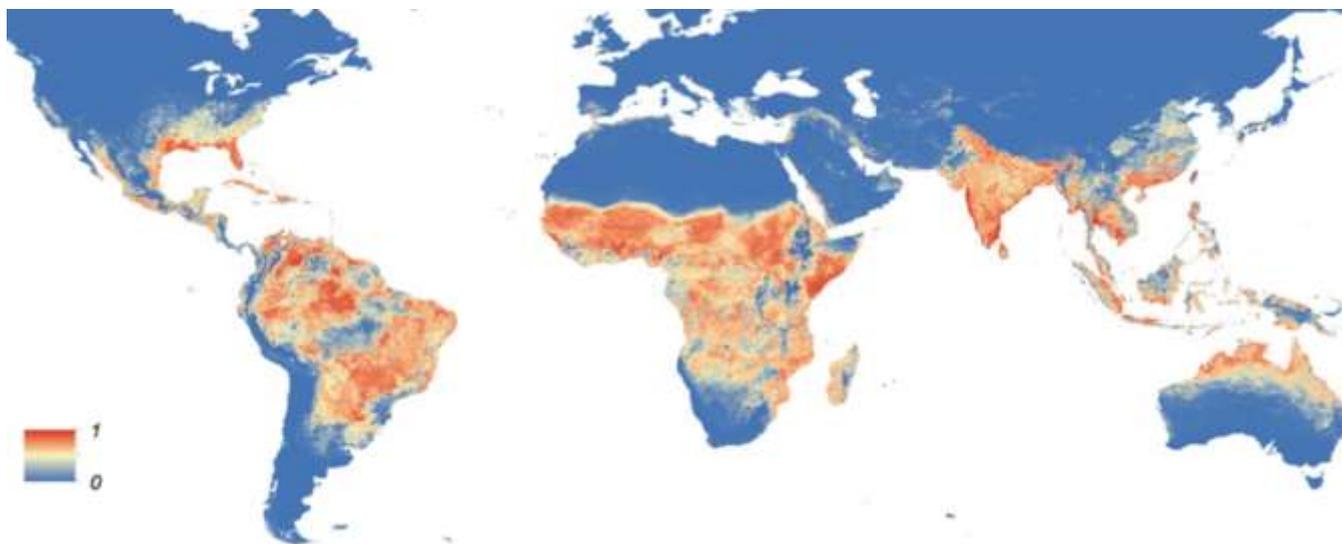


Figura 6: Distribuição mundial de *Aedes aegypti*. Probabilidade de ocorrência do inseto, variando de total presença (em vermelho) ou total ausência (em azul). Adaptado de Kraemer et al., 2015.

A. aegypti é ainda um dos mais importantes mosquitos vetores, o que decorre do fato de ser vetor de vários arbovírus causadores de doenças como: Dengue, Febre Amarela Urbana, Chikungunya, Zika e Mayaro (Gloria-Soria et al., 2016; Pereira et al., 2020).

Culex quinquefasciatus é um inseto pertencente a ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae, sendo popularmente conhecido como mosquito ou muriçoca. São insetos de corpo delgado e coloração marrom, sendo esta uma característica utilizada por muitos leigos para diferenciá-lo do mosquito da dengue (Forattini, 2002).

Esse inseto apresenta ciclo de vida holometábolo, passando pelas fases de ovo, larvas (com quatro estádios larvais), pupa e adultos (Figura 7). Diferente do observado entre os flebotomíneos e semelhante ao observado para *A. aegypti*, as formas larvais de *C. quinquefasciatus* se desenvolvem em coleções aquáticas, as quais, por sua vez, tem por característica serem ricas em matéria orgânica em decomposição, o que inclui nos criadouros desse mosquito, coleções aquáticas poluídas. Os adultos se alimentam de secreções açucaradas, como seiva e néctar de plantas, sendo que somente as fêmeas se alimentam de sangue, o que é necessário para o desenvolvimento e amadurecimento dos seus ovários (DeLisi et al., 2017; Forattini, 2002; Reisen, 2012). As fêmeas apresentam hábito noturno de hematofagia, o que faz com que sejam apontadas como agentes perturbadores do sono. O ciclo desse inseto dura aproximadamente 30 dias (Bartholomay et al., 2010; Forattini, 2002).

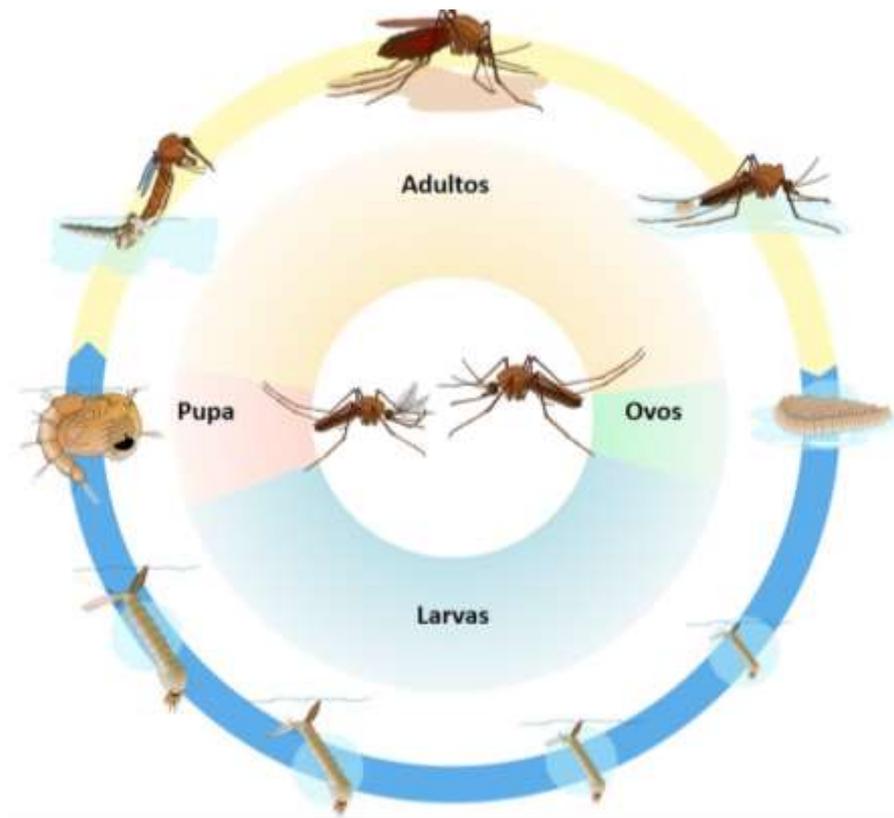


Figura 7: Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus*. Ciclo biológico de *C. quinquefasciatus* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki>. Autor(a): Mariana Ruiz Villarreal.

Apresenta distribuição em grande parte das áreas tropicais e subtropicais do globo, possuindo hábito antropofílico, sendo frequentemente encontrado no interior de residências (Alaniz et al., 2019; Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002)(Figura 8). *C. quinquefasciatus* apresenta grande importância médico-veterinária, uma vez que atua como transmissor de importantes patógenos, como: Vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus), o qual infecta naturalmente aves, sendo oportunamente transmitido a mamíferos; e *Wuchereria bancrofti*, um dos agentes etiológicos da filariose linfática (Bartholomay et al., 2010). Além disso, diversas encefalites são apontados como sendo transmitidas por esse mosquito (Mourya et al., 1989; Spinsanti et al., 2003).

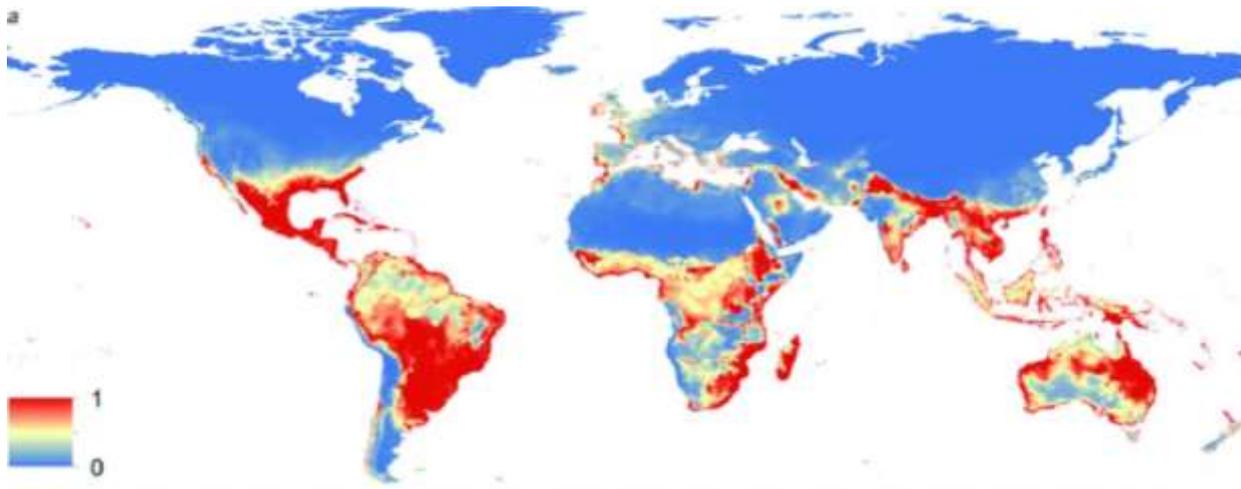


Figura 8: Distribuição mundial de *Culex quinquefasciatus*. Probabilidade de ocorrência do inseto, variando de total presença (em vermelho) ou total ausência (em azul). Adaptado de Alaniz et al., 2019.

1.3 “Nematocera”

A ordem Diptera é um dos mais diversos grupos dentro da classe Insecta, com aproximadamente 150.000 espécies descritas (Grimaldi & Engel, 2005; Pape et al., 2011; Wiegmann et al., 2011). Grande é a importância atribuída a esse grupo de insetos, a maior parte dela se deve a associação do grupo com diferentes aspectos que perpassam a vida humana. Dentro da ordem Diptera, encontramos importantes vetores de doenças parasitárias, importantes pestes agrícolas e importantes agentes decompositores (M. Bates, 1949; Gubler, 1991).

Os dípteros são historicamente divididos em duas subordens: “Nematocera” e Brachycera (Hennig, 1953; Wiegmann et al., 2011; D. K. Yeates & Wiegmann, 1999). Compondo um grupo parafilético, os “Nematocera” recebem também a denominação de “dípteros inferiores”, do inglês “*Lower Diptera*”, abrangendo, portanto, todos aqueles organismos não agrupados em Brachycera (Hennig, 1973; David K. Yeates et al., 2007)(Figura 9).

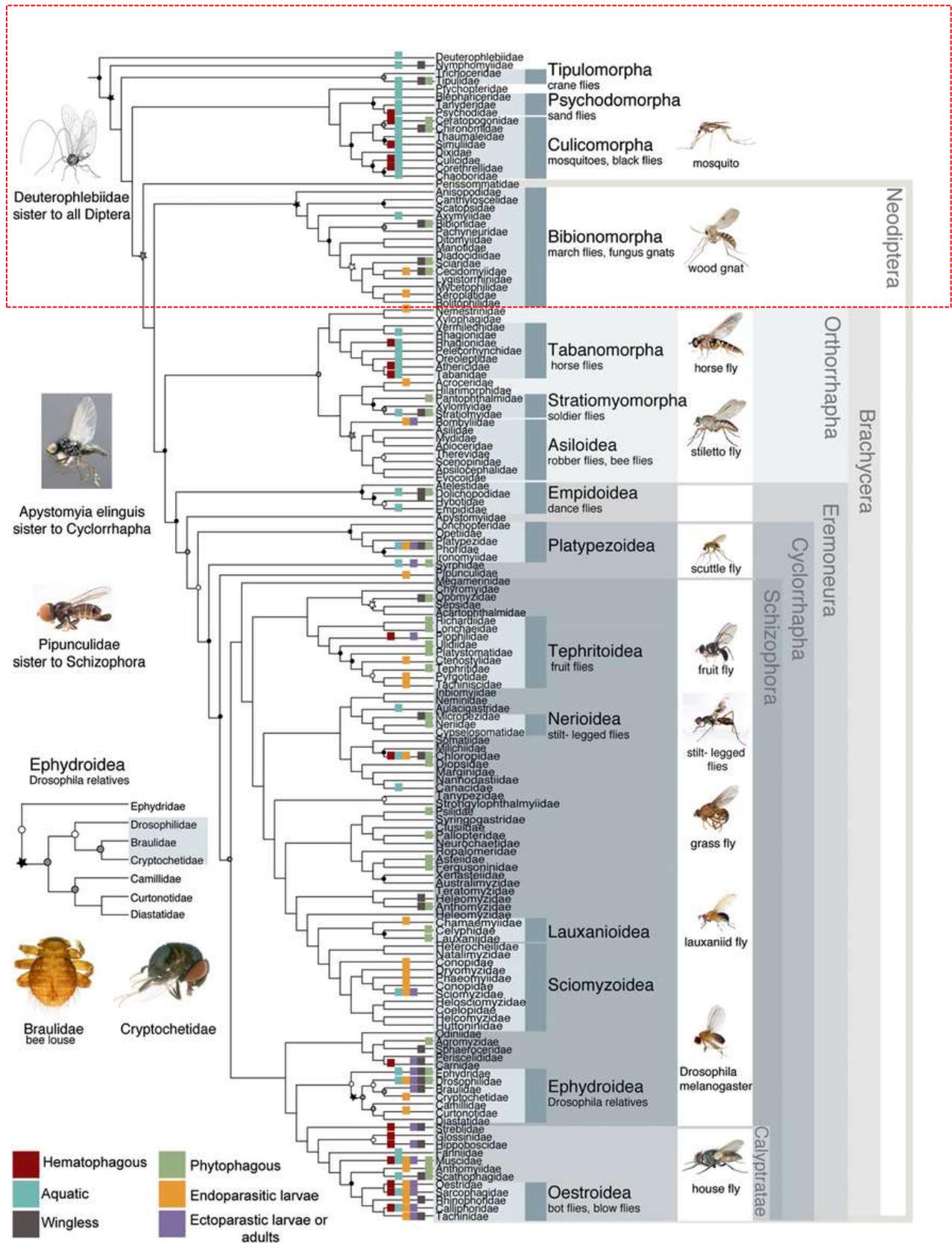


Figura 9: Filogenia de Diptera. Filogenia molecular combinada dos Diptera. Dados obtidos a partir de genes codificantes para proteínas nucleares, DNA ribossomal 18S e 25S. Destaque para as famílias e infraordens pertencentes aos “Nematocera”. Adaptado de Wiegmann et al., 2011.

A presença desse agrupamento parafilético chama atenção por apresentar organismos que compartilham algumas importantes características morfológicas: a maior parte dos adultos apresenta corpo delgado; antenas multissegmentadas; as larvas são do tipo eucéfala, ou seja, com cabeça bem desenvolvida e destacada do corpo, além de apresentarem mandíbulas expostas lateralmente ao corpo (Hennig, 1973; Triplehorn & Jhonson, 2005)(Figura 10). Além das semelhanças morfológicas, há indícios de que os insetos desse grupo compartilhem características fisiológicas extremamente importantes como a manutenção de um ambiente intestinal bem controlado e definido. Alguns estudos têm demonstrado que essa semelhança intestinal é encontrada tanto entre as formas larvais como entre os adultos de diferentes espécies.

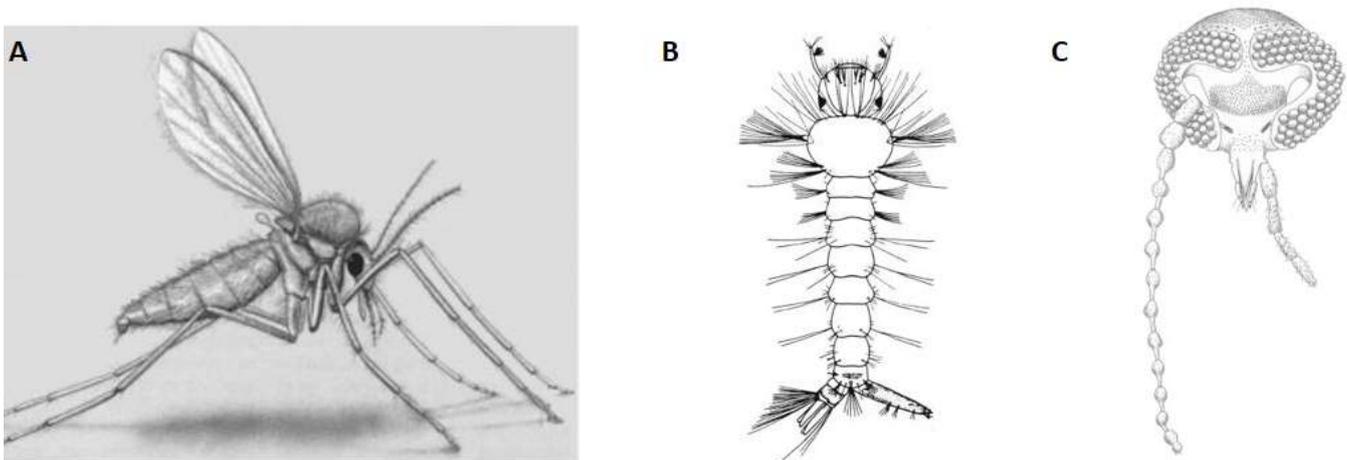


Figura 10: Características morfológicas compartilhadas entre alguns membros de “Nematocera”. Em A fêmea de *Phlebotomus* sp., destaque para o corpo delgado do inseto. Em B larva de Culicinae, destaque para o tipo larvar (eucéfala) e para as peças bucais bem expostas. Em C cabeça de *Psychoda alternicula*, destaque para a antena multissegmentada. Adaptado de Andreadis, 2005; Bogitsh, Burton J.; Carter, Clint E.; Oeltmann, 2018; Ibáñez-Bernal, 2008.

Essas semelhanças são curiosas e extremamente interessantes quando observamos que importantes vetores se encontram nesse agrupamento, como: flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* e mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, dentre outros. Ainda analisando a filogenia dos Diptera, é curioso notar que a hematofagia surgiu várias vezes de forma independente dentro dessa ordem (Adams, 1999; J. M. Ribeiro, 1995; Wiegmann et al., 2011).

Há estudos que estimam o surgimento da hematofagia em 12 famílias diferentes dentro de Diptera, sendo elas: Psychodidae, Culicidae, Corethrellidae, Ceratopogonidae, Simuliidae, Athericidae, Tabanidae, Muscidae, Glossinidae, Hippoboscidae, Streblidae, Nycteribiidae (Azar & Nel, 2012; Wiegmann et al., 2011). Alguns estudos apontam ainda para o surgimento e posterior perda desse hábito alimentar dentro da família Chironomidae (Azar & Nel, 2012). É curioso notar que esses surgimentos são apontados como eventos independentes (Adams, 1999) e que, dentre essas famílias, cinco delas pertencem à subordem “Nematocera”, onde a hematofagia está diretamente relacionada com o desenvolvimento ovariano das fêmeas. Destaca-se ainda o fato de que os machos das espécies hematófagas não alimentam-se de sangue.

1.3 Hematofagia

A hematofagia pode ser definida como o processo alimentar através do qual um organismo consome sangue de outro animal, o qual por sua vez recebe o nome de hospedeiro (Balashov, 1984; Lehane, 1992). Esse tipo de alimentação tem por característica principal fornecer àqueles organismos que o fazem um aporte grande e repentino de nutrientes, em sua maioria proteínas, as quais são essenciais ao desenvolvimento gonotrófico nos adultos fêmeas de determinadas espécies de Diptera, pelo menos dentro de Nematocera (Adams, 1999; Spielman, 1971). Cerca de 80% de um repasto sanguíneo é composto por água proveniente do sangue, dos sólidos presentes, cerca de 97% são proteínas (Adams, 1999). Dados como estes evidenciam o fato de que adaptações morfológicas e fisiológicas são extremamente importantes para que os organismos que se alimentam de sangue, o façam de forma eficiente.

O surgimento da hematofagia e sua evolução são vistos através de dois cenários: o primeiro deles se relaciona com a coevolução ectoparasito/hospedeiro, em um cenário em que, um organismo ancestral viveria em associação com hospedeiros de sangue quente. Esse organismo ancestral, vivendo dentro do ninho dos hospedeiros, por vezes entraria em contato e ingeriria de forma oportuna secreções, restos de pele, ou outros resíduos produzidos pelos animais de sangue quente. Com o passar do tempo, a seleção natural teria atuado sobre esses organismos oportunistas, com a pressão seletiva atuando na direção de uma associação mais duradoura entre ectoparasito e hospedeiro. O segundo

cenário se aplica aos organismos nos quais os ancestrais não mantinham estreita relação com os possíveis hospedeiros. Nesse caso, os ancestrais se alimentariam de forma oportunista de carcaças frescas, passando posteriormente a uma alimentação ativa sobre o hospedeiro (Adams, 1999; Azar & Nel, 2012; Lehane, 1992, 2005, 2009).

Esse tipo de alimentação representou um salto evolutivo extremamente importante para alguns insetos, isto porque a alimentação rica em nutrientes possibilitou a adoção de um período de tempo maior entre as alimentações, o que por sua vez representava menor tempo de exposição desses organismos ao ambiente e menor risco de predação (Balashov, 1984). Resultou também numa maior capacidade reprodutiva, o que pode ser exemplificado pela maior produção de ovos de algumas fêmeas de insetos hematófagos (Adams, 1999). Portanto, de maneira geral, a hematofagia resultou no aumento do “*fitness*” de alguns organismos, pelos fatos já citados anteriormente.

Por ter surgido várias vezes e de forma independente, é difícil estabelecer um padrão fisiológico que possa ser aplicado a todos os grupos de animais hematófagos. As variações relacionadas com o processo foram e são tão grandes que, por exemplo, dentro da classe Insecta, são encontrados organismos nos quais ambos os sexos, machos e fêmeas, realizam o processo de hematofagia (Lehane, 1992), como é o caso dos insetos da família Reduviidae, popularmente conhecidos como barbeiros; porém encontramos também organismos nos quais somente as fêmeas realizam hematofagia, como por exemplo várias espécies de insetos da família Culicidae, os chamados mosquitos (Lehane, 1992). Com base nessa variação de características, Lehane (1992) propôs a divisão da hematofagia em três diferentes tipos (Tabela 1), sendo eles: hematófagos do tipo 1, que são aqueles em que as formas imaturas se alimentam de sangue sobre ou sob a pele do hospedeiro, mas suas formas adultas são livres e não se alimentam de sangue; hematófagos do tipo 2, que são aqueles em que os organismos se alimentam exclusivamente de sangue durante todas as fases de seu desenvolvimento, não havendo diferença na alimentação entre machos e fêmeas; na hematofagia do tipo 3, somente os adultos se alimentam de sangue, sendo que, em algumas espécies desse grupo, a hematofagia é essencial para a reprodução. A hematofagia do tipo 3 apresenta ainda três subcategorias: na hematofagia tipo 3A, machos e fêmeas alimentam-se exclusivamente de sangue; na hematofagia tipo 3B, machos e fêmeas alimentam-se de sangue de forma opcional, alimentando-se de outros recursos; por fim, na hematofagia do tipo 3C, somente um dos sexos se alimentam de sangue, normalmente as fêmeas, que podem ainda se alimentar de outras fontes, como secreções açucaradas (Adams, 1999; Lehane, 1992,

2005) (Tabela 1). Toda essa variação gera curiosidade acerca de quais seriam os parâmetros e características envolvidas no surgimento da hematofagia.

Apesar de todas as possibilidades adaptativas que o processo de hematofagia acabou por proporcionar aos organismos hoje hematófagos, deve-se deixar claro que o ato de retirar sangue de outro organismo representa um processo perigoso e que, sem as adaptações necessárias, pode ser extremamente prejudicial, fazendo por exemplo com que o inseto seja percebido pelo hospedeiro e eliminado pelo seu comportamento de “grooming” (Graça-Souza et al., 2006).

TIPO	SUBTIPO	DESCRIÇÃO	EXEMPLOS
1	-	Larvas hematófagas; os adultos não se alimentam de sangue	Berne
2	-	Todos os estágios e ambos os sexos são exclusivamente hematófagos	Percevejos de cama
3	-	Somente os adultos se alimentam de sangue	
	3A	Machos e fêmeas são hematófagos obrigatórios	Pulgas
	3B	Machos e fêmeas são hematófagos oportunistas	Moscas do estábulo
	3C	Apenas um dos sexos é hematófago	Mosquitos

Tabela 1. Classificação dos diferentes tipos de hematofagia. Adaptado de Adams, 1999 e Lehane, 1992.

As características encontradas dentro dos insetos hematófagos, por exemplo, são das mais variadas, passando por: i) expressão de proteínas salivares com funções anti-hemostáticas, bem como com funções de inibição do sistema imune do hospedeiro (Cavalcante et al., 2003; Mans & Neitz, 2004; José M.C. Ribeiro & Arcà, 2009; Ribeiro et al., 1987); ii) expressão de proteínas com funções de inibição de estresse: “*heat shock proteins*” (HSPs), contra o estresse ocasionado pelo calor do sangue de animais homeotérmicos (Benoit & Lopez-Martinez, 2012; Dana et al., 2005; Paim et al., 2016); iii) expressão de certas proteínas salivares que desempenham o papel de kratagonistas, ou

seja, proteínas que atuam como antagonistas por captura de moléculas farmacologicamente ativas do hospedeiro, inibindo a ação de agonistas inflamatórios que poderiam interferir no processo de alimentação (Andersen & Ribeiro, 2017; José M.C. Ribeiro & Arcà, 2009).

Insetos hematófagos devem lidar também com o estresse oxidativo proveniente da digestão de sangue. A digestão da hemoglobina do sangue resulta na liberação de grupamentos heme, os quais em contato com H_2O_2 acabam provocando a liberação de mais espécies reativas de oxigênio (ROS) (Graça-Souza et al., 2006; Paes et al., 2001; Winterbourn, 1995). Diversos são os mecanismos desenvolvidos por insetos hematófagos para lidar com esse estresse oxidativo (Dansa-Petretski et al., 1995; M. F. Oliveira et al., 1999; Paes & Oliveira, 1999; Souza et al., 1997), dentre os quais podemos citar a expressão de catalases e superóxido dismutases (Paes et al., 2001). Em especial, as catalases são responsáveis pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Graça-Souza et al., 2006).

1.4 Exaptação

Uma adaptação evolutiva é vista sob duas perspectivas: a primeira diz respeito a uma característica moldada pela seleção natural para sua atual função; a segunda diz respeito a uma característica que vem agregar valor adaptativo em determinada função, não necessariamente tendo relação com as pressões evolutivas a partir das quais ela foi selecionada. Esta segunda perspectiva é o que se conhece por exaptação (Gould & Vrba, 1982)(Tabela 2).

PROCESSO	CARACTERÍSTICA
A Seleção Natural molda uma característica para sua atual função	Adaptação
Uma característica, previamente moldada pela seleção natural para uma função particular, é cooptada para um novo uso	Exaptação
Uma característica a partir da qual sua origem não pode ser atribuída a ação direta da seleção natural, é cooptada para uma nova função	Exaptação

Tabela 2. *Classificação das características adaptativas.* Adaptado de Gould & Vrba, 1982.

Na história evolutiva dos animais, diversos são os exemplos de exaptação, dentre os quais o mais comum é aquele relacionado com as penas das aves. Grande parte dos evolucionistas acreditam que, em um passado distante, a seleção natural atuou sobre organismos que apresentavam em sua epiderme anexos queratinizados (o que hoje se conhece por penas). Estes anexos foram selecionados como uma adaptação de resistência a incidência de raios solares, funcionando muitas vezes também como isolantes térmicos. Organismos que apresentavam tal proteção encontravam-se, portanto, mais aptos a uma exposição prolongada ao ambiente. Mais tarde, sob diferentes pressões, as penas tiveram sua função inicial deslocada, passando a atuar em situações completamente diferentes, como por exemplo, o voo (Figura 11). Portanto, as penas foram coaptadas de sua função inicial, e sem que houvesse uma pressão seletiva para o surgimento de um novo caráter, passaram trabalhar em uma nova função (Gould & Vrba, 1982).

A proposição de que eventos de exaptação se aplicariam a grande parte das adaptações relacionadas à hematofagia surge do fato de que, em “Nematocera” observam-se múltiplos eventos de surgimento da hematofagia, e o mais curioso, eventos independentes (Adams, 1999; Wiegmann et al., 2011).

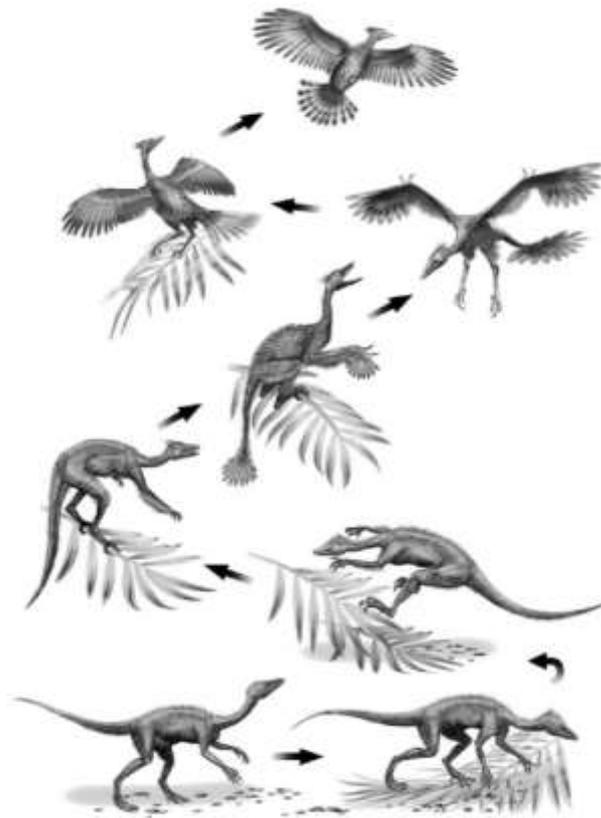


Figura 11. Cenário evolutivo para o surgimento do voo. As penas foram selecionadas a princípio como uma adaptação a incidência de raios solares, funcionando como isolantes térmicos. Organismos que apresentavam tal proteção encontravam-se mais adaptados a uma exposição prolongada ao sol. Posteriormente, sob diferentes pressões, as penas tiveram sua função inicial deslocada, passando a atuar como adaptação ao voo. Adaptado de Kurochkin & Bogdanovich, 2008.

Partindo da perspectiva da parcimônia, o curso evolutivo sempre segue o caminho que necessita de um menor número de passos para o estabelecimento de um caráter (Sober, 1983). Portanto, quando a pressão evolutiva atua sobre uma característica já presente em um organismo, é de se esperar que o “esforço” evolutivo seja menor do que aquele empregado para a seleção de uma nova característica (Gould & Vrba, 1982).

1.5 Proteínas com provável ter caráter exaptativo

1.5.1 Tripsinas

A tripsina é uma enzima que tem destaque em se tratando de insetos (Wu et al., 2009), isso porque desempenha papel essencial na digestão em várias espécies desse grupo de organismos (Applebaum, 1985; Walter R Terra & Ferreira, 1994). É uma enzima classificada entre as serino-proteases, possuindo atividade máxima em faixas alcalinas de pH (Santiago et al., 2017; Walter R Terra & Ferreira, 1994). As serino-proteases são encontradas desde vírus e bactérias até eucariotos, nos quais apresenta funções digestivas, imunológicas e nervosas. Dentro dessa última função, foi demonstrado o papel das enzimas no desenvolvimento neural, plasticidade, neuroregeneração e degeneração (Rawlings & Barrett, 1994; Wang et al., 2008).

As serino-proteases estão ainda envolvidas em processos como formação de vitelo, imunidade inata e transmissão de patógenos, não só entre insetos, mas também entre outros artrópodes como os carrapatos (Santiago et al., 2017).

Entre os insetos hematófagos, foi observado que a tripsina desempenha papel fundamental durante a digestão do sangue ingerido (Applebaum, 1985; Walter R Terra & Ferreira, 1994; Yang & Davies, 1968). Durante a digestão do sangue, sua expressão é aumentada logo após o repasto sanguíneo, o que foi observado em *L. longipalpis*, *A. aegypti*, *Anopheles gambiae* e algumas espécies de simulídeos (Jochim et al., 2008; Muller et al., 1995; Müller et al., 1993; Shambaugh, 1954; Telleria et al., 2007; Yang & Davies, 1968). Em *L. longipalpis* e *A. gambiae*, encontramos ainda a expressão de mais de um tipo de tripsina, as quais possuem regulação diferencial de expressão, sendo o tipo de tripsina com maior expressão determinado pelo tipo de alimento ingerido (sangue ou carboidratos) pelos insetos (Muller et al., 1995; Telleria et al., 2007). Para *A. aegypti*, ficou demonstrada a relação entre o tipo de alimento ingerido e a produção/liberação de tripsina no espaço luminal do intestino desses insetos, bem como a relação entre a quantidade de alimento ingerido e a quantidade de tripsinas liberadas para que ocorra a digestão (Gooding, 1973)(Figura 12).

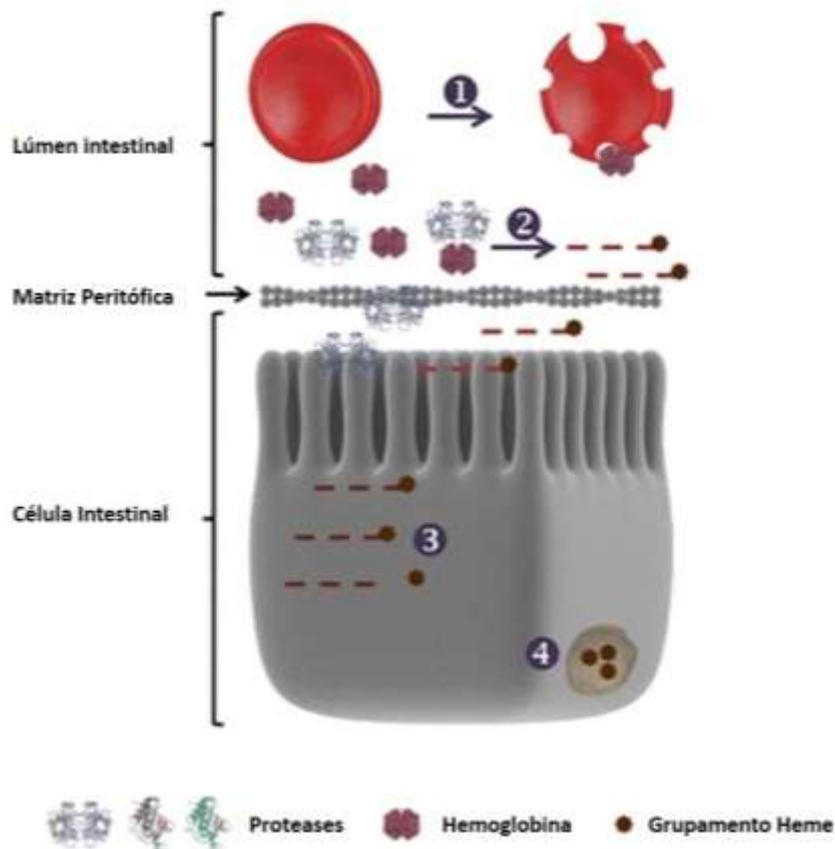


Figura 12. Esquema da digestão de sangue entre os insetos hematófagos. Em 1, digestão dos eritrócitos pelas proteases e liberação de hemoglobina no lúmen intestinal (ressalta-se a participação de hemolisinas não proteolíticas, as quais não são apontadas no esquema). Em 2, digestão extracelular de hemoglobina ainda no lúmen intestinal. Em 3, internalização de aminoácidos e alguns di/tri-peptídeos. Em 4, processo de detoxificação a partir da eliminação de grupamentos heme. Adaptado de Santiago et al., 2017.

1.5.2 Catalase

A catalase é uma enzima que tem sua função primária relacionada com a homeostase oxidativa em grande parte dos grupos animais existentes (Champion & Xu, 2017). Trata-se de uma enzima que atua catalisando a quebra de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio gasoso (O_2) (Chance et al., 1979). Em *Drosophila melanogaster*, foi demonstrado o papel desta enzima no controle de peróxido de hidrogênio produzido naturalmente como parte do sistema imune inato daqueles insetos (Ha et al., 2005; Lemaitre & Miguel-Aliaga, 2013) e em *Rhodnius prolixus*, foi demonstrado que tanto a catalase quanto a superóxido dismutase, outra enzima envolvida

com a catalise de ROS, possuem sua expressão aumentada em células do intestino daqueles insetos durante a digestão do sangue ingerido (Paes et al., 2001). Alguns estudos apontam a expressão de catalase como sendo determinante para a longevidade e fecundidade de alguns insetos (DeJong et al., 2007; Griswold et al., 1993; Mackay & Bewley, 1989).

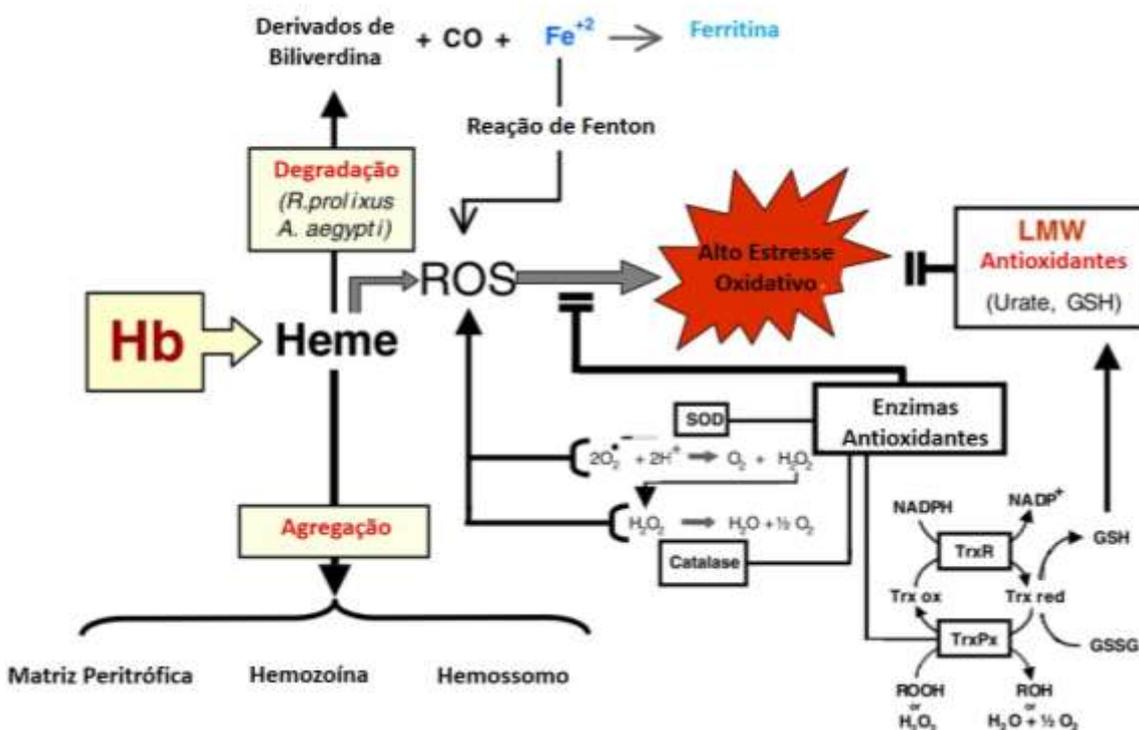


Figura 13. Esquema das estratégias de defesa contra o estresse oxidativo no intestino médio de artrópodes hematófagos. Destaque para ação das enzimas antioxidantes, em especial a catalase. Hb - hemoglobina; ROS – espécies reativas de oxigênio; O_2^- - ânion superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; SOD – superóxido dismutase; TrxR— tioredoxina redutase; TrxPx— tioredoxina peroxidase; Trx red— tioredoxina reduzida; Trx ox— tioredoxina oxidada; GSH— glutatona reduzida; GSSG—glutatona oxidada; LMW— baixo peso molecular. Adaptado de Graça-Souza et al., 2006.

Enzimas que conseguem lidar com o estresse oxidativo são extremamente importantes em insetos hematófagos (Dansa-Petretski et al., 1995; Graça-Souza et al., 2006; L. Oliveira et al., 1995; Paes et al., 2001), uma vez que, após a digestão do sangue, ocorre a liberação de uma grande quantidade de grupamento heme. Esse grupamento

prostético da hemoglobina é extremamente reativo, podendo causar danos potenciais a membranas, ácidos nucleicos e proteínas (Graça-Souza et al., 2006). Fato verdadeiro não só para os insetos hematófagos, mas também para outros artrópodes sugadores de sangue, como os carrapatos, é de suma importância a seleção de estratégias para lidar com a toxicidade provocada pelo acúmulo de grupamentos heme provenientes da digestão de sangue (Sabadin et al., 2019). Diante disso, a detoxificação de grupamentos heme e do excesso de ROS é de extrema importância para insetos hematófagos (M. F. Oliveira et al., 1999; Marcus F. Oliveira et al., 2000; Paes et al., 2001).

1.5.3 α -Glicosidases

As carboidrases são enzimas que catalisam a degradação de carboidratos durante a digestão. Estas enzimas são importantes na digestão de insetos que ingerem açúcares de diversas fontes durante sua alimentação (Figura 14). Um exemplo de carboidrase importante para a digestão de açúcares em artrópodes são as α -glicosidases (Walter R. Terra & Ferreira, 2012).

As α -glicosidases são enzimas responsáveis pela hidrólise da porção α -1,4 dos resíduos de glicose presentes em dissacarídeos e oligossacarídeos. São frequentemente chamadas de maltases, podendo também receber o nome de sacarase, embora esse termo não se aplique exclusivamente às α -glicosidases (W.R. Terra & Ferreira, 2005; Walter R. Terra & Ferreira, 1994). Com base na especificidade de substratos, as α -glicosidases podem ser divididas em três tipos, podendo também ser divididas em duas famílias segundo sua estrutura primária (Chiba, 1997; da Costa et al., 2019).

Nos insetos a enzima pode ser encontrada sob duas formas: uma forma solúvel, presente no lúmen do intestino médio desses organismos; e ligada a membrana dos enterócitos, como parte do glicocálice dessas células (W.R. Terra & Ferreira, 2005).

A enzima possui atividade ótima em valores ácidos de pH (5 - 6.5), o que coincide com o valor de pH luminal de insetos hematófagos como *L. longipalpis* e *A. aegypti* durante o período de vida em que esses insetos se alimentam de secreções açucaradas (Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2017). As α -glicosidases de membrana, pelo menos de *L. longipalpis*, não possuem distribuição uniforme ao longo do intestino médio, estabelecendo relação com as mudanças de pH que ocorrem no intestino médio durante o repasto sanguíneo das fêmeas. Essas enzimas também possuem relação com o sucesso da infecção de *L. longipalpis* por protozoários do gênero *Leishmania* (Gontijo et al., 1996,

1998). Recentemente, foram identificadas α -glicosidases solúveis de *L. longipalpis* que atuam na digestão de glicoproteínas presentes no sangue ingerido pelo inseto. Essas α -glicosidases possuem pH ótimo em faixa alcalina, o que coincide com a elevação de pH no intestino de fêmeas após o repasto sanguíneo (da Costa et al., 2019; Vânia C. Santos et al., 2011).

Além do seu papel na digestão de açúcares, ficou demonstrado o papel dessa enzima em *R. prolixus* na formação de hemozoína, importante processo de detoxificação após o repasto sanguíneo (Mury et al., 2009).

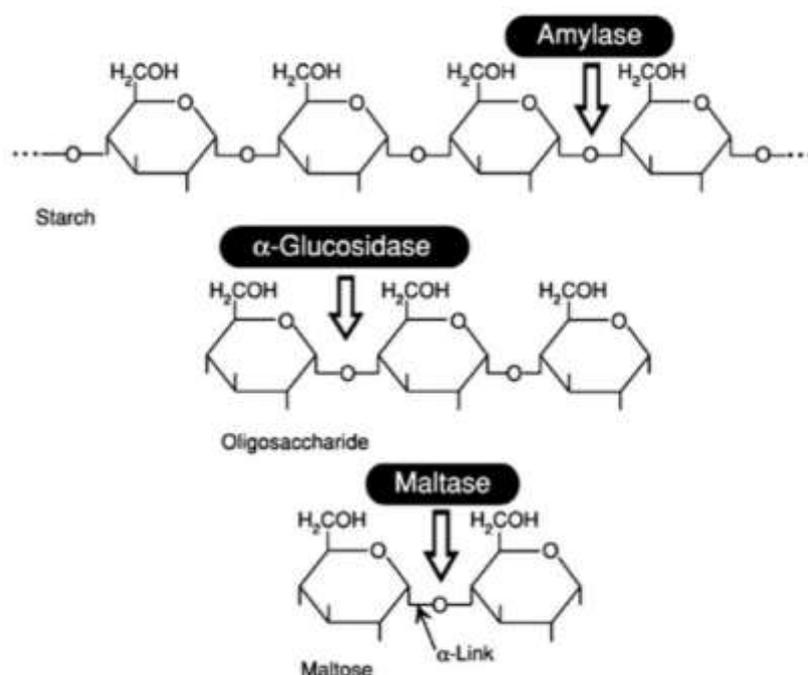


Figura 14. Reações de digestão de açúcares em insetos. Observa-se o sítio de clivagem de três importantes carboidratos. Destaque para o sítio de clivagem da α -glicosidase, no centro da imagem. Adaptado de Walter R. Terra & Ferreira, 2012.

1.5.4 4-HPPD

A 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase (4-HPPD) é uma enzima pertencente a classe das oxigenases dependentes de ferro, atuando primariamente na catálise de 4-hidroxifenilpiruvato em homogentisato. Essa enzima possui aplicações na medicina e na

agricultura, uma vez que atua no segundo passo da cadeia de degradação do metabolismo de tirosina, metabolismo este que é comum a todas as formas de vida aeróbicas (Moran, 2005)(Figura 15).

Nas plantas, tal enzima atua na formação de cofatores de isoprenóides essenciais. O bloqueio da formação de tais cofatores é a base de muitos herbicidas de interesse na agricultura (Moran, 2005). Nos humanos, o bloqueio da enzima tem caráter terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo de tirosina, como a tirosemia (Lindstedt, 1992; Moran, 2005; Sterkel et al., 2016).

A importância da enzima entre os insetos hematófagos foi confirmada por Sterkel e colaboradores (2016), que mostraram que o bloqueio da enzima afeta de maneira diferente insetos hematófagos e insetos não-hematófagos (Sterkel et al., 2016; Sterkel & Oliveira, 2017). O bloqueio da enzima em *R. prolixus* levou ao acúmulo de tirosina no intestino desses insetos após o repasto sanguíneo, a deposição de tirosina foi ainda seguida por acentuado processo de melanização, o que levou os insetos à morte (Sterkel et al., 2016).

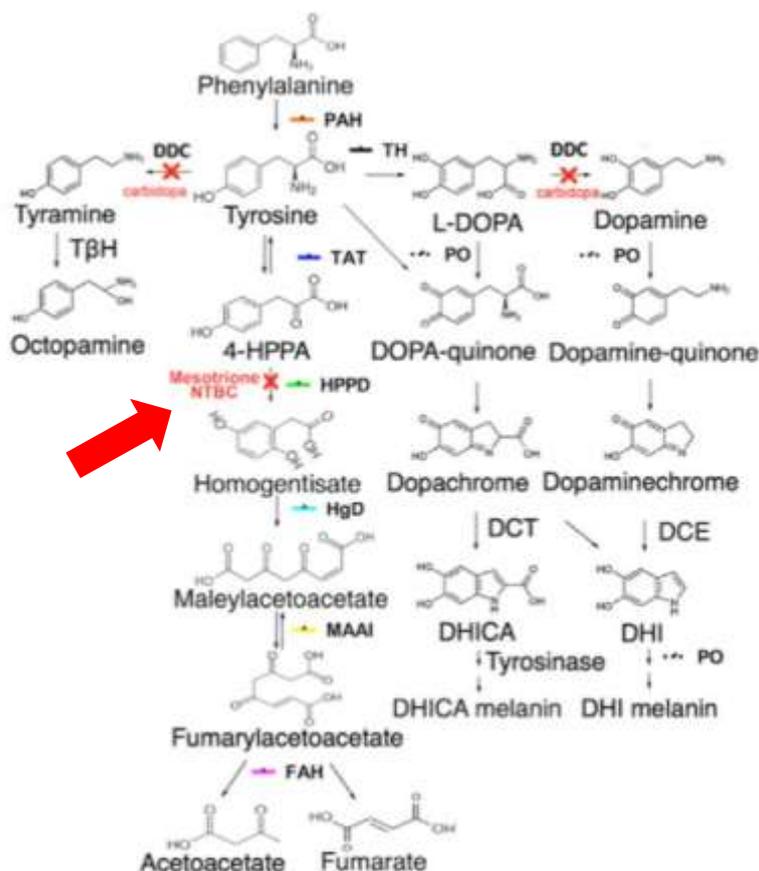


Figura 15. Vias metabólicas da tirosina. Destaque para a via de atuação da 4-HPPD. PAH, fenilalanina hidroxilase; TAT, tirosina aminotransferase; HPPD, 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase; HgD, homogentisato 1,2-dioxigenase; MAAI, maleilacetoacetato isomerase; FAH, fumarilacetoacetase; TH, tirosina hidroxilase; DDC, L-DOPA descarboxilase/descarboxilase L-aminoácido aromático; PO, fenoloxidase; DCT, dopacromo taltomerase; DCE, enzima de conversão de dopacromo; TbH, tiramina b-hidroxilase; 4-HPPA, ácido 4-hidroxifenilpiruvídico; L-DOPA, L-3,4-dihidroxifenilalanina; DHI, 5,6-dihidroxiindol; DHICA, ácido 5,6-dihydroxiindol-2-carboxílico. Adaptado de Sterkel et al., 2016.

1.6 pH intestinal

Dentre os vários fatores que desempenham papel fundamental na fisiologia intestinal dos insetos, o pH luminal merece destaque (Harrison, 2001; Walter R Terra & Ferreira, 1994). Isso porque tal propriedade química tem influência direta sobre a ação de enzimas digestivas. Enzimas, como todas as proteínas, possuem resíduos de aminoácidos que podem sofrer protonação ou desprotonação dependente do pH do meio em que estão dissolvidas. Essas mudanças de cargas podem alterar a conformação das moléculas e isso altera a atividade enzimática.

Em alguns insetos hematófagos da subordem Nematocera, o pH intestinal ganha destaque ainda maior porque tais insetos, ao longo de sua vida, alimentam-se não só de sangue, mas também de outras fontes de alimento, como soluções açucaradas, as quais requerem, para sua digestão, enzimas diferentes daquelas requeridas para digestão de sangue (Walter R Terra & Ferreira, 1994).

Em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sacarose é observado um valor luminal de pH igual a 6,0 (V. C. Santos et al., 2008), portanto um valor de pH ácido, o qual é mantido de forma ativa, o que ficou evidenciado pela capacidade desses insetos de acidificarem uma solução de sacarose tamponada no pH 7,5 assim que ela é ingerida (V. C. Santos et al., 2008). Quando as fêmeas são alimentadas com sangue, é observado aumento do valor de pH luminal, o qual nas primeiras horas após digestão é de aproximadamente 8,1, caindo gradativamente conforme a digestão vai avançando (V. C. Santos et al., 2008). Esta alcalinização requer a percepção da presença de proteínas no interior do intestino e o subsequente desligamento do mecanismo de manutenção do pH ~6,0.

Em fêmeas de *A. aegypti* foram descritos valores de pH intestinal semelhantes àqueles encontrados em *L. longipalpis* (Nepomuceno et al., 2017). Portanto, em fêmeas

alimentadas com solução de sacarose o valor de pH intestinal foi caracterizado como ácido (pH = ~6), quando as fêmeas foram alimentadas com sangue ou com solução que representasse uma alimentação rica em proteínas, foi observada alcalinização do pH intestinal, o qual atingiu valores aproximados de 7,5 (Nepomuceno et al., 2017).

Tanto em *L. longipalpis* como em *A. aegypti*. O intestino médio de fêmeas pode ser dividido morfológica e fisiologicamente em duas porções: uma torácica e outra abdominal. As duas porções apresentam valores de pH diferentes quando as fêmeas são alimentadas com sangue (Nepomuceno et al., 2017; V. C. Santos et al., 2008; Vânia C. Santos et al., 2011). A região do intestino médio abdominal é aquela na qual ocorre a alcalinização. Já a região do intestino médio torácico mantém valores de pH semelhantes àqueles encontrados antes do repasto sanguíneo, portanto, valores próximos de 6, o que coincide com o valor ótimo de pH para atividade das α -glicosidases, que predominantemente se encontram ligadas às microvilosidades intestinais desta região do intestino médio. Desse modo, temos uma compartimentalização do intestino médio, o que faz com que a digestão de sangue e açúcares possam acontecer de forma simultânea, mesmo com padrões bioquímicos diferentes.

1.7 Sistema Complemento

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato dos vertebrados, compondo, portanto, uma das primeiras linhas de defesa daqueles organismos. É composto por mais de 40 proteínas plasmáticas que, quando ativadas, algumas dessas proteínas são clivadas ao longo de cascatas que culmina na opsonização de patógenos, com alguns desses fragmentos atuando como potentes mediadores pró-inflamatórios (anafilatoxinas) e na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que produz poros na superfície de patógenos. O sistema complemento pode ser ativado basicamente por três vias, sendo elas: via clássica, via alternativa e via das lectinas. Independente da via a partir da qual o sistema complemento foi ativado, o resultado final é a formação do Complexo de Ataque às Membranas (MAC) (Dodds & Sim, 1997; Ricklin et al., 2010).

A via clássica do complemento possui ativação dependente de complexo antígeno-anticorpo. O primeiro complexo proteico dessa cascata é conhecido como C1, o qual tem sua ativação dependente de íons cálcio. Quando C1 se liga ao complexo antígeno/anticorpo na presença de íons cálcio, ocorre a conversão de C4 e C2 em seus

elementos clivados, a partir dos quais é formada a C3 convertase. Este complexo é responsável pela clivagem de C3 em C3a e C3b, sendo que este último se liga à C3 convertase para formação da C5 convertase. A C5 convertase é responsável pela clivagem de C5, a partir da qual ocorre a formação do elemento C5b, que ao ligar-se à membrana em associação com C6, C7, C8 e C9, forma o complexo de ataque à membrana (Ricklin et al., 2010).

A via alternativa é ativada a partir da hidrólise espontânea de C3. O complexo C3H₂O expõe um sítio de ligação para a proteína fator B, possibilitando então a ação da protease fator D, que faz com que o complexo C3H₂O-fatorB seja convertido em C3 convertase (C3H₂O-Bb). Esta por sua vez cliva o componente C3, liberando C3b, que se liga em quaisquer moléculas que estejam próximas do local de ativação. Quando se liga na superfície de uma célula do próprio organismo, moléculas do complemento com função reguladora inibem o processo. Quando se ligam em superfícies estranhas, como membranas de bactérias, o complemento não sofre inibição pelas moléculas reguladoras e a ativação prossegue. Após essa ligação, a molécula de C3b se torna disponível a uma nova ligação com fator B (formação de C3b-Bb). Com a ligação de mais uma molécula de C3b, temos a formação da C5 convertase da via alternativa (C3b-Bb-C3b). Com isso temos a ativação C5-C9, por ligações moleculares, que culmina com a formação do complexo de ataque à membrana (Ricklin et al., 2010).

A via das lectinas, assim como a via clássica, é dependente de íons cálcio, e é ativada a partir do reconhecimento de carboidratos complexos por proteínas MBL (do inglês “mannose binding lectin”). A ligação de MBL aos carboidratos complexos é capaz de ativar as proteases denominadas MASP ligadas às MBL, as quais são responsáveis pela clivagem de C2 e C4, formando uma convertase semelhante à C3 convertase presente na via clássica do complemento (Ricklin et al., 2010) (Figura 16).

A presença de inibidores do sistema complemento é de extrema importância para o sucesso na alimentação e sobrevivência de artrópodes hematófagos. Esses inibidores, que podem ser tanto intestinais quanto salivares, são importantes para a inativação do complemento que permanece ativo por horas no sangue ingerido. A ativação do complemento no intestino de artrópodes hematófagos é potencialmente perigosa para os enterócitos, que se caracterizam por ser uma camada única de células (Saab et al., 2020). Atividade anticomplemento já foi descrita em vários artrópodes como *L. longipalpis*, *A.*

aegypti, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles aquasalis* e *Amblyomma cajennense* e outras espécies (Cavalcante et al., 2003; Ferreira et al., 2016; Franco et al., 2016; Lara, 2020; Lawrie et al., 1999, 2005; Mendes-Sousa et al., 2018; Pereira-Filho et al., 2020; JoséM M.C. Ribeiro, 1987; Saab et al., 2020).

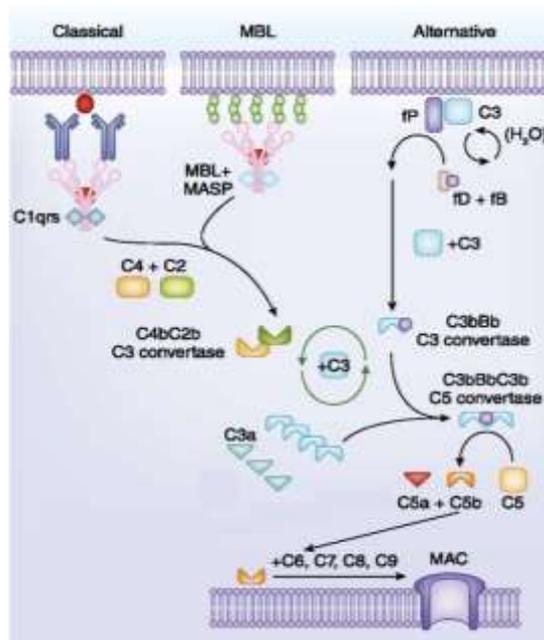


Figura 16. Cascata de ativação do Sistema Complemento. Três vias de ativação do Sistema Complemento Humano. Resumidamente temos: via clássica do complemento, que possui ativação dependente de complexo antígeno-anticorpo; via alternativa é ativada a partir da hidrólise espontânea de C3; e via das lectinas que é ativada a partir do reconhecimento de carboidratos complexos por proteínas MBL (do inglês “mannose binding lectin”). Adaptado de Mathern & Heeger, 2015.

2. JUSTIFICATIVA

Clogmia albipunctata é um inseto com alto grau de sinantropia, sendo apontado em diversos estudos como vetor mecânico de bactérias e helmintos (Faulde & Spiesberger, 2012, 2013; Rupprecht et al., 2020) e suas larvas são apontadas como possíveis causadoras de miíases no trato geniturinário (El-Badry et al., 2014; El-Dib et al., 2017, 2020; Gökçe, 2020; Hjaija et al., 2018; Mokhtar et al., 2016). Por apresentarem ciclo de vida rápido (Forattini, 1973; Jiménez-Guri et al., 2014), tais insetos vêm ganhando destaque como modelo de estudo para evolução e desenvolvimento de artrópodes (Crombach et al., 2014; Janssens et al., 2014).

A espoliação sanguínea, o incômodo ocasionado pelas picadas e o potencial vetorial dos insetos hematófagos representam um grande problema de saúde pública, principalmente quando leva-se em consideração os altos índices populacionais de alguns insetos, sejam parasitos de associação temporária ou duradoura (Adams, 1999).

É sabido que insetos hematófagos possuem controle sofisticado de sua fisiologia intestinal, fato relacionado com sua capacidade de lidar diretamente com a de digestão do sangue ingerido, bem como com fatores secundários provenientes dessa digestão, como o estresse oxidativo.

Uma adaptação evolutiva pode ser vista sob duas diferentes perspectivas: a primeira é chamada de adaptação propriamente dita, e tem relação com uma característica moldada sob determinada pressão seletiva para sua atual função; a segunda diz respeito a uma característica previamente moldada pela seleção natural, mas que desempenha um papel diferente daquele para o qual ela foi selecionada. Essa segunda perspectiva é definida como exaptação (Gould & Vrba, 1982). A hematofagia surgiu independentemente diversas vezes dentro dos Diptera, fato que gera curiosidade sobre quais seriam os mecanismos e os passos evolutivos que possibilitaram diverso número de surgimentos independentes.

A lei da parcimônia evolutiva diz que o curso da evolução sempre segue o caminho que necessita de um menor número de passos para o estabelecimento de um caráter (Sober, 1983). Portanto, quando a pressão evolutiva atua sobre uma característica já presente em um organismo, coaptando esta característica para uma nova função, é de se esperar que o “esforço” evolutivo seja menor do que aquele empregado para a seleção de uma nova característica.

Uma vez que *C. albipunctata* pertence ao grupo irmão dos insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, e por não realizarem hematofagia, tais insetos mostram-se um excelente modelo para o estudo de exaptações relacionadas com a alimentação de sangue. Por ter surgido várias vezes e de forma independente dentro de “Nematocera”, a hematofagia parece estar diretamente relacionada a exaptações, tanto morfológicas quanto fisiológicas, isso porque determinadas características já presentes nos ancestrais não-hematófagos possivelmente atuaram como facilitadores do processo, uma vez que a pressão evolutiva para modificar uma característica já existente e bem estabelecida, é bem menor do que aquela necessária para o estabelecimento de um novo caráter.

Destaca-se ainda o fato de que existem poucos estudos que tem por modelo *C. albipunctata*, o que abre portas para estudos descritivos desse organismo. O estudo de características diretamente relacionadas com a hematofagia permitirá que projetos que visem estratégias de controle sejam futuramente desenvolvidos, a grande inovação de tais estratégias será sua especificidade, uma vez que serão direcionadas somente aos insetos hematófagos, com destaque para os vetores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar e analisar aspectos da fisiologia intestinal de *Clogmia albipunctata* que se relacionem com aqueles já descritos para outros insetos hematófagos, identificando características de cunho exaptativo, de modo a esclarecer aspectos da adaptação à hematofagia.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar e descrever comparativamente a morfologia do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, bem como de machos e fêmeas das espécies hematófagas: *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

-Determinar o pH intestinal de machos e fêmeas do inseto não-hematófago *C. albipunctata* por meio de alimentação com corantes indicadores.

-Determinar a resposta fisiológica de *C. albipunctata* no que diz respeito ao pH intestinal, quando submetido à alimentação rica em proteínas.

- Comparar a atividade tripsinolítica intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata* submetidos a diferentes tipos de alimentação.

- Comparar a atividade de catalase no intestino médio de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, estabelecendo comparações entre machos e fêmeas de cada uma das espécies citadas.

- Comparar a atividade de α -glicosidases no intestino médio de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, estabelecendo comparações entre machos e fêmeas de cada uma das espécies citadas.

- Investigar a capacidade de inibição da cascata do complemento por conteúdo intestinal de *C. albipunctata*.

- Investigar o genoma de *C. albipunctata* a procura de proteínas sabidamente relacionadas à hematofagia, estabelecendo comparações filogenéticas com base em sequências ortólogas.

4. METODOLOGIA

4.1 Material Biológico

Os insetos da espécie *C. albipunctata* utilizados foram coletados em Belo Horizonte - MG e obtidos a partir da colônia mantida em insetário no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – ICB/UFMG, sendo criados em condições controladas de temperatura e umidade, com período claro-escuro de 12 horas. Em todos os experimentos realizados, os insetos adultos apresentavam idade de 2 a 5 dias.

Em sua fase larval, os insetos foram alimentados com restos de ração animal Presence[®] para camundongos. Na medida em que emergiam da fase de pupa, os adultos eram transferidos para gaiolas de pano como as utilizadas para criação de flebotomíneos (Modi & Tesh, 1983), sendo alimentados com solução de sacarose 30%.

Os flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram obtidos de uma colônia originada da cidade de Teresina (PI), mantidos de acordo com Modi & Tesh, (1983) no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos de maneira semelhante ao descrito para *C. albipunctata*.

Os mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foram também mantidos em insetário no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos em condições semelhantes às descritas para os organismos anteriormente mencionados. Os mosquitos *A. aegypti* eram pertencentes à linhagem Rockefeller, e *C. quinquefasciatus* foram provenientes de população de campo das cidades de Belo Horizonte (MG) e Betim (MG). Ambas as espécies foram mantidas em gaiolas de plástico teladas na porção superior e mantidos à 27°C em umidade relativa de 75%. Os insetos foram alimentados em algodão embebido com solução de sacarose a 10%, sendo o repasto sanguíneo realizado em Hamsters previamente anestesiados com 0,2 mL de Thiopental[®] (50 mg/mL), para *A. aegypti* e sangue heparinizado em algodão para *C. quinquefasciatus*.

4.2 Determinação do pH intestinal de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*

Insetos adultos, machos e fêmeas, foram alimentados em algodão embebido em solução de sacarose 30% contendo corante indicador vital, por um período de 24h horas (antes do período de alimentação os insetos foram submetidos a jejum de 24h).

Os corantes utilizados foram Azul de Bromotimol ($pK_a = 7,4$) e Púrpura de Bromocresol ($pK_a = 6,3$), ambos na concentração de 0,1%, sendo o valor final de pH ajustado de acordo com cada experimento. Para determinação do pH intestinal utilizando o corante Azul de Bromotimol, o valor final de pH da solução foi ajustado para 7,4. Já para o corante Púrpura de Bromocresol, o valor final de pH da solução foi ajustado para 6,5.

Passado o tempo de alimentação, os insetos foram dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico e a coloração adquirida pela região do intestino médio comparada com escala padrão de cada um dos corantes (Figura 17). Nenhuma das soluções de sacarose oferecidas foram tamponadas.

Os resultados foram lançados separadamente para machos e fêmeas alimentados com cada um dos corantes em faixas que variavam em 0,5 unidades de pH.



Figura 17 – Padrão de cores para os corantes Azul de Bromotimol e Púrpura de Bromocresol em diferentes valores de pH. Em A, soluções tamponadas padrão de Azul de Bromotimol (0,1%) com valores de pH de 6 – 8. Em B, soluções tamponadas padrão de Púrpura de Bromocresol (0,1%) com valores de pH de 5 – 7. Em C, soluções padrão do corante Azul de Bromotimol (0,1%) em soro humano, valores de pH de 6 – 8.

4.3 Análise da atividade de manutenção do pH intestinal em machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*

A fim de verificarmos se os valores de pH encontrados para machos e fêmeas de *C. albipunctata* são controlados de forma ativa pelo inseto, grupos de machos e fêmeas foram alimentados por 24h com sacarose 30% contendo o corante Azul de Bromotimol

(pKa = 7,4) na concentração de 0,1%, contendo solução tampão HEPES na concentração final de 30 mM. O pH final da solução foi ajustado para 7,5.

Passado o tempo de alimentação, assim como descrito anteriormente, os insetos foram dissecados e a coloração adquirida pela região do intestino médio comparada com as soluções padrão (Figura 17).

4.4 Determinação do pH intestinal de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* alimentados com soro humano

Para determinação do valor de pH do intestino médio de machos e fêmeas quanto submetidos à alimentação rica em proteínas, grupos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* foram alimentados por 24 horas em algodão embebido com soro humano inativado (inativação por calor, 56 °C por 30 minutos) acrescido do corante indicador Azul de Bromotimol (pKa = 7,4) na concentração de 0,1%.

O valor final de pH da solução foi ajustado para 6. Como descrito anteriormente, os insetos foram dissecados, a região do intestino médio obtida e sua coloração comparada com escala padrão (Figura 17).

Devido ao fato de que ocorre interação entre proteínas do soro e o corante indicador Azul de Bromotimol, alterando parcialmente a cor observada, montamos nova escala padrão para que se pudesse realizar a comparação (Figura 17C).

4.5 Efeito da hemolinfa de *Lutzomyia longipalpis* em intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*

Como um dos mecanismos envolvidos na alcalinização intestinal de *L. longipalpis* e *A. aegypti* envolve a liberação de moléculas induzidas pelo repasto sanguíneo na hemolinfa dos insetos, resolvemos testar a resposta de machos e fêmeas de *C. albipunctata* à hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas ou não alimentadas com sangue.

Para obtenção da hemolinfa a ser utilizada, três fêmeas de *L. longipalpis* de 4 a 5 dias de idade tiveram seu abdômen aberto em 1 µl de PBS, o volume obtido foi então coletado com uma ponteira, sendo posteriormente aplicado sobre o intestino de *C. albipunctata*.

Foi testada a hemolinfa de fêmeas de flebotomíneos alimentadas com sangue, nas quais a coleta foi feita logo após a alimentação, sendo de 2 horas o tempo máximo pós-alimentação para utilização das fêmeas. Como controle foi utilizada hemolinfa de fêmeas não alimentadas com sangue.

Os intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* alimentados com o corante Azul de Bromotimol em sacarose 30% foram retirados e colocados sobre bloco de agarose 0,5%, de modo a evitar que os mesmos ressecassem. Foram utilizados somente aqueles intestinos que apresentavam coloração inicial que indicasse um $\text{pH} \leq 6$.

4.6 Análise comparativa da morfologia do intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Machos e fêmeas de *C. albipunctata* ($n = 15$), foram dissecados com auxílio de lupa estereoscópica. A região do intestino médio de cada um foi isolada. Os intestinos foram então fotografados e comparados entre si e também com a região do intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

4.7 Comparação da atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* e *Lutzomyia longipalpis*

C. albipunctata com idade entre 2 e 5 dias foram divididos em três grupos, os quais foram submetidos a diferentes dietas: insetos em jejum, alimentados com soro humano inativado (inativação por calor, 56 °C por 30 minutos) e insetos alimentados com sacarose 30%. De forma semelhante, machos e fêmeas de *L. longipalpis*, também com idade entre 2 e 5 dias, foram divididos em dois com diferentes dietas: insetos em jejum e insetos alimentados com sacarose 30%.

Para garantir que somente foram selecionados intestinos de insetos que realmente se alimentaram do tratamento oferecido, a cada 5 mL da solução que compunha a alimentação do grupo (soro humano inativado ou sacarose 30%) foram acrescentados 2 μL de corante para fins alimentícios de cor Azul, do fabricante Arcolor.

Passado o período de alimentação, os insetos foram dissecados em salina 0,9% com auxílio de lupa estereoscópica. Três intestinos de cada grupo foram colocados separadamente em 100 μL de salina 0,9%, sendo posteriormente sonicados em sonicador

de banho por 15 segundos. Em seguida o material foi centrifugado à 10.000 g, à 4°C por 5 minutos.

Para o ensaio enzimático foram utilizados os seguintes reagentes: tampão TRIS-HCl 0,1 M com pH ajustado para 8,5; substrato BApNA na concentração final de 1 mM; salina 0,9%; e amostra do extrato de intestino (equivalentes a 1,5 intestinos). A leitura foi realizada em leitor de ELISA à 410 nm, 30°C em modo cinético com leituras a cada 30 segundos durante 30 minutos. A placa foi agitada por 5 segundos antes da primeira leitura. A atividade foi expressa como a quantidade de produto (*p*-Nitro-anilida) liberado por minuto no início da reação período no qual a enzima atinge a sua velocidade máxima.

4.8 Comparação da atividade de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

A catalase intestinal foi ensaiada medindo-se a taxa de queda da absorvância do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), composto este que absorve luz de comprimento de onda de 240 nm.

O ensaio foi realizado em espectrofotômetro em modo cinético de leitura na temperatura de 30°C. Na medida em que a água oxigenada foi sendo degradada pela enzima catalase, uma queda proporcional foi observada na absorvância.

Os intestinos médios de machos e fêmeas (n = 8) foram dissecados em salina 0,9%, sendo posteriormente colocados, separadamente, em tubos contendo 200 µL de Tampão Fosfato de Potássio [50 mM] e pH 7. Em seguida o material foi sonicado em sonicador de banho por cerca de 20 segundos. Ao final foi realizada análise de cinética enzimática em espectrofotômetro à 240 nm, à 30 °C por um período de tempo de 2 min.

Cem µL de amostra, equivalentes a 4 intestinos, foram misturados a 900 µL de substrato (peróxido de hidrogênio misturado ao tampão fosfato com absorvância inicial entre 0,520 e 0,550) dentro de uma cubeta de 1 mL em espectrofotômetro Shimadzu com temperatura de 30 °C. A absorvância foi medida em intervalos de 5 segundos no módulo cinético, o que possibilitou o cálculo da taxa de queda de absorvância ao longo dos 2 minutos de leitura.

A atividade da catalase foi expressa em micromoles de peróxido de hidrogênio degradados por minuto por intestino (uma unidade de atividade – U corresponde a quantidade de enzima capaz de degradar 1 µmol de peróxido de hidrogênio por minuto

por intestino). A concentração do peróxido de hidrogênio foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar de $39,4.M^{-1}.cm^{-1}$ (Aebi, 1984).

Uma vez que alguns materiais podem degradar não enzimaticamente o peróxido de hidrogênio, essa degradação foi avaliada no extrato de intestino fazendo ensaio da catalase na presença de um inibidor específico da enzima. O inibidor 3-amino-1,2,4-triazole foi utilizado na concentração final de 10 mM. A degradação do peróxido de hidrogênio medida neste controle foi subtraída da degradação total medida na ausência do inibidor.

4.9 Comparação da atividade de α -glicosidases no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

As α -glicosidases intestinais foram ensaiadas medindo-se a formação do produto p -Nitrofenol a partir da quebra do substrato p -Nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo. Foram utilizados machos e fêmeas de *C. albipunctata* com idade entre 2 e 5 dias de vida. Os insetos foram dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico para retirada do intestino médio dos mesmos. A avaliação da atividade de α -glicosidases de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, seguiram os mesmos parâmetros utilizados para a avaliação em *C. albipunctata*. Para os ensaios de avaliação da atividade de α -glicosidases em diferentes regiões do intestino médio, os intestinos dissecados foram divididos seguindo divisão anatômica: intestino médio torácico e intestino médio abdominal, no caso de fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Como não existe diferença morfológica que permita a distinção entre o intestino médio torácico e intestino médio abdominal nos machos e fêmeas *C. albipunctata* e nos machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e, consideramos como intestino médio torácico a primeira metade do intestino médio e como intestino médio abdominal, a segunda metade do intestino médio desses organismos.

Para o ensaio enzimático foram utilizados os seguintes reagentes: tampão MES 0,25 mol/L com pH ajustado para 6,0; tampão Glicina 0,375 mol/L com pH ajustado para 10,5; substrato p -nitrofenol- α -D-glicopiranosídeo na concentração final de 5 mM; salina 0,9%; TRITON X-100 1%; e amostra do extrato de intestino (equivalentes a 0,1 intestino). A leitura foi realizada em leitor de ELISA à 400 nm, 30°C com leitura única.

Para cada grupo ensaiado foram feitos “pools” de 2 intestinos, os quais eram colocados em 200 μ L de salina 0,9% contendo 2 μ L de Triton X-100. Os tubos contendo os intestinos foram então sonicados em sonificador de banho por 15 segundos, sendo posteriormente centrifugados por 5 minutos a 10.000 G em centrífuga refrigerada à 4 °C.

A reação foi preparada acrescentando-se em placa de poços destinada ao teste os seguintes reagentes, nas seguintes quantidades: 50 μ L de p-nitrofenol- α -D-glicopiranosídeo; 20 μ L de tampão MES e 10 μ L de H₂O destilada.

Para realização do ensaio, foram acrescentados 20 μ L de cada amostra aos seus respectivos poços (para o grupo controle foram acrescentados 20 μ L de H₂O no lugar da amostra de intestinos). A placa foi então encubada por 30 minutos à 30 °C. Passado o tempo de incubação, 100 μ L de tampão Glicina foram acrescentados a cada poço a fim de parar a reação.

A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA à 400 nm em modo “Endpoint” com 200 μ L de cada amostra.

4.10 Investigação da capacidade inibitória do sistema complemento humano por conteúdo intestinal de *Clogmia albipunctata*

Modificado de Cavalcante et al., 2003. Para os testes de hemólise pela via clássica foram coletados 10 ml de sangue de carneiro mantidos a 4°C em solução conservadora (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8%, NaCl 0,42% e ácido cítrico 0,05%) na proporção de 1:1.

Para utilização das hemácias, 500 μ L do sangue foram lavados três vezes com 5 mL de solução GHB-EDTA (HEPES 5mM, NaCl 145mM, EDTA 10mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) por centrifugação à 490 G por 5 minutos à 4°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 3 mL de GHB-EDTA, opsonizadas com anticorpo anti-hemácias de carneiro produzido em coelho (SIGMA®) na proporção de 1:1000 durante incubação à 37°C por 30 minutos sob leve agitação.

Após a sensibilização, as células foram lavadas uma vez com solução GHB-EDTA e, em seguida, duas vezes com solução GHB²⁺ (HEPES 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 0,15mM, MgCl₂ 0,5mM e gelatina 0,1%, pH 7,4). Após a última lavagem, a concentração das hemácias foi ajustada para 2x10⁸ células/mL.

Nos testes, 12,5 µL do conteúdo intestinal foram adicionados a 25 µL de soro diluído em tubos. Os soros foram diluídos em solução GHB²⁺ o suficiente para lisar cerca de 90% das hemácias. O soro humano foi utilizado na diluição 1:60. Em seguida, foram adicionados 25 µL de solução de hemácias opsonizadas e os tubos foram então incubados à 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 250 µL de salina gelada foram acrescentados a cada tubo interrompendo a reação de hemólise. Após centrifugação à 1700 G por 30 segundos, 200 µL foram transferidos do sobrenadante para uma placa de 96 poços, para ser lida em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark®) à 415 nm.

Para cada teste, três controles foram utilizados: i) hemólise total, no qual foram acrescentados 250 µL de água destilada fria após a incubação; ii) hemólise espontânea, no qual não havia adição de soro; iii) hemólise pelo complemento (controle positivo), no qual foi acrescentado soro.

4.11 Busca das sequências ortólogas por tBLASTn

As buscas de sequências ortólogas foram realizadas com base no genoma de *C. albipunctata* depositado no NCBI sob o número de identidade 38294 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Clogmia+albipunctata>).

De *L. longipalpis* foram utilizadas as sequências de tripsinas L1tryp1, L1tryp2, catalase. De *A. aegypti* foi utilizada a sequência da enzima 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase (4 – HPPD). Essas sequências foram utilizadas como *query* numa busca por sequências ortólogas de nucleotídeos utilizando a ferramenta tBLASTn contra a base de dados contendo o genoma de *C. albipunctata*. Os parâmetros do tBLASTn não foram alterados durante as buscas.

Na seleção dos resultados foram utilizados os seguintes parâmetros:

i) Porcentagem de identidade. Que representa a porcentagem de similaridade entre seu molde e aquilo que se procura. Foram selecionadas somente sequências que se destacaram por apresentar porcentagem de identidade alta quando comparadas com os demais resultados. As sequências obtidas com o tBLASTn foram ainda utilizadas num BLASTx para averiguar se a proteína retornada foi a mesma utilizada no tBLASTn inicial. Procedimento este conhecido como BLAST recíproco, sendo comumente utilizado na obtenção mais precisa de sequências ortólogas.

ii) Tamanho dos *scaffolds* retornados. Característica esta que forneceu pistas com relação a localização dos genes dentro dos cromossomos de *C. albipunctata*.

iii) Padrão de distribuição dos *scaffolds*. Que permitiu identificar regiões do genoma que não foram amostradas durante o sequenciamento. A identificação desse padrão permite a inferência de ortólogos que não foram identificados devido a falha amostral.

A partir dos *scaffolds* selecionadas, foi montada uma sequência única, a qual foi utilizada nas análises posteriores. Como proteína molde foi utilizada a mesma proteína utilizada no tBLASTn, e como sequência de nucleotídeos, foi fornecida a sequência montada a partir dos *scaffolds*.

Os parâmetros originais do GeneWise foram mantidos (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>). Os resultados do GeneWise foram arquivados em formato.txt. A partir dos resultados do GeneWise foi obtida então a estrutura putativa dos genes, a sequência de aminoácidos da proteína mais provável e o cDNA do referente gene.

Foi realizada análise filogenética dos genes selecionados para *C. albipunctata* e outros insetos hematófagos, esta análise filogenética forneceu uma ideia do curso evolutivo e da associação entre ortólogos dentro da filogenia dos Diptera. Além disso, a presente análise permitiu uma distinção entre genes parálogos e aqueles que podem realmente ser considerados ortólogos.

A árvore filogenética foi construída por *Neighbor-Joining* com correção de Poisson e deleção completa, pelo programa MEGA4.0 (Tamura et. al, 2007).

As análises das relações filogenéticas entre as proteínas selecionadas e comparadas foram confirmadas a partir da correção de Poisson, sendo aplicado teste de “Bootstrap” com 5000 repetições.

4.12 Análises Estatísticas

Nos resultados referentes aos ensaios das enzimas tripsina, catalase e α -glicosidase, bem como nos ensaios hemolíticos de bloqueio da cascata do complemento, foram realizados testes t-student e Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, sendo consideradas significativas diferenças com valor $p < 0,05$. Para análise das diferenças existentes entre os grupos dos ensaios de alcalinização intestinal de machos e fêmeas de

C. albipunctata após alimentação com SHI e para verificação da atividade da hemolinfa de *L. longipalpis* em intestino médio de *C. albipunctata*, foi realizado teste de proporção de Fisher, sendo consideradas significativas diferenças com valor $P < 0,05$

5. RESULTADOS

5.1 Não existe diferença entre o intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*.

Nossas observações mostraram que a região do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata* não apresentam diferenças morfológicas observáveis ao microscópio estereoscópico (Figuras 18 e 19).

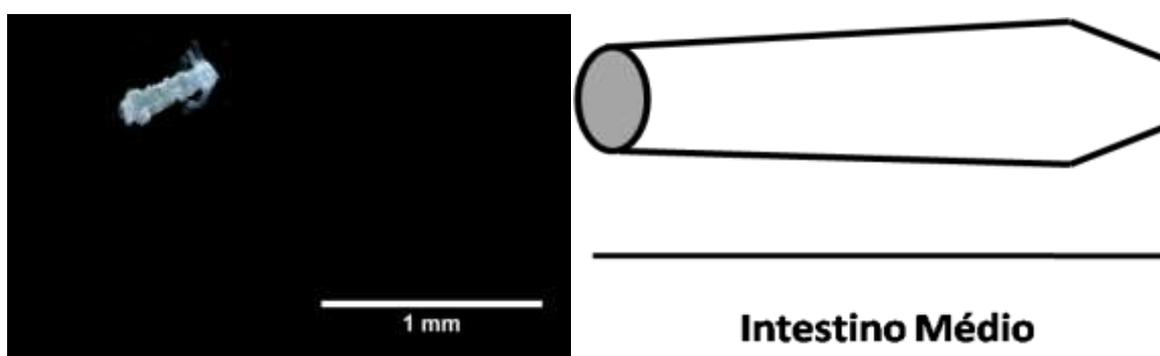


Figura 18. Intestino médio de fêmeas de *Clogmia albipunctata*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de *Clogmia albipunctata*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

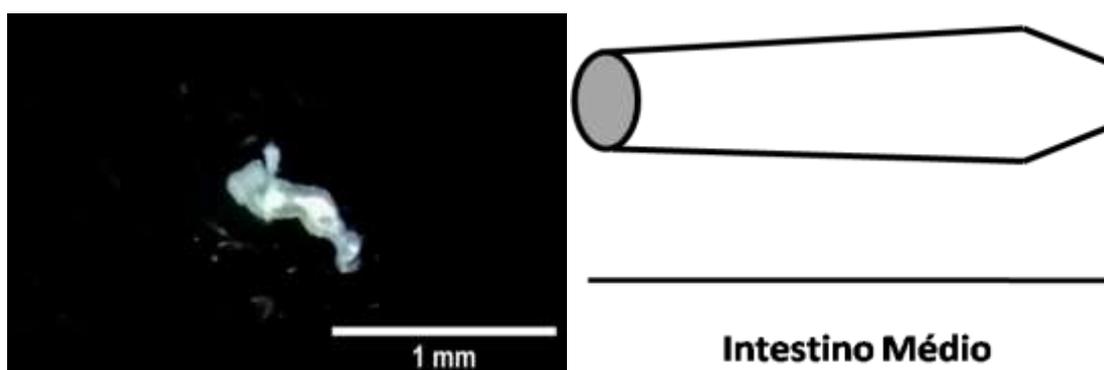


Figura 19. Intestino médio de machos de *Clogmia albipunctata*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de *Clogmia albipunctata*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

Contudo, quando observamos a região do intestino médio de espécies hematófagas, como *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, ficou evidente a grande diferença morfológica entre o intestino médio de machos e fêmeas dessas espécies. Como já descrito para fêmeas dessas espécies, os intestinos se mostraram divididos em duas porções: uma primeira porção fina e tubular, chamada de intestino médio torácico; e uma porção larga e dilatada, chamada de intestino médio abdominal (Figuras 20, 22 e 24).

A morfologia do intestino médio dos machos dessas espécies, que ainda não havia sido descrita, é caracterizada pela ausência da diferenciação observada entre as fêmeas, apresentando-se fino e tubular ao longo de toda sua extensão (Figuras 21, 23 e 25).

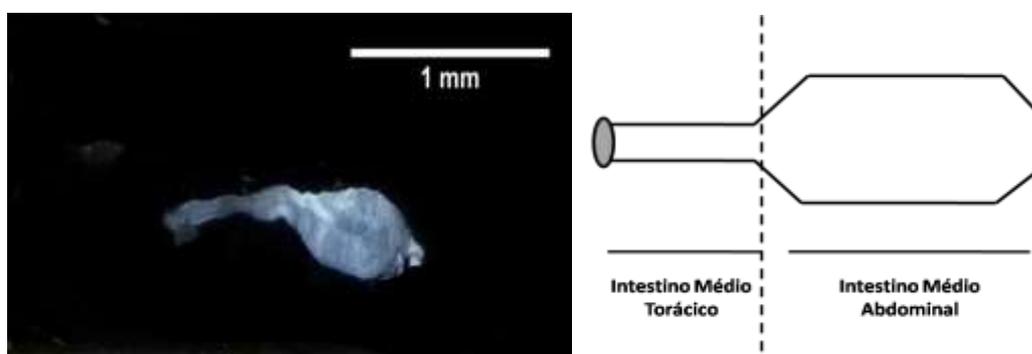


Figura 20. Intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

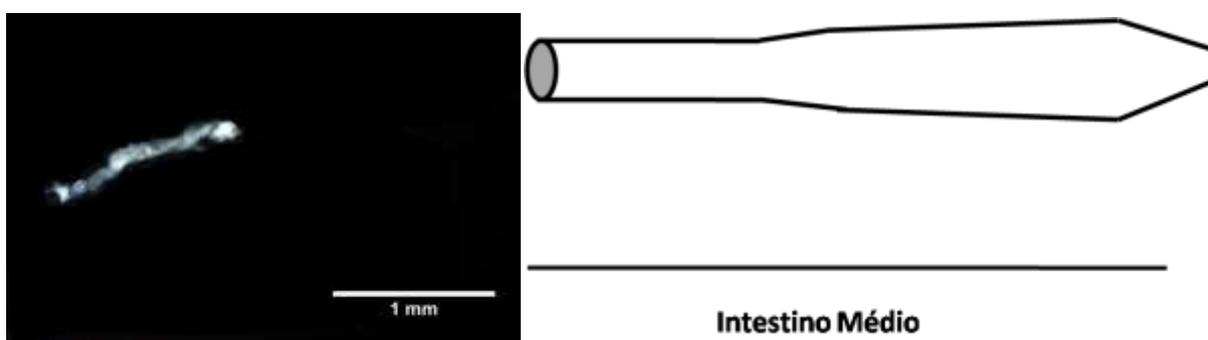


Figura 21. Intestino médio de machos de *Lutzomyia longipalpis*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de *Lutzomyia longipalpis*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

É curioso notar que o intestino dos machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, por não apresentarem divisões ao longo de sua extensão, são semelhantes ao intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Ressalta-se o fato de que, os machos das espécies hematófagas citadas não realizam a hematofagia em nenhum momento de suas vidas, assim como os machos e fêmeas de *C. albipunctata*.

Destaca-se ainda o fato de que, para a região do intestino médio de machos de *C. quinquefasciatus*, foram observados dois padrões morfológicos (Figuras 25 e 26). O primeiro deles é semelhante ao observado para machos e fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Figura 25), já o segundo padrão observado, mostra-se como um estado de transição entre a morfologia encontrada entre os intestinos médios de fêmeas e machos das espécies hematófagas (Figura 26), apresentando longo, fino e tubular na maior parte de sua extensão, porém com pequena dilatação em sua porção final.

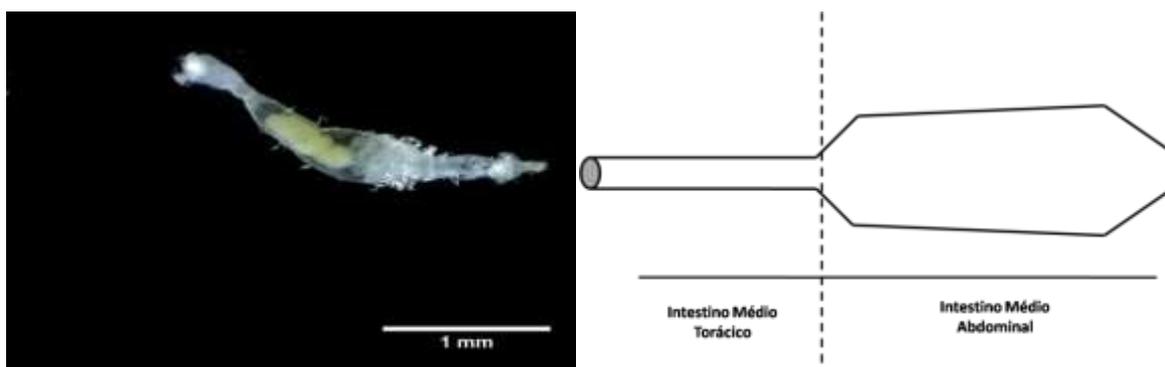


Figura 22. Intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

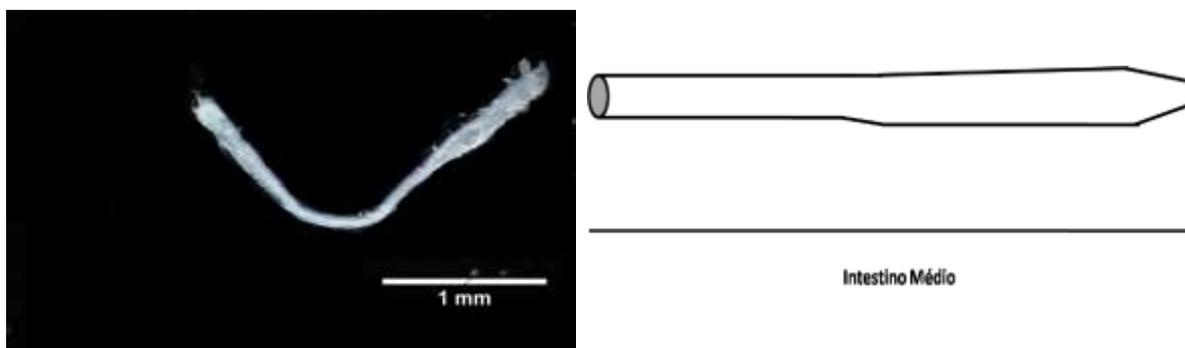


Figura 23. Intestino médio de machos de *Aedes aegypti*. À esquerda, fotográfica do intestino médio de machos de *Aedes aegypti*; à direita, esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

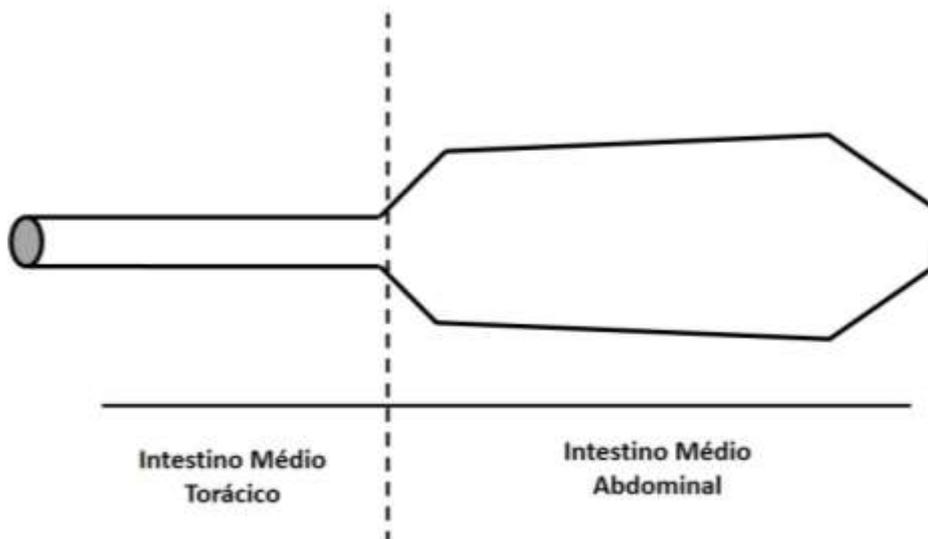


Figura 24. Intestino médio de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. Esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

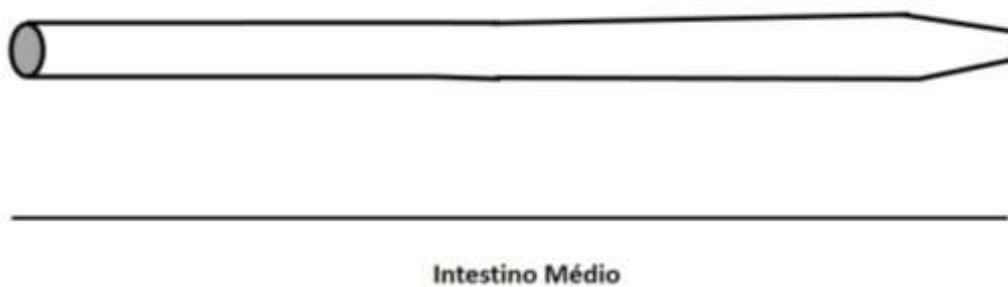


Figura 25. Intestino médio de machos de *Culex quinquefasciatus*. Esquema ilustrativo do mesmo intestino médio.

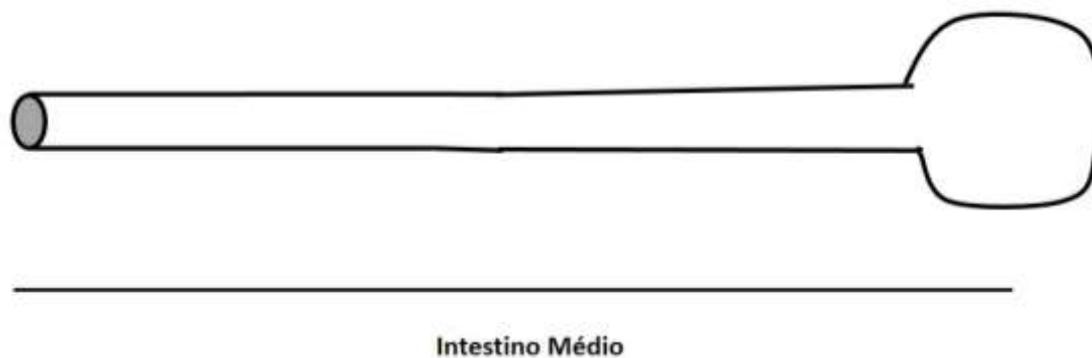
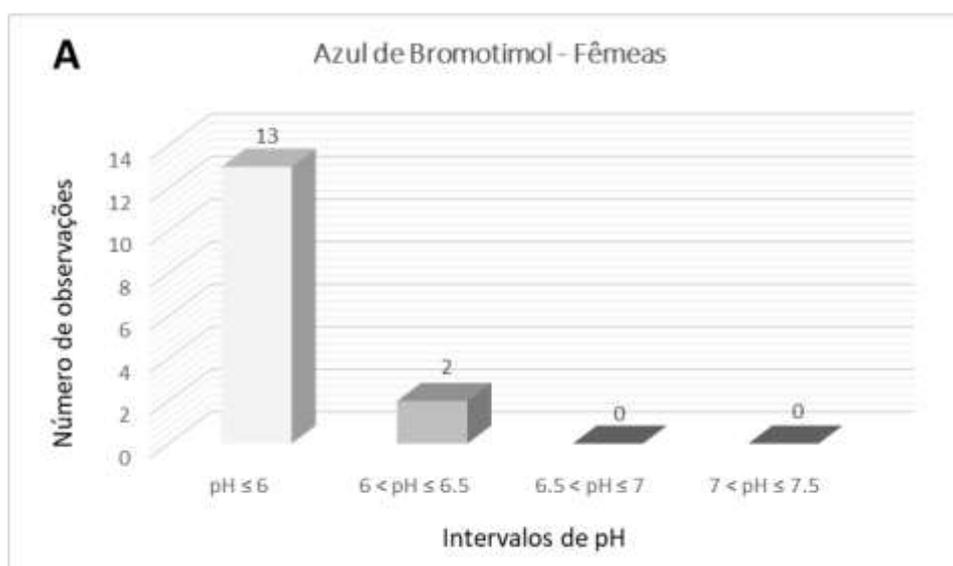


Figura 26. Intestino médio de machos de *Culex quinquefasciatus*. Esquema ilustrativo mostrando o formato do intestino médio.

5.2 pH da região do intestino médio de machos e fêmeas é ácido (~ 6,0)

Quando alimentados com os corantes Azul de Bromotimol, com $pK_a = 7,4$ e Púrpura de Bromocresol, que possui um valor de $pK_a = 6,3$, observamos que, tanto em intestinos de machos quanto em intestinos de fêmeas, a coloração adquirida indicou um pH intestinal ácido, por volta de pH 6,0 (Figuras 27 e 28). Tal valor se assemelha àqueles encontrados para alguns insetos hematófagos como *L. longipalpis* e *A. aegypti*, como descrito, respectivamente, por Santos et al, 2008 e Nepomuceno et al, 2017.



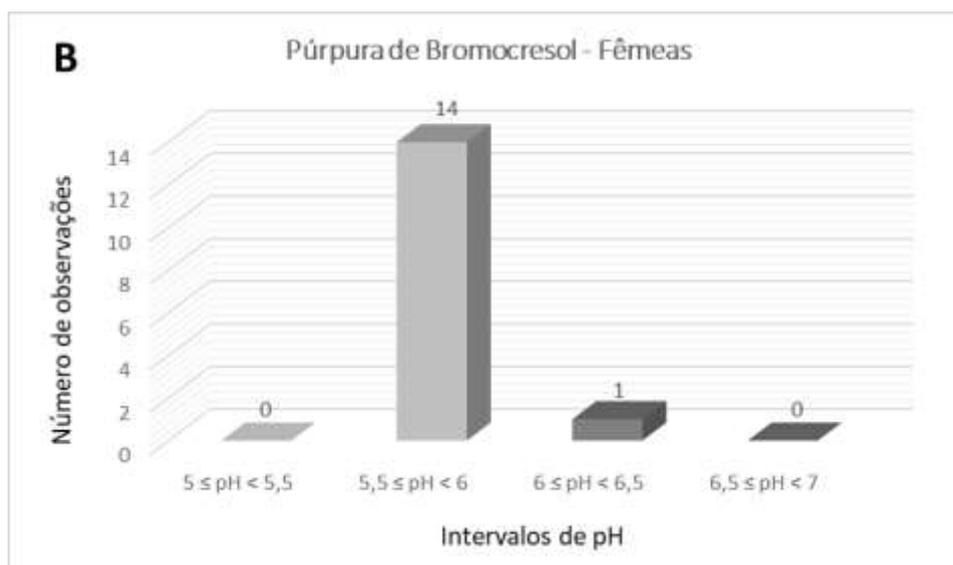
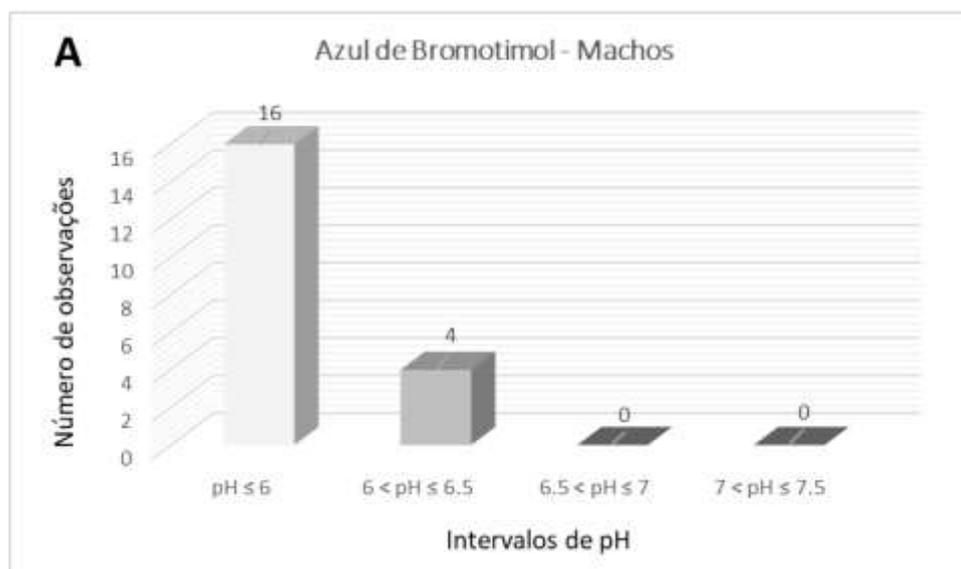


Figura 27. pH intestinal de fêmeas de *Clogmia albipunctata*. Número de observações por faixa de pH. Em **A** insetos alimentados com o corante Azul de Bromotimol [0,1%] em sacarose 30%; em **B** insetos alimentados com o corante Púrpura de Bromocresol [0,1%] em sacarose 30%. pH referente a região do intestino médio dos insetos.



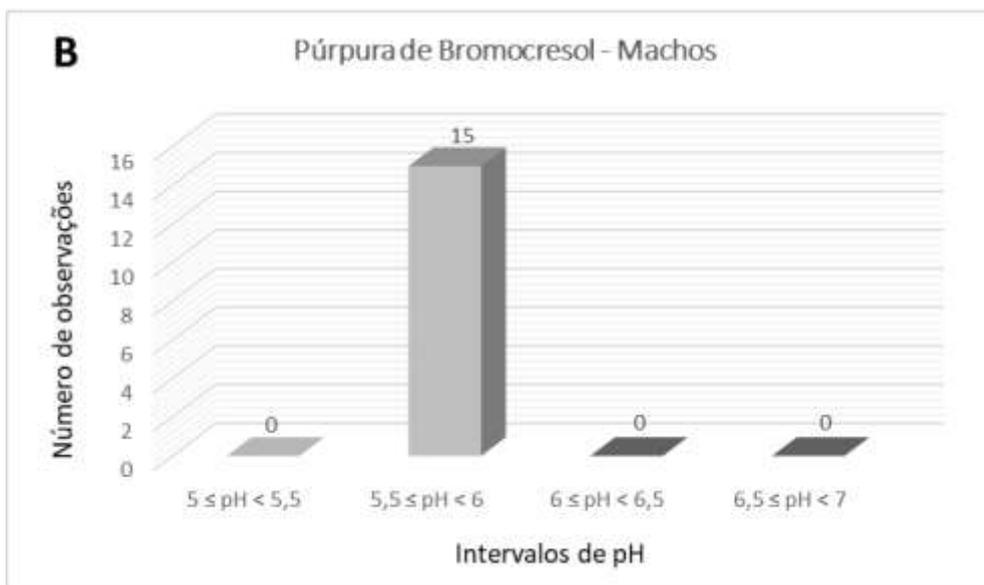
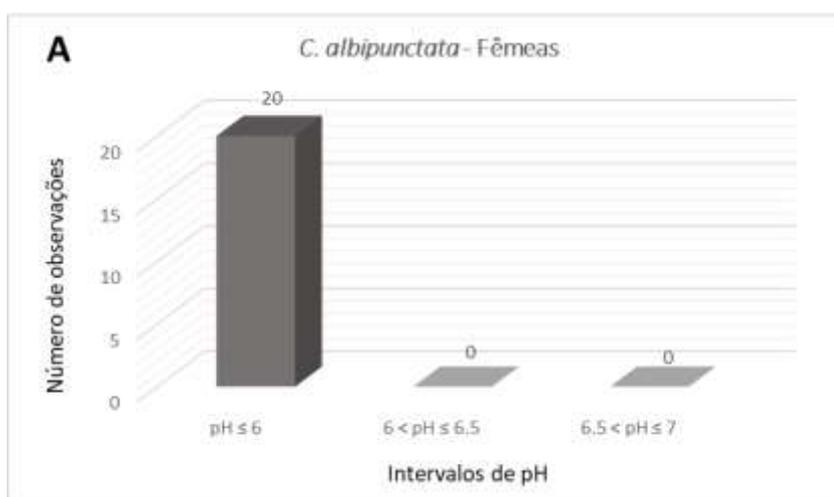


Figura 28. pH intestinal de machos de *Clogmia albipunctata*. Número de observações por faixa de pH. Em **A** insetos alimentados com o corante Azul de Bromotimol [0,1%] em sacarose 30%; em **B** insetos alimentados com o corante Púrpura de Bromocresol [0,1%] em sacarose 30%. pH referente a região do intestino médio dos insetos.

5.3 pH intestinal é mantido ácido de forma ativa

Machos e fêmeas de *C. albipunctata* são capazes de controlar de forma ativa seu pH intestinal, mantendo seu valor próximo de pH 6,0. Isso ficou evidente quando observamos que quando alimentados com o corante Azul de Bromotimol em solução de sacarose 30% tamponada com HEPES 30 mM e com valor de pH final ajustado para 7,5, todas as fêmeas e a maior parte dos machos foram capazes de acidificar a solução em seu intestino médio para um valor de $\text{pH} \leq 6$ (Figura 29).



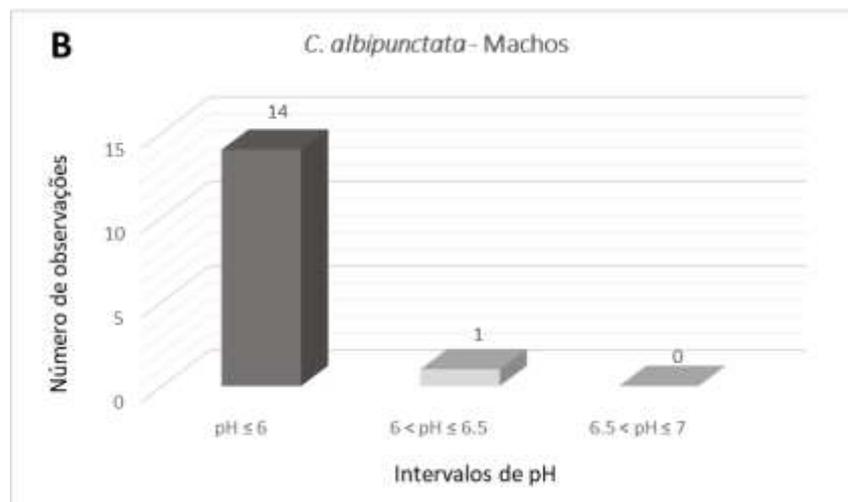


Figura 29. pH intestinal de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* quando alimentados com solução de sacarose 30% tamponada com HEPES [30 mM] acrescida do corante indicador Azul de Bromotimol [0,1%]. Número de observações por faixa de pH. Em A fêmeas de *C. albipunctata*; em B machos de *C. albipunctata*. pH referente a região do intestino médio dos insetos. O pH final da solução foi ajustado para 7,5 antes de ser oferecido aos insetos.

5.4 Insetos alimentados com soro humano inativado aumentam o valor de pH intestinal

Em insetos hematófagos, logo após o repasto sanguíneo, observamos uma elevação do valor de pH intestinal, o que, em grande parte, está relacionado com o processo de digestão do sangue envolvendo diversas enzimas, dentre as quais podemos citar a tripsina, que funciona bem em faixas mais alcalinas de pH.

A fim de verificarmos se tal reposta a uma alimentação rica em proteínas estaria também presente em um inseto não hematófago, alimentamos machos e fêmeas de *C. albipunctata* com solução de soro humano inativado acrescido do corante Azul de Bromotimol, sendo o pH final da solução ajustado para 6,0.

Machos e fêmeas foram capazes de alcalinizar seu pH intestinal frente à alimentação rica em proteínas, mas curiosamente observamos que o processo de alcalinização é mais evidente e eficaz no intestino médio das fêmeas (Figura 30).

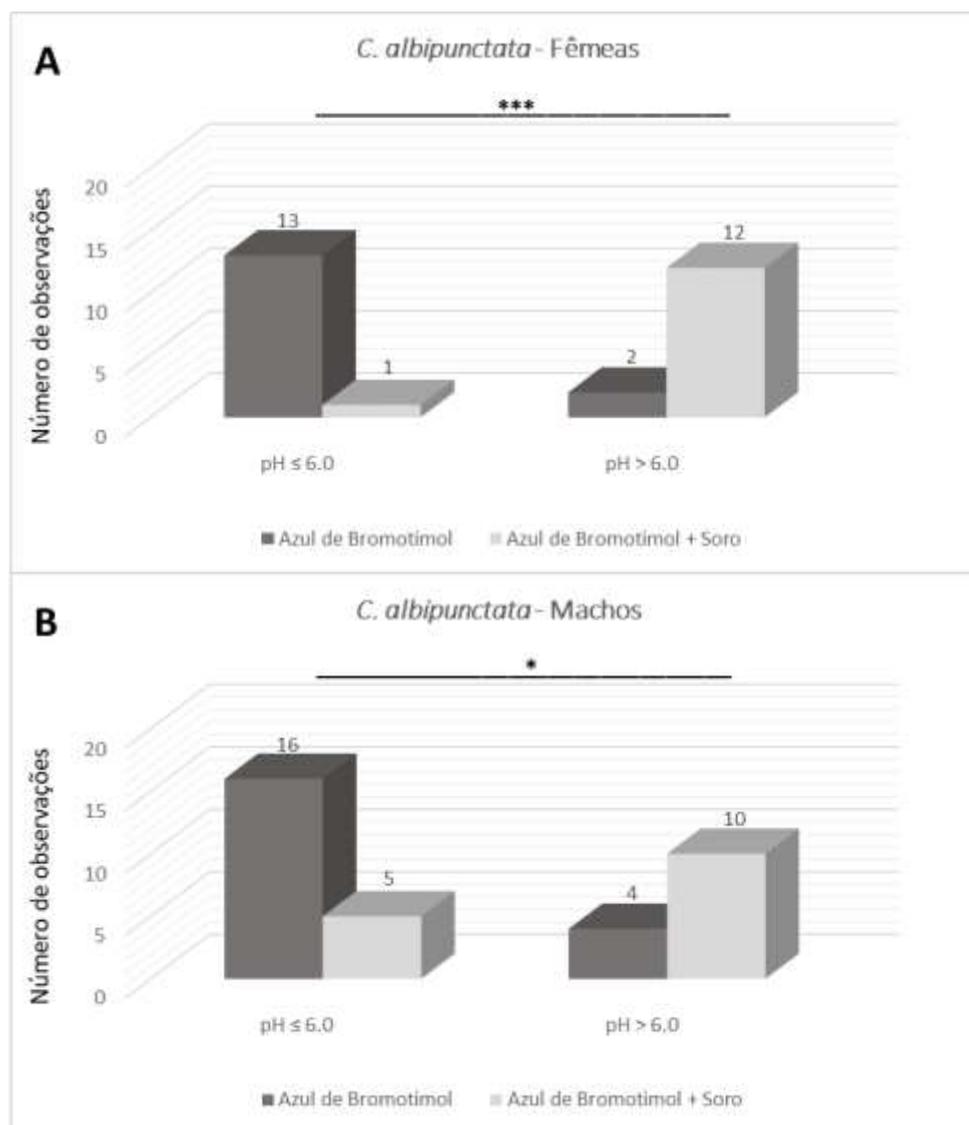


Figura 30. Alcalinização do intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* após alimentação com soro humano inativado (SHI). Em **A**, determinação do pH intestinal de fêmeas após ingestão de solução de sacarose 30% contendo Azul de Bromotimol (0,1%) ou após ingestão de soro humano inativado contendo Azul de Bromotimol (0,1%) com pH final ajustado para 6. Em **B**, resultados obtidos a partir do intestino de machos alimentados com as mesmas soluções descritas para as fêmeas. Foi utilizado o teste de Fisher para analisar as diferenças de proporção entre cada tratamento (***) $p < 0.001$; * $p < 0.013$).

5.5 Somente intestino de fêmeas de *C. albipunctata* sofrem alcalinização do pH intestinal quando tratadas com hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue

Dada nossa observação de que fêmeas de *C. albipunctata* são eficientes em realizar alcalinização intestinal quando submetidas à alimentação rica em proteínas, realizamos ensaio para verificar se os intestinos de *C. albipunctata*, tanto de machos quanto de fêmeas, são responsivos a hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue.

Curiosamente, somente os intestinos de fêmeas de *C. albipunctata* foram responsivos à hemolinfa (Figura 31), o que foi observado pela mudança de coloração do corante no lúmen do intestino médio dos insetos após aplicação da hemolinfa mostrando que ocorreu alcalinização. Quando utilizamos hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue, nenhuma mudança de pH foi observada nos intestinos de *C. albipunctata* (Figura 32).

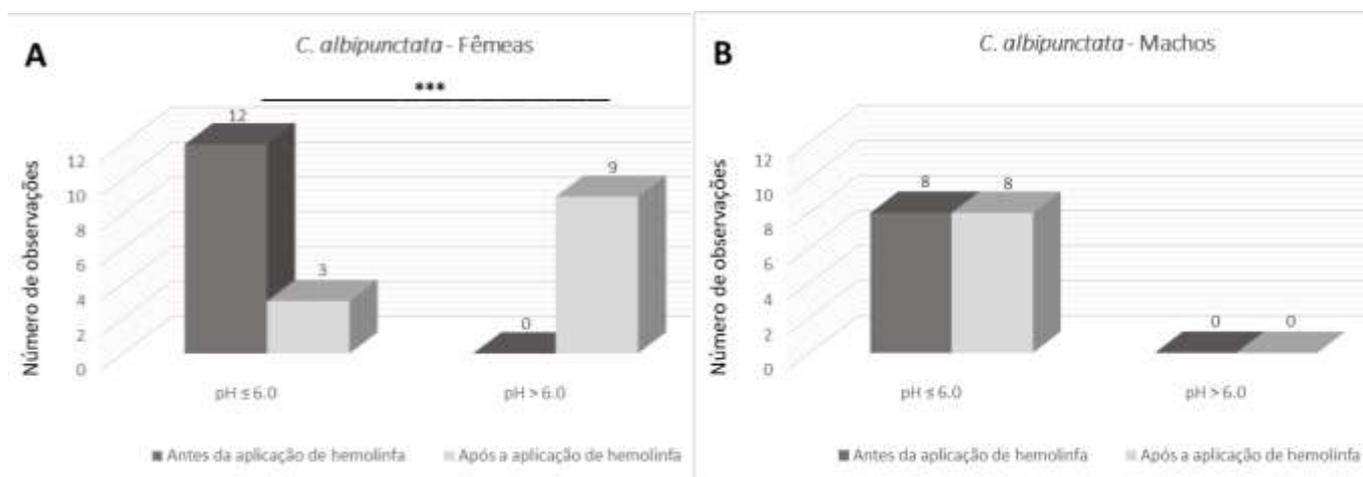


Figura 31. Efeito da aplicação da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue no pH intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Em **A**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de fêmeas de *C. albipunctata* ($P = 0.0003$). Em **B**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de machos de *C. albipunctata* ($P = 1$). As **barras pretas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH antes da aplicação de hemolinfa; as **barras brancas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH após a aplicação da hemolinfa. O número de observações em cada intervalo de pH (N) foi comparado com seu controle utilizando teste de Fisher.

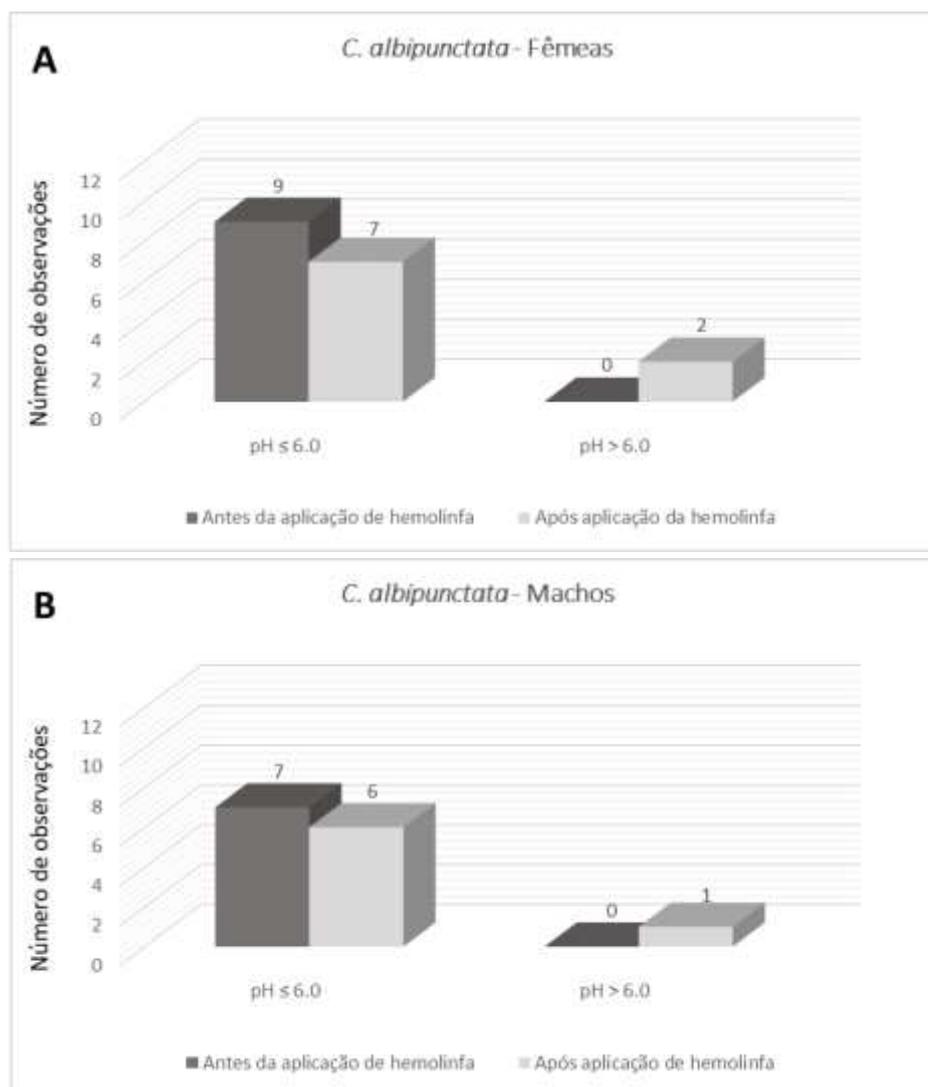


Figura 32. Efeito da aplicação da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não-alimentadas com sangue no pH intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Em **A**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de fêmeas de *C. albipunctata*. Em **B**, efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* não ingurgitadas sobre intestinos com pH ácido de machos de *C. albipunctata*. As **barras pretas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH antes da aplicação de hemolinfa; as **barras brancas** representam o número de intestinos em cada faixa de pH após a aplicação da hemolinfa. O número de observações em cada intervalo de pH (N) foi comparado com seu controle utilizando teste de Fisher.

5.6 Não existe diferença entre a atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* submetidos a diferentes dietas.

Nossos resultados mostraram que não existe diferença na atividade de tripsina entre os intestinos médios de machos e fêmeas de *C. albipunctata* quando esses são submetidos a um mesmo tipo de alimentação (Figura 33), porém quando comparamos a atividade de tripsina nos intestinos de um mesmo sexo submetidos a diferentes tipos de tratamentos, observamos que a maior atividade é encontrada nos intestinos de machos e fêmeas que foram deixados de jejum por um período de 24h (Figura 33). Curiosamente a menor atividade foi encontrada entre os intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* que foram submetidos a uma alimentação com soro humano inativado (Figura 33).

Tal resultado despertou curiosidade, visto que entre os insetos, a tripsina é a principal enzima envolvida com a digestão de proteínas (Walter R Terra & Ferreira, 1994). Além disso, entre os insetos hematófagos, é sabido que o repasto sanguíneo é capaz de aumentar a expressão e atividade de tripsinas no intestino médio daqueles organismos (Telleria et al., 2007).

Realizamos ainda ensaios para verificar a atividade de tripsina no intestino de machos e fêmeas de *L. longipalpis* quando estes foram submetidos a dois dos tratamentos oferecidos à *C. albipunctata*, sendo eles: jejum e sacarose 30%, ambos por 24h (Figura 34).

Observamos então que, diferente do observado para *C. albipunctata*, há diferença na atividade de tripsina entre machos e fêmeas quando estes são submetidos a um mesmo tipo de tratamento, sendo que a maior atividade foi sempre encontrada entre as fêmeas. Não há diferença na atividade da enzima quando comparamos um mesmo sexo submetido a diferentes tratamentos (Figura 34).

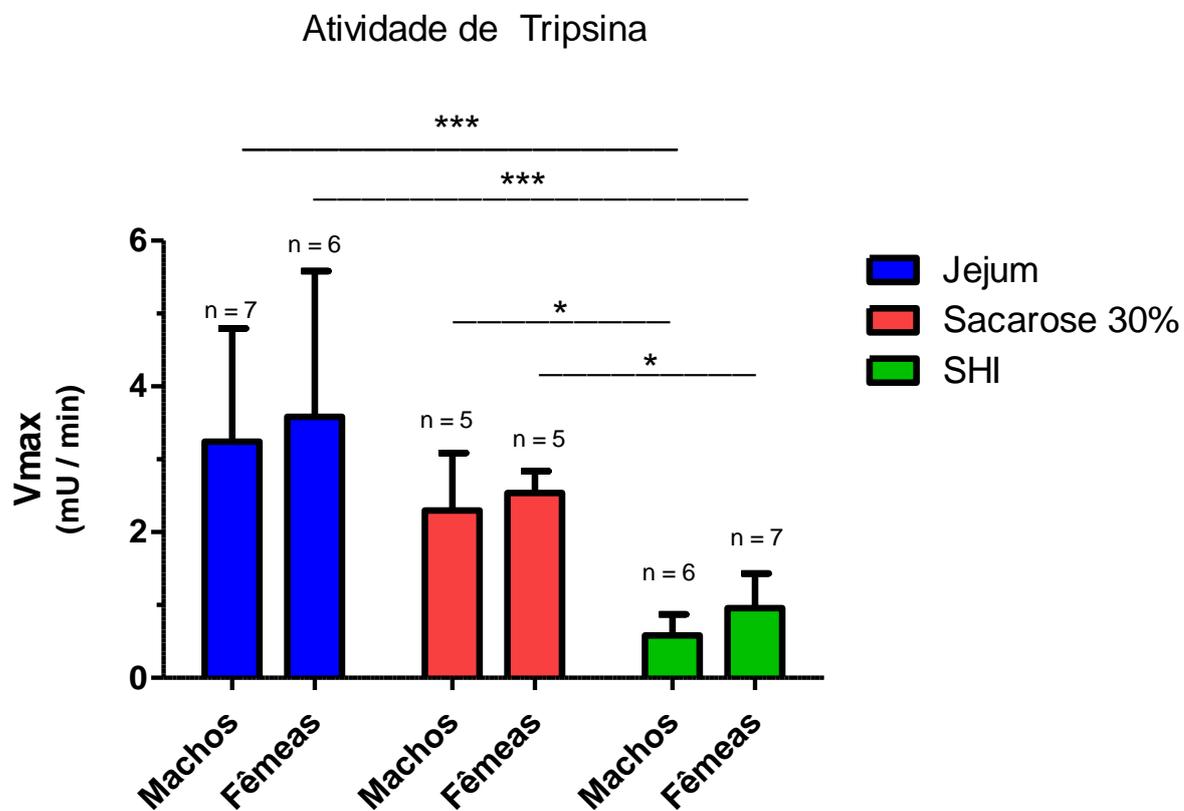


Figura 33. Atividade de tripsina no intestino de *Clogmia albipunctata*. Atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* submetidos a diferentes dietas alimentares. Em azul, insetos mantidos em jejum; em vermelho, insetos alimentados com sacarose 30%, em verde insetos alimentados com soro humano inativado (SHI). Os insetos foram submetidos aos tratamentos por um mesmo período de tempo, 24h. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA).

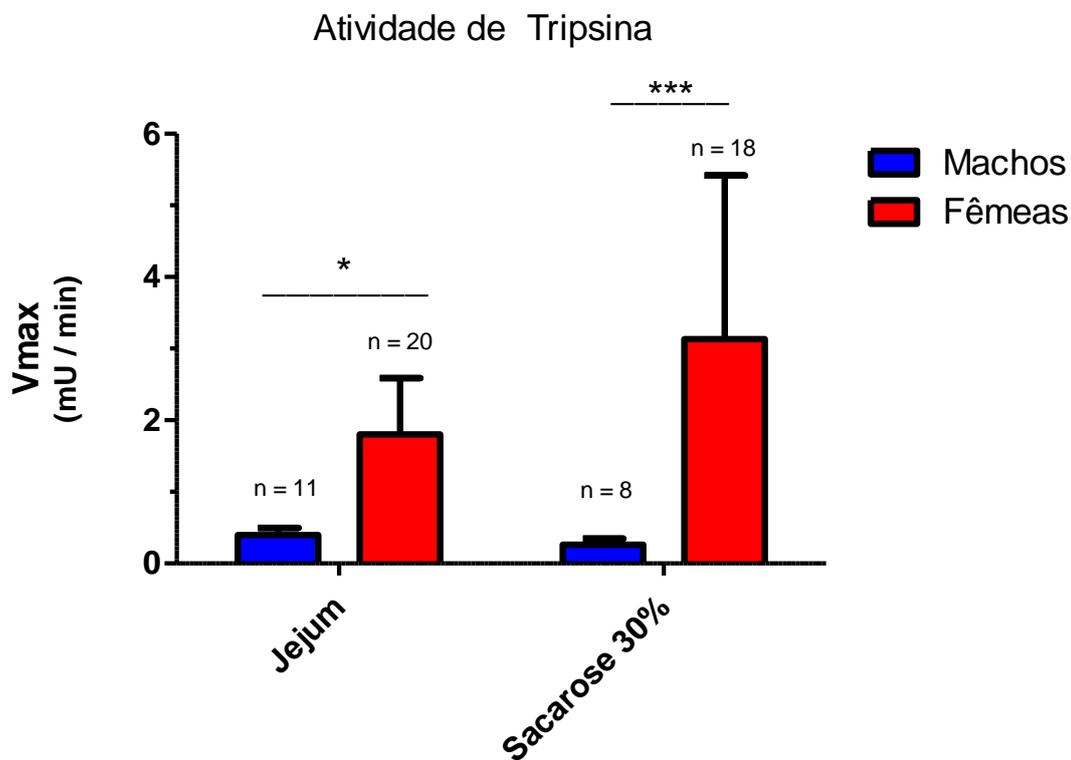


Figura 34. Atividade de tripsina no intestino de *Lutzomyia longipalpis*. Atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis* submetidos a diferentes dietas alimentares. Em azul, insetos machos submetidos ao jejum (à esquerda) ou a alimentação com sacarose 30% (à direita); em vermelho, insetos fêmeas submetidos ao jejum (à esquerda) ou a alimentação com sacarose 30% (à direita). Os insetos foram submetidos aos tratamentos por um mesmo período de tempo, 24h. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA).

5.7 A atividade de catalase de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* é semelhante àquela apresentada por machos de espécies hematófagas

Nossas análises mostraram que machos e fêmeas de *C. albipunctata* possuem atividade de catalase em seu intestino médio, porém não existe diferença quando realizamos a comparação das atividades apresentadas pelos intestinos de machos e fêmeas (Figura 35).

Dentre as espécies hematófagas, observamos que as atividades de catalase foram sempre maiores do que aquelas encontradas para *C. albipunctata*. Para *L. longipalpis* e *A. aegypti* observamos que existe diferença na atividade de catalase do intestino de machos e fêmeas, sendo que as maiores atividades são encontradas nos intestinos das últimas (Figura 35).

Para *C. quinquefasciatus* não observamos diferença na atividade de catalase entre o intestino médio de machos e fêmeas, resultado este que gerou curiosidade, uma vez que dentre as espécies hematófagas analisadas, esta foi a única onde essa diferença não ficou evidente (Figura 35). Por trabalharmos com uma população de laboratório que possui comportamento alimentar distinto daquele apresentado por populações naturais (onde os machos acabam ingerindo um pouco de sangue em consequência da metodologia de alimentação empregada), optamos por realizar também ensaios de atividade com uma população de campo (*C. quinquefasciatus* – B). Para nossa surpresa, os resultados foram semelhantes àqueles encontrados para a população de laboratório (Figura 35).

É interessante também notarmos que as atividades de catalase dos machos de *L. longipalpis* e *A. aegypti* foram semelhantes àquelas encontradas para machos e fêmeas de *C. albipunctata* (Figura 35). Destaca-se mais uma vez o fato de que, assim como machos e fêmeas de *C. albipunctata*, machos de *L. longipalpis* e *A. aegypti*, não se alimentam de sangue.

As maiores atividades de catalase foram encontradas entre machos e fêmeas da população de laboratório de *C. quinquefasciatus* e fêmeas de *A. aegypti* (Figura 35). Quando comparamos a atividade de catalase dentro de um mesmo sexo em espécies diferentes, observamos que, para as fêmeas, as maiores atividades são encontradas entre os mosquitos, as quais não possuem diferença entre si; já para os machos, observamos que as maiores atividades são encontradas dentro das duas populações de *C. quinquefasciatus*, sendo que as atividades de machos de *C. albipunctata*, *L. longipalpis* e *A. aegypti*, são semelhantes entre si (Figura 35).

Atividade de Catalase

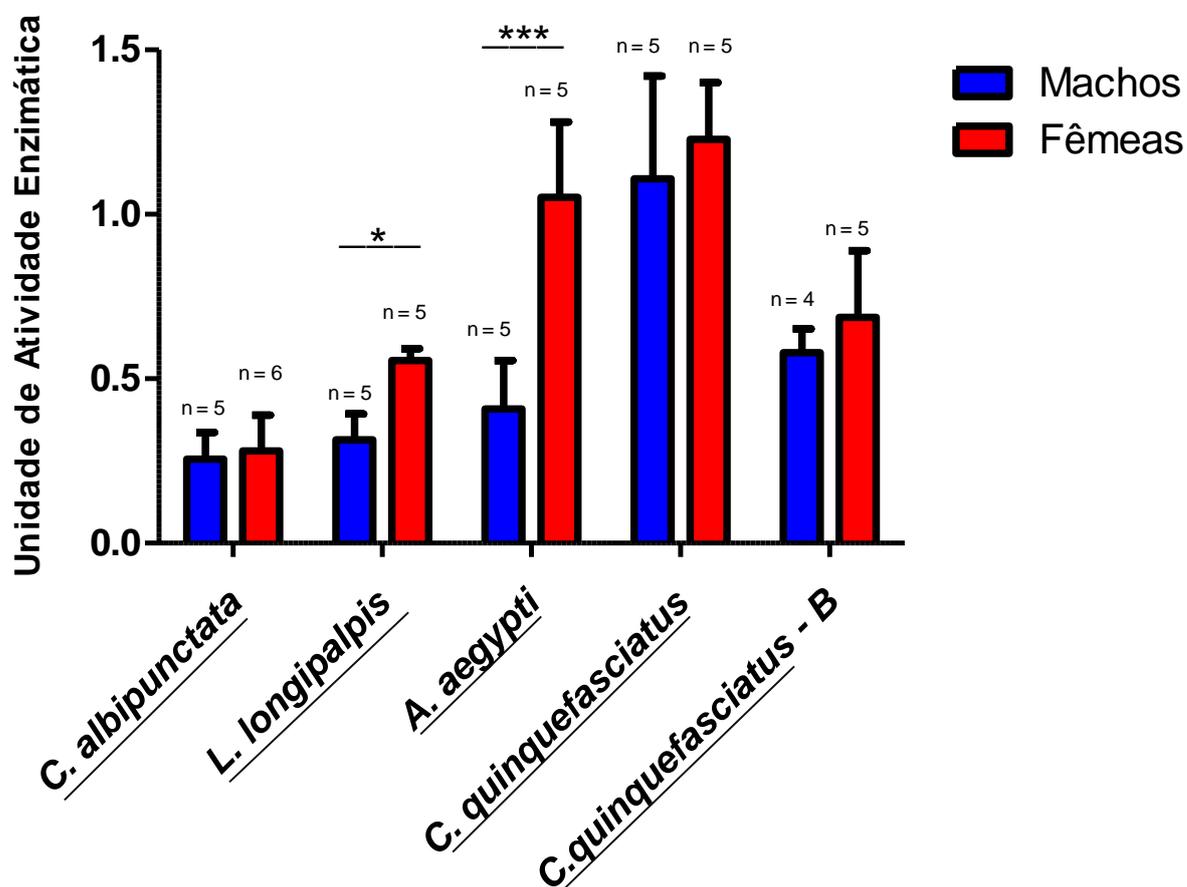


Figura 35. Atividade de catalase no intestino médio. Atividade de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *C. quinquefasciatus* (duas populações: laboratório e campo). Em azul, insetos machos; em vermelho, insetos fêmeas. A população de campo é identificada pela letra **B**. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,001$ (teste Two-way ANOVA).

5.8 *Clogmia albipunctata* apresenta atividade de α -glicosidase maior que aquela encontrada em *Lutzomyia longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Partindo do pressuposto de que haveria envolvimento entre as α -glicosidases e a formação de hemozoína após a digestão de sangue nos insetos hematófagos, decidimos por analisar a atividade dessa enzima no intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *L. longipalpis*. Nossa hipótese seria de que entre os organismos que efetivamente se alimentam de sangue, ou seja, fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, encontraríamos uma maior atividade de α -glicosidases, sendo a atividade de machos e fêmeas de *C. albipunctata* semelhante as de machos das espécies hematófagas analisadas.

Nossos resultados mostraram que não há diferença entre a atividade de α -glicosidase dos intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* (Figura 36). Resultado semelhante foi também encontrado para os intestinos de machos e fêmeas de duas espécies hematófagas: *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* (Figuras 38 e 39).

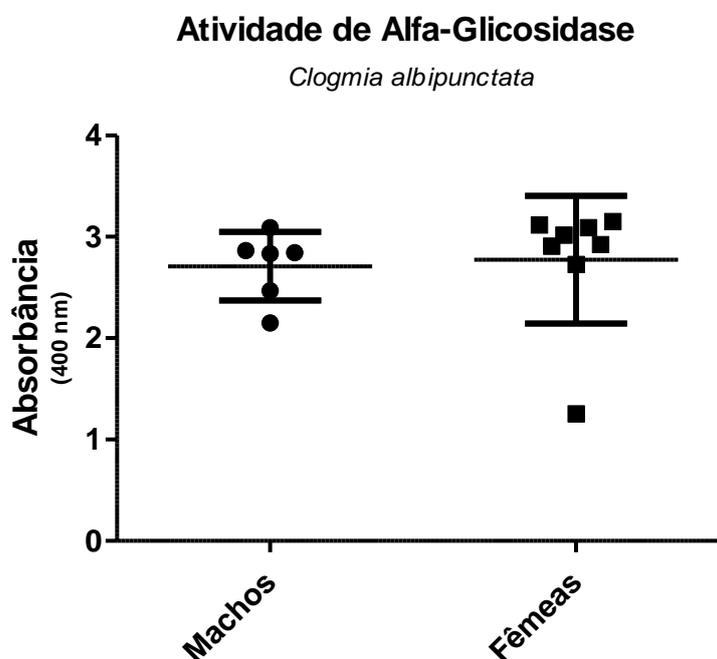


Figura 36. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata*.

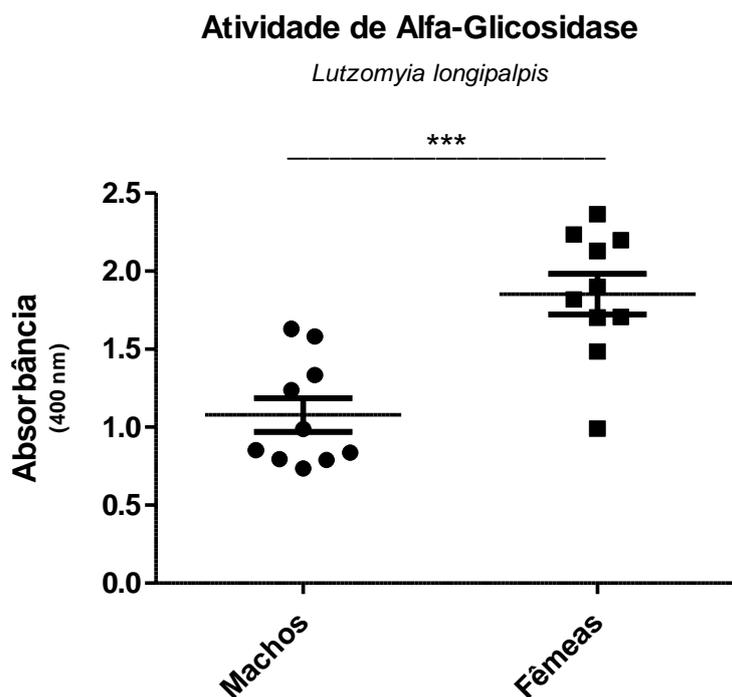


Figura 37. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. *** $p < 0,0001$ (teste t).

Contudo, quando analisamos a atividade de α -glicosidase no intestino de machos e fêmeas de *L. longipalpis*, observamos que existe diferença significativa entre a atividade encontrada nos intestinos, sendo que os intestinos das fêmeas apresentaram maior atividade (Figura 37), resultado este que corrobora nossa hipótese inicial de que entre os organismos que efetivamente se alimentam de sangue, a atividade de α -glicosidases seria maior.

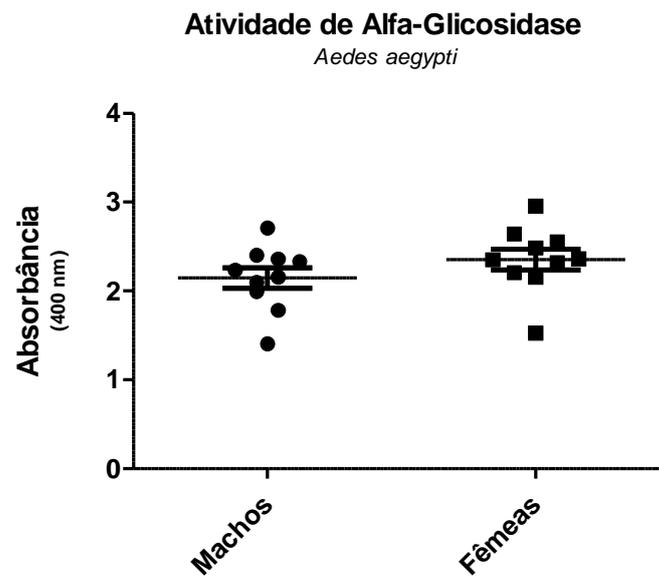


Figura 38. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*.

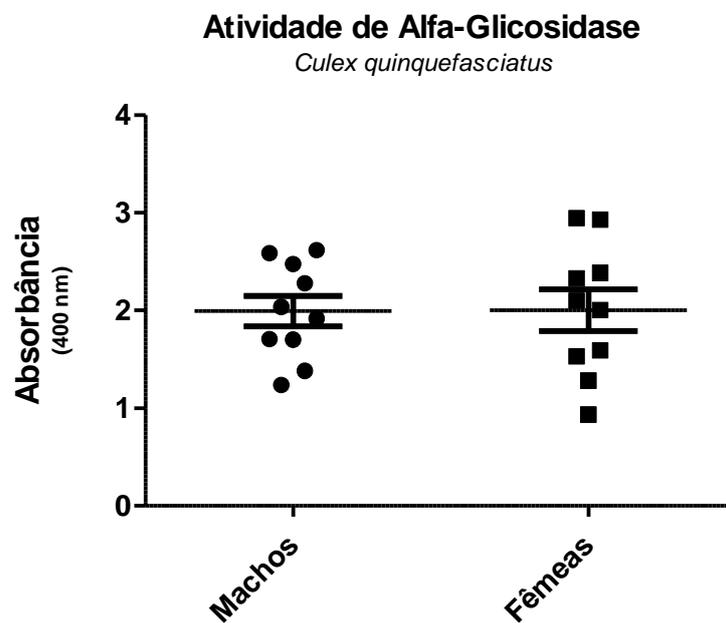


Figura 39. Atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos e fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.

Quando comparamos as atividades encontradas para um mesmo sexo das diferentes espécies, observamos que as maiores atividades, tanto de machos como de fêmeas, são aquelas apresentadas por *C. albipunctata* (Figuras 40 e 41).

Nossos resultados se mostraram interessante, porém somente a atividade de α -glicosidases encontrada no intestino de machos e fêmeas de *L. longipalpis* corroborou nossa hipótese inicial.

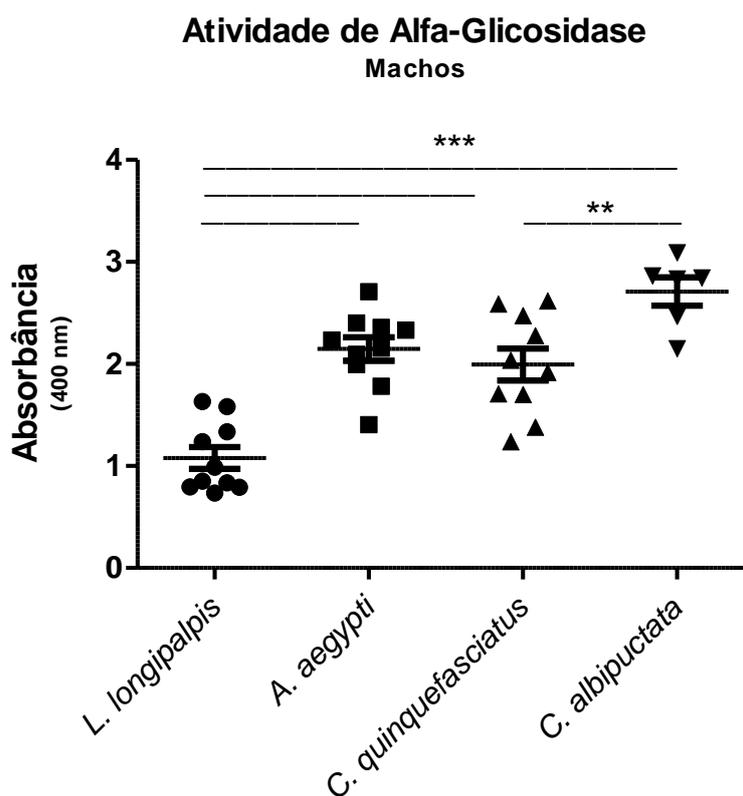


Figura 40. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino médio de machos de diferentes espécies. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino de machos de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. * $p < 0,05$ (teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

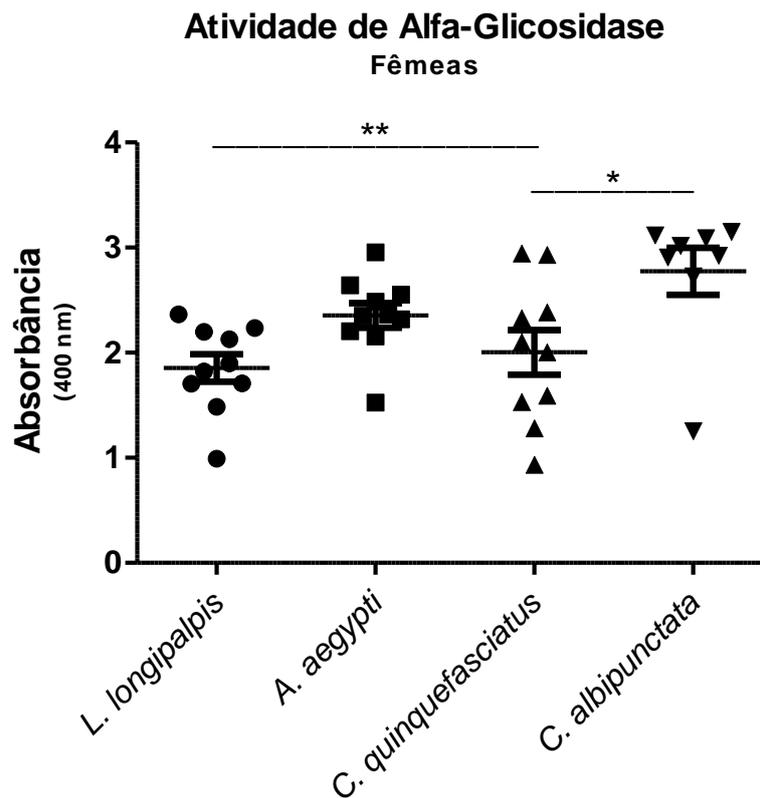


Figura 41. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de diferentes espécies. Comparação da atividade de α -glicosidase no intestino de fêmeas de *Clogmia albipunctata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. * $p < 0,05$ (teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

5.9 Existe diferença na atividade de α -glicosidase entre regiões do intestino médio tanto de *Clogmia albipunctata* como das espécies hematófagas analisadas

Como não encontramos diferença na atividade de α -glicosidase entre os intestinos de machos e fêmeas das espécies analisadas (com exceção de *L. longipalpis*) (Figuras 36 a 39), decidimos testar se haveria diferença na distribuição da atividade entre diferentes porções dos intestinos dos insetos analisados, tanto para machos quanto para fêmeas. Observamos então que, todas as espécies analisadas (*C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*), e ambos os sexos, apresentam distribuição diferencial de atividade entre as regiões do intestino médio, sendo que as maiores atividades são encontradas no intestino médio anterior ou intestino médio torácico (Figuras 42 a 49).

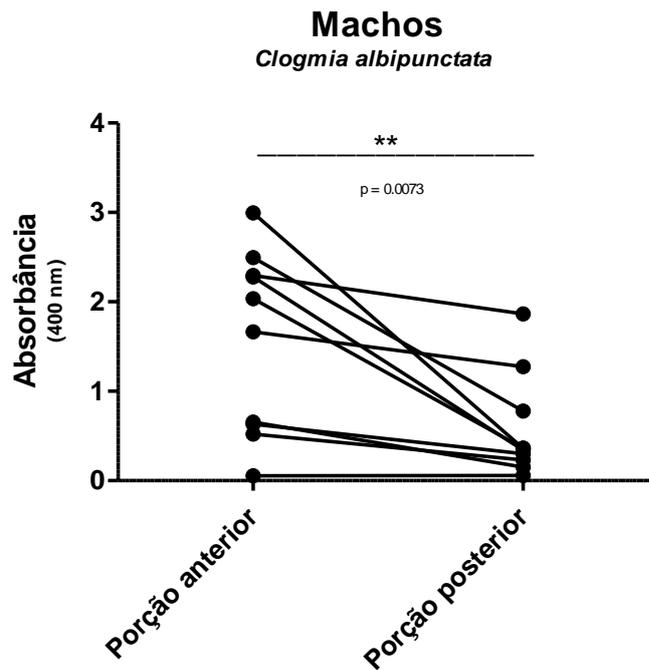


Figura 42. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de *Clogmia albipunctata*. ** $p < 0,001$ (teste t).

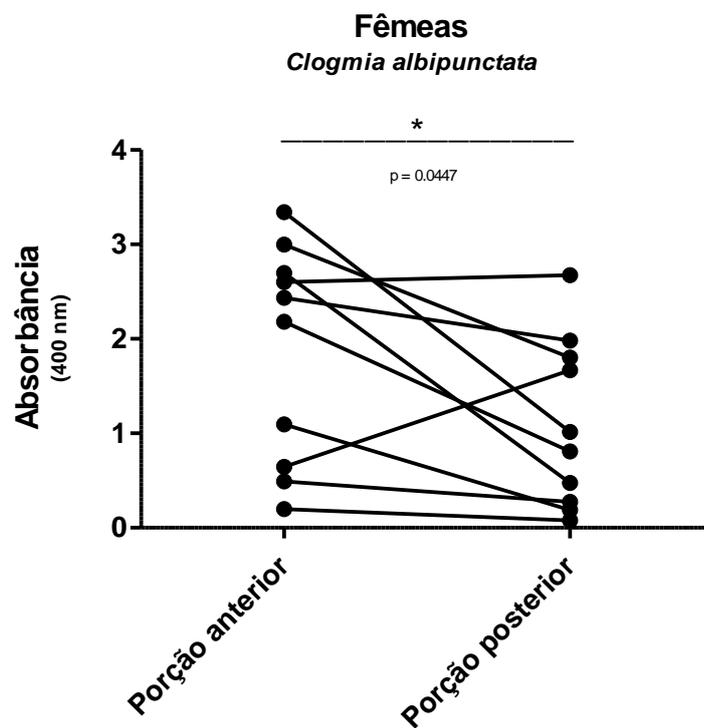


Figura 43. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de *Clogmia albipunctata*. ** $p < 0,001$ (teste t).

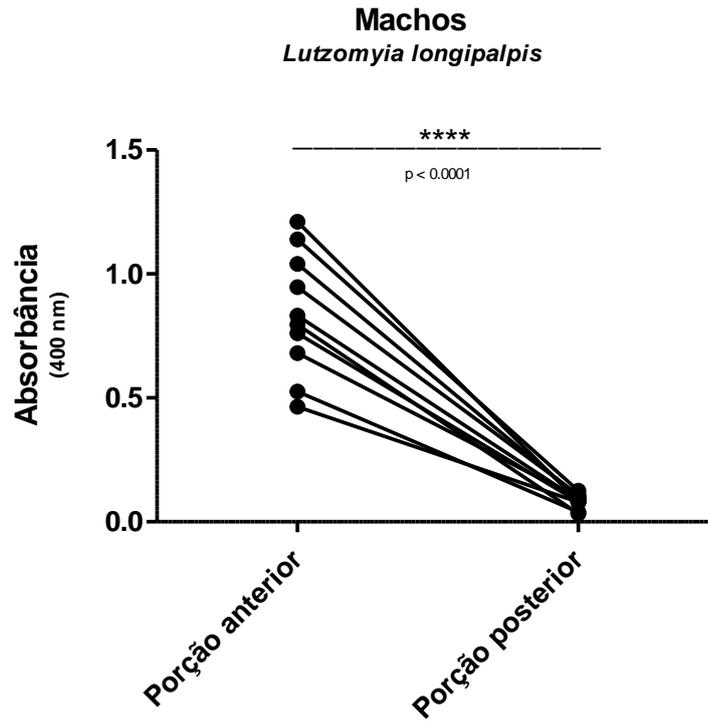


Figura 44. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de *Lutzomyia longipalpis*. **** $p < 0,0001$ (teste t).

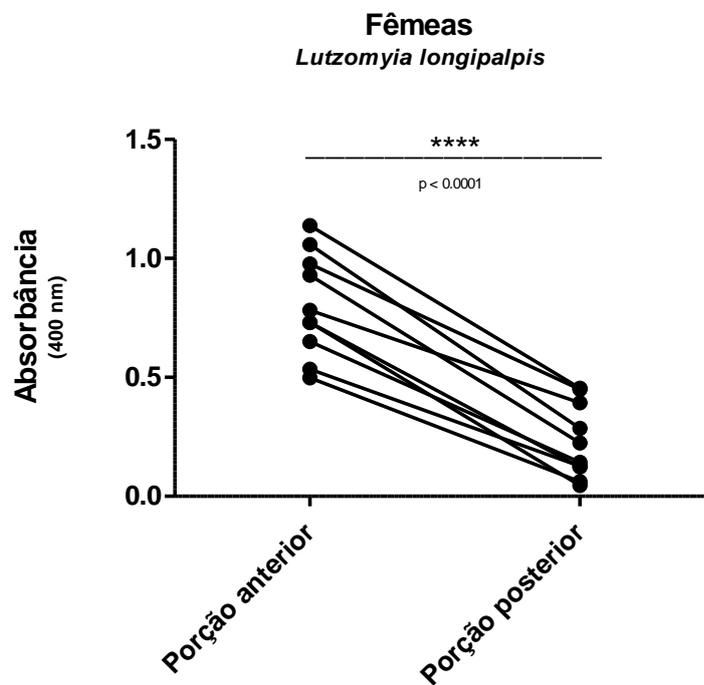


Figura 45. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. **** $p < 0,0001$ (teste t).

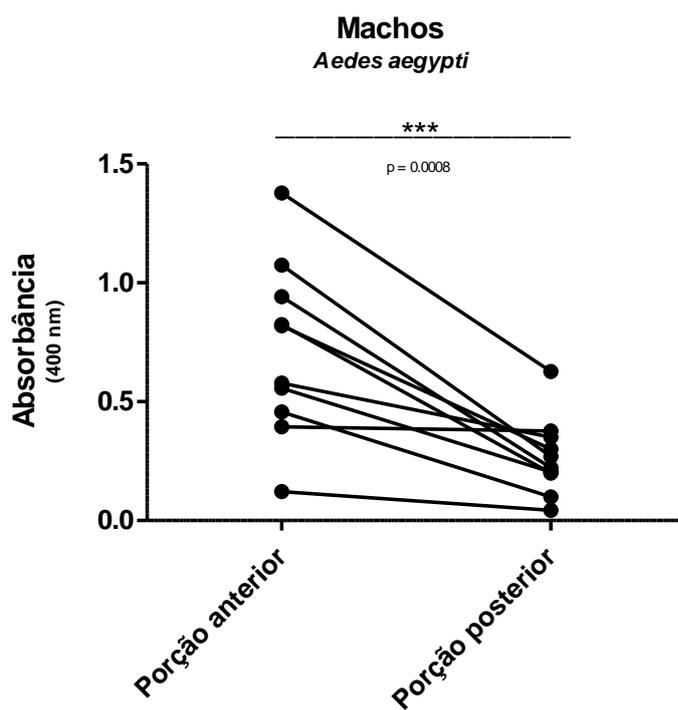


Figura 46. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de *Aedes aegypti*. *** $p = 0,0008$ (teste t).

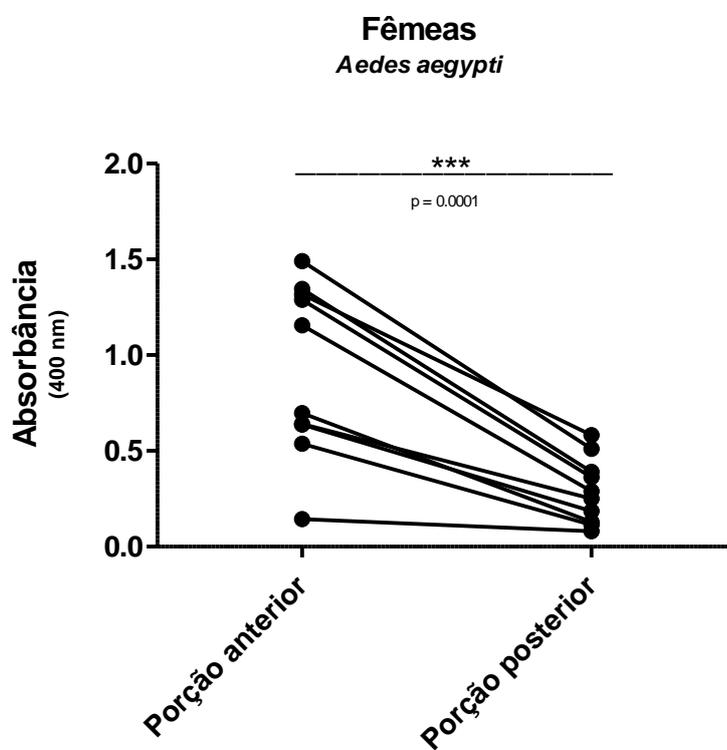


Figura 47. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*. *** $p = 0,0001$ (teste t).

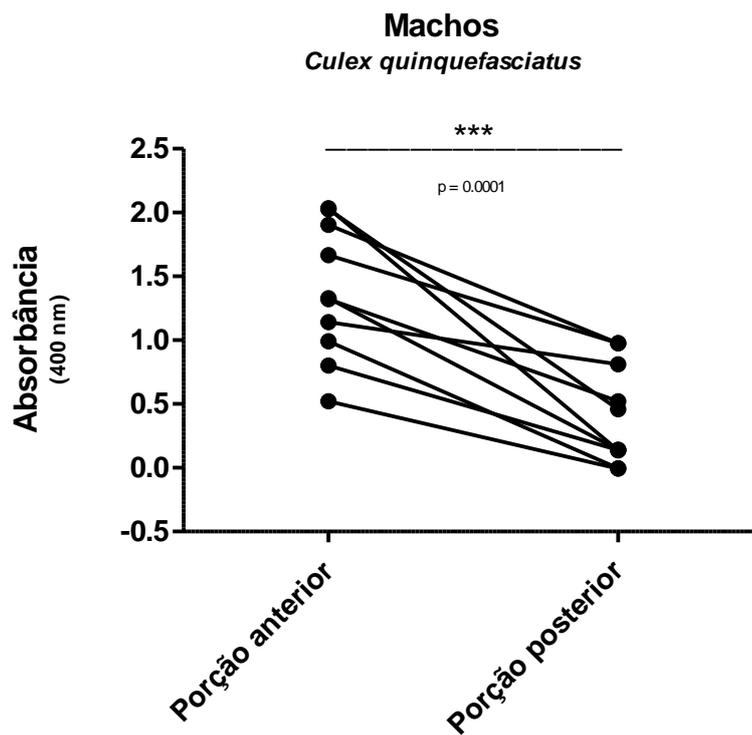


Figura 48. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de machos de *Culex quinquefasciatus*. *** $p = 0,0001$ (teste t).

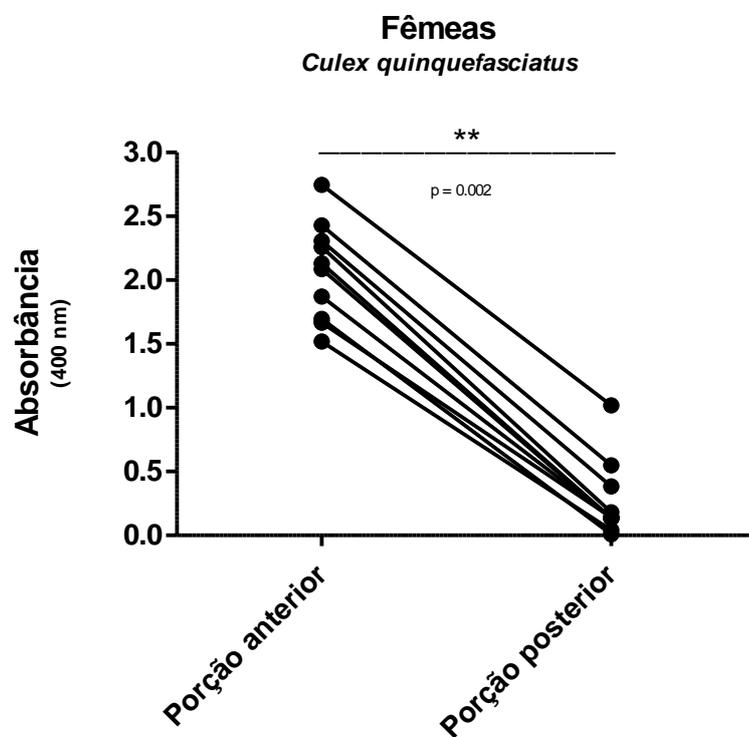


Figura 49. Atividade de α -glicosidase em diferentes porções do intestino médio de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. *** $p = 0,002$ (teste t).

5.10 O conteúdo intestinal de machos e fêmeas de *Clogmia albipunctata* apresenta indícios de capacidade inibitória para a via clássica do Sistema Complemento

Entre os insetos hematófagos, estratégias que sejam capazes de lidar com fatores imunológicos de seus hospedeiros são de grande importância para que tais organismos obtenham sucesso durante o processo alimentar. No sangue ingerido pelos insetos hematófagos, encontram-se, por exemplo, as proteínas envolvidas na cascata do sistema complemento. Caso os organismos hematófagos não apresentassem inibidores capazes de inativar as proteínas solúveis do complemento, este acabaria por ser ativado no intestino e danificar os enterócitos daqueles organismos que ingeriram o sangue, provocando sua lise. Resolvemos então analisar se a capacidade de inibir o sistema complemento estaria presente em um inseto não hematófago. Com isso testamos a capacidade inibitória do conteúdo intestinal de machos e fêmeas de *C. albipunctata* para a via clássica do complemento humano.

Observamos então que o conteúdo intestinal de *C. albipunctata* possui sim capacidade inibitória para a via clássica do complemento. Curiosamente, tanto o conteúdo intestinal de fêmeas, como o de machos, mostraram tal capacidade (Figura 50).

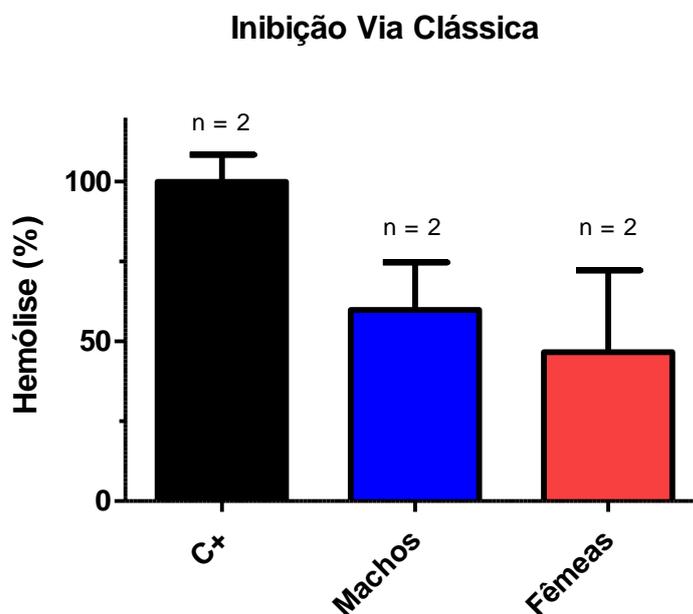


Figura 50. Inibição da via clássica do sistema complemento por conteúdo intestinal de *Clogmia albipunctata*. Em preto, grupo controle (C+); em azul, conteúdo intestinal de machos; em vermelho, conteúdo intestinal de fêmeas.

5.11 Análise filogenética da tripsina de *Clogmia albipunctata* aponta relação com a tripsina constitutiva de *Lutzomyia longipalpis*

Nossos resultados para a atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, mostraram que não há diferença na atividade dessa enzima entre machos e fêmeas quando estes são submetidos a um mesmo tratamento (Figura 33). Porém observamos também que, dentre os tratamentos oferecidos, aquele que gerou a resposta com a menor atividade de tripsina no intestino de machos e fêmeas, foi o tratamento com soro humano inativado (Figura 33). Tal resultado despertou curiosidade, uma vez que se esperava um aumento na atividade de tripsina no intestino dos insetos alimentados com alimento rico em proteína, isso porque a tripsina é a principal enzima envolvida com a digestão de proteínas entre os insetos.

É sabido que flebotomíneos como *L. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, apresentam em seu genoma mais de um gene codificante para tripsinas, e mais, essas tripsinas possuem atividades e expressões reguladas de forma diferencial. Em *L. longipalpis* a tripsina do tipo 2, também chamada de tripsina constitutiva, tem sua expressão ativada e sua maior atividade, durante o período de vida em que o inseto se alimenta exclusivamente de açúcares, não se conhecendo a função específica dessa enzima nessa fase da vida do inseto. A tripsina do tipo 1, chamada tripsina induzida, tem sua expressão ativada e maior atividade durante o período de vida em que o inseto está digerindo o sangue ingerido após o repasto sanguíneo, o que resulta também na inibição da expressão da tripsina do tipo 2.

Diante disso, revolvemos realizar análise filogenética dos genes de tripsina de dípteros a fim de descobrir se existiria relação entre a tripsina de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis*. Isso porque a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis* sofre inibição de expressão durante a digestão de sangue, como observamos uma queda na atividade de tripsina em *C. albipunctata* alimentados com solução rica em proteínas, hipotetizamos que haveria uma relação de ortologia entre as duas tripsinas desses organismos.

Nossos resultados apontaram que *C. albipunctata* possui duas tripsinas, as quais são ortólogas entre si, originando-se provavelmente de uma duplicação gênica “*in tandem*”. Quanto a relação dessas tripsinas com as tripsinas de outras espécies de Diptera,

obtivemos dois resultados divergentes: o primeiro resultado (Figura 51), nos mostra uma árvore filogenética que agrupa as tripsinas de *C. albipunctata* juntamente com a tripsina do tipo 1 de *L. longipalpis*, resultado este que vai contra nossa hipótese inicial de que haveria uma relação de ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis*. O segundo resultado (Figura 52), ao contrário do primeiro, reafirma nossa hipótese inicial de que há ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis*, contudo esse resultado deve ser analisado com cuidado, uma vez que a confiabilidade da árvore é diminuída por índices baixos de “bootstrap”.

Com isso temos dois resultados que contam histórias evolutivas diversas, sendo a filogenia da figura 51 aquela com maior índice de confiabilidade pelos testes estatísticas, e a filogenia da figura 52 aquela que, embora com pouca confiabilidade, vai de encontro aos nossos resultados referentes a função das tripsinas de *C. albipunctata*.

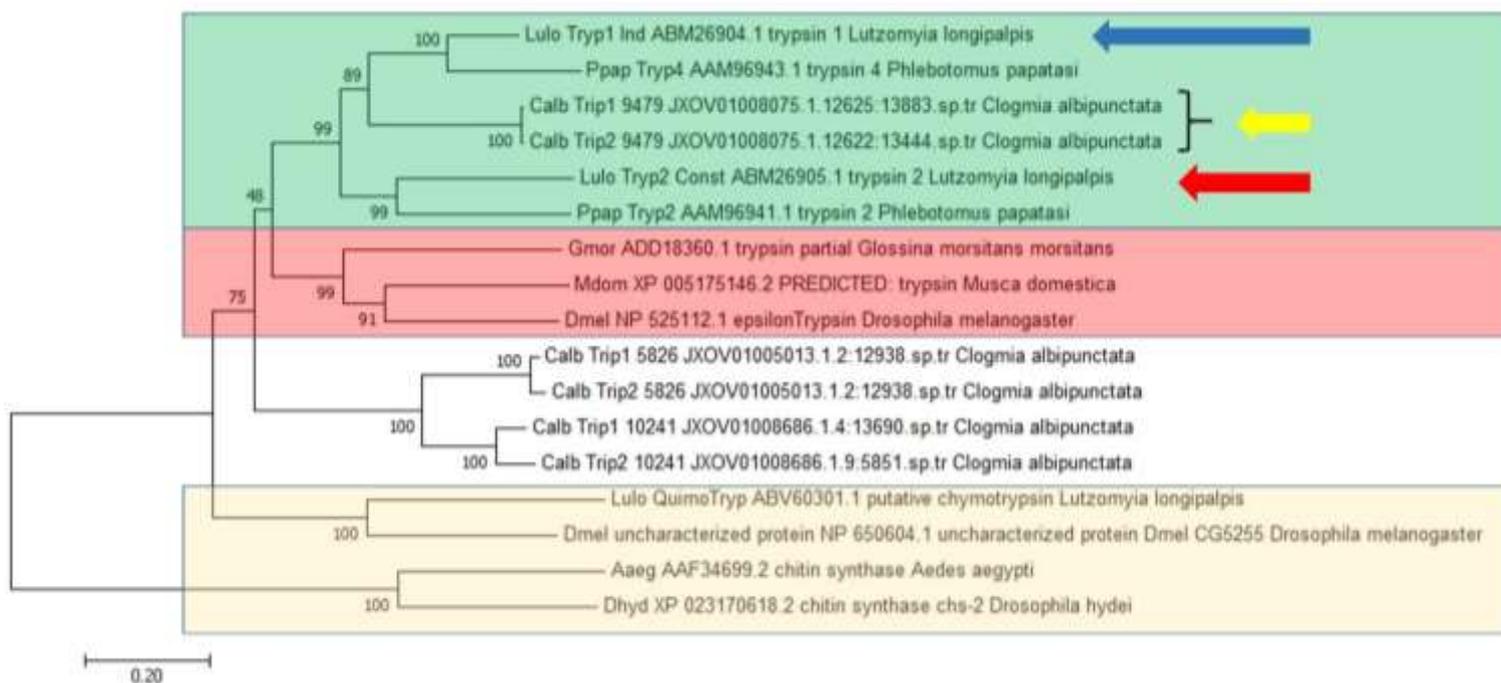


Figura 51. Filogenia das tripsinas (1). Árvore filogenética dos genes de tripsina de algumas espécies de Diptera. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica o grupo externo da árvore; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo Muscomorpha; **retângulo verde**, que identifica o grupo dos Psychodomorpha; **seta vermelha**, indica a tripsina do tipo 2 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp2); **seta azul**, indica a tripsina do tipo 1 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp1); **seta amarela**, indica o agrupamento das tripsinas de *Clogmia albipunctata*. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Dmel, *Drosophila melanogaster*; Dhyd, *Drosophila hydei*; Gmor, *Glossina morsitans*; Mdom, *Musca domestica*; Ppap, *Phlebotomus papatasi*. As

sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa).

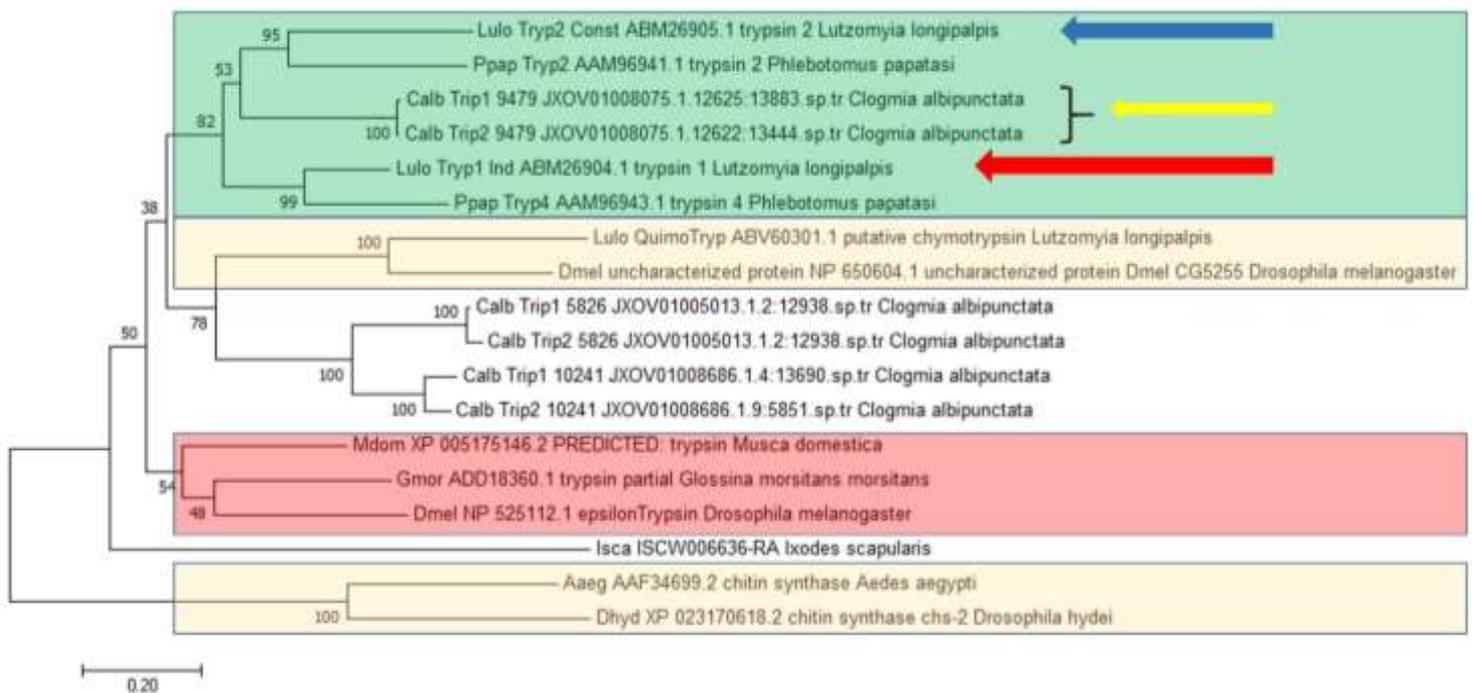


Figura 52. Filogenia das tripsinas (2). Árvore filogenética dos genes de tripsina de algumas espécies de Diptera. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica os grupos externos da árvore (superior referente às quimotripsinas / inferior referente a quitina sintase; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo Muscomorpha; **retângulo verde**, que identifica do grupo dos Psychodomorpha; **seta vermelha**, indica a tripsina do tipo 2 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp2); **seta azul**, indica a tripsina do tipo 1 de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo Tryp1); **seta amarela**, indica o agrupamento das tripsinas de *Clogmia albipunctata*. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Dmel, *Drosophila melanogaster*; Dhhd, *Drosophila hydei*; Gmor, *Glossina morsitans morsitans*; Mdom, *Musca domestica*; Ppap, *Phlebotomus papatasi*; Isca, *Ixodes scapularis*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa).

5.12 *Clogmia albipunctata* possui uma única cópia para o gene de catalase

Nossos resultados mostraram que tanto *C. albipunctata* como as demais espécies que utilizamos nos ensaios para atividade de catalase (*L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*), possuem uma única cópia para o gene que codifica a enzima. Com isso, conseguimos também realizar inferência evolutiva do gene dentro da filogenia de Diptera. Curioso é notar que o grupo dos Psychodomorpha agrupou-se fora longe de

Culicomorpha e Muscomorpha, o que pode indicar uma evolução diferente do gene dentro de Psycodomorpha.

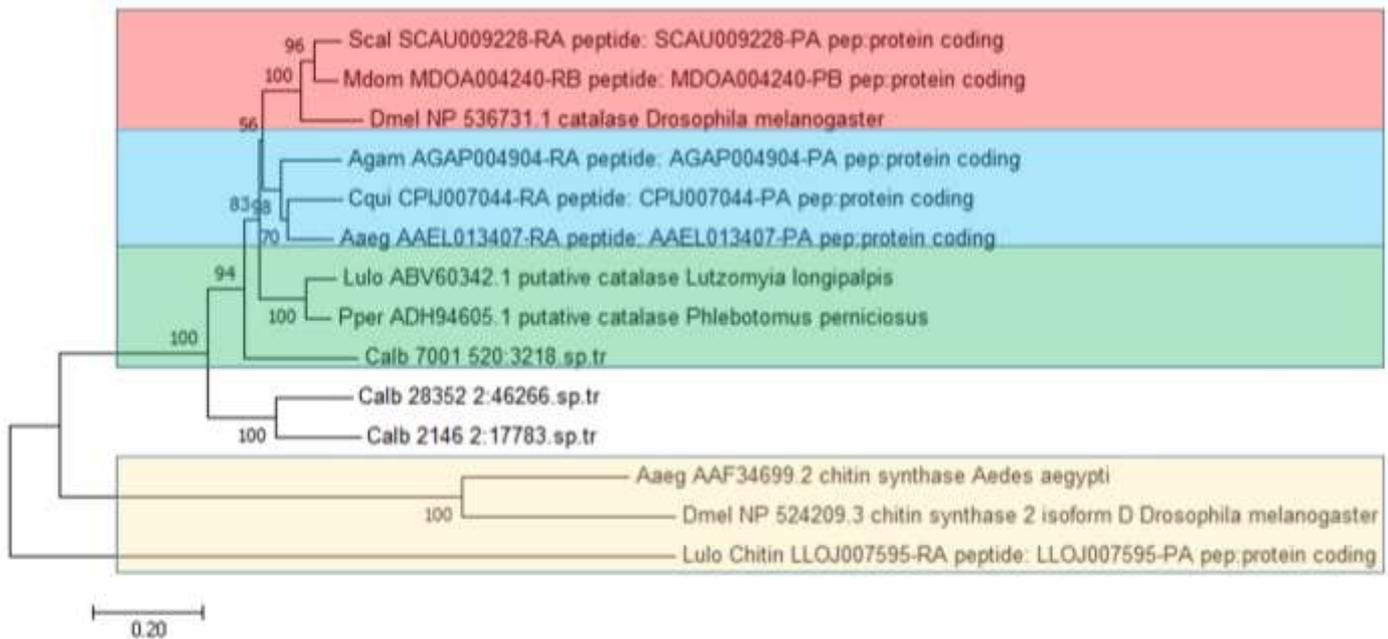


Figura 53. Filogenia da catalase. Árvore filogenética dos genes de catalase de algumas espécies de Diptera. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica o grupo externo da árvore; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo do Culicomorpha; **retângulo verde**, que identifica do grupo dos Psychodomorpha; **retângulo azul**, que identifica o grupo dos Muscomorpha. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Agam, *Anopheles gambiae*; Aaeg, *Aedes aegypti*; Pper, *Phlebotomus perniciosus*; Mdom, *Musca domestica*; Scal, *Stomoxys calcitrans*; Dmel, *Drosophila melanogaster*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa).

5.13 Não há relação filogenética entre o gene da 4-HPPD de *Clogmia albipunctata* e os demais dípteros analisados

A 4-HPPD é uma enzima que faz parte do metabolismo da tirosina, e que foi apontada em *R. prolixus* como uma enzima essencial no processo de detoxificação desse inseto logo após o repasto sanguíneo. Como esta enzima está diretamente relacionada com o sucesso na digestão de sangue e a sobrevivência de *R. prolixus*, tentamos identificar o gene dessa tentamos identificar o gene dessa enzima em diferentes espécies de Diptera,

estabelecendo relação filogenética entre os genes identificados. Caso o gene fosse identificado, poderíamos então estabelecer a relação do mesmo entre espécies hematófagos de “Nematocera” e *C. albipunctata*.

Nossos resultados mostraram que provavelmente o gene que codifica a enzima 4-HPPD foi perdido em *C. albipunctata* e *L. longipalpis*, uma vez que para outras espécies de “Nematocera” bem como para *Phlebotomus papatasi* conseguimos estabelecer as relações filogenéticas da enzima (Figura 54). Para maiores inferências precisaríamos acrescentar outras espécies à filogenia, principalmente outras espécies de psicodídeos, para que pudéssemos contar de maneira mais fiel a história evolutiva da enzima dentro da família Psychodidae, onde há indícios de perda dessa enzima.

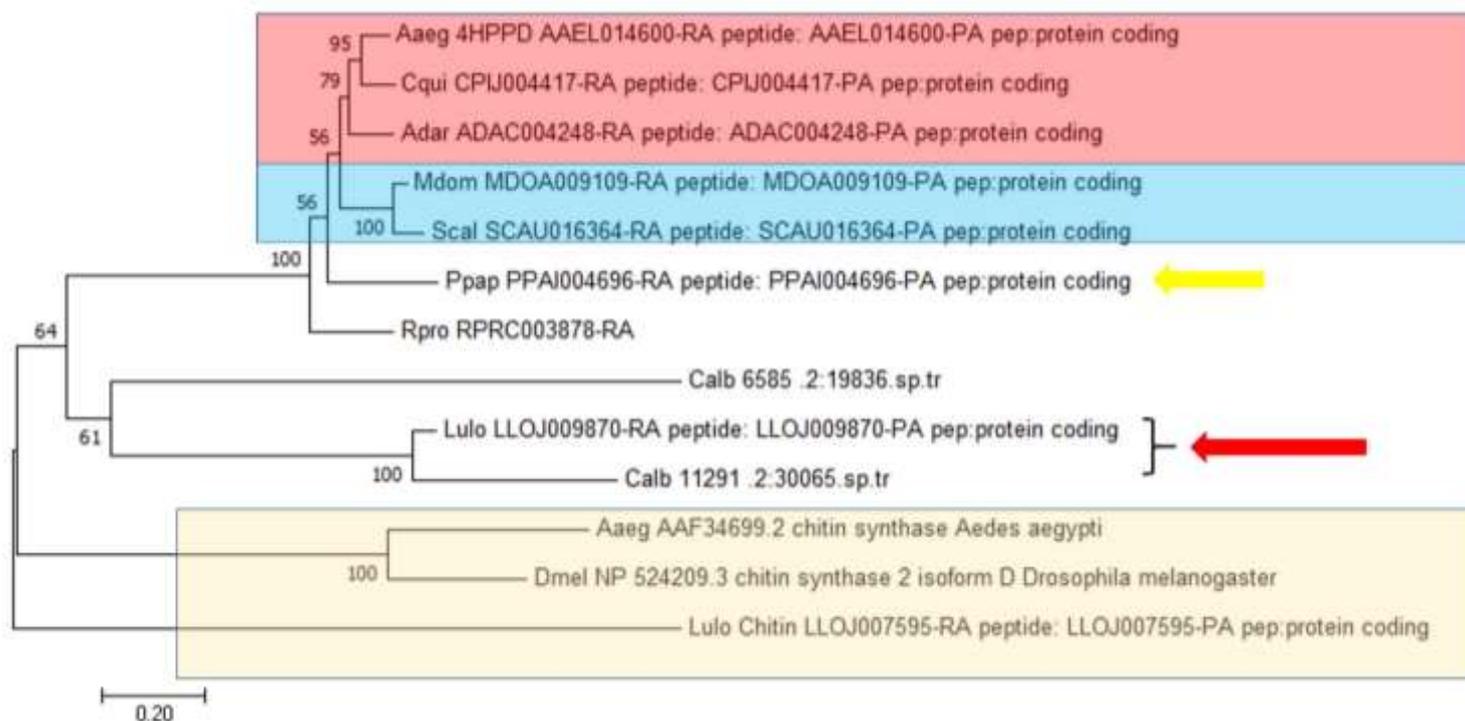


Figura 54. Filogenia da 4-HPPD. Árvore filogenética dos genes de 4-HPPD de algumas espécies de Diptera e de *Rhodnius prolixus*. Destaque para: **retângulo bege**, que identifica o grupo externo da árvore; **retângulo vermelho**, que identifica o grupo do Culicomorpha; **retângulo azul**, que identifica o grupo dos Muscomorpha; **seta amarela**, que identifica a sequência de *Phlebotomus papatasi*; **seta vermelha**, que identifica as sequências de *C. albipunctata* e *L. longipalpis*. Calb, *Clogmia albipunctata*; Lulo, *Lutzomyia longipalpis*; Adar, *Anopheles darlingi*; Aaeg, *Aedes aegypti*; Ppap, *Phlebotomus papatasi*; Mdom, *Musca domestica*; Scal, *Stomoxys calcitrans*; Rpro, *Rhodnius prolixus*. As sequências de proteínas foram alinhadas com ClustalW e a árvore construída através do software MEGA (NJ, correção de Poisson e deleção completa).

6. DISCUSSÃO

Clogmia albipunctata é um inseto pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Psychodinae. É um organismo não-hematófago e que pode ser caracterizado principalmente por seu alto grau de sinantropia, o que faz com seja conhecido como mosca-do-banheiro, mosca-do-ralo, dentre outros tantos nomes populares que mostram o quão próximo esse organismo é do ser humano (Forattini, 1973; Jiménez-Guri et al., 2014). Apesar de não realizar hematofagia, esse inseto ganha destaque como organismo modelo para o estudo de evolução e desenvolvimento de insetos de um modo geral (Crombach et al., 2014; Janssens et al., 2014; Jiménez-Guri et al., 2018). Além disso, relatos de caso tem apontado *C. albipunctata* como agente infestante de ambientes hospitalares e como vetor mecânico de patógenos, como bactérias multirresistentes (El-Badry et al., 2014; El-Dib et al., 2017, 2020; Faulde & Spiesberger, 2012, 2013; Gökçe, 2020; Hjaija et al., 2018; Mokhtar et al., 2016; Rupprecht et al., 2020).

Como *C. albipunctata* encontra-se agrupado dentro de “Nematocera” e dada sua estreita relação com o ramo hematófago da família Psychodidae (a subfamília Phlebotominae, onde encontramos os flebotomíneos), encontramos em *C. albipunctata* um excelente modelo para o estudo de características consideradas importantes para a realização da hematofagia (Bertone et al., 2008; Gunnar M. Kvifte & Wagner, 2017). Partindo da hipótese de que a hematofagia, dentro de “Nematocera” seria um caráter derivado, seria possível identificar em *C. albipunctata* características morfológicas e fisiológicas com caráter plesiomórfico. Essas características plesiomórficas, sob a óptica evolutiva, seriam os moldes para as importantes adaptações atribuídas aos insetos hematófagos.

Uma adaptação evolutiva pode ser vista sob duas perspectivas: a primeira diz respeito a uma característica moldada por determinada pressão seletiva para sua atual função, portanto uma adaptação propriamente dita; a segunda perspectiva diz respeito a uma característica inicialmente moldada pela seleção natural para uma função, mas que com o passar do tempo vem agregar valor adaptativo a uma nova função, não necessariamente tendo relação com aquela para qual ela foi inicialmente selecionada. Nessa segunda perspectiva, temos que uma característica é coaptada a uma nova função

sem que passe inicialmente por novas pressões evolutivas, a essa característica damos o nome de exaptação (Gould & Vrba, 1982).

Neste trabalho, nos propusemos a investigar algumas importantes adaptações relacionadas à hematofagia, realizando ensaios comparativos entre um organismo não-hematófago e algumas espécies hematófagas de importância médica e veterinária. Acreditamos que grande parte das adaptações relacionadas à hematofagia, na verdade, se enquadrem dentro da definição de exaptação. Essa proposição poderia ajudar a explicar pelo menos em parte os vários eventos de surgimento independente da hematofagia dentro da ordem Diptera. Alguns estudos apontam para o surgimento independente em pelo menos 12 famílias. (Azar & Nel, 2012; Wiegmann et al., 2011). A ideia de que a maior parte das adaptações à hematofagia seriam na verdade exaptações corrobora o fato de que o curso evolutivo sempre segue o caminho mais curto e com o menor número de alterações possíveis para o estabelecimento de um caráter biológico, cujo fato evolutivo chamamos de “lei da parcimônia”. Portanto, quando determinada pressão evolutiva atua sobre uma característica já estabelecida, apenas deslocando-a de função, espera-se um menor “esforço evolutivo” do que aquele que seria necessário ao estabelecimento de uma nova característica.

Dentre as adaptações relacionadas à hematofagia, as adaptações morfológicas são de extrema importância para que os organismos que realizam a hematofagia obtenham sucesso em seu processo alimentar (Adams, 1999). O sistema digestivo dos insetos é do tipo completo e pode ser dividido em três porções, sendo elas: intestino anterior (da boca à cárdia), intestino médio (da cárdia ao piloro) e intestino posterior (do piloro ao ânus) (W.R. Terra & Ferreira, 2005; Walter R. Terra & Ferreira, 2012; Walter R Terra & Ferreira, 1994). Entre essas regiões, grande destaque e atenção é dado ao intestino médio, por se tratar da região intestinal onde observa-se a digestão e absorção da maior parte dos nutrientes ingeridos pelos insetos, sejam proteínas, açúcares ou lipídeos (W.R. Terra & Ferreira, 2005). Além disso, no caso de alguns insetos vetores, é na região do intestino médio que acontece a maior parte do desenvolvimento de determinados parasitos, como é o caso dos flebotomíneos e protozoários do gênero *Leishmania*, os quais crescem, multiplicam-se e diferenciam-se nessa região do trato digestivo dos flebotomíneos (P. A. Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012).

Aqui realizamos análises comparativas entre as regiões do intestino médio de quatro espécies de insetos, sendo uma não-hematófaga (*C. albipunctata*) e três hematófagas (*L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*). Realizamos ainda comparações morfológicas entre os intestinos de machos e fêmeas de cada uma das espécies analisadas, isto porque até o momento os estudos descritivos de morfologia do trato intestinal de insetos hematófagos se restringem a descrições somente do trato intestinal de fêmeas, já que grande parte dos machos de dípteros hematófagos (principalmente dentro de “Nematocera”), não realizam a hematofagia, portanto tiveram sua importância negligenciada.

Nossos resultados mostram que não existe diferença morfológica entre as regiões do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata* (Figuras 18 e 19). Resultado esse que não causa estranheza, uma vez que ambos os sexos dessa espécie apresentam comportamentos alimentares semelhantes, não sendo apontando na literatura diferença no padrão alimentar entre os sexos.

Porém, quando analisamos a região do intestino médio de machos e fêmeas das espécies hematófagos, observamos evidente diferença morfológica. As fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, apresentam seu intestino médio visualmente dividido em duas porções: uma porção anterior, fina e tubular, de comprimento pequeno, chamada intestino médio torácico; e uma porção posterior, longa e larga, à semelhança do corpo de uma garrafa, chamada intestino médio abdominal (Figuras 20, 22 e 24). Porém, o intestino médio dos machos das três espécies se apresenta completamente diferente do que foi encontrado para as fêmeas, sendo longo e fino em toda sua extensão, sem que haja uma diferenciação entre regiões torácica e abdominal (Figuras 21, 23 e 25).

Essas observações chamam a atenção para um fato curioso: provavelmente a diferenciação de regiões do intestino médio estaria ligada ao processo alimentar dos insetos, isso porque nossas observações mostram que somente entre aqueles organismos que realizam a hematofagia (fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*) há diferenciação entre as regiões do intestino. E mais curioso ainda é notar que os intestinos daqueles insetos que não realizam hematofagia, ou seja, intestinos de machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e de machos e fêmeas de *C. albipunctata* são semelhantes entre si.

Podemos apontar então que insetos hematófagos necessitam de uma porção diferenciada do seu intestino médio, o que pode estar relacionado com a quantidade de sangue ingerido por esses insetos durante um único repasto e com a regionalização do processo de digestão, o que por sua vez tem relação direta com o pH intestinal desses insetos e com a regionalização enzimática (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008; Santos et al., 2011).

Chamamos a atenção para o fato de que, entre os machos de *C. quinquefasciatus*, foram encontrados dois padrões de morfologia intestinal (Figuras 25 e 26). Um primeiro padrão, semelhante ao encontrado entre machos de *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Figuras 21 e 23); e um segundo padrão que poderia ser apontado como um “estágio de transição” entre a morfologia encontrada entre o intestino de machos *L. longipalpis* e *A. aegypti* e fêmeas destas mesmas espécies. O segundo padrão encontrado para o intestino de machos de *C. quinquefasciatus* é caracterizado por apresentar em sua porção final uma pequena dilatação (Figura 26).

Esse resultado se torna ainda mais interessante quando levamos em consideração os parâmetros alimentares apresentados por machos e fêmeas da colônia de *C. quinquefasciatus* a partir da qual foram obtidos os insetos para esse experimento. Trata-se de uma colônia obtida a partir de população de campo e estabelecida no Instituto de Pesquisa René Rachou (IPRR-Fiocruz) de Belo Horizonte, Minas Gerais, sendo posteriormente transferida para o Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) da UFMG. Essa colônia caracteriza-se por alimentar-se somente de sangue heparinizado em pedaços de algodão, os quais ficam depositados dentro das gaiolas contendo tanto fêmeas quanto machos desse inseto. Curiosamente, alguns machos alimentam-se nesses pedaços de algodão embebidos em sangue (Lara, 2020).

Não conseguimos estabelecer uma relação direta entre o comportamento alimentar dos machos em algodão com sangue e a morfologia diferencial em relação aos machos que não apresentam aquele comportamento alimentar (dados não apresentados), porém o simples fato de que as duas observações (morfologia diferencial e comportamento alimentar) existem em concomitância, cria respaldo para investigações mais aprofundadas que corroborem o fato aqui observado de que existe relação entre o comportamento alimentar e a morfologia intestinal entre os insetos hematófagos. Destacamos ainda o fato de que, entre os machos da população de campo utilizados para

os ensaios de catalase, somente foram observados intestinos que se assemelhavam a morfologia fina e tubular em toda sua extensão (Figura 25).

Em termos evolutivos, podemos inferir que o estado plesiomórfico em relação à morfologia dos intestinos é o intestino não dilatado na região posterior do intestino médio, morfologia esta que encontramos em machos e fêmeas de *C. albipunctata* e machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Figuras 18, 19, 21, 23 e 25). A dilatação do intestino médio abdominal e sua posterior regionalização (divisão clara entre intestino médio torácico e abdominal) nos organismos que efetivamente se alimentam de sangue, representariam um estado de adaptação a uma nova dieta, sem que houvesse modificação na função do órgão em questão (função digestiva), portanto temos indícios do que seria uma exaptação morfológica à hematofagia.

O pH representa uma propriedade química de grande importância nas mais variadas funções biológicas, sendo, portanto, controlado de forma fina para garantir a manutenção da homeostase de um organismo (Demaurex, 2002). No caso dos insetos, mais especificamente no processo de digestão, observamos que o pH tem papel central, uma vez que a maioria das enzimas digestivas possuem atividade máxima em uma faixa de pH bem determinada (Applebaum, 1985; Harrison, 2001; Walter R Terra & Ferreira, 1994).

Neste trabalho identificamos que a região do intestino médio tanto de machos quanto de fêmeas de *C. albipunctata* apresenta valor de pH ácido, por volta de ~6,0 (Figuras 27 e 28). O fato de ambos os sexos apresentarem o mesmo valor de pH não causa estranheza, uma vez que se encontram geralmente no mesmo ambiente, alimentando-se, portanto, das mesmas fontes alimentares. Interessante é notar que esse valor é semelhante àquele encontrado para duas espécies de insetos hematófagos: *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2017; V. C. Santos et al., 2008). Nesses insetos o pH ácido do intestino médio está relacionado com o tipo de alimentação desses insetos durante parte de sua vida adulta, alimentação esta caracterizada por ser rica em carboidratos. Uma das principais classes de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos em insetos são as α -glicosidases, as quais tem sua velocidade máxima de trabalho justamente em faixa ácida de pH (Gontijo et al., 1998; Vânia C. Santos et al., 2011; W.R. Terra & Ferreira, 2005; Vale et al., 2012).

É sabido que o pH intestinal de diversos insetos é controlado de forma ativa e fina. Nos insetos hematófagos da subordem Nematocera, temos a ação de bombas de prótons (V-ATPases) que atuam mantendo a concentração de H^+ no lúmen intestinal (Nepomuceno et al., 2017; Patrick et al., 2006; Vânia C. Santos et al., 2011). Nossos resultados apontam que esse controle fino e ativo também está presente em *C. albipunctata*, que foi capaz de acidificar uma solução tamponada em pH alcalino (Figura 29).

Como dito anteriormente, o ajuste do valor de pH do lúmen intestinal é de extrema importância quando levamos em consideração a velocidade máxima de trabalho de certas enzimas envolvidas no processo de digestão de insetos (Applebaum, 1985; Walter R Terra & Ferreira, 1994; Wolfson & Murdock, 1990). Quando alimentamos *C. albipunctata* com soro humano inativado, alimentação esta que simularia uma alimentação rica em proteínas como o repasto sanguíneo nos insetos hematófagos, observamos que, tanto para machos quanto para fêmeas, ocorreu alcalinização do lúmen intestinal, sendo que entre as fêmeas essa alcalinização foi observada em um número maior de insetos, atingindo também valores maiores de pH (Figura 30).

A capacidade de alcalinização do pH intestinal frente à alimentação rica em proteínas é característica importante dentro dos dípteros hematófagos da subordem “Nematocera”. Em fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti*, foi observado que após o repasto sanguíneo o pH intestinal tem valores próximos ou maiores que 7,4 (Nepomuceno et al., 2017; V. C. Santos et al., 2008). A alcalinização do pH intestinal favorece a ação de uma importante enzima digestiva, a tripsina, a qual possui sua velocidade máxima de trabalho numa faixa de pH alcalino (Walter R Terra & Ferreira, 1994).

Nossos dados apontam que o(s) mecanismo(s) capaz(es) de reconhecer a presença de proteínas, culminando com a alcalinização do pH intestinal, já estão presentes em um inseto nematócero não-hematófago, evidenciando o controle fino do pH intestinal como uma das características que possibilitaram a adaptação a diferentes dietas dentro desse grupo de insetos. Além disso, esses resultados mostram uma conservação de funções entre mecanismos de organismos com nichos muito diferentes, o que corrobora nossa hipótese de que, as adaptações relacionadas com a hematofagia partiram de características já existentes, as quais podem ou não sofrer modificações com relação a sua função e sua ação, mas de toda forma podendo ser apontadas como exaptações.

Em *C. albipunctata* encontramos a presença de pH intestinal ácido em condições naturais, ou seja, alimentando-se de soluções açucaradas (Figuras 27 e 28); encontramos um controle fino e ativo desse pH intestinal (Figura 29); e também evidenciamos a capacidade de alcalinização do intestino médio quando esses insetos foram submetidos à alimentação rica em proteínas (Figura 30). Todos esses achados foram semelhantes àqueles já descritos para duas espécies de insetos hematófagos, os quais se encontram em duas famílias diferentes.

Até o momento três são os mecanismos já descritos envolvidos na alcalinização do pH intestinal: volatilização de CO₂ presente no sangue ingerido, transporte concomitante de aminoácidos e H⁺ por carreadores tipo PAT e a ação de uma molécula liberada na hemolinfa, de caráter possivelmente hormonal, que atua de maneira conjunta com o desligamento do mecanismo de acidificação do pH intestinal e a entrada de aminoácidos alcalinizantes nos enterócitos, dando início ao processo como um todo (V. C. Santos et al., 2008; Nepomuceno et al., 2017, 2020;). Os processos são desencadeados assim que os insetos ingerem sangue e foram primeiramente descritos em fêmeas de *L. longipalpis* (Nepomuceno et al., 2020; Vânia C. Santos et al., 2011; Vânia C Santos et al., 2008).

O fato de nossos resultados apontarem para a capacidade de *C. albipunctata* de responder a uma alimentação rica em proteínas alcalinizando o pH intestinal (Figura 30), fez com que nos perguntássemos quais seriam os mecanismos envolvidos nesse processo em um inseto não-hematófago, e se existiria um “*modus operandi*” semelhante entre duas espécies diferentes: *L. longipalpis* e *C. albipunctata*.

Como *C. albipunctata* não é um inseto hematófago e por ter sido alimentado com soro, testar sua capacidade de volatilizar CO₂ do sangue ingerido não faria sentido, portanto resolvemos testar a resposta desse inseto à molécula alcalinizadora liberada na hemolinfa de insetos hematófagos logo após o repasto sanguíneo. Para tanto, fizemos uso da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* recém alimentadas com sangue. Essa hemolinfa foi coletada e aplicada sobre intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, os quais tinham sido previamente alimentados com corante indicador de pH.

Curiosamente, nossos resultados apontaram que fêmeas de *C. albipunctata* são responsivas à hemolinfa de fêmeas recém alimentadas de *L. longipalpis* (Figura 31). Os

intestinos que se apresentavam ácidos sofreram alcalinização após aplicação de hemolinfa. Esse resultado aponta para um mecanismo de resposta hormonal similar entre esses dois insetos.

Interessante também foi observar que somente as fêmeas de *C. albipunctata* responderam à hemolinfa, não sendo verificada nenhuma mudança de pH nos intestinos de machos (Figura 31), assim como ocorre nas espécies hematófagas *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017; Vânia C. Santos et al., 2011).

Se nos atentarmos para o fato de que, dentro de “Nematocera”, somente as fêmeas realizam a hematofagia como parte essencial para maturação de seus ovários (Adams, 1999; Spielman, 1971), a ausência de resposta à hemolinfa por parte dos machos de *C. albipunctata* e a resposta de alcalinização entre as fêmeas, pode mais uma vez ser indício de que parte desse mecanismo hoje adaptado ao processo de hematofagia partiu de uma condição plesiomórfica ainda mantida por *C. albipunctata*. Em outros insetos hematófagos, tal característica plesiomórfica poderia ser representada pela hemolinfagia (processo alimentar onde um inseto ingere a hemolinfa de outro inseto), como acontece entre alguns *Ceratopogonidae* (Marshall, 2012), sendo as proteínas presentes na hemolinfa o gatilho para uma mudança fisiológica no intestino desses insetos.

Somados aos resultados nos quais fêmeas de *C. albipunctata* responderam a alimentação rica em proteínas, alcalinizando seu pH intestinal (Figura 30) e se mostraram responsivas à hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue (Figura 31), temos mais uma evidência de que ambos os mecanismos representam plesiomorfias fisiológicas que no ancestral comum de um ramo hoje hematófago, representaram características facilitadoras do surgimento da hematofagia, enquadrando-se perfeitamente no conceito de exaptações fisiológicas.

Dentre as enzimas digestivas dos insetos, a tripsina se destaca como sendo uma das principais quando tratamos de digestão de proteínas (Applebaum, 1985; Walter R Terra & Ferreira, 1994; Wu et al., 2009). Trata-se de uma enzima ubíqua entre os eucariotos, sendo uma endopeptidase da classe das serino-proteases, com funções que não se restringem à função digestiva (Rawlings & Barrett, 1994; Wang et al., 2008). Dada a observação de que entre fêmeas de insetos hematófagos da subordem “Nematocera”, a enzima tripsina tem sua atividade aumentada após a alimentação com sangue (Gooding,

1973; Muller et al., 1995; Telleria et al., 2007), resolvemos testar a atividade dessa enzima em machos e fêmeas de *C. albipunctata* submetidos a diferentes dietas.

Nossos resultados mostraram que não existe diferença entre a atividade de tripsina de machos e fêmeas de *C. albipunctata* quando esses são submetidos a um mesmo tipo de tratamento alimentar, seja jejum, alimentação com sacarose 30% ou com soro humano inativado (Figura 33). Porém, quando analisamos os resultados comparando o efeito dessas dietas em um mesmo sexo, observamos que há diferença, sendo que a maior atividade foi encontrada entre os insetos submetidos ao jejum, e a menor atividade encontrada entre os insetos que se alimentaram de soro humano inativado (Figura 33).

Este resultado gerou curiosidade devido ao fato de que esperávamos encontrar maior atividade de tripsina entre os insetos que se alimentassem de soro humano inativado, isto porque, como dito anteriormente, a tripsina é a principal enzima envolvida com a digestão de proteínas entre os insetos hematófagos. Logo, uma alimentação rica em proteínas (soro humano inativado) deveria aumentar a atividade da tripsina.

Em *L. longipalpis*, foi observada a expressão diferencial de dois tipos de tripsinas, as quais tem sua expressão regulada por alguns fatores como o repasto sanguíneo (Telleria et al., 2007). Nesse inseto foi observado que durante o repasto sanguíneo ocorre um aumento na expressão de tripsina do tipo I (Lltryp1), com redução da expressão de tripsina do tipo II (Lltryp2), a qual, por sua vez é considerada constitutiva por ser aquela com maior expressão em insetos que se alimentam de açúcares (Jochim et al., 2008; Telleria et al., 2007). Expressão diferencial entre tipos de tripsinas também foi observada em *A. gambiae* (Muller et al., 1995; Müller et al., 1993).

Esse fato nos leva a pensar que, possivelmente, a queda observada na expressão de tripsina em *C. albipunctata* alimentados com soro humano, em comparação com aqueles deixados em jejum ou alimentados com açúcar, pode estar relacionada com a ausência de tipos diferentes de tripsina, sendo que a tripsina encontrada nesses insetos seria semelhante a Lltryp2 de *L. longipalpis*, que é a tripsina de expressão constitutiva, justamente a tripsina que, em *L. longipalpis*, sofre uma diminuição de sua expressão logo após a ingestão de sangue. Esse fato aponta para um provável evento de duplicação gênica na linhagem que deu origem ao ramo hematófago da família Psychodidae, bem como para os demais ramos hematófagos, pelo menos dentro de Culicidae, sendo que um dos

ortólogos pode ter sofrido regulação diferente, de modo que sua expressão fosse aumentada na presença de proteínas ingeridas.

Resolvemos também analisar como seria a atividade de tripsina em machos e fêmeas de *L. longipalpis* quando estes fossem submetidos a duas dietas semelhantes as que foram oferecidas para *C. albipunctata*: jejum e alimentação com sacarose 30%. Curiosamente, em ambas as alimentações houve diferença na atividade de tripsina entre machos e fêmeas, sendo as maiores atividades encontradas sempre entre as fêmeas (Figura 34). Ressaltamos o fato de que, as atividades encontradas entre as fêmeas de *L. longipalpis*, em valor, são semelhantes àquelas encontradas para machos e fêmeas de *C. albipunctata* submetidos ao jejum e a alimentação com sacarose 30% (Figura 33).

Levando em consideração o fato de que todos os insetos utilizados nos experimentos apresentavam a mesma idade após emergirem das pupas, acreditamos que a diferença na atividade de tripsina observada entre os machos e fêmeas de *L. longipalpis* não pode ser explicada por uma diferença na síntese e armazenamento da enzima em vesículas dos enterócitos desses insetos. Possivelmente a diferença observada reflete um papel diferente das tripsinas entre machos e fêmeas da espécie hematófaga *L. longipalpis*, sendo que, entre os machos, a enzima desempenha um papel por vezes de menor importância se comparado ao papel exercido entre as fêmeas. Além disso, os valores semelhantes encontrados entre fêmeas de *L. longipalpis* e machos e fêmeas de *C. albipunctata*, quando em jejum ou alimentados com sacarose 30%, evidenciam a conservação da atividade dessa enzima entre os ramos não-hematófago e hematófago da família Psychodidae. As baixas atividades encontradas entre os machos de *L. longipalpis*, que, à semelhança de *C. albipunctata*, não se alimentam de sangue, pode evidenciar modificações ligadas à expressão da enzima, as quais teriam relação com uma maior especificidade alimentar (machos de *L. longipalpis* alimentam-se exclusivamente de carboidratos).

Com isso, mostramos mais uma vez que a adaptação à hematofagia, no que diz respeito a digestão do sangue nesse insetos, passou pela modificação, seja ao nível de expressão ou de regulação, de uma enzima já ubíqua entre os organismos não-hematófagos, sem que sua função digestiva sofresse alterações. Essas modificações adaptativas se enquadram perfeitamente na definição aqui empregada de exaptação.

O surgimento da hematofagia representou um salto evolutivo extremamente importante entre os insetos, porque possibilitou aos organismos que a realizavam um aporte nutricional amplo em um pequeno período de tempo, o que conseqüentemente apresentava relação com uma menor exposição ao ambiente e uma maior capacidade reprodutiva. Todas essas vantagens adaptativas ajudam a entender em partes o porquê do surgimento independente desse processo alimentar dentro de “Nematocera”. (Anderson & Roitberg, 1999; Bradshaw, 1980; Day et al., 1994).

Porém, a hematofagia exigiu desses organismos determinadas adaptações fisiológicas, necessárias para lidar com determinados fatores estressores, garantindo o sucesso alimentar. Dentre os fatores estressores impostos aos organismos hematófagos temos aqueles que vieram diretamente da ingestão de sangue, como por exemplo, o estresse térmico gerado pela ingestão de sangue de animais de sangue quente (Benoit & Lopez-Martinez, 2012; Dana et al., 2005; Paim et al., 2016), bem como de fatores intrínsecos ao hospedeiro, os quais estariam relacionados com fatores hemostáticos e imunológicos (Cavalcante et al., 2003; Mans & Neitz, 2004; Ribeiro, J. C. et al, 1987).

Outro exemplo de fator relacionado diretamente à ingestão de sangue é o estresse oxidativo gerado durante a digestão do sangue (Graça-Souza et al., 2006; Gutteridge & Smith, 1988). Como parte natural do sistema imune de insetos, temos a produção e liberação luminal de espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre as quais podemos citar: hipoclorito, superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (Ha et al., 2005; Hoffmann J. A., 1995; Hultmark, 1993; Rada & Leto, 2008). Durante a digestão do sangue ingerido pelo inseto, temos a degradação da hemoglobina presente nas hemácias, com conseqüente liberação de seu grupo prostético, o grupo heme, o qual em contato com peróxido de hidrogênio produz formas reativas de oxigênio extremamente nocivas ao epitélio intestinal (Graça-Souza et al., 2006; Tappel, 1995).

Neste trabalho nos propusemos a analisar a atividade de catalase no intestino de machos de fêmeas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (duas populações). A catalase é uma importante enzima relacionada com a manutenção da homeostase oxidativa, atuando diretamente na degradação de peróxido de hidrogênio, o qual é convertido a água e oxigênio gasoso (Chance et al., 1979). Sua presença no intestino de insetos pode estar relacionada com o controle do estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio (ROS), como parte do sistema imune inato desses

organismos. Nos insetos hematófagos, sua função vai além da homeostase oxidativa imunológica, estabelecendo relação direta com o processo de digestão, evitando o acúmulo e conseqüente toxicidade gerada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a digestão (Graça-Souza et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que não existe diferença na atividade de catalase encontrada no intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, nosso modelo não-hematófago (Figura 35). Porém, quando analisamos as atividades encontradas no intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti*, nossas espécies hematófagas, notamos que existe diferença na atividade dessa enzima entre os intestinos de cada sexo (Figura 35). As maiores atividades são encontradas nos intestinos das fêmeas, aqueles organismos que efetivamente se alimentam de sangue e tem que lidar com a presença de grupamento heme no seu intestino.

Curiosamente, para *C. quinquefasciatus*, não observamos diferença na atividade de catalase entre os intestinos de machos e fêmeas (Figura 35). Esse resultado causou estranheza, uma vez que para duas das espécies hematófagas analisadas, a diferença encontrada entre os intestinos de machos e fêmeas foram bem evidentes. Inicialmente pensamos que a ausência de diferença na atividade de catalase entre os intestinos de machos e fêmeas poderia ser explicada pelo fato de os mosquitos da colônia a partir da qual obtivemos os insetos utilizados no experimento, não apresentarem comportamento alimentar usual. Como dito anteriormente, os insetos da colônia de *C. quinquefasciatus* mantidos no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), só se alimentam de forma artificial, em algodão embebido em sangue humano heparinizado. Durante a alimentação desses insetos, observam-se inúmeros machos que, assim como as fêmeas, ingerem o sangue contido no algodão. Pensamos então que nosso resultado poderia ser explicado pelo fato de estarmos presenciando/induzindo um evento de seleção artificial em laboratório, isso porque a maior longevidade daqueles insetos machos que se alimentassem de sangue e conseguissem digeri-lo de forma eficiente (por apresentarem uma maior expressão de catalase), resultaria por vezes em uma maior taxa reprodutiva, tendo como resultado final a fixação do caráter de alta expressão de catalase entre os machos de *C. quinquefasciatus* de nossa colônia.

Para testar essa hipótese, realizamos então ensaios de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de *C. quinquefasciatus* provenientes de uma população de campo da

cidade de Betim, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Curiosamente os resultados obtidos para esses insetos foram semelhantes aos obtidos para a população de laboratório de *C. quinquefasciatus*, não sendo observada diferença na atividade de catalase entre os intestinos de machos e fêmeas (Figura 35). Porém, ressalta-se que as atividades de catalase encontradas para os insetos da população de campo, foram menores do que aquelas encontradas para os insetos da população de laboratório.

É interessante notarmos ainda que, para machos de *L. longipalpis* e de *A. aegypti*, ou seja, organismos que ao longo de sua vida não se alimentam de sangue, as atividades de catalase são semelhantes às aquelas encontradas para machos e fêmeas de *C. albipunctata* (Figura 35), o que pode ter relação com a proteção ao estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio não relacionadas à digestão de sangue.

Em conjunto, esses resultados reforçam ainda mais a hipótese de que, as adaptações à hematofagia se fixaram a partir de características já existentes nos ancestrais dos organismos hoje hematófagos. Os caracteres já existentes funcionaram como facilitadores do processo. No caso da catalase, observamos que entre os organismos que efetivamente se alimentam de sangue, é observada uma exacerbação na atividade dessa enzima, o que pode estar ligado a uma maior taxa de expressão fixada nesses organismos. Ressaltamos mais uma vez que, pela lei da parcimônia evolutiva, a evolução sempre caminha na direção com o menor número de modificações possíveis para o estabelecimento de um caráter. Portanto, atuar sobre uma proteína já existente, apenas aumentando sua expressão ou responsividade, exige um menor “esforço evolutivo”, apontando a atividade de catalase em insetos hematófagos como uma exaptação.

O resultado encontrado para *C. quinquefasciatus*, diverge do pensamento anteriormente exposto, porém podemos levar em consideração algumas correntes de taxonomistas que apontam que em algumas famílias de Diptera, a hematofagia seria o caráter plesiomórfico e a alimentação independente de sangue, o caráter derivado (Lounibos et al., 1982; O'Meara, 1985). Esse pensamento poderia explicar o porquê de machos de *C. quinquefasciatus* ainda apresentarem altas taxas de atividade de catalase, contudo não impedindo que a ideia de exaptação seja aqui novamente aplicada, atuando no sentido de diminuir a expressão/atividade da enzima em organismos onde o caráter não-hematófago já esteja bem fixado.

As α -glicosidases são um conjunto de enzimas de extrema importância entre os insetos, isso porque são as enzimas envolvidas com a digestão de grande parte dos carboidratos por esses insetos ingeridos (W.R. Terra & Ferreira, 2005; Walter R Terra & Ferreira, 1994). Destacamos aqui que, em *R. prolixus*, essa enzima foi apontada como sendo de essencial importância para a formação de hemozoína, produto de detoxificação de grupamentos heme resultantes da digestão do sangue ingerido por esses insetos (Mury et al., 2009). A produção de hemozoína está diretamente relacionada com a diminuição de grupamentos heme nos enterócitos dos insetos hematófagos, o que por sua vez colabora para uma menor chance de reações entre grupamentos heme livres e espécies reativas de oxigênio.

Dada a importância dessa enzima no processo de detoxificação em um organismo hematófago, resolvemos testar sua atividade nos intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, a fim de identificar e caracterizar a atividade dessa enzima nesses insetos, bem como estabelecer relação entre a enzima e a hematofagia.

Nossos resultados apontaram que não existe diferença entre a atividade de α -glicosidase do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, um organismo que ao longo de toda sua vida não se alimenta de sangue (Figura 36). Curiosamente, quando realizamos os ensaios com machos e fêmeas de *L. longipalpis*, observamos que existe maior atividade dessa enzima nos intestinos de fêmeas (Figura 37), resultado este que vai em concordância com nossa hipótese inicial de que a atividade da enzima seria maior entre os organismos hematófagos, dada sua participação na transformação dos grupos heme provenientes da digestão de sangue em hemozoína. Porém, quando analisamos os resultados obtidos para machos e fêmeas de duas outras espécies hematófagas, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, observamos que não existe diferença na atividade da enzima entre machos e fêmeas dessas espécies (Figuras 38 e 39).

Analisamos então os resultados obtidos para um mesmo sexo de diferentes espécies, e observamos que tanto entre os machos como entre as fêmeas, as maiores atividades são encontradas nos intestinos de *C. albipunctata* (Figuras 40 e 41). A maior atividade encontrada nos intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* pode ter relação com a alimentação desses insetos durante sua vida adulta, a qual ainda não se encontra descrita, podendo esse inseto viver somente com as reservas alimentares

acumuladas enquanto larva, ou se alimentar de secreções açucaradas. De toda forma, nossos resultados não são suficientes para que possamos estabelecer uma relação entre a atividade de α -glicosidase e o sucesso da hematofagia dentro de “Nematocera”. A associação dos nossos resultados com experimentos que verificassem a formação de hemozoína nos intestinos dos insetos aqui estudados poderiam esclarecer de forma mais satisfatória a associação entre as α -glicosidases e a hematofagia.

As α -glicosidases possuem atividade ótima em valores ácidos de pH (5 - 6.5), o que coincide com o valor de pH luminal de insetos hematófagos como *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2017). As α -glicosidases de membrana, pelo menos de *L. longipalpis*, não possuem distribuição uniforme ao longo do intestino médio, a maior parte das enzimas se encontram na porção anterior do intestino médio (intestino médio torácico), região esta que não sofre alteração de pH quando o inseto se alimenta de sangue, portanto temos uma relação entre a distribuição da enzima e uma regionalização fisiológica de pH (Gontijo et al., 1996, 1998). Essas observações nos levaram a pensar se a regionalização dessas enzimas, encontrada no intestino de algumas espécies hematófagas, já estaria presente o intestino médio de um organismo não-hematófago. Para testar essa hipótese, realizamos ensaios de atividade da enzima dividindo o intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* em duas porções.

Como descrito anteriormente, os intestinos de fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* apresentam divisão natural, o que permitiu que os intestinos fossem divididos em suas porções torácica e abdominal (Figuras 20, 22 e 24). Já os intestinos de machos e fêmeas de *C. albipunctata* e machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* não apresentam divisão natural e, portanto, tiveram suas porções separadas cortando-se o intestino ao meio (Figuras 18, 19, 21, 23 e 25).

De forma muito interessante, nossos resultados mostraram que existe diferença na atividade de α -glicosidase entre as porções anterior/torácica e posterior/abdominal tanto de machos quanto de fêmeas, para todas as espécies analisadas: *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Figuras 42 a 49). As maiores atividades foram sempre encontradas na porção anterior/torácica dos intestinos, o que coincide com os resultados encontrados por Gontijo e colaboradores em 1998, no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*. Nossos resultados também se relacionam com estudos de pH

intestinal de insetos hematófagos como *L. longipalpis* e *A. aegypti*, os quais mostraram que a região do intestino médio torácico desses insetos permanece ácida mesmo após o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas (Nepomuceno et al., 2017; Vânia C. Santos et al., 2011; Vânia C Santos et al., 2008).

A presença de uma maior atividade de α -glicosidase na porção anterior do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata* e machos de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, organismos que não se alimentam de sangue em nenhuma fase de suas vidas, em semelhança a maior atividade encontrada na região do intestino médio torácico de fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, apontam para o fato de que, provavelmente, os organismos que vieram a se tornar hematófagos fizeram proveito de uma regionalização enzimática já presente no intestino de ancestrais não-hematófagos, o que fica evidente pela regionalização encontrada no intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata*. Esse resultado vem em concordância com nossa ideia de que exaptações fisiológicas e morfológicas estão extremamente relacionadas às características que possibilitaram o sucesso e o estabelecimento da hematofagia em Diptera.

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato de organismos vertebrados, compreendendo uma série de proteínas que atuam em cascata, culminando com a formação de poros e consequente lise de patógenos invasores, sendo ativado por três vias, todas resultando na formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) (Dodds & Sim, 1997; Ricklin et al., 2010).

A presença de inibidores do sistema complemento é de fundamental importância para o sucesso alimentar de organismos hematófagos, uma vez que a ausência desses inibidores resultaria por vezes no rompimento do epitélio intestinal desses organismos (Barros et al., 2009; Saab et al., 2020). Esses inibidores podem ser tanto intestinais quanto salivares e já foram descritos em organismos como *L. longipalpis*, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *A. aquasalis* e *Amblyomma cajennense* e outras espécies de carrapatos (Cavalcante et al., 2003; Ferreira et al., 2016; Franco et al., 2016; Lara, 2020; Lawrie et al., 1999, 2005; Mendes-Sousa et al., 2018; Pereira-Filho et al., 2020; JoséM M.C. Ribeiro, 1987; Saab et al., 2020).

Aqui nos propusemos a verificar se um organismo não hematófago, *C. albipunctata*, apresentaria inibidores para o sistema complemento em seu conteúdo intestinal, fato esse que demonstraria um caráter exaptativo dos inibidores hoje encontrados entre os organismos hematófagos.

Nossos resultados, apesar de ainda preliminares, mostraram que o conteúdo intestinal, tanto de machos quanto de fêmeas de *C. albipunctata* apresentam indícios de causar inibição da via clássica do complemento humano (Figura 50). Por motivos técnicos, não fomos capazes de realizar experimento que pudessem aumentar nosso número amostral ou mesmo que nos permitissem analisar se o conteúdo intestinal de *C. albipunctata* é capaz de inibir as vias alternativa e das lectinas do sistema complemento humano.

Anteriormente mostramos que não existe diferença entre a atividade de tripsina no intestino de machos e fêmeas de *C. albipunctata*, mas que atividades de tripsina diferentes são encontradas quando esses insetos são submetidos a diferentes tipos de dietas (Figura 33). O resultado que causou mais curiosidade entre nós foi que tanto para machos quanto para fêmeas de *C. albipunctata*, a menor atividade tripsinolítica é encontrada naqueles insetos que se alimentaram de soro humano inativado (Figura 33). Esse resultado causou estranheza dado o fato de que, entre os insetos a enzima tripsina é aquela que está diretamente relacionada com a digestão de proteínas.

Também como dito anteriormente, para *L. longipalpis*, *Phlebotomus papatasi* e alguns mosquitos, estudos apontam para o fato de que esses insetos apresentam mais de um tipo de tripsina, as quais por sua vez tem sua atividade e expressão controladas de forma diferencial segundo a alimentação daqueles insetos (Muller et al., 1995; Müller et al., 1993; Telleria et al., 2007).

Levando em consideração as exposições anteriores, hipotetizamos que a tripsina encontrada e ensaiada por nós em *C. albipunctata* seria ortóloga a tripsina do tipo 2 (Lltryp2) de *L. longipalpis*, a qual tem sua expressão e atividade máxima no período de vida desse inseto no qual ele se alimenta de soluções açucaradas. Para testar essa hipótese, realizamos análises filogenéticas com base nas sequências de tripsinas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis* e outros Diptera hematófagos ou não.

Nossos resultados mostraram que *C. albipunctata* possui duas tripsinas, as quais são ortólogas entre si, sugerindo que são derivadas de evento de duplicação gênica “*in tandem*”. Quanto a história evolutiva dessas tripsinas, obtivemos dois resultados que divergem entre si quanto a sua interpretação. Nosso primeiro resultado (Figura 51), aponta para o fato de que as tripsinas de *C. albipunctata* são ortólogas a tripsina do tipo 1 de *L. longipalpis* (Lltryp1), resultado este que vai contra nossa hipótese inicial, uma vez que, em caráter de função e expressão, observamos que as tripsinas de *C. albipunctata* tem sua menor atividade em presença de solução rica em proteínas (Figura 33). Nosso segundo resultado (Figura 52), ao contrário do primeiro, já mostra uma relação de ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 2 de *L. longipalpis* (Lltryp2). Este resultado vai em concordância com nossa hipótese inicial e com nossos resultados de atividade tripsinolítica para *C. albipunctata* e *L. longipalpis*. Contudo, os índices de “*Bootstrap*” para a filogenia foram muito baixos, o que gera baixa confiabilidade para os resultados.

Com isso temos um resultado de alta confiabilidade que vai contra os resultados de função que obtivemos, e com resultado com baixa confiabilidade que vai em concordância com os resultados funcionais para as tripsinas de *C. albipunctata*. Como nossa melhor árvore filogenética é aquela que aponta para a ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 1 de *L. longipalpis* (Lltryp1), acreditamos que a diferença observada entre as funções dessas tripsinas (aumento ou diminuição da atividade frente à soluções ricas em proteínas) pode estar relacionada a uma diferença no controle de expressão dessas enzimas, que apesar de ortólogas em sua parte codificante, podem ter promotores com formas diferentes de ativação.

Realizamos também análises filogenéticas para outras duas enzimas: catalase e 4-HPPD, duas importante enzimas relacionadas com a detoxificação de produtos gerados a partir da digestão de sangue nos insetos hematófagos (Graça-Souza et al., 2006; Sterkel et al., 2016). Para a enzima catalase, nossos resultados mostraram uma relação filogenética para a enzima que se assemelha as atuais filogenias propostas para os Diptera (Wiegmann et al., 2011), mostrando que *C. albipunctata* e outros Diptera possuem uma única cópia gênica dessa enzima (Figura 53). Contudo, a árvore também nos dá indícios de que a enzima evoluiu de uma forma diferente dentro de Psychodidae, com mudanças que não influenciaram sua função, mas a distanciou filogeneticamente da enzima de outros “Nematocera”.

Para a enzima 4-HPPD, nossos resultados mostraram que a enzima está presente no genoma de importantes espécies de Muscomorpha e Culicomorpha, porém não conseguimos identifica-la em *C. albipunctata* e *L. longipalpis* (Figura 54), o que pode estar relacionado com falhas durante o sequenciamento gênico desses organismos, ou mesmo com a ausência da enzima no genoma de alguns Diptera. Chama a atenção o fato de que conseguimos encontrar a enzima em *P. papatasi*, o que reforça as hipóteses de falha no sequenciamento ou perda do gene codificante para a enzima. De qualquer forma, se destaca aqui o estudo de Sterkel e colaboradores em 2016, que evidenciou a importância da enzima 4-HPPD no processo de digestão de sangue em *R. prolixus*. Investigações mais específicas para verificação da expressão ou atividade dessa enzima em dípteros hematófagos seriam de grande importância, principalmente entre as espécies que aqui analisamos e que se agruparam dentro de Culicomorpha.

Em suma, nossos resultados apresentaram uma série de evidências que comprovam nossa hipótese inicial de que, pelo menos parte das adaptações relacionadas com o processo de hematofagia em Diptera, tratam-se na verdade de exaptações evolutivas, conceito este que nos permite explicar pelo menos em parte a “facilidade” com que a hematofagia surgiu, de forma independente, várias vezes dentro da ordem Diptera. Mais uma vez, é mais parcimoniosa, em termos evolutivos, a ideia de que exige um menor “esforço evolutivo” para modificar um caráter já existente sem que sua função seja alterada, do que modificar, por pressões evolutivas diversas, um caráter de função totalmente diversa àquela que se espera posteriormente.

7. CONCLUSÕES

- Machos e fêmeas de *C. albipunctata* não apresentam diferenças morfológicas entre seus intestinos médios.
- Fêmeas de *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* apresentam diferenças morfológicas em seu intestino médio que é dividido em duas porções (intestino médio torácico e intestino médio abdominal), resultado oposto ao encontrado para os machos dessas espécies, os quais não possuem divisões morfológicas que permitam a separação do seu intestino médio.
- Machos e fêmeas de *C. albipunctata* apresentam pH intestinal ácido (pH =6) assim como fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti*. Além disso ambos os sexos de *C. albipunctata* apresentam capacidade de manter de forma ativa seu pH intestinal ácido, assim como ocorre em *L. longipalpis* e *A. aegypti*.
- Quando submetido a alimentação rica em proteínas, tanto fêmeas quanto machos de *C. albipunctata* mostraram capacidade de alcalinizar o pH intestinal, porém essa alcalinização foi mais eficaz e evidente entre as fêmeas.
- O intestino médio de fêmeas de *C. albipunctata* responde à hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *L. longipalpis*. Essa resposta é evidenciada pela alcalinização do pH intestinal logo após a aplicação da hemolinfa. Os machos de *C. albipunctata* não se mostraram responsivos.
- Não existe diferença na atividade de tripsina do intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata* quando estes são submetidos a um mesmo tipo de dieta. Porém, para diferentes dietas encontramos diferentes atividades, sendo a maior atividade encontrada nos insetos que foram mantidos em jejum, e a menor atividade encontrada entre os insetos que se alimentaram de soro humano inativado.
- Há diferença entre a atividade de tripsina no intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis* quando estes são submetidos a diferentes dietas. As maiores atividades são encontradas nos intestinos de fêmeas.
- Não há diferença entre a atividade de catalase no intestino médio de machos e fêmeas de *C. albipunctata* e de duas populações de *C. quinquefasciatus*. Porém uma maior atividade é encontrada no intestino médio de fêmeas das espécies *L. longipalpis* e *A. aegypti*.

- Existe diferença entre a atividade de α -glicosidase do intestino médio de machos e fêmeas de *L. longipalpis*, sendo a maior atividade encontrada no intestino médio de fêmeas. Porém não foram encontradas diferenças nas atividades entre machos e fêmeas de *C. albipunctata*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.
- Tanto machos quanto fêmeas de *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, apresentam diferença na distribuição de α -glicosidases em seus intestinos. As maiores atividades dessa enzima foram encontradas sempre na porção anterior do intestino médio desses insetos.
- O conteúdo intestinal de *C. albipunctata* apresenta indícios de capacidade inibitória para a via clássica do sistema complemento humano.
- Existe relação de ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e ambas as tripsinas de *L. longipalpis*, porém uma maior confiabilidade é dada a ortologia entre as tripsinas de *C. albipunctata* e a tripsina do tipo 1 de *L. longipalpis* (Lltryp1).
- A enzima catalase é codificada a partir de um gene de cópia única no genoma de algumas espécies de Diptera, dentre elas as espécies aqui ensaiadas: *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Há indícios de que a enzima evoluiu de forma diferente dentro de Psychodidae.
- O gene codificante para a enzima 4-HPPD não foi identificado no genoma de *C. albipunctata* e *L. longipalpis*, impedindo que fosse estabelecida relação filogenética em agrupamento representativo de Diptera.
- Os resultados aqui apresentados confirmam a hipótese de que grande parte das adaptações relacionadas à hematofagia enquadraram-se no conceito de exaptações evolutivas, sendo este termo mais adequado por trazer inferências funcionais de plesiomorfias e apomorfias relacionadas com a hematofagia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, T. S. (1999). Hematophagy and Hormone Release. *Annals of the Entomological Society of America*, 92(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/aesa/92.1.1>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Alaniz, A. J., Carvajal, M. A., Bacigalupo, A., & Cattan, P. E. (2019). Global spatial assessment of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* : a scenario of Zika virus exposure. *Epidemiology and Infection*, 147, e52. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003102>
- Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. C. (2017). Salivary Kratagonists. In *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2* (Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805360-7.00004-6>
- Anderson, R. A., & Roitberg, B. D. (1999). Modelling trade-offs between mortality and fitness associated with persistent blood feeding by mosquitoes. *Ecology Letters*, 2(2), 98–105. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.1999.22055.x>
- Andrade-Filho, J. D., Scholte, R. G. C., Amaral, A. L. G., Shimabukuro, P. H. F., Carvalho, O. S., & Caldeira, R. L. (2017). Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 54(5), 1430–1434. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx094>
- Andreadis, T. G. (2005). *Identification guide to the mosquitoes of Connecticut*. Connecticut Agricultural Experiment Station.
- Applebaum, W. S. (1985). Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology* (pp. 279–311). Pergamon Press.
- Azar, D., & Nel, A. (2012). Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terrestrial Arthropod Reviews*, 5(1), 15–34. <https://doi.org/10.1163/187498312x620577>
- Balashov, Y. S. (1984). Interaction Between Blood-Sucking Arthropods and Their Hosts, and Its Influence on Vector Potential. *Annual Review of Entomology*, 29(1),

137–156. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.29.010184.001033>

- Barros, V. C., Assumpção, J. G., Cadete, A. M., Santos, V. C., Cavalcante, R. R., Araújo, R. N., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2009). The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and mosquitoes. *PLoS ONE*, *4*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006047>
- Bartholomay, L. C., Waterhouse, R. M., Mayhew, G. F., Campbell, C. L., Michel, K., Zou, Z., Ramirez, J. L., Das, S., Alvarez, K., Arensburger, P., Bryant, B., Chapman, S. B., Dong, Y., Erickson, S. M., Karunaratne, S. H. P. P., Kokoza, V., Kodira, C. D., Pignatelli, P., Shin, S. W., ... Muskavitch, M. A. T. (2010). Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and Meta-Analysis of Infection Responses to Diverse Pathogens. *Science*, *330*(6000), 88–90. <https://doi.org/10.1126/science.1193162>
- Bates, M. (1949). *The natural history of mosquitoes*. New York : The Macmillan Co.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, *37*(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bauzer, L. G., Souza, N. A., Maingon, R. D., & Peixoto, A. A. (2007). *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000100001>
- Benoit, J. B. ., & Lopez-Martinez, G. (2012). Role of conventional and unconventional stress proteins during the response of insects to traumatic environmental conditions. In *Hemolymph proteins and functional peptides: recent advances in insects and other arthropods* (Vol. 1, pp. 128–160). Bentham Science Publishers.
- Bertone, M. A., Courtney, G. W., & Wiegmann, B. M. (2008). Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. *Systematic Entomology*, *33*(4), 668–687. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.00437.x>
- Bogitsh, Burton J.; Carter, Clint E.; Oeltmann, T. N. (2018). *Human parasitology*. Academic Press.

- Bradshaw, W. E. (1980). Blood-feeding and Capacity for Increase in the Pitcher-plant Mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Environmental Entomology*, 9(1), 86–89.
<https://doi.org/10.1093/ee/9.1.86>
- Carvalho, F. D., & Moreira, L. A. (2017). Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotropical Entomology*, 46(3), 243–255.
<https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4>
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2003a). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, 127(1), 87–93. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003329>
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2003b). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, 127(1), 87–93. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003329>
- Champion, C. J., & Xu, J. (2017). The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 105, pp. 79–85). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.031>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chiba, S. (1997). Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(8), 1233–1239.
<https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>
- Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. de. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. In *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*.
<https://doi.org/10.7476/9788575412909>
- Crombach, A., García-Solache, M. A., & Jaeger, J. (2014). Evolution of early development in dipterans: Reverse-engineering the gap gene network in the moth midge *Clogmia albipunctata* (Psychodidae). In *BioSystems* (Vol. 123, pp. 74–85).
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2014.06.003>
- da Costa, S. G., Bates, P., Dillon, R., & Genta, F. A. (2019). Characterization of α -

Glucosidases From *Lutzomyia longipalpis* Reveals Independent Hydrolysis Systems for Plant or Blood Sugars. *Frontiers in Physiology*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00248>

Dana, A. N., Hong, Y. S., Kern, M. K., Hillenmeyer, M. E., Harker, B. W., Lobo, N. F., Hogan, J. R., Romans, P., & Collins, F. H. (2005). Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-5>

Dansa-Petretski, M., Ribeiro, J. M. C., Atella, G. C., Masuda, H., & Oliveira, P. L. (1995). Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 18, pp. 10893–10896). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10893>

Day, J. F., Edman, J. D., & Scott, T. W. (1994). Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. *Journal of Medical Entomology*, 31(4), 611–617. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.4.611>

DeJong, R. J., Miller, L. M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., & Barillas-Mury, C. (2007). Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2121–2126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608407104>

DeLisi, N., Ottea, J., & Healy, K. (2017). Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Southern Louisiana to Larval Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 110(6), 2562–2567. <https://doi.org/10.1093/jee/tox244>

Demaurex, N. (2002). pH homeostasis of cellular organelles. *News in Physiological Sciences*, 17(1), 1–5. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1>

Dodds, A. W., & Sim, R. B. (1997). *Complement: a practical approach*. Oxford University Press.

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>

- El-Badry, A. A., Salem, H. K. hair., & El-Aziz Edmardash, Y. A. b. (2014). Human urinary myiasis due to larvae of *Clogmia (Telmatoscopus) albipunctata* Williston (Diptera: Psychodidae) first report in Egypt. *Journal of Vector Borne Diseases*, *51*(3), 247–249.
- El-Dib, N. A., Ali, M. I., Hamdy, D. A., & Abd El Wahab, W. M. (2020). Human intestinal myiasis caused by *Clogmia albipunctata* larvae (Diptera: Psychodidae): First report in Egypt. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(4), 661–663. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.07.023>
- El-Dib, N. A., El Wahab, W. M. A., Hamdy, D. A., & Ali, M. I. (2017). Case report of human urinary myiasis caused by *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodidae) with morphological description of larva and pupa. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, *11*(4), 533–538.
- Espíndola, A., Buerki, S., Jacquier, A., Ježek, J., & Alvarez, N. (2012). Phylogenetic relationships in the subfamily Psychodinae (Diptera, Psychodidae). *Zoologica Scripta*, *41*(5), 489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2012.00544.x>
- Faulde, M., & Spiesberger, M. (2012). Hospital infestations by the moth fly, *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae), in Germany. *Journal of Hospital Infection*, *81*(2), 134–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.04.006>
- Faulde, M., & Spiesberger, M. (2013). Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *Journal of Hospital Infection*, *83*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.09.019>
- Ferreira, V. P., Fazito Vale, V., Pangburn, M. K., Abdeladhim, M., Ferreira Mendes-Sousa, A., Coutinho-Abreu, I. V., Rasouli, M., Brandt, E. A., Meneses, C., Lima, K. F., Nascimento Araújo, R., Horácio Pereira, M., Kotsyfakis, M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M. C., Gontijo, N. F., Collin, N., & Valenzuela, J. G. (2016). SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*, *6*(January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19300>
- Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., & Morrison, A. C. (1997). Larval Microhabitats of

- Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 34(6), 719–728.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/34.6.719>
- Forattini, O. P. (1973). *Entomologia médica: 4º volume: psychodidae. phlebotominae. leishmanioses. bartonelose.* (4º Volume).
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia* (v2 ed.).
- Franco, P. F., Silva, N. C. S., Fazito do Vale, V., Abreu, J. F., Santos, V. C., Gontijo, N. F., Valenzuela, J. G., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R. V., Gomes, A. P. S., & Araujo, R. N. (2016). Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 164, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.002>
- Friedrich, M., & Tautz, D. (1997). Evolution and phylogeny of the Diptera: A molecular phylogenetic analysis using 28S rDNA sequences. *Systematic Biology*, 46(4), 674–694. <https://doi.org/10.2307/2413500>
- García-Solache, M., Jaeger, J., & Akam, M. (2010). A systematic analysis of the gap gene system in the moth midge *Clogmia albipunctata*. *Developmental Biology*, 344(1), 306–318. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.019>
- Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., Coetzee, M., Elahee, K. Bin, Fernandez-Salas, I., Kamal, H. A., Kamgang, B., Khater, E. I. M., Kramer, L. D., Kramer, V., Lopez-Solis, A., Lutomiah, J., Martins, A., Micieli, M. V., Paupy, C., ... Powell, J. R. (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology*, 25(21), 5377–5395. <https://doi.org/10.1111/mec.13866>
- Gökçe, D. (2020). Synanthropic *Clogmia albipunctata* Causing Urogenital and Gastrointestinal Myiasis. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 44(3), 182–184. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6853>
- Gontijo, N. F., Almeida-Silva, S., Costa, F. F., Mares-Guia, M. L., Williams, P., & Melo, M. N. (1998). *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. *Experimental Parasitology*,

90(3), 212–219. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4336>

- Gontijo, N. F., Melo, M. N., Riani, E. B., Almeida-Silva, S., & Mares-Guia, M. L. (1996). Glycosidases in *Leishmania* and their importance for *Leishmania* in phlebotomine sandflies with special reference to purification and characterization of a sucrase. *Experimental Parasitology*, 83(1), 117–124. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0055>
- Gooding, R. H. (1973). The digestive processes of haematophagous insects iv. secretion of trypsin by *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, 105(4), 599–603. <https://doi.org/10.4039/Ent105599-4>
- Gould, S. J., & Vrba, E. S. (1982). Exaptation—a Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology*, 1(N/A), 4–15. <https://doi.org/10.1017/S0094837300004310>
- Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R. C., Paes, M. C., Sorgine, M. H. F., Oliveira, M. F., & Oliveira, P. L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4 SPEC. ISS.), 322–335. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.009>
- Grimaldi, D., & Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. www.cambridge.org/9780521821490
- Griswold, C. M., Matthews, A. L., Bewley, K. E., & Mahaffey, J. W. (1993). Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134(3), 781–788. <https://doi.org/10.1093/genetics/134.3.781>
- Gubler, D. J. (1991). Insects in disease transmission. *Hunter Tropical Medicine*.
- Gutteridge, J. M. C., & Smith, A. (1988). Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 256(3), 861–865. <https://doi.org/10.1042/bj2560861>
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., & Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310(5749), 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.1117311>
- Harhay, M. O., Olliaro, P. L., Costa, D. L., & Costa, C. H. N. (2011). Urban

- parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, 27(9), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>
- Harrison, J. F. (2001). *Insect Acid-Base Physiology*.
- Hennig, W. (1953). Kritische Bemerkungen zum phylogenetischen System der Insekten.(Mit Beiträgen von H. Bollmann und J. Machatschke). In *Beiträge zur Entomologie= Contributions to Entomology* (v. 3, pp. 1–85).
- Hennig, W. (1973). Diptera (Zweiflugler). In *Handbuch der zoologie* (v. 4, pp. 1–337).
- Hjaija, D., Sawalha, S. S., Amr, Z. S., Katbeh-Bader, A., & Hassoon, R. A. H. (2018). Urinary myiasis caused by *Clogmia albipunctata* from the Palestinian territories. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, 11(3), 148–151. <https://doi.org/10.3166/bspe-2018-0037>
- Hoffmann J. A. (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, 7, 4–10.
- Hopp, M. J., & Foley, J. A. (2001). Global-Scale Relationships between Climate and the Dengue Fever Vector, *Aedes aegypti*. *Climatic Change*, 41, 441–463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1010717502442>
- Hultmark, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics*, 9(5), 178–183. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90165-E](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90165-E)
- Ibáñez-Bernal, S. (2008). New Records and Descriptions of Mexican Moth Flies (Diptera: Psychodidae, Psychodinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 134(1 & 2), 87–131. [https://doi.org/10.3157/0002-8320\(2008\)134\[87:nradom\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3157/0002-8320(2008)134[87:nradom]2.0.co;2)
- Janssens, H., Siggins, K., Cicin-Sain, D., Jiménez-Guri, E., Musy, M., Akam, M., & Jaeger, J. (2014). A quantitative atlas of Even-skipped and Hunchback expression in *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodidae) blastoderm embryos. *EvoDevo*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-1>
- Jiménez-Guri, E., Wotton, K. R., Gavilán, B., & Jaeger, J. (2014). A staging scheme for the development of the moth midge *Clogmia albipunctata*. *PLoS ONE*, 9(1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084422>

- Jiménez-Guri, E., Wotton, K. R., & Jaeger, J. (2018). Tarsal-less is expressed as a gap gene but has no gap gene phenotype in the moth midge *Clogmia albipunctata*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/266288>
- Jochim, R. C., Teixeira, C. R., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R. B., Elnaiem, D. E., & Valenzuela, J. G. (2008). The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: Comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* chagasi-infected sand flies. *BMC Genomics*, 9, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-15>
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *ELife*, 4(JUNE2015), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kurochkin, E. N., & Bogdanovich, I. A. (2008). On the origin of avian flight: Compromise and system approaches. *Biology Bulletin*, 35(1), 1–11. <https://doi.org/10.1134/S1062359008010019>
- Kvifte, Gunnar M., & Wagner, R. (2017). 24 Psychodidae (Sand Flies, Moth Flies or Owl Flies). In A. H. Kirk-Spriggs & B. J. Sinclair (Eds.), *Manual of Afrotropical Diptera* (Suricata 5, Vol. 2, Issue Nematoceros Ditpera and lower Brachycera, pp. 607–632). South African National Biodiversity Institute.
- Kvifte, Gunnar Mikalsen. (2015). *AFROTROPICAL MOTH FLIES Gunnar Mikalsen Kvifte* (Issue April). University of Bergen.
- Lainson, R., & Rangel, B. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 811–827. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>
- Lara, L. de M. (2020). *ADAPTAÇÃO A HEMATOFAGIA: COMO FÊMEAS E MACHOS DE Culex quinquefasciatus (DIPTERA: CULICIDAE) ENFRENTAM O*

*ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO APÓS
REPASTO SANGUÍNEO.* Universidade Federal de Minas Gerais.

- Lawrie, C. H., Randolph, S. E., & Nuttall, P. A. (1999). *Ixodes* ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*, 93(4), 207–214. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4456>
- Lawrie, C. H., Sim, R. B., & Nuttall, P. A. (2005). Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Molecular Immunology*, 42(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.001>
- Lehane, M. J. (1992). *Biology of blood sucking insects*. Chapman & Hall.
- Lehane, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects* (Second Edi). Cambridge University Press.
- Lehane, M. J. (2009). Blood Sucking. In *Encyclopedia of Insects* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00037-0>
- Lemaitre, B., & Miguel-Aliaga, I. (2013). The Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics*, 47(1), 377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133343>
- Lindstedt, S. (1992). Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *The Lancet*, 340(8823), 813–817. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92685-9](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92685-9)
- Lounibos, L. P., Van Dover, C., & O'Meara, G. F. (1982). Fecundity, autogeny, and the larval environment of the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Oecologia*, 55(2), 160–164. <https://doi.org/10.1007/BF00384482>
- Mackay, W. J., & Bewley, G. C. (1989). The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: Isolation and characterization of acatalasemic mutants. *Genetics*, 122(3), 643–652. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.3.643>
- Maingon, R. D. C., Ward, R. D., Hamilton, J. G. C., Bauzer, L. G. S. R., & Peixoto, A. A. (2008). The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends in Parasitology*, 24(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.10.003>

- Mans, B. J., & Neitz, A. W. H. (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.002>
- Marshall, S. A. (2012). *Flies. the natural history & diversity of Diptera* (595.77 M3.). <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=sibe01.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=028339>
- Mathern, D. R., & Heeger, P. S. (2015). Molecules Great and Small: The Complement System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(9), 1636–1650. <https://doi.org/10.2215/CJN.06230614>
- Mendes-Sousa, A. F., Vale, V. F., Queiroz, D. C., Pereira-Filho, A. A., da Silva, N. C. S., Koerich, L. B., Moreira, L. A., Pereira, M. H., Sant’Anna, M. R., Araújo, R. N., Andersen, J., Valenzuela, J. G., & Gontijo, N. F. (2018). Inhibition of the complement system by saliva of *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 92, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.11.004>
- Modi, G. B., & Tesh, R. B. (1983). A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 20(5), 568–569. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.568>
- Mokhtar, A. S., Braima, K. A. O., Peng Chin, H., Jeffery, J., Mohd Zain, S. N., Rohela, M., Lau, Y. L., Jamaiah, I., Wilson, J. J., & Abdul-Aziz, N. M. (2016). Intestinal Myiasis in a Malaysian Patient Caused by Larvae of *Clogmia albipunctatus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 53(4), 957–960. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw014>
- Moran, G. R. (2005). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.015>
- Mourya, D. T., Ilkal, M. A., Mishra, A. C., Jacob, P. G., Pant, U., Ramanujam, S., Mavale, M. S., Bhat, H. R., & Dhanda, V. (1989). Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected in Karnataka state, India from 1985 to

1987. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4), 550–552. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90288-5)
- Muller, H. M., Catteruccia, F., Vizioli, J., Dellatorre, A., & Crisanti, A. (1995). Constitutive and Blood Meal-Induced Trypsin Genes in *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology*, 81(3), 371–385. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1128>
- Müller, H. M., Crampton, J. M., della Torre, A., Sinden, R., & Crisanti, A. (1993). Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *The EMBO Journal*, 12(7), 2891–2900. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05951.x>
- Mury, F. B., da Silva, J. R., Ferreira, L. S., dos Santos Ferreira, B., de Souza-Filho, G. A., de Souza-Neto, J. A., Ribolla, P. E. M., Silva, C. P., do Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Berbert-Molina, M. A., & Dansa-Petretski, M. (2009). Alpha-glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug: An evolutionary history. *PLoS ONE*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006966>
- Natal, D. (2002). Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico, São Paulo*, 64(2), 205–207.
- Nepomuceno, D. B., Paim, R. M. M., Araújo, R. N., Pereira, M. H., Pessoa, G. C. D. Á., Koerich, L. B., Sant’Anna, M. R. V., & Gontijo, N. F. (2020). The role of LuloPAT amino acid/proton symporters in midgut alkalization in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera – Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*, 120, 103973. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103973>
- Nepomuceno, D. B., Santos, C., Nascimento, R., & Hora, M. (2017). *pH control in the midgut of Aedes aegypti under different nutritional conditions*. 3355–3362. <https://doi.org/10.1242/jeb.158956>
- O’Meara, G. F. (1985). Gonotrophic Interactions in Mosquitoes: Kicking the Blood-Feeding Habit. *The Florida Entomologist*, 68(1), 122. <https://doi.org/10.2307/3494335>
- Oliveira, L., Kawooya, J. K., Ribeiro, J. M. C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E. W., Walker, F. A., Machado, E. A., Nussenzveig, R. H., Padovan, G. J., & Masuda, H.

- (1995). J. Biol. Chem.-1995-Oliveira-10897-901.pdf. In *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, pp. 10897–10901).
- Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C. M. S., Masuda, H., & Oliveira, P. L. (1999). Haem detoxification by an insect [3]. *Nature*, *400*(6744), 517–518. <https://doi.org/10.1038/22910>
- Oliveira, Marcus F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Braga, C. M. S., Masuda, H., & Oliveira, P. L. (2000). Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Letters*, *477*(1–2), 95–98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01786-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01786-5)
- Paes, M. C., Oliveira, M. B., & Oliveira, P. L. (2001). Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *48*(2), 63–71. <https://doi.org/10.1002/arch.1058>
- Paes, M. C., & Oliveira, P. L. (1999). Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *41*(4), 171–177. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1999\)41:4<171::AID-ARCH1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1999)41:4<171::AID-ARCH1>3.0.CO;2-5)
- Paim, R. M. M., Araujo, R. N., Leis, M., Sant'anna, M. R. V., Gontijo, N. F., Lazzari, C. R., & Pereira, M. H. (2016). Functional evaluation of Heat Shock Proteins 70 (HSP70/HSC70) on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) physiological responses associated with feeding and starvation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *77*, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.011>
- Pape, T., Blagoderov, V., & Mostovski, M. B. (2011). Order Diptera Linnaeus, 1758. *Zootaxa*, *3148*, 222–229. <http://www.mapress.com/zootaxa/2011/f/zt03148p229.pdf>
- Patrick, M. L., Aimanova, K., Sanders, H. R., & Gill, S. S. (2006). *P-type Na⁺ / K⁺ -ATPase and V-type H⁺ -ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti**. 4638–4651. <https://doi.org/10.1242/jeb.02551>
- Pereira-Filho, A. A., Mateus Pereira, R. H., da Silva, N. C. S., Ferreira Malta, L. G., Serravite, A. M., Carvalho de Almeida, C. G., Fujiwara, R. T., Bartholomeu, D. C.,

- Giunchetti, R. C., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Araujo, R. N., Gontijo, N. de F., & Viana Sant'Anna, M. R. (2020). The gut anti-complement activity of *Aedes aegypti*: Investigating new ways to control the major human arboviruses vector in the Americas. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *120*, 103338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103338>
- Pereira, T. N., Carvalho, F. D., De Mendonça, S. F., Rocha, M. N., & Moreira, L. A. (2020). Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(4), e0007518. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>
- Quate, L. W. (1959). Classification of the Psychodini (Psychodidae: Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, *52*(4), 444–451. <https://doi.org/10.1093/aesa/52.4.444>
- Rada, B., & Leto, T. L. (2008). Egesten A, Schmidt A, Herwald H (eds): Trends in Innate Immunity Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. *Contrib Microbiol. Basel, Karger*, *15*, 164–187.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1994). *Families of serine peptidases* (pp. 19–61). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44004-2)
- Reisen, W. K. (2012). The Contrasting Bionomics of *Culex* Mosquitoes in Western North America. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *28*(4s), 82–91. <https://doi.org/10.2987/8756-971X-28.4.82>
- Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, *4*(3), 143–152. <http://europepmc.org/abstract/MED/8548192>
- Ribeiro, José M.C., & Arcà, B. (2009). From Sialomes to the Sialoverse. An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects. In *Advances in Insect Physiology* (1st ed., Vol. 37, Issue 09). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(09\)37002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(09)37002-2)
- Ribeiro, José M.C. (1987). *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology*, *64*(3), 347–353. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90046-4)

- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, *11*(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Rupprecht, T., Moter, A., Wiessener, A., Reutershan, J., Lang-Schwarz, K., Vieth, M., Rupprecht, C., Wagner, R., & Bollinger, T. (2020). Spread of multidrug-resistant bacteria by moth flies from hospital waste water system. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(8), 1893–1898. <https://doi.org/10.3201/eid2608.190750>
- Saab, N. A. A., Nascimento, A. A. S., Queiroz, D. C., da Cunha, I. G. M., Filho, A. A. P., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R. V., Araújo, R. N., & Gontijo, N. F. (2020). How *Lutzomyia longipalpis* deals with the complement system present in the ingested blood: The role of soluble inhibitors and the adsorption of factor H by midgut. *Journal of Insect Physiology*, *120*, 103992. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103992>
- Sabadin, G. A., Xavier, M. A., & Da Silva Vaz, I. (2019). Control of redox homeostasis in tick blood feeding. *Acta Scientiae Veterinariae*, *47*(1), 1–11. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.94819>
- Santiago, P. B., De Araújo, C. N., Motta, F. N., Praça, Y. R., Charneau, S., Bastos, I. M. D., & Santana, J. M. (2017). Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2005-z>
- Santos, V. C., Araujo, R. N., Machado, L. A. D., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2008). The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): PH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *Journal of Experimental Biology*, *211*(17), 2792–2798. <https://doi.org/10.1242/jeb.019836>
- Santos, Vânia C., Nunes, C. A., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2011). Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: Roles for ingested molecules and hormones. *Journal of Experimental Biology*, *214*(9), 1411–1418. <https://doi.org/10.1242/jeb.051490>
- Shambaugh, G. (1954). *Protease Stimulation by Foods in Adult Aedes aegypti Linn.*

54(3), 151–160.

Sherlock, Í. R. de A. et al. (2003). Importância médico-veterinária. A importância dos flebotomíneos. In *Importância médico-veterinária*. Editora Fiocruz.

Silva Fernandes, T. L., Pereira-Filho, A. A., Nepomuneno, D. B., de Freitas Milagres, T., Ferreira Malta, L. G., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Araujo, R. N., Gontijo, N. de F., & Viana Sant'Anna, M. R. (2020). Galactosamine reduces sandfly gut protease activity through TOR downregulation and increases *Lutzomyia* susceptibility to *Leishmania*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 122, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103393>

Silva, J. S., Scopel, I., & Ariano, Z. de F. (2008). A dengue no brasil e as políticas de combate ao aedes aegypti: da tentativa de erradicação às políticas de controle-the dengue fever in brazil and combat dengue fever to the *Aedes aegypti*: Of the try eradication to control policies. *Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e Da Saúde*, 4(6). <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/16906>

Soares, R. P. P., & Turco, S. J. (2003). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 75(3), 301–330. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000300005>

Sober E. (1983). Parsimony in Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 14, 335–357.

Souza, A. V. G., Petretski, J. H., Demasi, M., Bechara, E. J. H., & Oliveira, P. L. (1997). Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1–2), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00293-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00293-6)

Spielman, A. (1971). Bionomics of Autogenous Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 16(1), 231–248. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.16.010171.001311>

Spinsanti, L., Basquiera, A. L., Bulacio, S., Somale, V., Kim, S. C. H., Ré, V., Rabbat, D., Zárate, A., Zlocowski, J. C., Mayor, C. Q., Contigiani, M., & Palacio, S. (2003). St. Louis Encephalitis in Argentina: the First Case Reported in the Last Seventeen Years. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2), 271b – 273. <https://doi.org/10.3201/eid0902.020301>

- Sterkel, M., & Oliveira, P. L. (2017). Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2607>
- Sterkel, M., Perdomo, H. D., Guizzo, M. G., Barletta, A. B. F., Nunes, R. D., Dias, F. A., Sorgine, M. H. F., & Oliveira, P. L. (2016). Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. *Current Biology*, 26(16), 2188–2193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.025>
- Tappel, A. (1995). Antioxidant's protection against peroxidation. *Inform*, v. 6, 780–783.
- Telleria, E. L., Pitaluga, A. N., Ortigão-Farias, J. R., De Araújo, A. P. O., Ramalho-Ortigão, J. M., & Traub-Cseko, Y. M. (2007). Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66(2), 53–63. <https://doi.org/10.1002/arch.20198>
- Terra, W.R., & Ferreira, C. (2005). Biochemistry of Digestion. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 171–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00053-3>
- Terra, Walter R., & Ferreira, C. (2012). Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X>
- Terra, Walter R, & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1), 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)
- Triplehorn, C., & Jhonson, N. (2005). *Borrór and DeLong's Introduction to the Study of Insects*.
- Vale, V. F., Moreira, B. H., Moraes, C. S., Pereira, M. H., Genta, F. A., & Gontijo, N. F. (2012). Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis*' larvae (Diptera - Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*, 58(10), 1314–1324. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.005>
- Vigoder, F. M., Araki, A. S., Bauzer, L. G. S. R., Souza, N. A., Brazil, R. P., & Peixoto,

- A. A. (2010). Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(6), 734–739.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.05.004>
- Wang, Y., Luo, W., & Reiser, G. (2008). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(2), 237–252. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7288-3>
- Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N. B., Kim, J. W., Lambkin, C., Bertone, M. A., Cassel, B. K., Bayless, K. M., Heimberg, A. M., Wheeler, B. M., Peterson, K. J., Pape, T., Sinclair, B. J., Skevington, J. H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S. N., Schmidt-Ott, U., ... Yeates, D. K. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5690–5695.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82–83(C), 969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)
- Wolfson, J. L., & Murdock, L. L. (1990). Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*, 16(4), 1089–1102.
<https://doi.org/10.1007/BF01021013>
- Wu, D. D., Wang, G. D., Irwin, D. M., & Zhang, Y. P. (2009). A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, 26(10), 2333–2341.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp139>
- Yang, Y. J., & Davies, D. M. (1968). Digestion, emphasizing trypsin activity, in adult simuliids (Diptera) fed blood, blood-sucrose mixtures, and sucrose. *Journal of Insect Physiology*, 14(2), 205–222. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90032-2)
- Yeates, D. K., & Wiegmann, B. M. (1999). CONGRUENCE AND CONTROVERSY: Toward a Higher-Level Phylogeny of Diptera. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 397–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.397>

Yeates, David K., Wiegmann, B. M., Courtney, G. W., Meier, R., Lambkin, C., & Pape, T. (2007). Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa*, 590(1668), 565–590.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>

Young, D. G., & Duncan, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). In *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 89, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90687-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90687-8)

9. ANEXOS

9.1 Manuscrito em Preparação

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) midgut physiology: pH control and functional relationship with nematoceran hematophagous species

Luccas Gabriel Ferreira Malta¹, Leonardo Barbosa Koerich¹, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa¹, Ricardo N. Araujo¹, Mauricio Roberto Viana Sant'Anna¹, Marcos H. Pereira¹, Nelder Figueiredo Gontijo^{1*}.

¹Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: nelder@icb.ufmg.br

Highlights

- *C. albipunctata* share midgut pH control mechanisms with hematophagous nematocerans
- It presents an acidic midgut, undergoing alkalization when feeding on proteins
- Alkalinizing hormones from *L. longipalpis* function in female *C. albipunctata*
- Exaptation events may be involved in adaptation to hematophagy in nematoceran

Abstract

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) is a non-hematophagous insect belonging to the order Diptera, suborder Nematocera and family Psychodidae. In the present work, we investigated how *C. albipunctata* control their midgut pH under different physiological conditions, comparing their midgut physiology with other hematophagous species. The *C. albipunctata* midgut pH was measured after ingestion of sugar, protein and under the effect of the alkalizing hormone released in the hemolymph of the hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis* obtained just after a blood meal. The midgut pH of unfed or sugar-fed *C. albipunctata* is 5.5-6, and its midgut underwent alkalization after protein ingestion or under treatment with alkalizing hormones from *L. longipalpis*. These results suggested that in nematocerans, mechanisms for pH control in different nutritional conditions seem present between hematophagous and non-hematophagous species. This kind of pH control is convenient for a successful blood digestion. The independent evolution of many hematophagous groups between the lower

Diptera suggests that characteristics involved in midgut pH control were already present and represent a readiness for adaptation to this feeding mode.

Keywords: *Clogmia albipunctata*, Hematophagy, Intestinal physiology, Exaptation, Midgut pH

1- Introduction

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) is a dipteran belonging to the suborder Nematocera (lower Diptera), family Psychodidae, and is commonly known as moth fly, drain fly, sewer fly, or bathroom fly. Although some publications still refer to this species as *Telmatoctopus albipunctatus*, *C. albipunctata* is considered the valid name by most taxonomists. *C. albipunctata* is a synanthropic and cosmopolitan insect which has a holometabolic life cycle. Its larvae of semi-aquatic habit feed on decaying sludge (Marshall, 2012; Jiménez-Guri et al., 2014). There are no descriptions of how adults feed in natural environments. It is likely that in natural conditions they feed on nectar or other sugar-rich compounds. On the other hand, adults may live by drinking only water and using their nutritional reserves that they have accumulated during their larval phase.

Although it is not a hematophagous insect, adult *C. albipunctata* may act as potential mechanical vectors of pathogens (Faulde and Spiesberger, 2013) and their larvae also have the potential to cause pseudo myiasis (El-Badry et al., 2014; Mokhtar et al., 2016; El-Dib et al., 2017). The suborder Nematocera is a paraphyletic group and this taxonomic category has fallen into disuse, with some authors referring to this group as Lower Diptera (Sinclair, 1992; Oosterbroek and Courtney, 1995; Blagoderov et al., 2007; Yeates et al., 2007; ; Wiegmann et al., 2011). In this group of numerous insects, we find several female hematophagous species, such as mosquitoes (Culicidae), sandflies (Psychodidae), black midges (Simuliidae), biting midges (Ceratopogonidae), and frog-biting midges (Corethrellidae) (6188 species in 71 genera -Ribeiro and Arcà, 2009). In these groups, hematophagy appeared independently in each of these families (Wiegmann et al., 2011) and it is associated with the development of oocytes inside the female ovary (Adams, 1999). The independent appearance of hematophagy suggests an adaptation readiness for this feeding mode among the Lower Diptera.

As a result of the Lower Diptera phylogenetic proximity, insects within this group probably share several physiological mechanisms, including those involved in midgut physiology. For years, our research group has been studying how some hematophagous

Diptera such as the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae) (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2008, 2011, 2014; Nepomuceno et al., 2020) and the mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae, Culicinae) (Nepomuceno et al., 2017), control their midgut pH. In these studies, we observed the following pattern between the two hematophagous species studied to date: the pH of the unfed female midgut is actively maintained at pH 6 even when the insect is challenged by the ingestion of buffered solutions with alkaline pH. This pH 6 maintenance is associated with the functioning of V-ATPases, which are present in the apical region of the enterocytes. Its function is to pump H⁺ ions from the enterocytes' cytoplasm to the intestinal lumen whenever necessary to bring back the pH to pH 6 (Santos et al., 2011, 2008; Nepomuceno et al., 2017).

When females ingest blood or even purified proteins, their abdominal midgut undertakes a drastic change in which the pH 6 maintenance mechanism is turned off, and the midgut undergoes alkalization by a set of physiological mechanisms. The first mechanism involves the CO₂ release from the ingested blood, a process similar to a respiratory alkalosis (Santos et al., 2008). The second involves amino acid transporters (PAT carriers) that perform amino acid/H⁺ symport. In the alkalization promoted by PAT carriers, the entry of amino acids into the enterocytes from blood digestion removes H⁺ ions from the gut lumen (Nepomuceno et al., 2020). The third mechanism involves pumping bicarbonate ions into the lumen and the pH 6 maintenance mechanism shut down (Santos et al., 2008). This third mechanism is stimulated by one or more alkalizing hormones released by endocrine cells of the gut (Santos et al., 2011, 2008; Nepomuceno et al., 2017). It is possible that hormones from other endocrine organs also influence this process. Curiously, alkalizing hormones from the sand fly *L. longipalpis* stimulate the midgut alkalization of female *A. aegypti* in *ex vivo* preparations (Nepomuceno et al., 2017). This highlights the physiological similarity between species belonging to different Lower Diptera families. To date, no study has been carried out involving males of these two species. Males are not hematophagous, and consequently are not vectors of vertebrate pathogens.

To obtain more evidence of the high similarity of gut physiology among Lower Dipterans, we investigated how the midgut pH control of adult *C. albipunctata* occurs under different physiological conditions. Our results indicate that *C. albipunctata* is very similar to the hematophagous insects *L. longipalpis* and *A. aegypti* regarding intestinal pH control. Alkalizing hormones released in the hemolymph of *L. longipalpis* after a blood meal promote alkalization of the female *C. albipunctata* midgut, but not males.

Based on this and previously obtained results, we hypothesize that the midgut pH control mechanisms among Lower Diptera are evolutionary conserved, at least within Culicomorpha and Psychodomorpha infraorders.

2- Material and Methods

2.1- Insects

C. albipunctata (Williston, 1893) used in the experiments were originated from a laboratory colony obtained from insects captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The colony is kept at 25°C, inside plastic pots containing sand and water. The sand is arranged at the bottom of the recipients, with an inclination, so the water covers half of its surface. The larvae are fed with mouse food every three days. As soon as the adults emerge they are transferred to cloth cages used for sand fly breeding (Modi and Tesh, 1983). The experiments were done with 3-to-6-day old insects.

The sand fly *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) were obtained from a laboratory colony originated from Teresina, Piauí, Brazil, and maintained according to standard procedures (Modi and Tesh, 1983). Three-to-four-day old females were used in the experiments for hemolymph collection. The sand fly maintenance protocol was approved by the ethics committee on animal experimentation (CETEA / UFMG) under protocol number 001/2017.

2.2- Midgut pH measurement

Midgut pH measurement followed the protocol established by Gontijo et al. 1998. Briefly, adult insects (males and females) were fasted for 24 hours and fed on 30% sucrose solution through soaked cotton wool containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue (**Sigma-Aldrich code 18470**) (pKa = 7.4) or bromocresol purple (**Sigma-Aldrich code 860891**) (pKa = 6.3). The unbuffered solutions of bromothymol blue and bromocresol purple had their pH adjusted to pH 7.5 and pH 6.5, respectively. The next day, the insects were dissected in 0.9% saline using a stereomicroscope and the insect midgut color was compared with standards containing the dyes in buffered solutions (**Figure 1**). To show that sucrose does not influence the pH control in the midgut, a control group received only water containing either 0.1% of bromothymol blue or bromocresol purple.



Figure 1 - Standard colors of Bromothymol Blue and Bromocresol Purple at different pH. (A) Buffered standard solutions from pH 6 to pH 8 containing 0.1% Bromothymol Blue. (B) Buffered standard solutions from pH 5 to pH 7 containing 0.1% Bromocresol Purple. (C) Buffered standard solutions from pH 6 to pH 8 containing 0.1% Bromothymol Blue and serum.

In some experiments, the ingested sucrose solutions were buffered with 30 mM HEPES (**Sigma-Aldrich code 183264**) at pH 7.5. These buffered solutions were used to check whether the guts of *C. albipunctata* were able to overcome the buffering capability of these solutions and restore the normal gut pH (pH 6).

To study the effect of proteins and amino acids in the *C. albipunctata* gut pH, we offered to the insects inactivated human serum (heated at 56°C for 30 minutes) containing 0.1% bromothymol blue (serum pH adjusted to pH 6). pH measurements were estimated by comparing the color obtained in dissected midguts with standard buffered solutions containing serum (Santos et al., 2011) (**Figure 1C**).

2.3- Effect of *L. longipalpis* hemolymph on male and female *C. albipunctata* midgut pH

In our experiments, the hemolymph of female *L. longipalpis* were used as a source of alkalizing hormones. To this end, 3 female *L. longipalpis* were washed with PBS containing a drop of detergent to remove the bristles. The insects were immediately washed in saline without detergent and were transferred to a microscope slide containing a drop of PBS (1 μ L), where their thorax was disrupted under a dissecting microscope

with care to avoid gut rupture. The hemolymph was carefully collected with a pipette and was then applied to a dissected midgut of male or female *C. albipunctata* which was previously fed with 30% sucrose containing 0.1% bromothymol blue. Only guts that initially had normal pH (pH 6) were used in the experiments. Midgut desiccation was avoided by placing the guts on 0.5% agarose blocks prepared with insect saline (119.7 mmol L⁻¹ NaCl, 2.68 mmol L⁻¹ KCl, 1.36 mmol L⁻¹ CaCl₂, and 0.56 mmol L⁻¹ glucose) (Santos et al., 2011). The midgut pH was measured one minute after hemolymph addition, comparing the color observed in the midgut with standard pH solutions containing the indicator dye. As a control, hemolymph collected from unfed females was used.

2.4- Statistical analysis

The Fisher's exact test was performed to analyze changes in proportion after treatment with *L. longipalpis* hemolymph (**Figure 5**), using the software GraphPad PRISM 7. The results were considered significant when $p \leq 0.05$.

3- Results

3.1- The pH of male and female *C. albipunctata* midgut is acidic (pH 5.5-6.0)

In line with previous work investigating the midgut pH of *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Santos et al., 2008; Nepomuceno et al., 2017), the midgut of female *C. albipunctata* is acidic, with pH between 5.5 and 6 (**Figure 2A and 2B**). Male midguts presented the same pH pattern observed for females (**Figure 2C and 2D**). In flies that ingested water without sucrose, the pH measurements generated similar results, indicating that carbohydrates do not influence *C. albipunctata* midgut pH (data not shown).

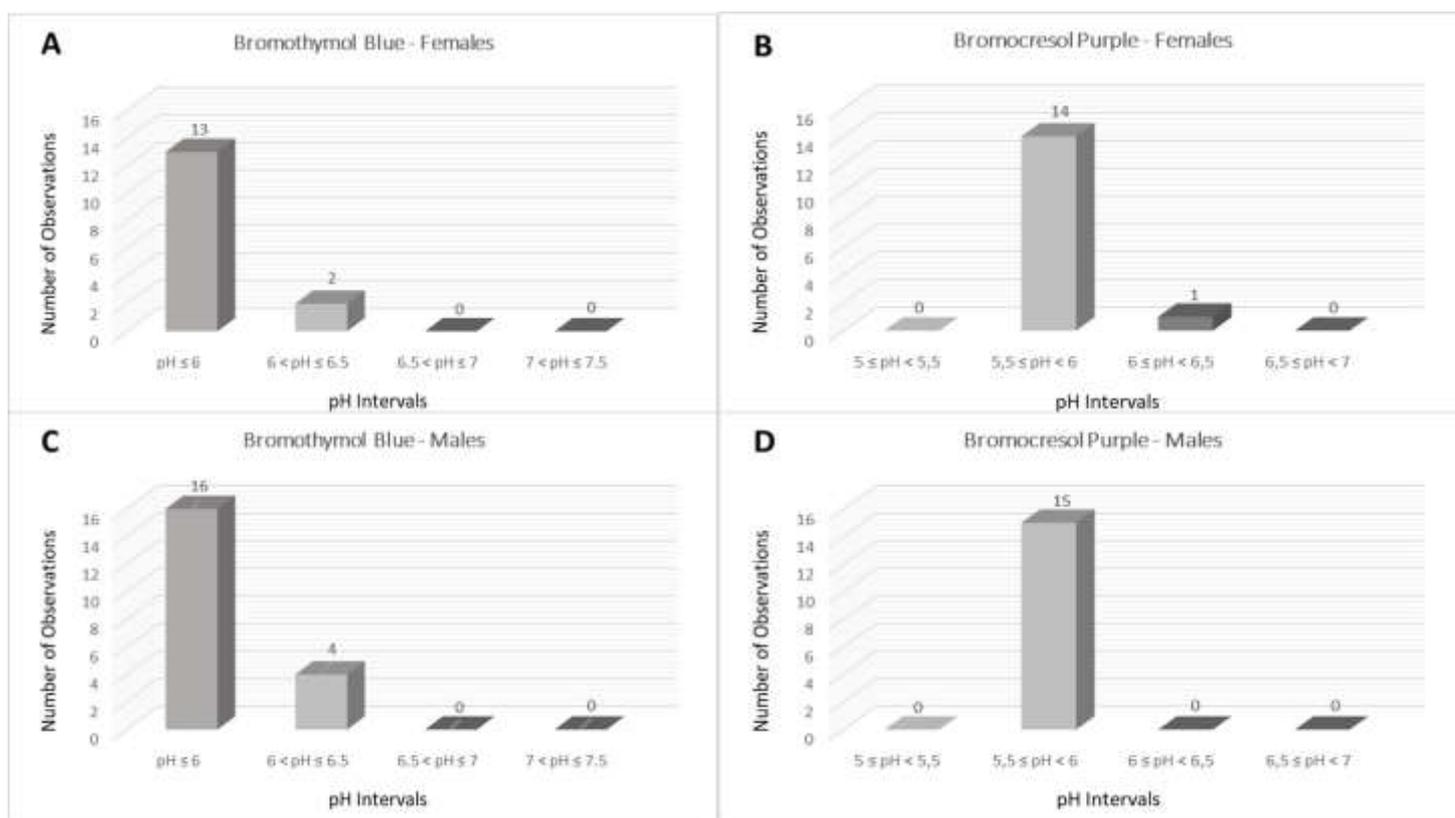


Figure 2 – Male and female *C. albipunctata* midgut pH. (A and B) Midgut pH of female *C. albipunctata* fed with 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue or bromocresol purple. (C and D) Midgut pH of male *C. albipunctata* fed with 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue or bromocresol purple.

3.2- *C. albipunctata* midgut pH is actively maintained at pH 5.5-6

The acidic pH found in the midguts of male and female *C. albipunctata* is actively maintained within the range of pH 5.5-6, similarly to what was observed for other hematophagous species (Santos et al., 2011; Nepomuceno et al., 2017). This physiological mechanism was evident when insects were challenged with 30 mM HEPES pH 7.5 mixed with a 30% sucrose solution containing the indicator dye bromothymol blue. The mechanism responsible for pH 5.5-6 maintenance was able to re-acidify the buffered solution, restoring the normal pH in both, males and females. Since the crop pH is not physiologically controlled, the ingested HEPES solution remained with pH 7.5 (data not shown).

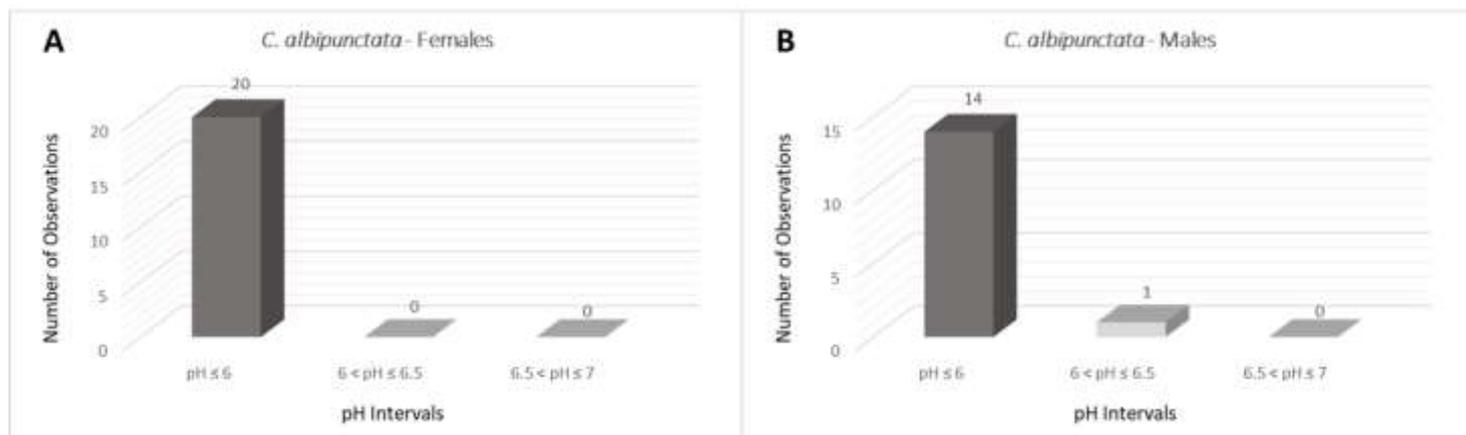


Figure 3 -The pH in the midgut of sugar-fed *C. albipunctata* is actively maintained at pH 5.5-6. (A) Midgut pH of female *C. albipunctata* fed with 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue buffered with 30 mM HEPES pH 7.5. (B) Midgut pH of male *C. albipunctata* fed with 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue buffered with 30 mM HEPES pH 7.5.

3.2- The gut alkalization mechanism is activated when female *C. albipunctata* ingest inactivated human serum

Male and female *C. albipunctata* were able to alkalize their midguts after ingestion of a protein-rich diet containing amino acids and proteins such as inactivated human serum, similarly to what was observed with female *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Santos et al, 2011; Nepomuceno et al. 2017). This human serum had its pH previously adjusted to pH 6, so any alkalization observed in this experiment is attributed to a physiological alkalization mechanism. According to the result presented in **Figure 4**, this alkalization process was more efficient in females than in males.

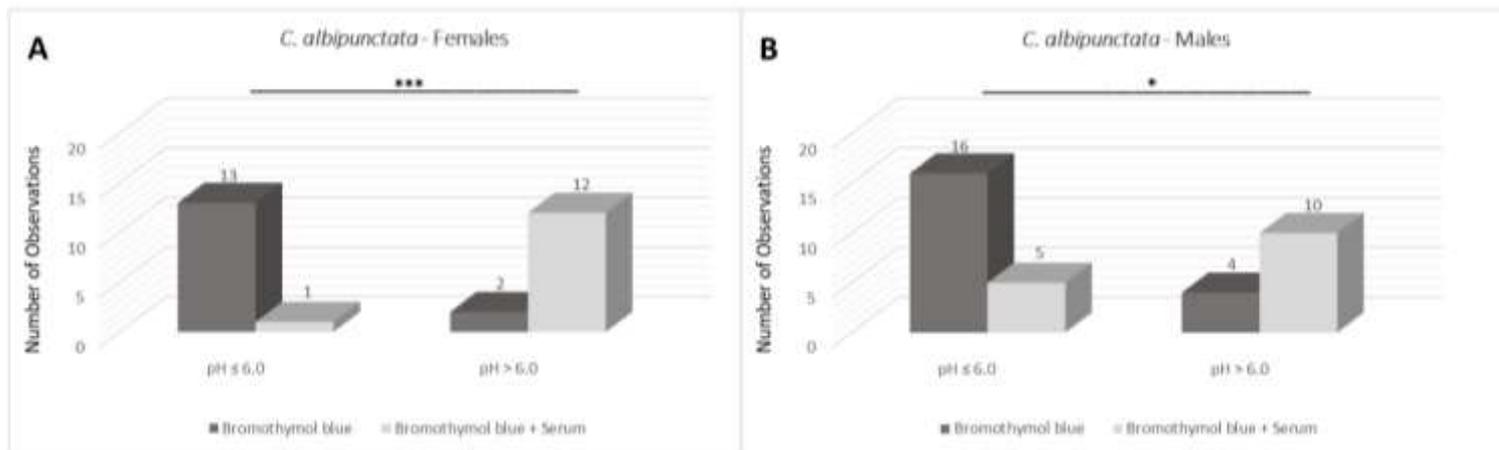


Figure 4 - Midgut alkalinization of male and female *C. albipunctata* after ingestion of inactivated human serum. (A) pH measured in female midguts after ingestion of 30% sucrose solution containing 0.1% bromothymol blue or after ingestion of inactivated human serum containing 0.1% bromothymol blue with pH previously adjusted to pH 6. (B) The same solutions were offered to males and pH was measured as above. The Fisher's exact test was performed to compare proportions observed between each treatment (***) $p < 0.001$; * $p < 0.013$).

3.3- *C. albipunctata* male and female midguts undergo alkalization when exposed to the hemolymph of blood fed female *L. longipalpis*

In a previous study, dissected guts of female *L. longipalpis* and *A. aegypti* containing the indicator dye bromothymol blue and exposed to the hemolymph of blood fed female *L. longipalpis* presented gut alkalization (Santos et al. 2011; Nepomuceno et al., 2017). To investigate whether *C. albipunctata* has a similar pH control influenced by the hemolymph of blood fed *L. longipalpis*, male and female guts of *C. albipunctata* were also exposed to *L. longipalpis* hemolymph. The results presented in **Figure 5** showed that only female midguts responded to the *L. longipalpis* hemolymph, becoming more alkaline. As expected, hemolymph from unfed *L. longipalpis* females was inefficient to modulate *C. albipunctata* luminal pH (**Figure 5**).

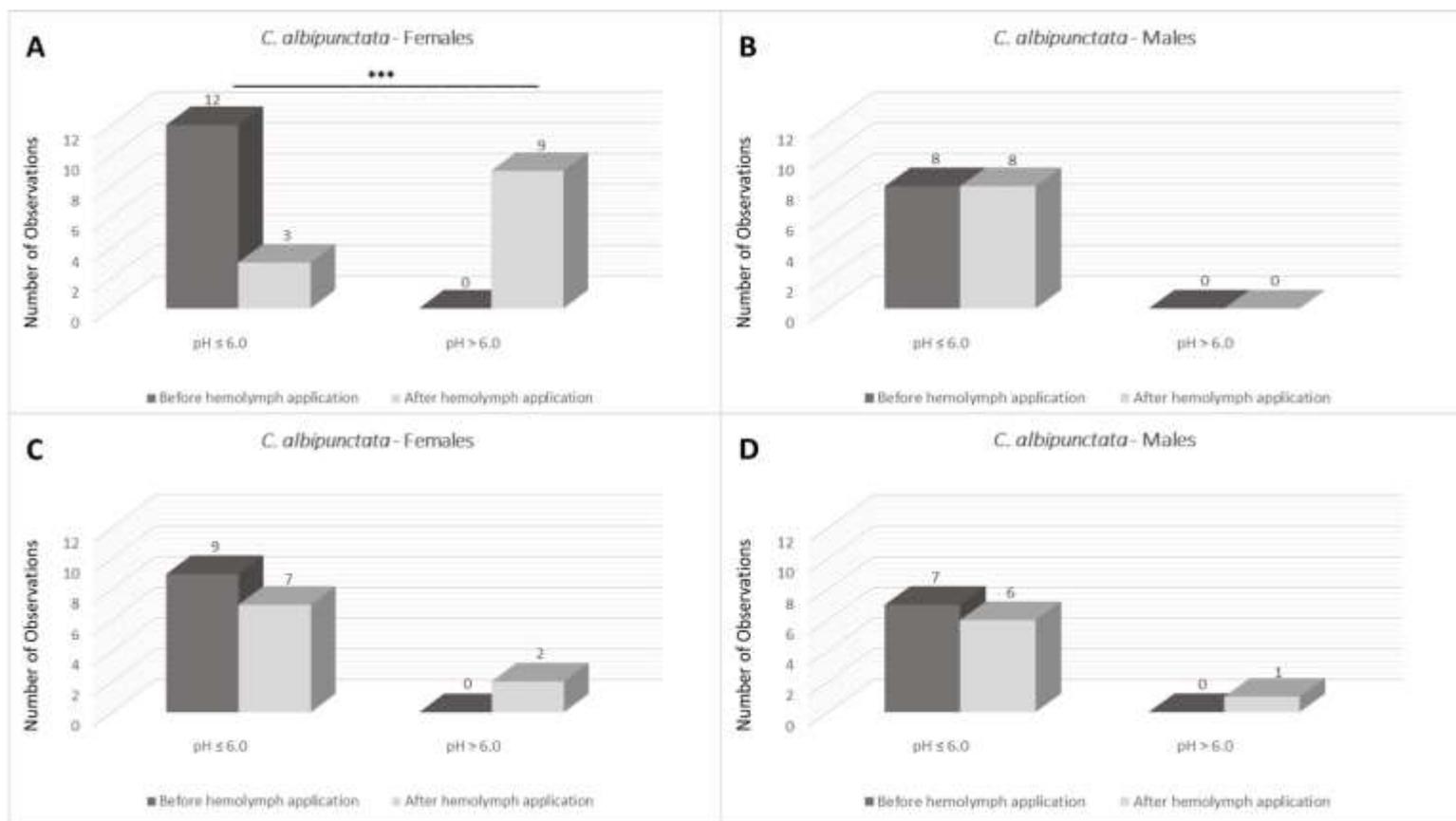


Figure 5 – The effect of blood fed female *L. longipalpis* hemolymph in the midgut pH of male and female *C. albipunctata*. (A) The effect of blood fed *L. longipalpis* hemolymph on acidic midguts of female *C. albipunctata* ($p = 0.0003$). (B) The effect of blood fed *L. longipalpis* hemolymph on acidic midguts of male *C. albipunctata* ($p = 1$). (C) The effect of unfed *L. longipalpis* hemolymph on acidic midguts of female *C. albipunctata* ($p = 0.4706$). (D) The effect of unfed *L. longipalpis* hemolymph on acidic midguts of male *C. albipunctata* ($P = 1$). Black bars represent pH values before hemolymph application on the midguts; white bars represent pH values after hemolymph application on midguts. Hemolymph was directly applied to midgut preparations dissected from females that had ingested sucrose solution containing Bromothymol Blue. The pH was inferred based on the color presented in the midgut lumen in comparison to standards. The number of observations in each pH interval (N) was compared with the appropriate control using Fisher's exact test.

4- Discussion

The “Lower Diptera” group encompasses different infraorders, including the infraorders Culicomorpha and Psychodomorpha, corresponding to many families (Oosterbroek and Courtney, 1995; Yeates et al., 2007; Wiegmann et al., 2011). The hematophagous insects included within these two important infraorders are mosquitoes, sandflies, black midges, biting midges, and frog-biting midges, belonging to the families Culicidae, Psychodidae, Simuliidae, Ceratopogonidae and Corethrellidae, respectively. In hematophagous species within these families, only females ingest blood that is used for the development of their ovaries. According to most recent phylogenetic studies (Hedges et al., 2015), the insects from the Culicomorpha infraorder and Psychodidae family have separated approximately 250 million years ago during the Triassic period (the timeline was calculated at www.timetree.org/) (Kumar et al., 2017). Despite such a long divergence period, our results showed that the gut physiology regarding pH control is very similar between species of these group of insects. To date, only two hematophagous species (*L. longipalpis* and *A. aegypti*) had been investigated for these mechanisms of gut pH control. Interestingly, we showed that the non-hematophagous species *C. albipunctata* also share these mechanisms with other hematophagous Diptera. Our results indicate that the genes involved in these processes are very conserved, and other dipterans have a similar gut pH control.

The pH is a characteristic of great importance for many biological functions (Applebaum, 1985; Wolfson and Murdock, 1990; Terra and Ferreira, 1994). Consequently, it is finely controlled in different organs and cellular compartments to guarantee homeostasis (Demaurex, 2002). During digestion, the pH in the lumen of the insect digestive tract has a central role, as digestive enzymes have maximum activity in a well-defined pH range (Applebaum, 1985; Terra and Ferreira, 1994; Harrison, 2001).

In the present study, we observed that the midguts of male and female *C. albipunctata*, are acidic, with pH around 5.5-6. To date, only the gut pH of female *L. longipalpis* and *A. aegypti* had been investigated (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2008; Nepomuceno et al., 2017). In these blood-sucking females, the acidic pH is related to the ingestion of plant sap, flower nectar, and secretions from aphids, all sugar-rich diets (Gontijo et al., 1998). One of the main classes of enzymes involved in carbohydrate digestion in those insects are alpha-glucosidases, which have their maximum activity in acidic pH (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2011). In *C. albipunctata*, both sexes have the same pH value when fed on sucrose or when insects were offered just water. That is

not surprising, as *C. albipunctata* males and females share the same ecological niche and therefore ingest the same type of food. Males of hematophagous species probably have the same gut pH pattern, but this remains to be investigated.

In lower Diptera, the midgut alkalinization after protein ingestion is relevant because proteolytic enzymes responsible for protein digestion (trypsin and chymotrypsin), work at an alkaline pH (Terra and Ferreira, 1994). Curiously, non-hematophagous female *C. albipunctata* undergo gut alkalinization after feeding on proteins and amino acids. This alkalinization occurred when they ingested inactivated serum at pH 6 (**Figure 4A**). In this case, only females were able to successfully promote gut alkalinization. This response from female *C. albipunctata* suggests that they may process protein-rich food, which may aid in the oocyte maturation in their ovaries. That would complement the nutritional reserves stored by the larvae during their development. Although males do not need to develop ovaries, they underwent a slight gut alkalinization upon serum feed (**Figure 4B**). We did not investigate the pattern of protease production in *C. albipunctata* when they ingest protein-rich food, except that they produce trypsin (not published data), as in other hematophagous species mentioned herein. In female *L. longipalpis* and *A. aegypti*, blood ingestion triggers an intense protease production, mainly trypsins (Müller et al., 1993; Terra and Ferreira, 1994; Muller et al., 1995; Telleria et al., 2007).

Due to the physiological importance of pH in the midgut, it is actively and finely controlled in blood-sucking insects. In these insects, the action of proton pumps (V-ATPases) exists to reacidify the midgut if its pH rises above pH 6 in insects that have not ingested blood (Patrick et al., 2006; Santos et al., 2011; Nepomuceno et al., 2017). Our results indicate that this fine and active control is also present in males and females of *C. albipunctata*, which were able to reacidify a buffered alkaline solution as soon as it was ingested (**Figure 3A and 3B**). This result indicates that *C. albipunctata* is physiologically prepared to feed on sucrose or any other carbohydrate that is digested by alpha-glucosidases or other carbohydrases that work at pH 6. In fact, *C. albipunctata* midgut presents an alpha-glucosidase (data not published) that works at the same physiological conditions as those observed for alpha-glucosidases in the midgut of *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Gontijo et al., 1998; Ferreira et al., 2010).

As mentioned above, the mechanisms of pH control in the gut of lower Diptera seem to be very similar. Thus, we decided to test whether the alkalinizing hormones produced by *L. longipalpis* would reproduce similar physiological effects in male and

female *C. albipunctata*. In a previous study, we showed that the *L. longipalpis* alkalizing hormones were effective to induce alkalization in the gut of female *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017). As it was hypothesized here, the alkalizing hormones released in the *L. longipalpis* hemolymph soon after hematophagy were able to cause alkalization of female *C. albipunctata*, but not in males (**Figure 5A and 5B**).

It is possible that *L. longipalpis* alkalizing hormones were able to bind to receptors present in the basolateral region of *C. albipunctata* enterocytes, activating a mechanism involved in the transport of specific ions across enterocyte luminal membrane. As in *L. longipalpis*, this mechanism probably includes the transport of bicarbonate ions into the midgut lumen. Other ions may also be involved in this process. Physiologically, the midgut of male *C. albipunctata* is different from that of females because the same treatment was ineffective to produce any gut alkalization effect. Possibly males do not have receptors for alkalizing hormones.

Probably the poor midgut alkalization observed when males ingested serum (**Figure 4B**) could be attributed to the functioning of amino acid/H⁺ symport into the enterocytes by PAT carriers as it occurs in the midgut of female *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2020). In females, in addition to PAT carriers, hormonal signaling also participates in midgut alkalization. It is significant to highlight that in male and female *C. albipunctata*, the ingestion of serum was effective to turn off the pH 6 maintenance mechanism, which is crucial for midgut alkalization. In females, alkalizing hormones can turn off the pH 6 maintenance mechanism. In males, this mechanism does not work (**Figure 5**). Therefore, the shutdown of the pH 6 maintenance, as observed in males after ingestion of serum followed by midgut alkalization, may be attributed only to amino acids uptake by the enterocytes. Likely, the hormones action and the uptake of amino acids work together to promote the shutdown of the pH 6 maintenance mechanism in females.

These results suggested that in nematocerans, mechanisms for pH control in different nutritional conditions seem present between hematophagous and non-hematophagous species. This kind of pH control is convenient for successful blood digestion. The independent evolution of many hematophagous groups between the lower Diptera suggests that characteristics involved in midgut pH control were already present in the group and represent a readiness for adaptation to this feeding mode.

Evolutionary adaptations may be observed from two viewpoints: the first involves characters shaped by natural selection for its current function; the second describes

characteristics that add adaptive value to a given physiological function, not necessarily linked with the evolutionary pressures responsible for its selection. The second perspective is known as exaptation (Gould and Vrba, 1982). The proposition that exaptation events may be involved in adaptations related to the hematophagy development arises from the fact that in the Lower Diptera hematophagy appeared in multiple and independent events (Adams, 1999; Wiegmann et al., 2011). By the parsimony perspective, the evolutive course always follows the pathway that needs fewer steps for a character to be established (Sober E, 1983). Therefore, when the evolutionary pressure acts on a characteristic already present in an organism, it is expected that the "evolutionary effort" will be smaller than that used to select a new character. Based on this, it is possible that many mechanisms present in hematophagous insects which control gut pH after a blood meal are also present in non-hematophagous Lower Diptera.

Acknowledgments

The authors would like to thank César Nonato de Oliveira for technical assistance.

Declaration of competing Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

LGFM and NFG designed the research. LGFM performed the experiments. LGFM, MRVS, and NFG analyzed the data. MRVS, NFG, RNA, MHP, GCDP, and LBK secured funding for research and reviewed the manuscript. LGFM, MRVS, and NFG wrote the paper.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, INCT- Entomologia Molecular - CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

References

Adams, T.S., 1999. Hematophagy and Hormone Release. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 1–13. <https://doi.org/10.1093/aesa/92.1.1>

- Applebaum, W.S., 1985. Biochemistry of digestion. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*.
- Blagoderov, V., Grimaldi, D.A., Fraser, N.C., 2007. How Time Flies for Flies: Diverse Diptera from the Triassic of Virginia and Early Radiation of the Order. *Am. Museum Novit.* 3572, 1–39. [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2007\)509\[1:htfffd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2007)509[1:htfffd]2.0.co;2)
- Demaurex, N., 2002. pH homeostasis of cellular organelles. *News Physiol. Sci.* 17, 1–5. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1>
- El-Badry, A.A., Salem, H.K. hair., El-Aziz Edmardash, Y.A. b., 2014. Human urinary myiasis due to larvae of *Clogmia (Telmatoscopus) albipunctata* Williston (Diptera: Psychodidae) first report in Egypt. *J. Vector Borne Dis.* 51, 247–249.
- El-Dib, N.A., El Wahab, W.M.A., Hamdy, D.A., Ali, M.I., 2017. Case report of human urinary myiasis caused by *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodidae) with morphological description of larva and pupa. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 11, 533–538.
- Faulde, M., Spiesberger, M., 2013. Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J. Hosp. Infect.* 83, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.09.019>
- Ferreira, L.M., Romão, T.P., Pompílio de-Melo-Neto, O., Silva-Filha, M.H.N.L., 2010. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.007>
- Gontijo, N.F., Almeida-Silva, S., Costa, F.F., Mares-Guia, M.L., Williams, P., Melo, M.N., 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. *Exp. Parasitol.* 90, 212–219. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4336>
- Gould, S.J., Vrba, E.S., 1982. Exaptation—a Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology* 1, 4–15. <https://doi.org/10.1017/S0094837300004310>
- Harrison, J.F., 2001. *Insect Acid-Base Physiology*.
- Hedges, S.B., Marin, J., Suleski, M., Paymer, M., Kumar, S., 2015. Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Mol. Biol. Evol.* 32, 835–845. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv037>
- Jiménez-Guri, E., Wotton, K.R., Gavilán, B., Jaeger, J., 2014. A staging scheme for the development of the moth midge *Clogmia albipunctata*. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084422>
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Hedges, S.B., 2017. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol. Biol. Evol.* 34, 1812–1819. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx116>
- Marshall, S.A., 2012. *Flies. the natural history & diversity of Diptera*, 595.77 M3. ed.

- Modi, G.B., Tesh, R.B., 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20, 568–569. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.568>
- Mokhtar, A.S., Braima, K.A.O., Peng Chin, H., Jeffery, J., Mohd Zain, S.N., Rohela, M., Lau, Y.L., Jamaiah, I., Wilson, J.J., Abdul-Aziz, N.M., 2016. Intestinal Myiasis in a Malaysian Patient Caused by Larvae of *Clogmia albipunctatus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 53, 957–960. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw014>
- Muller, H.M., Catteruccia, F., Vizioli, J., Dellatorre, A., Crisanti, A., 1995. Constitutive and Blood Meal-Induced Trypsin Genes in *Anopheles gambiae*. *Exp. Parasitol.* 81, 371–385. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1128>
- Müller, H.M., Crampton, J.M., della Torre, A., Sinden, R., Crisanti, A., 1993. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *EMBO J.* 12, 2891–2900. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05951.x>
- Nepomuceno, D.B., Paim, R.M.M., Araújo, R.N., Pereira, M.H., Pessoa, G.C.D.Á., Koerich, L.B., Sant’Anna, M.R.V., Gontijo, N.F., 2020. The role of LuloPAT amino acid/proton symporters in midgut alkalization in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera – Psychodidae). *J. Insect Physiol.* 120, 103973. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103973>
- Nepomuceno, D.B., Santos, C., Nascimento, R., Hora, M., 2017. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions 3355–3362. <https://doi.org/10.1242/jeb.158956>
- Oosterbroek, P., Courtney, G., 1995. Phylogeny of the nematoceros families of Diptera (Insecta). *Zool. J. Linn. Soc.* 115, 267–311. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1995.tb02462.x>
- Patrick, M.L., Aimanova, K., Sanders, H.R., Gill, S.S., 2006. P-type Na⁺/K⁺-ATPase and V-type H⁺-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti* 4638–4651. <https://doi.org/10.1242/jeb.02551>
- Ribeiro, J.M.C., Arcà, B., 2009. From Sialomes to the Sialoverse. An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects., 1st ed, *Advances in Insect Physiology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(09\)37002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(09)37002-2)
- Santos, V.C., Araujo, R.N., Machado, L.A.D., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* 211, 2792–2798. <https://doi.org/10.1242/jeb.019836>
- Santos, V.C., Nunes, C.A., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: Roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* 214, 1411–1418. <https://doi.org/10.1242/jeb.051490>
- Santos, V.C., Vale, V.F., Silva, S.M., Nascimento, A.A.S., Saab, N.A.A., Soares, R.P.P., Michalick, M.S.M., Araujo, R.N., Pereira, M.H., Fujiwara, R.T., Gontijo,

- N.F., 2014. Host modulation by a parasite: How *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favor its development. PLoS One 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111241>
- Sinclair, B.J., 1992. A phylogenetic interpretation of the Brachycera (Diptera) based on the larval mandible and associated mouthpart structures. Syst. Entomol. 17, 233–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1992.tb00335.x>
- Sober E, 1983. Parsimony in Systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 14, 335–357.
- Telleria, E.L., Pitaluga, A.N., Ortigão-Farias, J.R., De Araújo, A.P.O., Ramalho-Ortigão, J.M., Traub-Cseko, Y.M., 2007. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 66, 53–63. <https://doi.org/10.1002/arch.20198>
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 109, 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 5690–5695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>
- Wolfson, J.L., Murdock, L.L., 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. J. Chem. Ecol. 16, 1089–1102. <https://doi.org/10.1007/BF01021013>
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., Courtney, G.W., Meier, R., Lambkin, C., Pape, T., 2007. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. Zootaxa 590, 565–590. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>